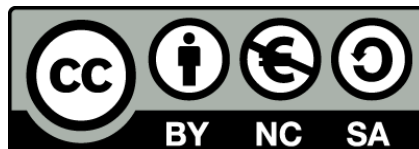




UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## **Funció de SDC2 i ERK5 en la regulació de l'expressió en la superfície cel·lular del complex TCR/CD3 i LFA-1**

Xavier Rovira Clavé



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – Compartirlqual 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – Compartirlqual 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0. Spain License.**

**Funció de SDC2 i ERK5 en la regulació  
de l'expressió en la superfície cel·lular  
del complex TCR/CD3 i LFA-1**

**Xavier Rovira Clavé  
Barcelona, Març 2016**





UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

**Universitat de Barcelona**  
**Facultat de Biologia**

**Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia**

Memòria presentada per **Xavier Rovira Clavé**, llicenciat en Biologia, per optar al grau de Doctor per la Universitat de Barcelona, per el programa de Doctorat en Biomedicina del departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia (2011-2016).

La present tesi doctoral: “Funció de SDC2 i ERK5 en la regulació de l’expressió en la superfície cel·lular del complex TCR/CD3 i LFA-1” ha estat realitzada en el grup CELLTEC-UB del Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia sota la direcció del Dr. Manuel Reina del Pozo i del Dr. Enric Espel Masferrer.

Vist-i-plau dels directors,

L’interessat,

Dr. Manuel Reina

Dr. Enric Espel

Xavier Rovira Clavé

**Barcelona**  
**Març, 2016**



*Als meus pares, Josep Maria i Mercè*



# AGRAÏMENTS

*I aquí, escrivint les últimes paraules de la tesi i reflexionant sobre tot el que t'ensenya el fet de fer un doctorat, trobo realment interessant que l'última lliçó que et dona sigui agrair. Ho intentaré fer el millor possible.*

*En primer lloc vull expressar la meva estima, admiració i agraïment al meu director de tesi, Dr. Enric Espel, per tot el que m'ha ensenyat al llarg d'aquests anys. La seva paciència, la seva motivació i el seu bast coneixement han sigut claus en el meu desenvolupament com a investigador. Gràcies pel suport permanent durant el meu doctorat. També vull agrair al meu director de tesi, Dr. Manuel Reina, que m'hagi donat l'oportunitat i la confiança per dur a terme la meva tesi doctoral en una època tant difícil. Gràcies.*

*Als companys de laboratori, Janat Fazal, Dr. Alex Martorell, Dra. Claudia Müller, Nuria Nieto, Marc Segarra, Dr. Víctor Velecela i Sònia Vicens, els hi vull agrair tota l'ajuda i les bones idees que m'han donat al llarg d'aquests anys. I, òbviamment, brindo per tota la diversió que ens ha acompanyat i ens acompanyarà. També vull donar gràcies als investigadors més experimentats del laboratori per tots els consells i suggeriments donats: Dr. Ricardo Casaroli, Dra. Conxita Castellarnau, Dra. Ofelia Martínez i Dr. Francesc Soriano.*

*Gràcies al meu supervisor Dr. Gregory Emery a l'IRIC, Mont-real, per haver-me donat l'oportunitat de treballar en un projecte tant estimulante, a més, també vull agrair als companys a l'IRIC, Dra. Gloria Assaker, Dr. Bastien Gerby, Sarah Keil, Dr. Carl Laflamme i, en especial, al Dr. Cédric Plutoni i al Carlos Zeledon, per totes les discussions al llarg d'aquest últim any.*

*Gràcies al Dr. Jaume Comas i al seu equip per resoldre tots els dubtes que m'han anat sorgint en els múltiples experiments en els quals he necessitat de la citometria de flux. Gràcies a la Dra. Eva Martínez, al Dr. Oriol Noguer i, especialment, a la Dra. Trini Teixé per la seva ajuda durant els primers dos anys en el laboratori.*

*També m'agradaria agrair als meus amics el seu suport al llarg d'aquests anys, en especial al David Rizo per les discussions científiques gairebé diàries, i al German Moreno, al Jordi Hernández i a la Carolina Migliorelli, per haver impactat en la meua manera de veure la ciència. I, òbviamment, brindo per tota la diversió que ens ha acompanyat i ens acompanyarà.*

*A la meua família, especialment als meus pares, Josep Maria Rovira i Mercè Clavé, a la meua germana Anna, al Gerard Ramon, a la Margarita Ibáñez i al Josep Maria Fulquet, gràcies per escoltar-me i aconsellar-me. I, òbviamment, brindo per tota la diversió que ens ha acompanyat i ens acompanyarà.*

*Finalment, a tu, Maria, gràcies. El teu esforç i les teves idees han fet que aquesta tesi sigui també teua. T'admiro. T'admiro i t'estimo. I, òbviamment, brindo per tota la diversió que ens ha acompanyat i ens acompanyarà.*

*Bé, ara sí. C'est fini.*

*Gràcies a tots, per tot i de tot cor. Una abraçada!*

Xavier Rovira Clavé  
Vilanova i la Geltrú  
15 de Març del 2016





ÍNDEX

---



<b>ABREVIATURES</b> .....	<b>15</b>
<b>INTRODUCCIÓ</b> .....	<b>19</b>
1. ELS LIMFÒCITS T .....	21
1.1. <i>Presentació d'antigen i activació dels limfòcit T</i> .....	21
1.1.1. Presentació d'antigen i formació de la sinapsis immunitària .....	22
1.1.2. Activació dels limfòcits T .....	25
Complex de senyalització proximal i transducció de senyal .....	25
Activació de Ras .....	27
Activació de les MAPKs .....	27
Activació d'ERK5 .....	28
1.1.3. Regulació de l'expressió del TCR en la superfície cel·lular .....	31
1.2. <i>Desenvolupament i diferenciació dels limfòcits T</i> .....	32
1.2.1. Desenvolupament dels limfòcits T .....	32
1.2.2. Diferenciació dels limfòcits T CD4 <sup>+</sup> .....	33
1.3. <i>Migració dels limfòcits T</i> .....	34
1.3.1. Migració dels limfòcits T naïve o <i>homing</i> .....	35
1.3.2. Migració dels limfòcits T efectors activats al teixit inflammat .....	36
La integrina LFA-1 .....	38
1.3.3. Migració dels limfòcits T memòria centrals i efectors .....	39
2. SINDECÀ-2 .....	41
2.1. <i>Els sindecans</i> .....	41
2.1.1 Estructura proteica dels sindecans .....	42
2.2. <i>Rol dels sindecans durant l'adhesió cel·lular</i> .....	45
2.3. <i>Rol dels sindecans durant la inflamació</i> .....	46
2.4. <i>Sindecà-2</i> .....	49
<b>HIPÒTESI I OBJECTIUS</b> .....	<b>51</b>
<b>MATERIAL I MÈTODES</b> .....	<b>55</b>
1. MATERIAL I REACTIUS .....	57
1.1 <i>Taules de material i reactius usats regularment</i> .....	57
1.2 <i>Consideracions generals</i> .....	64
2. LÍNIES CEL·LULARS, CULTIUS PRIMARIS I RATOLINS .....	64
2.1 <i>Cèl·lules en suspensió</i> .....	64
2.2 <i>Cèl·lules en adhesió</i> .....	66
2.3 <i>Ratolins</i> .....	68
3. AÏLLAMENTS CEL·LULARS .....	69
3.1 <i>Aïllament de limfòcits T CD4<sup>+</sup> humans</i> .....	69
3.2 <i>Generació de clons de limfòcits T CD4<sup>+</sup> Th17 humans</i> .....	70
3.3 <i>Aïllament de cèl·lules de la melsa i del tim dels ratolins</i> .....	71
4. TÈCNiques CEL·LULARS, MOLECULARS, BIOQUÍMIQUES I HISTOLÒGIQUES .....	72
4.1 <i>Citometria de flux i separació cel·lular (FACS)</i> .....	72
4.1.1 Marcatge extracel·lular per citometria de flux .....	72
4.1.2 Anàlisi d'apoptosis mitjançant la unió d'Annexina V .....	73
4.1.3 Marcatge intracel·lular per citometria de flux .....	73
4.1.4 Separació cel·lular per citometria o <i>Fluorescence-activated cell sorting (FACS)</i> .....	74
4.2 <i>Extracció de RNA i RT-PCR</i> .....	74
4.3 <i>Western Blot</i> .....	76
4.4 <i>Co-immunoprecipitació per el anàlisi de l'estat d'ubiquitinació de TCR<math>\zeta</math></i> .....	78
4.5 <i>Transfecció per electroporació i generació de línies estables</i> .....	79
4.6 <i>Microscopia de fluorescència i confocal</i> .....	80
4.6.1 Marcatge extracel·lular per microscopia .....	80

4.6.2 Marcatge intracel·lular per microscopia .....	80
4.7 <i>Inclusió de teixits en parafina</i> .....	81
4.8 <i>TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling)</i> .....	82
5. ASSAJOS FUNCIONALS .....	82
5.1 <i>Assaig d'adhesió en estàtic</i> .....	82
5.2 <i>Assaig d'extensió cel·lular o spreading</i> .....	83
5.3 <i>Assaig de migració transendotelial</i> .....	84
5.4 <i>Assaig de conjugació</i> .....	85
5.5 <i>Assaig d'activació de limfòcits T i downregulació del TCR</i> .....	86
5.6 <i>Assaig d'internalització i reciclatge del TCR</i> .....	87
6. GENERACIÓ DE LA PROTEÏNA RECOMBINANT SDC2-IGG2A .....	88
6.1 <i>Cloning de SDC2-IgG2a a pSecTag</i> .....	88
6.2 <i>Transfecció estable de CHO-K1 amb SDC2-IgG2a_pSecTag</i> .....	88
6.3 <i>Selecció de línies productores de SDC2-IgG2a</i> .....	89
6.3.1 ELISA .....	89
6.3.1 Marcatge extracel·lular per citometria de flux.....	90
6.4 <i>Producció de SDC2-IgG2a</i> .....	90
6.5 <i>Purificació de SDC2-IgG2a</i> .....	91
6.5.1 Purificació per cromatografia d'afinitat .....	91
6.5.2 Purificació per precipitació per (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	92
6.5.3 Confirmació de la purificació de SDC2-IgG2a.....	92
7. ANÀLISI ESTADÍSTIC.....	93
<b>RESULTATS .....</b>	<b>95</b>
1. FUNCIÓ DE SDC2 EN ELS LIMFÒCITS T CD4 <sup>+</sup> .....	97
1.1. <i>Descripció del model a estudiar</i> .....	97
1.1.1. Transfecció estable de SDC2 en Jurkat.....	97
1.1.2. Consideracions generals.....	97
1.2. <i>Rol de SDC2 en l'adhesió dels limfòcits T CD4<sup>+</sup></i> .....	99
1.2.1. La lligació de SDC2 incrementa la polarització cel·lular .....	99
1.2.2. SDC2 redueix l'adhesió a les cèl·lules endotelials .....	99
1.2.3. SDC2 redueix l'adhesió als limfòcits B.....	99
1.2.4. SDC2 no afecta la transmigració de les Jurkat.....	100
1.2.5. SDC2 disminueix el nivell en membrana de LFA-1 .....	101
1.2.6. Rol del domini EFYA de SDC2 en l'adhesió .....	103
1.2.7. SDC2 inhibeix la formació de l'estat d'elevada afinitat de LFA-1 per PMA i Mg <sup>2+</sup> , però no del clustering, a través del domini EFYA.....	104
1.2.8 L'expressió de Talin1-head no rescata l'afinitat de LFA-1 en les Jurkat-SDC2 .....	106
1.2.9 L'expressió de RhoA, Rac1 i Cdc42 no reverteix el bloqueig de l'afinitat de LFA-1 en les Jurkat-SDC2 .....	107
1.2.10 Rol de les tirosines i serines citoplasmàtiques de SDC2 en l'adhesió cel·lular .....	108
1.3. <i>SDC2 podria promoure la downregulació del complex TCR/CD3</i> .....	111
1.3.1. SDC2 disminueix el nivell en membrana del complex TCR/CD3 .....	111
1.3.2. Les Jurkat-SDC2 no responen a l'estimulació amb anti-CD3ε.....	112
1.3.3. La internalització i el reciclatge del TCR/CD3 en les Jurkat-SDC2 no es troba alterat .....	113
1.3.4. La disminució del nivell en membrana del TCR/CD3 per SDC2 és independent de l'activitat d'Arf6 .....	114
1.3.5. Les Jurkat-SDC2 mostren alteracions en el nivell en membrana de receptors que ciclejaven per la via d'endocitosis depenent de clatrina .....	114
1.3.6. El domini EFYA de SDC2 no és necessari per disminuir el nivell en membrana del TCR/CD3 .....	115
1.3.7. Els limfòcits T CD4 <sup>+</sup> humans primaris lligats amb anti-SDC2 mostren una disminució en el nivell del TCR/CD3 en membrana.....	116
1.3.8. Presència de proteïna A en l'anti-SDC2 (clon 186.C): un artefacte experimental .....	117
1.3.9. Les Th17 no expressen SDC2 en la superfície cel·lular .....	119

1.3.10. Recerca del lligand de SDC2 .....	120
<b>2. FUNCIO D'ERK5 EN LA REGULACIO DE L'EXPRESSION EN LA SUPERFICIE CEL·LULAR DEL COMPLEX TCR/CD3.....</b>	<b>123</b>
<b>2.1 Rol d'ERK5 en la regulació dels nivells en membrana del complex TCR/CD3.....</b>	<b>123</b>
2.1.1 El <i>knock-down</i> d'ERK5 en Jurkat mostra un augment en el nivell de TCR/CD3 a la superfície cel·lular .....	123
2.1.2 El <i>knock-down</i> d'ERK5 en Jurkat mostra un augment en el nivell total de TCR $\zeta$ i una reducció en la capacitat de recuperar un nivell òptim de TCR/CD3 a la superfície després de l'estimulació amb anti-CD3 $\epsilon$ .....	125
2.1.3 La inhibició farmacològica d'ERK5 frena la downregulació del complex TCR/CD3 i redueix la recuperació en membrana en limfòcits T CD4 <sup>+</sup> estimulats.....	127
2.1.4 ERK5 controla la degradació i la ubiquitinació de TCR $\zeta$ durant la downregulació del complex TCR/CD3 .....	129
2.1.5 Limfòcits T de la melsa del ratolí ERK5 <sup>-/-</sup> no mostren alteracions en la downregulació del complex TCR/CD3 .....	130
2.1.6 El ratolí ERK5 <sup>-/-</sup> mostra una reducció en la degradació de TCR $\zeta$ en els timòcits DP.....	131
2.1.7 El ratolí ERK5 <sup>-/-</sup> mostra un increment en el percentatge de timòcits CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> CD25 <sup>+</sup> i una reducció de T <sub>reg</sub> en la melsa .....	134
<b>DISCUSSIO .....</b>	<b>137</b>
1. FUNCIO DE SDC2 EN ELS LIMFOCITS T CD4 <sup>+</sup> .....	139
1.1 <i>Funció de SDC2 durant l'adhesió dels limfòcits T CD4<sup>+</sup></i> .....	139
1.2 <i>Funció de SDC2 durant l'activació dels limfòcits T CD4<sup>+</sup></i> .....	141
2. FUNCIO D'ERK5 EN ELS LIMFOCITS T CD4 <sup>+</sup> .....	144
2.1 <i>Funció d'ERK5 en la regulació del nivell en membrana del complex TCR/CD3</i> .....	144
3. FUNCIO DE SDC2 I ERK5 EN LA REGULACIO DE TCR $\zeta$ I LFA-1 .....	147
<b>CONCLUSIONS .....</b>	<b>149</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>153</b>
<b>ANNEX: ARTICLES PUBLICATS.....</b>	<b>165</b>



## ABREVIATURES

---





<b>a.a.</b>	Aminoàcids
<b>APC</b>	<i>Antigen Presenting Cell</i> o cèl·lula presentadora d'antigen
<b>CD</b>	<i>Cluster of Differentiation</i>
<b>CHX</b>	Cicloheximida
<b>CS</b>	Condriotin-Sulfat
<b>cSMAC</b>	<i>central Supramolecular Activation Complex</i>
<b>DAG</b>	Diacilglicerol
<b>DC</b>	<i>Dendritic Cell</i> o cèl·lula dendrítica
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfòxid
<b>DN</b>	<i>Double-Negative</i>
<b>DP</b>	<i>Double-Positive</i>
<b>dSMAC</b>	<i>distal Supramolecular Activation Complex</i>
<b>ECGS</b>	<i>Endothelial Cell Growth Supplement</i>
<b>ECM</b>	<i>Extracellular Matrix</i> o matriu extracel·lular
<b>ERK</b>	<i>Extracellular Regulated Kinase</i>
<b>FBS</b>	<i>Fetal Bovine Serum</i>
<b>Fc</b>	Fracció constant
<b>g</b>	Força-G
<b>G418</b>	Geneticina
<b>Gads</b>	<i>GRB2-related adapter downstream of Shc</i>
<b>GAG</b>	Glicosaminoglicans
<b>GEF</b>	<i>Guanine nucleotide Exchange Factor</i>
<b>GlcA</b>	Àcid glucurònic
<b>GlcNAc</b>	N-acetilglucosamina
<b>GPCR</b>	<i>G-Protein Coupled Receptor</i>
<b>GRB2</b>	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
<b>HEVs</b>	<i>High Endothelial Venules</i>
<b>HS</b>	Heparà-Sulfat
<b>HSPG</b>	Heparà-Sulfat Proteoglicà
<b>HUVEC</b>	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>
<b>IC<sub>50</sub></b>	<i>Half maximal Inhibitory Concentration</i>
<b>Ig</b>	Immunoglobulines
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IP<sub>3</sub></b>	<i>Inositol-3-Phosphate</i>
<b>ITAM</b>	<i>Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif</i>
<b>iT<sub>reg</sub></b>	Limfòcits T reguladors induïts a la perifèria
<b>KLF-2</b>	<i>Krüppel-Like Factor 2</i>
<b>LAT</b>	<i>Transmembrane adapter protein linker for the activation of T-cells</i>
<b>LFA-1</b>	<i>Lymphocyte Function-associated Antigen 1</i>
<b>L-Gln</b>	L-Glutamina
<b>MAPKs</b>	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
<b>MC</b>	Microclusters
<b>MEK</b>	<i>MAPK/ERK Kinase</i>
<b>MFI</b>	<i>Mean Fluorescence Intensity</i>
<b>MHC</b>	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
<b>o/n</b>	<i>overnight</i>
<b>PBL</b>	<i>Peripheral Blood Lymphocytes</i> o limfòcits de sang perifèrica

<b>PBMC</b>	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i> o cèl·lules mononucleades de sang perifèrica
<b>PGs</b>	Proteoglicans
<b>PHA</b>	<i>Phytohemagglutinin</i> o Fitohemagglutinina
<b>PI</b>	<i>Propidium Iodide</i>
<b>PI3K</b>	<i>Phosphoinositide 3-Kinase</i>
<b>PKC</b>	<i>Protein Kinase C</i>
<b>PLC</b>	Fosfolipasa C
<b>pLys</b>	Poli-D-Lisina
<b>PMA</b>	<i>Phorbol 12-Myristate 13-Acetate</i>
<b>pMHC</b>	Complex pèptid-MHC
<b>PNAd</b>	<i>Peripheral Node Addressin</i>
<b>P/S</b>	Penicil·lina i estreptomicina
<b>PSGL-1</b>	<i>P-Selectin Glycoprotein Ligand 1</i>
<b>pSMAC</b>	<i>peripheral Supramolecular Activation Complex</i>
<b>PtdIns[4,5]P<sub>2</sub></b>	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfat
<b>PTK</b>	<i>Phospho Tyrosine Kinase</i>
<b>RE</b>	Reticle Endoplasmàtic
<b>Rpm</b>	Revolucions per minut
<b>S1P</b>	<i>Sphingosine-1-Phosphate</i>
<b>S1PR1</b>	<i>Sphingosine-1-Phosphate Receptor 1</i>
<b>SD</b>	<i>Standard Deviation</i>
<b>SDC</b>	Sindecà
<b>SED</b>	<i>Sthapylococcal Enterotoxin D</i>
<b>SI</b>	Sinapsis Immunitària
<b>SN</b>	Sobrenedant
<b>SP</b>	<i>Single-Positive</i>
<b>SH</b>	<i>Src homology</i>
<b>SLP-76</b>	<i>SH2 domain-containing leucocyte phosphoprotein of 76 kDa</i>
<b>SMAC</b>	<i>Supramolecular Activation Complex</i>
<b>TCR</b>	<i>T Cell Receptor</i>
<b>TfR</b>	<i>Transferrin Receptor</i>
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	<i>Tumor Necrosis Factor <math>\alpha</math></i>
<b>tT<sub>reg</sub></b>	Limfòcits T reguladors originats al tim
<b>VDJ</b>	<i>Variable (V), Diversity (D) i Joining (J)</i>
<b>Wt</b>	<i>Wild-Type</i>

# INTRODUCCIÓ

---



# 1. Els limfòcits T

Els limfòcits T inicien i regulen la resposta immunitària adaptativa contra infeccions i càncers, i juguen un rol fonamental en al·lèrgies, malalties autoimmunes i rebuig de transplantaments. Aquestes funcions depenen del reconeixement de pèptids immunogènics per part del complex *T Cell Receptor (TCR)/Cluster of Differentiation 3 (CD3)* present en la superfície cel·lular dels limfòcits T, un reconeixement que en cas de ser productiu porta a l'activació del limfòcit T (secció 1.1 de la introducció) en concert amb senyals co-estimuladors <sup>1</sup>.

El desenvolupament dels limfòcits T (secció 1.2 de la introducció) es dona en el tim a partir dels *common lymphoid progenitors* provinents del moll de l'os, en un procés en que es produeix la recombinació del gens *TCRA* i *TCRB* i una posterior selecció que permet generar un repertori T que garanteix una restricció al propi *Major Histocompatibility Complex (MHC)* i una correcta tolerància immunitària <sup>2</sup>. Els limfòcits del llinatge  $\alpha:\beta$  ja preparats per sortir del tim són limfòcits T CD4<sup>+</sup> (col·laboradors) o limfòcits T CD8<sup>+</sup> (citotòxics), els quals reconeixen pèptids carregats en els MHC de tipus II o de tipus I, respectivament.

Un cop surten del tim, aquests limfòcits T naïve (ja que encara no han contactat amb un antigen immunogènic) migren cap als teixits limfoides secundaris on es pot produir un contacte amb un pèptid immunogènic que pot portar a l'activació <sup>3</sup>. Si es dona, s'inicia la proliferació i posterior migració del limfòcit T (secció 1.3 de la introducció) cap al teixit inflammat per tal de regular la resposta immunitària. Un cop solucionat, la majoria de limfòcits T moren, però la resta, els limfòcits T memòria, migren a diferents òrgans per a dur a terme una funció de vigilància bàsica per a la resposta immunitària adaptativa.

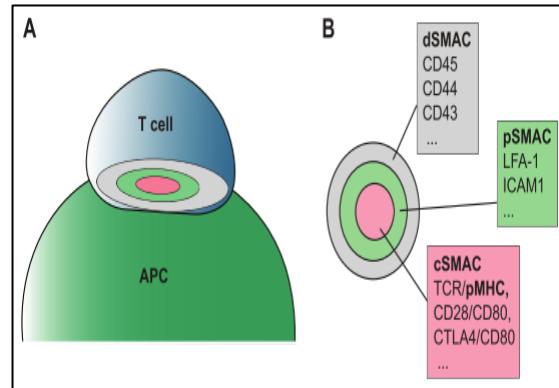
## 1.1. Presentació d'antigen i activació dels limfòcit T

L'activació i funció d'un limfòcit T requereix de la unió amb una *Antigen Presenting Cell (APC)* o cèl·lula presentadora d'antigen). Aquests contactes permeten la interacció entre el complex TCR/CD3 i el complex pèptid-MHC (pMHC) i presenten dues dinàmiques diferents *in vivo*: contactes transitoris o *immunological kinapses* i contactes prolongats o *immunological synapses* (SI o sinapsis immunitària) <sup>4</sup>. Les *immunological kinapses* permeten l'eficient detecció de pMHC propis, enviant senyals imprescindible per a la supervivència dels limfòcits T en la perifèria, i la cerca de pMHC derivats de patògens. Si el pèptid és agonista es pot produir un contacte més estable, la SI, que origina una robusta resposta immune generant limfòcits T efectors i, posteriorment, limfòcits T memòria. La formació de la SI és altament coordinada i integra l'adhesió cel·lular, el reconeixement del pMHC per part del complex TCR que origina el TCR *triggering* (o iniciació del senyal) i la posterior miriada de senyals activadors i inhibidors que acabaran determinant si el limfòcit és activat o no.

Els limfòcits T expressen un complex TCR/CD3 únic i clonal i presenten un mecanisme altament eficient per tal de trobar i discriminar antigens presentats per el MHC. Aquesta eficiència és molt important ja que els limfòcits T han de ser capaços de reconèixer uns pocs pèptids activadors ( $\approx 10$ ) entremig de milers de no activadors, els quals poden presentar una diferència d'un únic aminoàcid entre ells <sup>5</sup>. Així doncs, la detecció d'un pèptid agonista per part del complex TCR/CD3 condueix a la formació de la SI (secció 1.1.1 de la introducció) i posterior activació del limfòcit T (secció 1.1.2 de la introducció).

### 1.1.1. Presentació d'antigen i formació de la sinapsis immunitària

L'activació dels limfòcits T requereix de la presentació d'un antigen immunogènic per part de les APCs. Aquest procés implica la formació de la SI, una estructura en forma d'ull de bou altament organitzada, que es forma en la zona de contacte entre el limfòcit T i la APC i que el dota de la capacitat de discriminar antigens d'una manera altament eficient <sup>6</sup>. Es va definir per primera vegada a finals de la dècada del 90 en el laboratori del Dr. Kupfer <sup>7</sup>. Tradicionalment s'ha definit estructuralment per la presència de tres dominis de segregació de proteïnes (Figura II), començant pel TCR/CD3 que junt amb CD28 i *Protein Kinase C θ* (PKC $\theta$ ) es troben implicats en la transmissió de senyals i són transportats cap al centre de la estructura, formant el clúster d'activació supramolecular central (cSMAC). Molècules d'adhesió com *Lymphocyte Function-associated Antigen 1* (LFA-1), unida a Talin1, formen un anell al voltant del cSMAC, anomenat clúster d'activació supramolecular perifèric (pSMAC). Les molècules de gran tamany, com ara la fosfatasa CD45, es troben en el clúster d'activació supramolecular distal (dSMAC). Actualment, noves dades han ampliat la visió tradicional d'aquesta estructura <sup>8</sup>, tal i com es descriu més endavant.

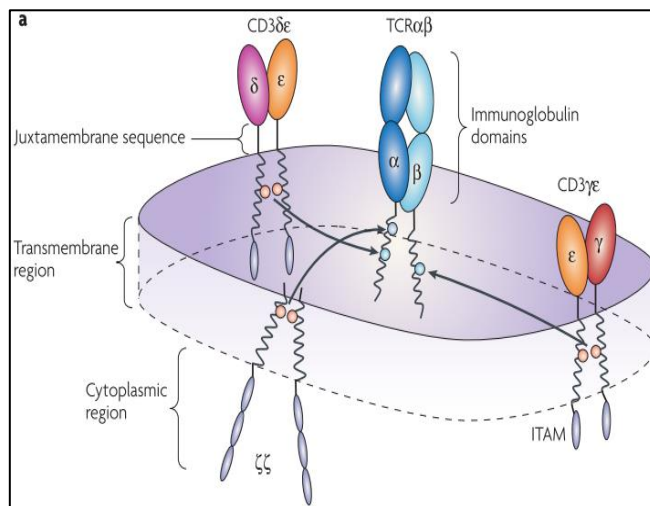


**Figura II.** Esquema de l'estructura bàsica de la SI <sup>9</sup>.

#### Els 5 grans grups de molècules transmembrana presents en la sinapsis immunitària

- Complex TCR/CD3

El TCR/CD3 és un complex multi proteic present en la superfície de tots els limfòcits T. La seva funció principal és contactar amb el MHC present en la superfície de les APCs i enviar senyals activadors al interior cel·lular en el cas de reconèixer el pèptid carregat en el MHC. L'estequiometria del TCR s'ha descrit clàssicament com a monovalent (Figura I2), composta per la unió de 4 dímers, tot i que resultats recents contradiuen aquesta idea <sup>10</sup>. L'heterodímer encarregat de contactar amb l'MHC i reconèixer l'antigen és el format per les cadenes TCR $\alpha$  i TCR $\beta$ , unides per ponts disulfur. La resta de cadenes del complex es troben implicades en la transducció de senyals, duta a terme a través dels motius *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif* (ITAM) presents en el domini intracel·lular d'aquestes molècules. Aquestes cadenes són els heterodímers CD3 $\epsilon$ /CD3 $\gamma$  i CD3 $\epsilon$ /CD3 $\delta$ , amb un ITAM a cadascuna de les cadenes, i l'homodímer TCR $\zeta$ /TCR $\zeta$ , amb tres ITAM a cadascuna de les cadenes.



**Figura I2.** Representació esquemàtica del complex TCR/CD3 <sup>11</sup>.

- Co-receptors CD8 i CD4

El complex TCR/CD3 és l'encarregat de reconèixer pèptids antigènics al contactar amb pMHC i iniciar la transmissió de senyals. Les molècules MHC poden ser de classe I o de classe II, unint pèptids citoplasmàtics generats pel proteasoma i presentat-los als limfòcits T citotòxics o bé unint antigens exògens obtinguts de l'exterior cel·lular per endocitosi i presentant-los als limfòcits T col·laboradors, respectivament.

- Molècules d'adhesió

Les molècules d'adhesió indispensables per a que es produeixi la sinapsis immunitària són els parells LFA-1(CD11a/CD18)-ICAM-1(CD54) i LFA-2(CD2)-LFA-3(CD58). LFA-1 és una integrina present en els limfòcits T (secció 1.3.2 de la introducció) i ICAM-1 és una molècula membre de la superfamília de les immunoglobulines (Ig) expressada en les APCs <sup>12</sup>. La interacció entre la conformació activa de LFA-1 i ICAM-1 presenta una unió més forta que la interacció formada entre el TCR/CD3 i el complex pMHC, implicant una segregació del primer parell de la zona d'interacció del segon. Apart d'ICAM-1, LFA-1 també pot interaccionar amb ICAM-2 i ICAM-3 <sup>13</sup>. LFA-2 s'expressa en els limfòcits T i LFA-3 en les APCs, sent totes dues de la superfamília de les Ig. La mida de la interacció és similar a la de TCR/CD3-pMHC, així doncs, LFA-2 actua com a molècula d'activació per mitjà de la unió en la cua citoplasmàtica de SAP, una proteïna que fa de pont amb la tirosina quinasa Fyn <sup>14</sup>.

- Molècules co-estimuladores

Les molècules co-estimuladores no tenen capacitat de senyalitzar o adherir per si soles, però actuen sinèrgicament amb d'altres receptors com el TCR/CD3 per tal de potenciar la senyalització. El co-estimulador més estudiat és CD28, un membre de la superfamília de les Ig que es troba formant homodímers i amb una regió citoplasmàtica que no té activitat enzimàtica, però sí que té un motiu que recluta i activa directament la tirosina quinasa Lck i, indirectament, *phosphoinositide 3-kinase* (PI3K) i PKC $\theta$  que activa NF- $\kappa$ B i promou la producció d'IL-2 <sup>15</sup>. Els lligands de CD28 en les APCs són B7-1 (CD80) i B7-2 (CD86) <sup>16</sup>, els quals són upregulats en les cèl·lules dendrítiques a través de l'estimulació amb citocines proinflamàtiques <sup>17</sup> o via TLRs <sup>18</sup>, constituint així una interacció crítica entre el sistema immunitari innat i l'adaptatiu.

Una altra molècula co-estimuladora és ICOS (CD278). És membre de la superfamília de les Ig, no s'expressa en els limfòcits T naïve però els nivells en superfície després de l'activació augmenten, s'uneix a L-ICOS (CD275) i està implicada en la senyalització a través de PI3K <sup>19</sup>. Apart de CD28 i ICOS, un ampli ventall de molècules co-estimuladores es troben implicades en la sinapsis immunitària. És el cas de CD27, OX40, GITR o 4-1BB de la superfamília de TNFR o bé molècules de la superfamília dels receptors tipus lectina units de forma no covalent a DAP10, com és el cas de NKG2D.

- Molècules co-inhidores

Les molècules co-inhidores actuen per mitjà de fosfatases com SHP-1 i SHP-2, atenuant els senyals iniciats per les tirosina quinases. Les dues molècules més ben definides són CTLA-4 (CD152) i PD-1 (CD279).

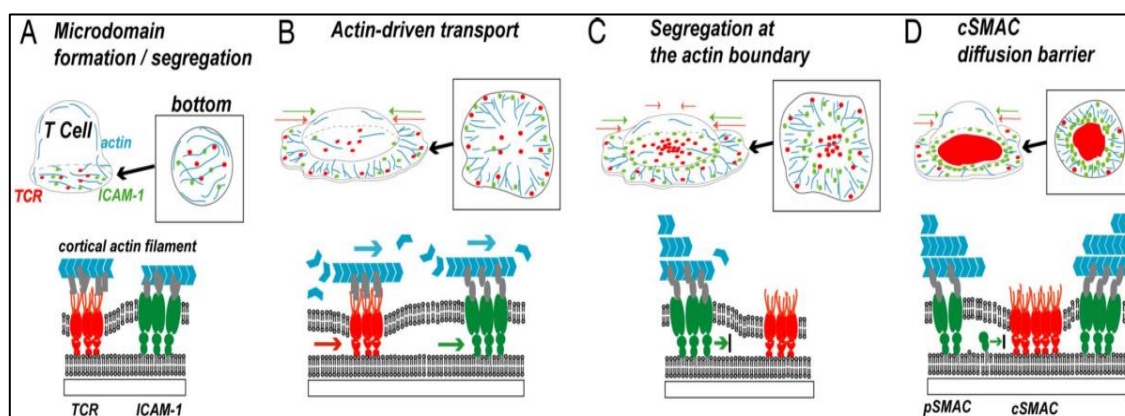


CTLA-4 s'upregula ràpidament després de l'activació del limfòcit T, competint amb CD28 per els lligands B7-1 i B7-2 <sup>20</sup> i, en conseqüència, regulant l'activitat del co-estimulador. La regulació de la internalització de CTLA-4 es dona per un motiu d'internalització present en la regió citoplasmàtica i que és constitutivament actiu excepte quan es troba fosforilat o CTLA-4 es troba unit al seu lligand <sup>21</sup>.

PD-1 té com a lligands en les APCs a PD-L1 (CD274) i PD-L2 (CD273) i es recluta a la sinapsi immunitària de manera dependent de l'abundància de pMHC i de la força de la senyalització <sup>22</sup>. PD-1 recluta la tirosina fosfatasa SHP-2 i disminueix la intensitat de la senyalització inicial a través del TCR/CD3 <sup>23</sup>.

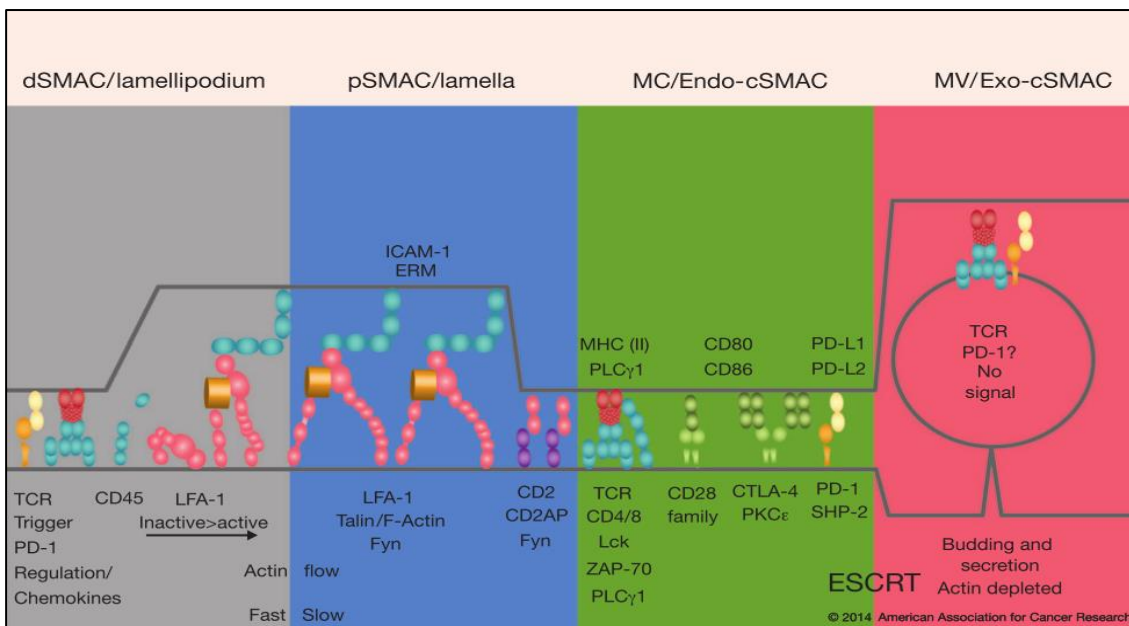
### Formació de la sinapsi immunitària

Les quimiocines del microambient tissular estimulen parcialment LFA-1, permetent una adhesió transitòria entre l'APC i el limfòcit T que incrementa la probabilitat de detecció d'antigen <sup>24</sup>. Si el TCR/CD3 detecta un pèptid agonista, s'inicia la senyalització per tal d'adquirir un estat d'elevada afinitat de LFA-1 i promoure una unió més duradora entre el limfòcit T i la APC que permeti la formació de la SI <sup>25</sup>. A més a més, després dels primers senyals d'activació, el sistema entra en un feedback positiu que inclou la formació de *microclusters* (MC) de TCR/CD3 (Figura I3) que recluten multitud de proteïnes importants per a la senyalització <sup>26</sup>. Abans de la interacció TCR-pMHC existeixen MC però en menor nombre i de menor mida, que són importants per la inicialització de la senyalització <sup>27</sup> i com a característica presenten l'exclusió de CD45, una proteïna transmembrana que presenta activitat fosfatasa intrínseca dirigida a Lck i que queda exclosa de la SI en el dSMAC. Els MC de TCR/CD3 es formen en el dSMAC i es mouen de manera centrípeta a través del pSMAC cap al cSMAC degut al moviment revers de l'actina (Figura I3), la qual es troba exclosa del cSMAC <sup>28</sup>. Això és possible degut a la menor mida del TCR/CD3, que pot travessar el pSMAC ja que LFA-1 també es troben organitzat en MCs, formats en el dSMAC <sup>29</sup>. Tot i que la SI és estable durant hores, el pSMAC i el cSMAC són estructures que es renoven cada pocs minuts.



**Figura I3.** Formació *in vitro* de MCs en el dSMAC i formació de la SI <sup>29</sup>. **A.** La interacció de les Jurkat amb una bicapa lipídica amb ICAM-1-alexa-488 i anti-TCR-biotin\_Streptavidin-TexasRed permet observar la formació de MCs. **B.** Els MCs formats en la perifèria són transportats cap a la SI per mitjà de filaments d'actina en polimerització. **C.** Els MCs de TCR es situen al cSMAC però la estabilitat dels MCs d'ICAM-1 depèn de la unió amb els filaments d'actina i es situen en el pSMAC. **D.** Es genera una barrera en el cSMAC degut a la menor mida del TCR i això exclou ICAM-1 de la SI.

Actualment les definicions de dSMAC i pSMAC realitzades pel Dr. Kupfer són vigents, tot i que nous estudis han reformulat el cSMAC (Figura I4), inicialment definit com una estructura central rica en TCR/CD3 i PKC $\theta$ . El cSMAC es pot dividir en zones riques en TCR/CD3 i deficientes en CD28 on es produeix la terminació de la senyalització, o bé en zones riques en CD28-PKC $\theta$  i pobres en TCR/CD3, on es manté la senyalització iniciada pel TCR/CD3 <sup>30</sup>. Anàlisis recents han mostrat que la divisió de zones es degut a la formació de microvesícules riques en TCR/CD3 definides com a ectosomes i que es troben en l'espai entre el limfòcit T i la APC, permetent una fàcil separació de la regió rica en CD28-PKC $\theta$  <sup>31</sup>. L'abscisió d'aquests ectosomes és similar a la dels exosomes ja que és depenent de TSG101 i VPS4, implicant així la via *endosomal sorting complexes required for transport* (ESCRT) <sup>31</sup>. Així doncs, el clàssic cSMAC es troba dividit en dos: l'endo-cSMAC, present en la membrana citoplasmàtica del limfòcit i ric en CD28-PKC $\theta$  i pobre en TCR/CD3 però implicat en el manteniment de la senyalització, i el exo-cSMAC, format per ectosomes rics en TCR/CD3 (Figura I4).



**Figura I4.** Distribució esquemàtica dels SMACs i les molècules transmembrana més importants de la SI <sup>8</sup>.

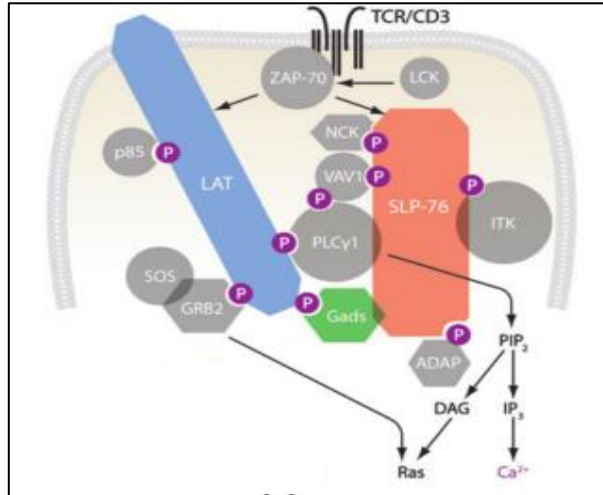
### 1.1.2. Activació dels limfòcits T

Actualment hi ha grans controvèrsies en el camp del *TCR triggering*, és a dir, com la interacció entre el TCR i el complex pMHC agonista es tradueix en el primer senyal intracel·lular <sup>32</sup>. Tot i això, els mecanismes moleculars posteriors que porten a l'activació del limfòcit T, es troben ben descrits <sup>1</sup>. Inicialment es forma el complex de senyalització proximal que permetrà la posterior entrada de Ca<sup>2+</sup> i la generació d'un *feedback loop* positiu responsable de l'activació de Ras i les *Mitogen-activated protein kinases* (MAPKs).

#### Complex de senyalització proximal i transducció de senyal

Un cop es produeix el *triggering* del TCR, el primer senyal intracel·lular que es produeix és l'activació de les Src PTKs, Lck i Fyn. Aquestes fosforilen els ITAM de les cadenes CD3 provocant que es pugui reclutar Zap-70, que al ser activada per fosforilació s'encarrega de propagar el senyal (Figura I5).

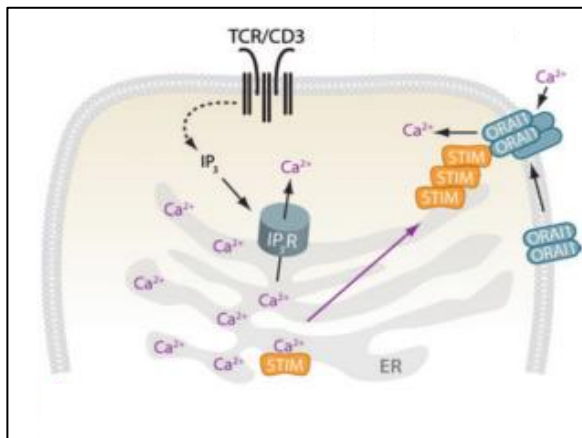
Les molècules adaptadores que formen l'esquelet del complex encarregat de transmetre el senyal i que permeten organitzar espacio-temporalment les molècules efectores són *Transmembrane adapter protein linker for the activation of T-cells* (LAT) <sup>33</sup> i *Src homology-2 (SH2) domain-containing leucocyte phosphoprotein of 76 kDa* (SLP-76) <sup>34</sup>. LAT presenta 9 tirosines que es fosforilen després de l'activació del TCR/CD3, importants per a que es produeixi la unió amb el domini SH2 C-terminal de PLC $\gamma$ 1, la subunitat p85 de PI3K i els adaptadors *Growth factor receptor-bound protein 2* (GRB2) i *GRB2-related adapter downstream of Shc* (Gads) <sup>35</sup>. Després de la unió de Gads a LAT, es produeix la unió de SLP-76 a LAT fosforilat amb Gads com a pont entre elles <sup>36</sup>. SLP-76 presenta tres regions: una regió N-terminal amb 3 tirosines fosforilables d'unió a dominis SH2 de Vav1, Nck i Itk, una regió amb un domini ric en prolines d'unió constitutiva a PLC $\gamma$ 1 i Gads, i una regió C-terminal amb un domini SH2 d'unió a ADAP (*Adhesion and degranulation-promoting adapter protein*) i HPK1 (*Hematopoietic progenitor kinase 1*) <sup>37</sup>. Malgrat que LAT i SLP-76 formen el nucli d'aquest complex, totes aquestes proteïnes efectores també es troben implicades en l'estabilització del complex de senyalització del TCR (Figura I5). La formació dels complex de senyalització proximal promou l'activació de PLC $\gamma$ 1. PLC $\gamma$ 1 activat hidrolitza PI(4,5)P<sub>2</sub>, generant els segons missatgers *Inositol-3-Phosphate* (IP<sub>3</sub>) i diacilglicerol (DAG), els quals són essencials per a l'activació del limfòcit T (Figura I5).



**Figura I5.** Complex de senyalització proximal <sup>1</sup>.

### Entrada de Ca<sup>2+</sup>

La generació d'IP<sub>3</sub> per part de PLC $\gamma$ 1 provoca l'activació del IP<sub>3</sub>R (*IP<sub>3</sub> receptor*), un canal permeable al Ca<sup>2+</sup> present en la membrana del reticle endoplàsmic (RE), i es produeix una sortida massiva al citoplasma del Ca<sup>2+</sup> emmagatzemat en el RE. La depleció dels Ca<sup>2+</sup> en el RE provoca la multimerització de STIM (*Stromal interaction molecule*) en les zones del RE properes a la membrana citoplasmàtica, on provoca la dimerització d'Orai1, els dímers constituents del canal CRAC (*Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup>*) que permet una entrada sostinguda del Ca<sup>2+</sup> de l'exterior cel·lular cap al interior (Figura I6).

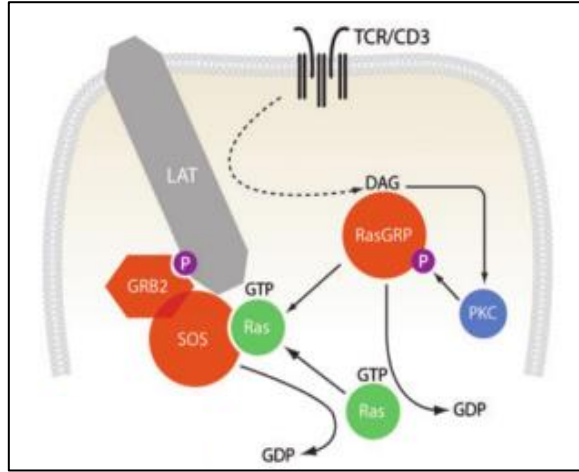


**Figura I6.** Entrada de Ca<sup>2+</sup> <sup>1</sup>.

Això provoca l'activació de varis factors de transcripció dependents de Ca<sup>2+</sup> com ara MEF2, o bé de proteïnes transmissores de senyals com ara la fosfatasa *Calcineurin*, que defosforila el factor de transcripció NFAT permetent la seva entrada al nucli. Aquest factor de transcripció és clau per a l'activació T ja que, junt amb AP-1, es troba implicat en l'activació de múltiples gens indispensables per a l'activació T, com és *IL2* <sup>38</sup>.

## Activació de Ras

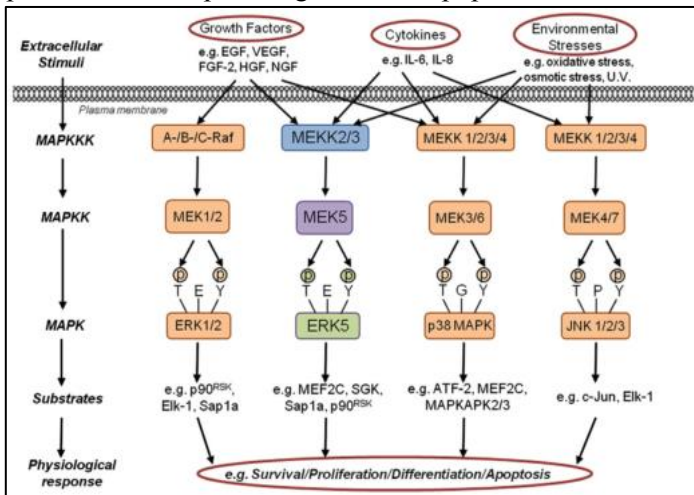
La producció de DAG per part de PLC $\gamma$ 1 permet el reclutament a la membrana de RasGRP i de PKC $\theta$ , implicada en l'activació del factor NF- $\kappa$ B<sup>39</sup>. RasGRP és una molècula de la família de les *Guanine nucleotide Exchange Factor* (GEFs) que és fosforilada i activada per PKC $\theta$ <sup>40</sup> (Figura I7). La seva funció és activar Ras, una proteïna que està en estat activat quan es troba unida a GTP, moment en el qual és capaç d'iniciar l'activació de la via de les MAPK. Ras també pot ser activada per SOS (*Son of sevenless*), una altra GEF, que es troba constitutivament unida a GRB2, la qual s'uneix a LAT durant l'estimulació a través del TCR i permet l'activació de SOS. RasGRP i SOS actuen en sinèrgia creant un *loop* d'activació que permet l'activació sostinguda de Ras<sup>41</sup> (Figura I7). Tot i que la via de Ras és la via d'activació de les MAPK a través del TCR més estudiada, d'altres vies independents de Ras actuen sinèrgicament per tal de generar una resposta correcta.



**Figura I7.** Activació de Ras<sup>1</sup>.

## Activació de les MAPKs

La via de senyalització de les MAPKs consta d'una sèrie d'enzims altament conservats i expressats en totes les cèl·lules eucariotes i que tenen per funció actuar com a reguladors de multitud de processos intracel·lulars<sup>42</sup>. L'inici de la senyalització via MAPK és deguda a estímuls cel·lulars com ara factors de creixement, citocines o hormones i, en el cas dels limfòcits T, també per l'activació del complex TCR/CD3. En aquesta via els senyals es transmeten de la següent manera: una MAPKKK (*Mitogen-activated protein kinase kinase kinase*) és fosforilada, fet que origina la seva activació i posterior fosforilació per part seva d'una MAPKK (*Mitogen-activated protein kinase kinase*), la qual acabarà fosforilant una MAPK. Aquesta última activació es dona per una doble fosforilació en una treonina (T) i una tirosina (Y) presents en el motiu d'activació T-X-Y present en el domini quinasa de la MAPK (Figura I8). L'activació de les MAPKs regula processos cel·lulars diversos, com pot ser la proliferació, l'expressió gènica o la apoptosi<sup>43</sup>.



**Figura I8.** Cascades de senyalització de les MAPKs convencionals<sup>43</sup>.

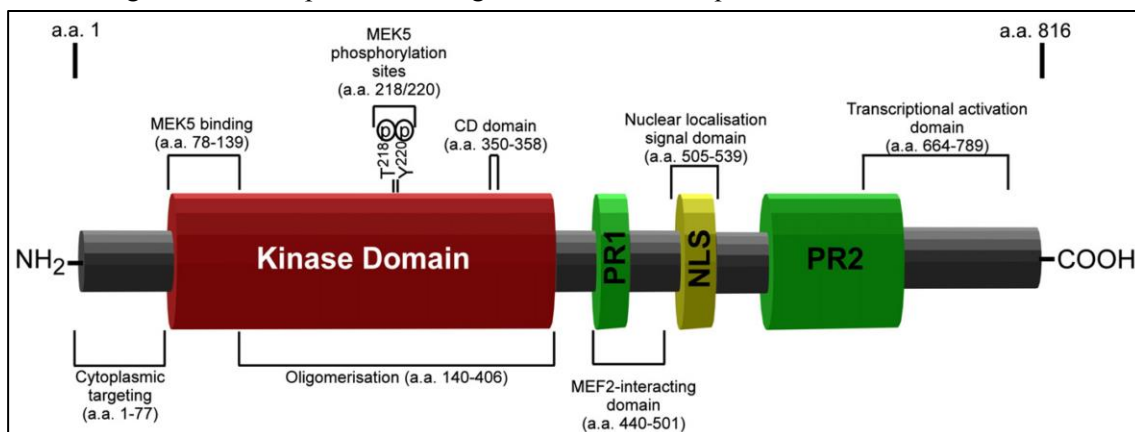
En mamífers existeixen varies subfamílies de MAPKs <sup>42</sup>. D'una banda hi ha les 4 subfamílies de MAPKs anomenades convencionals: ERK1/2 (*Extracellular regulated kinase*), JNK1/2/3 (*Jun NH<sub>2</sub> terminal kinase*), p38 $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$ / $\delta$  i ERK5; d'altra banda trobem les MAPKs anomenades atípiques, formades per la subfamília d'ERK3/4 i la subfamília d'ERK7/8. El rol de les subfamílies de p38, JNK i ERK1/2 en l'activació dels limfòcits T ha estat extensament estudiat <sup>42</sup>, malgrat això, el paper de la resta no es troba definit. Així doncs, en aquesta tesi hem profunditzat en l'estudi d'ERK5.

### Activació d'ERK5

- Estructura i activació d'ERK5

El gen humà *ERK5* (també anomenat *MAPK7* o *BMK1*) consta de 5824 parells de bases que es transcriuen en una proteïna de 816 aminoàcids (Figura I9). La regió N-terminal consta dels primers 406 aminoàcids i s'inicia amb un domini per a la localització d'ERK5 en el citoplasma (a.a. 1-77) i es seguit per un domini quinasa (a.a. 78-406) que comparteix un 66% d'homologia amb el domini quinasa d'ERK2 <sup>44</sup>. Aquest últim domini pot ser dividit en dues regions: regió per a la interacció amb *MAPK/ERK Kinase 5* (MEK5) (a.a. 78-139) i regió per a la oligomerització (a.a. 140-406) <sup>45</sup>. De la mateixa manera que altres MAPKs, ERK5 presenta un motiu d'activació (a.a. 218-220) format per una treonina (T), un àcid glutàmic (E) i una tirosina (Y), el qual es fosforilat per MEK5 en la T i la Y, a més a més, també presenta un *common docking domain* (CD), un curta seqüència d'aminoàcids carregats negativament implicats (a.a. 350-358) en la interacció amb certs substrats que presenten un *docking domain* (D) <sup>46</sup>.

Com a tret diferencial respecte d'altres quinases de la mateixa família, ERK5 presenta una llarga regió C-terminal (a.a. 407-816). Aquesta característica li dona un pes molecular d'aproximadament 102 KDa, més del doble que la resta de MAPKs <sup>44</sup>, i provocant que també es conegui pel nom de *BMK1* (*Big MAPK 1*), originant així certs problemes de nomenclatura en la literatura existent. En aquesta regió trobem un domini de senyalització per a la localització nuclear (*NLS domain*; a.a. 505-539) <sup>45</sup>, dos dominis rics en prolines (PR) anomenats PR1 (a.a. 434-465) i PR2 (a.a. 578-701) que actuen com a llocs d'unió per proteïnes que presenten dominis SH3 (*Src-homology 3*) <sup>44,45</sup>, una regió d'interacció amb MEF2 (a.a. 440-501) i un domini d'activació de la transcripció (a.a. 664-789) el qual és regulat per auto-fosforilació <sup>47</sup>. Cal destacar que la regió C-terminal té una funció auto-inhividora, ja que la generació d'ERK5 sense la regió C-terminal provoca un augment en l'activitat quinasa d'ERK5 <sup>48</sup>.



**Figura I9.** Estructura esquemàtica d'ERK5 <sup>43</sup>.

En estat basal ERK5 no està fosforilat i es troba plegat en una conformació en la que les regions N-terminal i C-terminal es troben en contacte, implicant així la funció del domini NLS i segregant la proteïna en el citoplasma <sup>49</sup>. Després de la fosforilació del domini TEY per part de MEK5 es produeix un canvi de conformació que trenca el plegament, permetent que es produeixi l'auto-fosforilació de la regió C-terminal i la posterior translocació cap al nucli degut a l'alliberament del domini NLS. La desfosforilació d'ERK5 provoca de nou el retorn cap a la conformació plegada i la translocació d'ERK5 cap al citoplasma <sup>49</sup>.

- ERK5 en els limfòcits T

En els limfòcits T, l'estimulació a través del TCR provoca l'activació de les diferents vies de MAPKs. En el cas d'ERK1/2, es produeix una clara activació per fosforilació després de l'estimulació via TCR sense necessitat del co-estímul a través de CD28 <sup>50</sup>. D'altra banda, p38 i JNK1 requereixen de l'activació a través del TCR i del co-estímul CD28 per ser activats modestament o fortament, respectivament <sup>51</sup>. Apart, l'estimulació dels limfòcits T amb PMA, un èster de forbol que activa PKC, provoca l'activació d'ERK1/2, p38 i JNK <sup>50,51</sup>. En canvi, ERK5 presenta un comportament diferent. L'estimulació a través del TCR és suficient per activar aquesta MAPK però en un menor grau que en el observat per ERK1/2, tot i que un lleuger augment en l'activació es produeix al co-estimular a través de CD28 <sup>50,52-54</sup>, un fenomen que presenta un pic als 10 minuts, que declina al arribar a 2 hores <sup>53-55</sup> i que presenta una activació directament proporcional a la dosi usada per estimular el TCR <sup>54</sup>. En canvi, a diferència de les altres MAPKs, ERK5 no s'activa a partir del tractament dels limfòcits T amb PMA <sup>50</sup>, indicant que la seva activació és independent de PKC.

L'estimulació amb pèptids que són agonistes forts o suaus permet definir la implicació d'una via en la selecció positiva o en la selecció negativa durant el desenvolupament T. En el cas d'ERK1/2, l'estimulació amb un pèptid agonista fort produeix la seva activació, fenomen que no es produeix en el cas de l'estimulació amb un pèptid agonista suau. En canvi, p38 i ERK5 presenten una activació similar per pèptids agonistes forts i suaus, indicant la seva implicació en la selecció negativa <sup>54</sup>. Tot i això, la cinètica d'activació és diferent, amb p38 sent activat intensament al arribar a la primera hora i ERK5 sent activat en el primer minut després de l'activació, suggerint que el *threshold* per a la seva activació és inferior que per a les altres MAPKs. La sobre-expressió de mutants dominant negatiu i constitutivament actiu de MEK5 <sup>54</sup>, va permetre demostrar que MEK5 regula l'apoptosi dels timòcits durant el seu desenvolupament i que expressió d'ERK5 correlaciona amb la de Nur77, una proteïna que promou l'apoptosi durant la selecció negativa dels timòcits. Tot i que MEK5 regula la selecció negativa, el *knock-out* condicional d'ERK5 en el llinatge T (usant Vav-Cre o CD4-Cre) no presenta alteracions en el desenvolupament dels limfòcits T <sup>53</sup>, a més a més, en el mateix treball es mostra una correcta activació dels limfòcits T perifèrics d'aquests ratolins.

Apart de l'activació a través del TCR, en els limfòcits T ERK5 també s'activa per mitjà de l'activació amb IL-7 <sup>52</sup>, una citocina produïda per les cèl·lules estromals del tim que promou la supervivència dels timòcits i els limfòcits T i que indueix l'expressió del factor de transcripció *Krüppel-like factor 2* (KLF-2) a través d'IL7-R (*Interleukin-7 Receptor*), un receptor de membrana important per a la supervivència dels timòcits DN que desapareix en els DP per després tornar-se a expressar en els SP <sup>56</sup>. KLF-2 regula la sortida del timus dels timòcits SP madurs per mitjà de l'expressió de *Sphingosine-1-Phosphate Receptor 1* (S1PR1) <sup>57</sup> i l'expressió del mRNA de KLF-2 en els limfòcits T CD4<sup>+</sup> del ratolí *knock-out* per *Erk5* en les

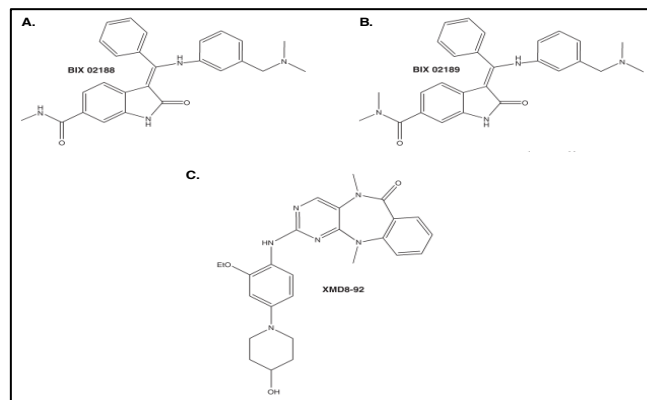
cèl·lules CD4<sup>+</sup> es troba reduït després de l'activació a través del TCR<sup>53</sup>. Malgrat això, ERK5 no regula la sortida del tim dels timòcits SP madurs<sup>58</sup>.

ERK5 es fosforila durant l'activació dels limfòcits T a través del TCR sense que això alteri el desenvolupament dels timòcits, la sortida dels timòcits madurs del tim ni el manteniment dels limfòcits T en la perifèria. Encara que s'ha relacionat MEK5 amb la selecció negativa, la funció d'ERK5 en els limfòcits T CD4<sup>+</sup> encara ha de ser caracteritzada. En aquesta tesis hem profunditzat en l'estudi de la funció d'ERK5 durant la disminució de l'expressió en superfície del complex TCR/CD3.

- Inhibidors de la via MEK5/ERK5

Les tècniques genètiques han estat fins fa poc les eines bàsiques per a l'estudi de la via MEK5/ERK5 degut a la manca d'inhibidors específics. Malgrat això, en els últims anys s'han generat diverses molècules que permeten estudiar aquesta via per inhibició farmacològica. Així doncs, existeixen tres grups d'inhibidors de la via de MEK5/ERK5, diferenciats per l'especificitat diferencial coneguda que presenten.

El primer grup és format per els inhibidors PD98059 i U0126, dues drogues àmpliament usades en estudis amb l'objectiu d'inhibir la via MEK1/ERK1 i ERK2, però dels quals també s'ha descrit un efecte inhibidor en la via MEK5/ERK5<sup>59</sup>. Aquest fet és degut a l'elevada homologia que presenten els diferents components de les dues vies, suggerint un re-anàlisi de les dades presentades en aquests treballs per definir la implicació de MEK1 i MEK5 en els diferents fenòmens observats. El segon grup és format per dos inhibidors específics per la via MEK5/ERK5, BIX02188 i BIX02189 (Figura I10), desenvolupats per la farmacèutica Boehringer Ingelheim. Les dues molècules suprimeixen l'activitat catalítica de MEK5 de manera dosi dependent (IC<sub>50</sub> de 4,3 nM i 1,5 nM, respectivament) alhora que bloquegen la fosforilació d'ERK5<sup>60</sup>, sense afectar altres molècules de la via de les MAPKs. D'altra banda, l'inhibidor XMD8-92 és el més recent en generar-se<sup>61</sup> (Figura I10). És una molècula altament selectiva per ERK5<sup>62</sup> que inhibeix la seva activació amb una IC<sub>50</sub> de 1,5 µM sense inhibir altres MAPKs relacionades ni MEK5. Actualment aquesta molècula es troba en un estadi de desenvolupament pre-clínic, amb al seu efecte antiproliferatiu en xenotransplants de càncer de pulmó i cèrvix<sup>62</sup>.



**Figura I10.** Estructura química dels inhibidors de la via MEK5/ERK5. (A) BIX02188 o (3Z)-3-[[[3[(Dimetilamino)metil]fenil]amino]fenilmetilè]-2,3-dihidro-2-oxo-1H-indol-5-carboxamida. (B) BIX02189 o (3Z)-3-[[[3[(Dimetilamino)metil]fenil]amino]fenilmetilè]-2,3-dihidro-N,N-dimetil-2-oxo-1H-indol-6-carboxamida. (C) XMD8-92 o 2-[[2-Etoxi-4-(4-hidroxi-1-piperidinil)fenil]amino]-5,11-dihidro-5,11-dimetil-6H-pirimidol[4,5-b][1,4]benzodiazepine-6-u.

### 1.1.3. Regulació de l'expressió del TCR en la superfície cel·lular

L'activació del limfòcit T a través del TCR és un fenomen dinàmic i regulat de múltiples maneres per assegurar una correcta transmissió de senyals ja sigui per controlar el desenvolupament T com per controlar les funcions efectores dels limfòcits T madurs. Un dels mecanismes de regulació més important per regular la intensitat de la senyalització del TCR és la modulació de l'expressió d'aquest receptor a la superfície cel·lular <sup>63</sup>. En el cas del desenvolupament T, els timòcits *double-positive* (DP) presenten uns nivells en membrana reduïts més de 10 vegades en comparació amb els nivells expressats pels timòcits *single-positive* (SP), ja siguin SP CD4<sup>+</sup> o SP CD8<sup>+</sup>, fenomen important per a dur a terme un correcte procés de selecció <sup>64</sup>. Els limfòcits T madurs de la perifèria tenen la capacitat de disminuir els nivells en la superfície cel·lular del complex TCR/CD3 després de l'estimulació antigènica, mecanisme que evita una excessiva activació del limfòcit T i que ajuda a evitar l'aparició de reaccions autoimmunitàries <sup>65</sup>.

El TCR s'internalitza constantment de forma constitutiva, per després reciclar de nou cap a la superfície cel·lular o bé per ser degradat en els lisosomes, generant una situació d'equilibri en la que el 70%-80% del TCR es troba a la superfície i la resta en l'interior cel·lular <sup>66-68</sup>. La modificació de qualsevol d'aquests tres processos d'internalització, reciclatge i degradació, porta a una alteració en els nivells en membrana del TCR dels limfòcits T en condició basal. Després de l'activació antigènica es produeix un augment en la internalització, una disminució del reciclatge i un augment de la degradació, resultant en la disminució dels nivells en la superfície cel·lular del complex TCR/CD3 comentada anteriorment <sup>67</sup>. L'endocitosi depenent de clatrina és un dels mecanismes d'internalització tant en limfòcits *resting* com en estimulats per antigen <sup>69,70</sup>, tot i això, existeixen mecanismes independents de clatrina que encara no han estat descrits <sup>70</sup>.



## 1.2. Desenvolupament i diferenciació dels limfòcits T

El repertori de limfòcits T humans a la perifèria conté aproximadament uns  $2,5 \times 10^8$  TCRs diferents <sup>71</sup>, permetent respostes immunes altament específiques davant d'un rang molt divers d'antígens forans. Durant el desenvolupament dels limfòcits T (secció 1.2.1 de la introducció), el sistema immunitari soluciona aquesta necessitat d'un ventall molt extens de TCRs i la limitació de la informació genòmica per mitjà d'un procés ordenat de recombinació i edició dels segments *variable* (V), *diversity* (D) i *joining* (J) del locus que codifica pel gen *TCRB* i dels segments V i J del locus que codifica pel gen *TCRA*, que permetrà la formació de receptors funcionals.

Un cop finalitzat el desenvolupament els limfòcits T ja madurs poden sortir del tim, i a la perifèria es pot produir la diferenciació dels limfòcits T a diferents subtipus després de l'activació del limfòcit. En aquest treball només es parlarà de la diferenciació dels limfòcits T CD4<sup>+</sup> (secció 1.2.2 de la introducció).

### 1.2.1. Desenvolupament dels limfòcits T

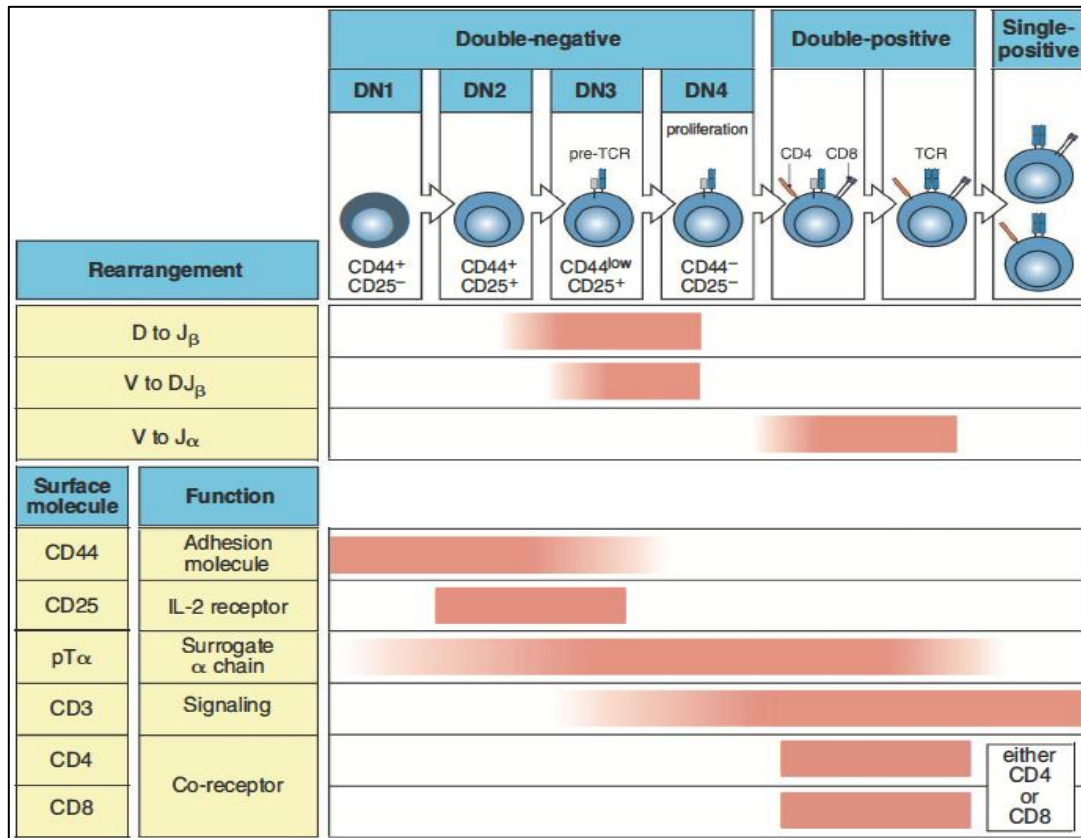
El desenvolupament T intratímic (Figura I11) comença quan els *common lymphoid progenitors* presents en el moll de l'os migren a través dels vasos sanguinis i arriben al tim. Un cop arriben, perden la capacitat de desenvolupar-se a limfòcits B <sup>72</sup> o NK <sup>73</sup>, i només podran desenvolupar-se a limfòcits T, els quals passen per a diferents estats de desenvolupament abans de ser totalment funcionals. L'expressió diferencial de determinades proteïnes en la superfície cel·lular dels timòcits (o limfòcit en desenvolupament) s'usa per determinar l'estat de maduració al llarg del procés de diferenciació.

Al entrar al tim, els *common lymphoid progenitors* no expressen cap dels marcadors característics dels limfòcits T madurs (CD4 i CD8), anomenant-se timòcits *double-negative* (DN), els quals representen aproximadament un 5% del timòcits <sup>2</sup>. D'aquesta població es poden desenvolupar limfòcits del llinatge  $\alpha\beta$ , el majoritari, o bé limfòcits del llinatge  $\gamma\delta$  i iNKT (*invariant NKT cells*), dels quals no es parlarà en aquest treball.

L'etapa inicial del desenvolupament dels limfòcits del llinatge  $\alpha\beta$  pot dividir-se en 4 fases seqüencials de diferenciació, depenent de l'expressió en membrana dels marcadors CD44 i CD25 <sup>74</sup>. En la primera etapa, o DN1, els timòcits són CD44<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> i mantenen els gens de les dues cadenes del TCR sense modificar. A mesura que maduren adquireixen l'expressió de CD25, anomenant-se timòcits DN2, i s'inicia la recombinació D <sub>$\beta$</sub>  i J <sub>$\beta$</sub> . La següent etapa de desenvolupament són els DN3, els quals perden l'expressió de CD44 però mantenen la de CD25, sent l'etapa on s'expressa el pre-TCR $\alpha$  i on es produeix la recombinació V <sub>$\beta$</sub>  i DJ <sub>$\beta$</sub> , que en el cas de ser exitós permet l'expressió del pre-TCR que per mitjà del contacte amb molècules CD3 enviarà senyals d'aturada de la recombinació de la cadena  $\beta$  i senyals de proliferació. La pèrdua d'expressió de CD25 degut a la ràpida proliferació origina els anomenats timòcits DN4, que no expressen cap dels dos marcadors (CD44<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup>).

En el moment en que els timòcits DN4 paren de proliferar passen a expressar les molècules CD4 i CD8 a la superfície <sup>75</sup>. Aquests timòcits CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> s'anomenen DP i representen la gran majoria de timòcits presents en el tim. En aquesta etapa del desenvolupament T es produeix la recombinació de la cadena  $\alpha$  del TCR, que serà exitosa en la majoria de timòcits DP i permetrà

l'expressió de baixos nivells del complex TCR/CD3 a la superfície cel·lular <sup>64</sup>. La majoria de timòcits DP no passaran la selecció positiva, és a dir el reconeixement de pèptids propis carregats en el MHC, i acabaran morint. A més, els timòcits DP que passin la selecció positiva però que responguin massa bé a antígens propis també seran eliminats, fenomen conegut com a selecció negativa, ja que són limfòcits que podrien originar malalties autoimmunitàries en cas d'aconseguir sortir del tim. En definitiva, els timòcits que reconeixin pèptids propis carregats en el MHC i generin senyals amb una intensitat intermèdia passaran a expressar nivells elevats del TCR/CD3 i perdran l'expressió d'un dels dos co-receptors (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> o CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>), originant els timòcits SP, els quals són suficient madurs com per emigrar a la perifèria i dur a terme les seves funcions com a limfòcits totalment funcionals <sup>75</sup>.



**Figura I11.** Etapes del desenvolupament dels limfòcits T del linatge αβ. Adaptat de Janeway, 2012.

### 1.2.2. Diferenciació dels limfòcits T CD4<sup>+</sup>

Per fer front a l'ampli ventall d'infeccions, els limfòcits T CD4<sup>+</sup> es diferencien a diferents subtipus amb distintes classes de funcions i són definits depenent dels factors de transcripció actius i del panell de citocines que secreten <sup>76</sup>. Els subtipus principals són les T<sub>H1</sub>, les T<sub>H2</sub>, les T<sub>H17</sub> i les T<sub>reg</sub> (Figura I12), encara que recentment s'han descrit nous subtipus com les T<sub>FH</sub>, les T<sub>H3</sub>, les T<sub>H9</sub>, les Tr1 o les T<sub>H22</sub>.

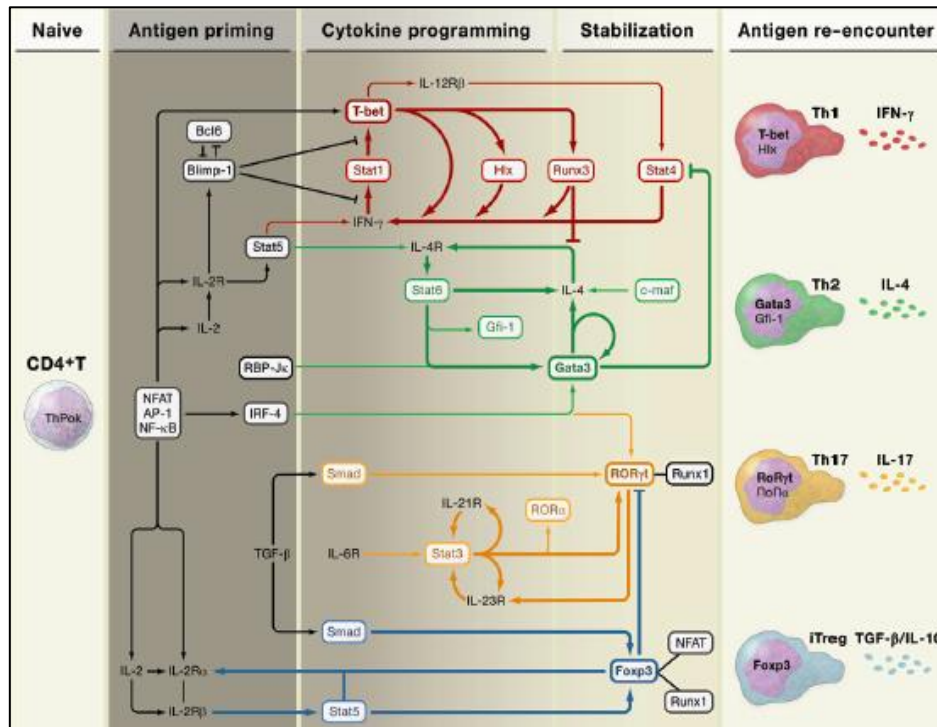
Les T<sub>H1</sub> es troben implicades en el control de les infeccions intracel·lulars, reconeixent antígens bacterians o virals carregats en el MHC-II de macròfags infectats, i estimulant-los per mitjà de la producció d'IFN-γ, un potenciador de l'activitat microbicida dels macròfags.

Les T<sub>H2</sub> es troben implicades en el control de les infeccions per paràsits, promovent respostes mediades per eosinòfils, mastòcits i anticossos de l'isotip IgE. Les citocines característiques

d'aquest subtipus són IL-4, IL-5 i IL-13, implicades en el *switching* dels gens de les Ig per tal que generin IgE. Aquest isotip es troba implicat en les al·lèrgies, fet que implica les T<sub>H</sub>2 en aquest tipus de patologies.

Les T<sub>H</sub>17 es troben implicades en la protecció contra bacteries extracel·lulars i fongs durant els estadis inicials de la immunitat adaptativa. Secreten citocines de la família de la IL-17, estimulants la secreció de citocines per part de les cèl·lules epitelials o estromals, importants per el ràpid reclutament de neutròfils al lloc d'infecció.

Les T<sub>reg</sub> (o T reguladores), al contrari de la resta de subtipus, es troben implicades en la supressió de la resposta immunitària i en la prevenció de respostes autoimmunes. Existeixen dos tipus de T<sub>reg</sub>: les T<sub>reg</sub> que s'originen en el tim (tT<sub>reg</sub>) i les T<sub>reg</sub> induïdes (iT<sub>reg</sub>) que es diferencien a partir de les T naïve de la perifèria.



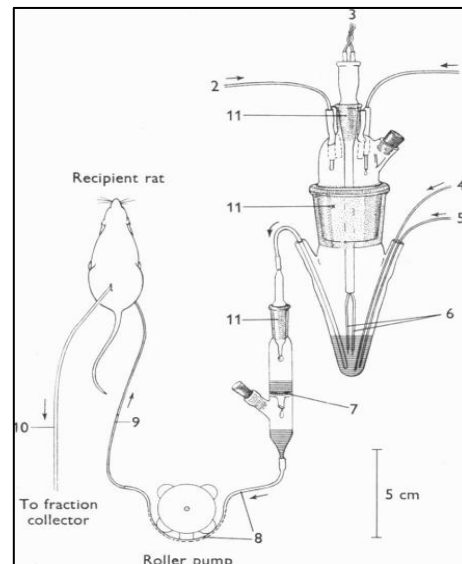
**Figura I12.** Subtipus de limfòcits T CD4<sup>+</sup> 77.

### 1.3. Migració dels limfòcits T

El reconeixement d'antigen que porta a l'activació i diferenciació dels limfòcits T i els rols d'aquests en el control d'infeccions, l'eradicació de tumors, l'autoimmunitat o l'al·lèrgia comparteixen un tret característic que és l'acció local. Per tant, el procés de migració d'aquestes cèl·lules es troba altament regulat i presenta patrons característics depenent de l'estat de diferenciació del limfòcit T <sup>3</sup>. En el cas dels limfòcits T naïve (secció 1.3.1 de la introducció), migren cap als òrgans limfoides secundaris per tal d'augmentar la probabilitat de detectar antigen. Els limfòcits T efectors (secció 1.3.2 de la introducció) activats migren cap als teixits infectats o inflamats on han de dur a terme les seves accions locals. Finalment, hi ha limfòcits T memòria (secció 1.3.3 de la introducció) amb característiques de migració de T naïve i altres T memòria que migren com T efectors per a dur a terme una funció de vigilància.

### 1.3.1. Migració dels limfòcits T naïve o *homing*

Més de 50 anys enrere, el Dr. Gowans va idear un sistema per a la determinació de la recirculació dels limfòcits en rates <sup>78</sup> (Figura I13). Un cop surten del tim, els limfòcits T naïve presents a la sang entren als ganglis limfàtics per mitjà dels conductes limfàtics aferents per després sortir pels conductes limfàtics eferents i arribar al conducte toràcic que acaba drenant a la vena subclàvia esquerra, tancant així el cercle <sup>78</sup>. Aquesta recirculació és més ràpida en els limfòcits T CD4<sup>+</sup> que en els CD8<sup>+</sup> <sup>79</sup>, però en ambdós casos permet el contacte diari amb milers de cèl·lules dendrítiques presents en els ganglis limfàtics i els seus MHC a la superfície, carregats amb antígens derivats de patògens que hagin pogut infectar qualsevol localització del cos.

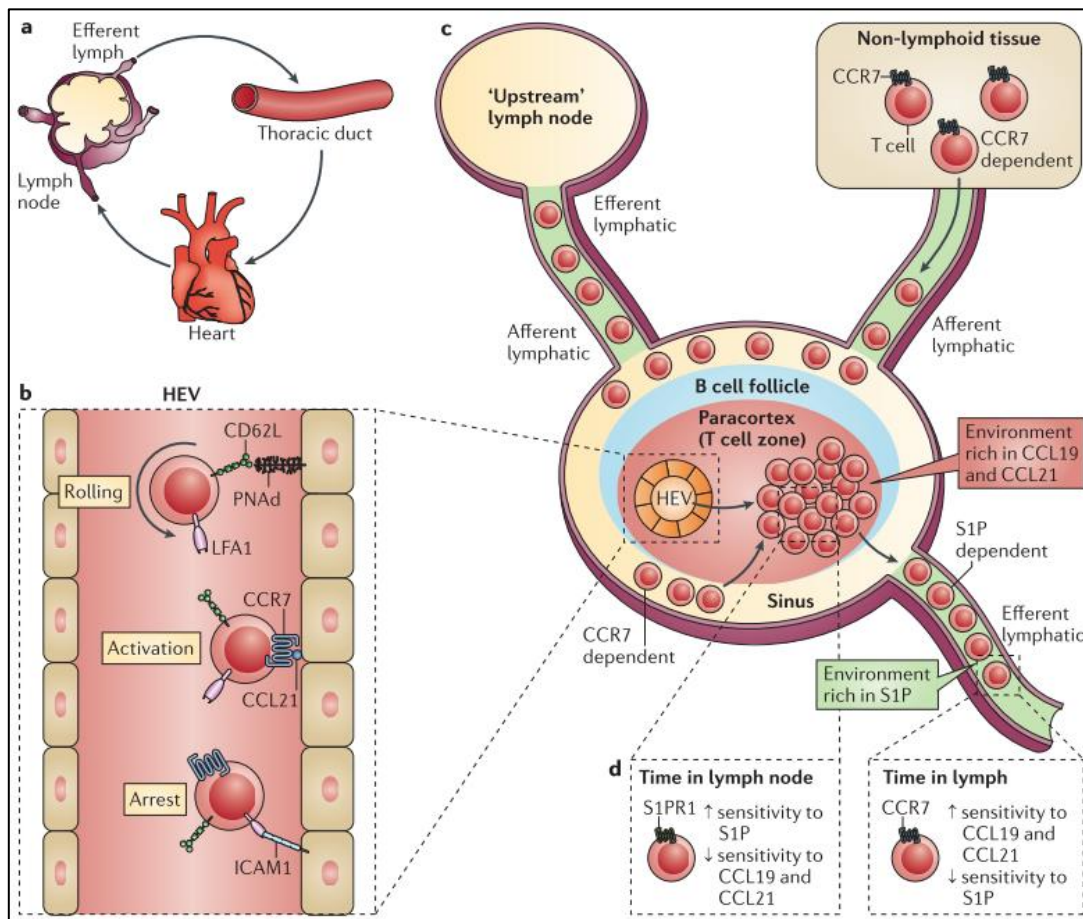


**Figura I13.** Esquema de l'aparell usat per a la transfusió intravenosa de limfòcits <sup>78</sup>.

Els limfòcits s'han d'aturar en les *High Endothelial Venules* (HEVs), un tipus d'endoteli vascular present en la regió paracortical dels ganglis limfàtics, per tal de poder-hi entrar (Figura I14). Aquesta acció es duu a terme gràcies a la interacció de curta durada entre la L-selectina (CD62L) i les PNA (*Peripheral Node Addressin*), un terme general per identificar qualsevol molècula present en les HEVs que presenta unions amb oligosacàrids 6-sulfò sialyl Lewis X <sup>80</sup>. La aturada permet a la quimiocina CCL21, unida a cadenes heparà-sulfat presents en les HEVs, contactar amb el receptor de quimiocina CCR7 fet que genera uns senyals intracel·lulars que provocaran l'activació de la integrina LFA-1 ( $\alpha_L\beta_2$ ) que, al seu torn, s'unirà a ICAM-1 present en les HEVs provocant l'aturada dels limfòcits T naïve <sup>81</sup>. Finalment es produirà la transmigració, ja sigui paracel·lular o transcel·lular, cap a la zona paracortical dels ganglis limfàtics. En aquesta zona es presenta una elevada expressió de CCL21 i CCL19, una quimiocina que també és lligand per a CCR7, originant la retenció dels limfòcits T naïve i augmentant així la probabilitat de contactar amb les *Dendritic Cells* (DCs o cèl·lules dendrítiques) <sup>82</sup>. Alhora, la interacció dels limfòcits T naïve amb CCL19 provoca una dessensibilització creixent cap a CCR7, portant a una disminució de la força amb la que el limfòcit T naïve es manté en la zona T dels ganglis limfàtics i augmentant la possibilitat que surti a través dels vasos limfàtics eferents degut a *sphingosine-1-phosphate* (S1P), una quimiocina present en la limfa i en la sang però no en la zona T dels ganglis limfàtics, que s'uneix al *Sphingosine-1-Phosphate Receptor 1* (S1PR1) <sup>83,84</sup>. Aquest fenomen també es produeix a la inversa ja que la dessensibilització de S1PR1 per contacte amb S1P permet l'entrada als ganglis limfàtics ja que en aquell moment ja s'ha produït la re-sensibilització de CCR7 <sup>85</sup> (Figura I14).

La combinació CD62L\_CCR7\_LFA-1 (Figura I14) és única per al *homing* dels limfòcits T naïve ja que, per exemple, els neutròfils presenten CD62L però no CCR7 fet que els exclou de l'entrada als ganglis limfàtics <sup>86</sup>. D'aquesta manera s'augmenta la presència de limfòcits T naïve en els ganglis limfàtics, augmentant així la probabilitat d'interacció amb un pèptid agonista, fet que desencadena l'activació de senyals a través del TCR que portaran, entre d'altres reaccions, a

L'augment de l'expressió de CCR7 i CD69. L'expressió transitòria de CD69 (el pic es dona a les 24 hores) inhibeix l'expressió de S1PR1 a la superfície cel·lular <sup>87</sup>, originant la retenció dels limfòcits T en expansió en un micro-ambient favorable com són els ganglis limfàtics. La combinació CD62L\_CCR7\_LFA-1 podria ser més flexible ja que l'entrada a les plaques de Peyer de l'intestí prim (un òrgan limfoide secundari), es pot donar per la interacció entre la integrina  $\alpha_4\beta_7$  i MADCAM1, enlloc de LFA-1 i ICAM-1. En el característic cas del procés inflamatori, els senyals pro-inflamatoris com CCL2 i TNF- $\alpha$  provoquen un canvi en els requeriments pel *homing*, com per exemple l'expressió de CCR5 en els limfòcits T CD8<sup>+</sup> que permet la resposta a gradients de CCL3 i CCL4 provinent de zones d'interacció entre limfòcits T CD4<sup>+</sup> i DCs <sup>88</sup>, o l'expressió de CXCR3 en els limfòcits T CD4<sup>+</sup> que permet la resposta a CXCL10 i CXCL9 <sup>89,90</sup>.



**Figura I14.** Recirculació dels limfòcits T naïve a través dels ganglis limfàtics <sup>3</sup>.

### 1.3.2. Migració dels limfòcits T efectors activats al teixit inflamat

L'eficiència de la resposta per part dels limfòcits T davant qualsevol patògen depèn de la seva capacitat per arribar a la zona on es troben les cèl·lules infectades. Tot i que la proliferació dels limfòcits T en els ganglis limfàtics augmenta les possibilitats que es produeixi la interacció al migrar per tot el cos, hi ha mecanismes que permeten que la migració cap al teixit infectat es dugui a terme més ràpid <sup>3</sup>. Una explicació per a aquest fet és l'anomenada *area code hypothesis*, un model que postula que cada òrgan presenta un codi d'entrada pels leucòcits en base a les molècules requerides per la transmigració, degut a que la majoria de limfòcits T activats disminueixen els nivells en membrana de CD62L i CCR7, i ja no entren en ganglis. Per exemple, els limfòcits amb direccionalitat cap a l'intestí prim augmenten els nivells en

membrana de la integrina  $\alpha_4\beta_7$  i de CCR9<sup>91</sup>, en canvi, els que es dirigeixen cap a la pell augmenten els nivells en membrana dels lligands de E-selectina i P-selectina i CCR4 i/o CCR10<sup>92</sup>. Tot i això, aquest no és un model rígid degut a l'elevat nombre de molècules que intervien en els múltiples passos de la migració durant la inflamació.

El procés de migració dels limfòcits cap al teixit inflamat s'ha descrit tradicionalment en tres passos: el *rolling* mediat per selectines, l'activació per quimiocines i l'aturada de la cèl·lula per integrines, coincidint amb els exposats en el cas del *homing* dels limfòcits T naïve. Tot i això, recentment s'han concretat els passos que es produeixen durant el procés de la migració endotelial<sup>93</sup> (Figura I15):

- *Rolling* del limfòcits T

El *rolling* és controlat per les L-, P- i E-Selectines<sup>93</sup>, la primera es troba expressada en tots els leucòcits i les altres dues en les cèl·lules endotelials del teixit inflamat. El *P-Selectin Glycoprotein Ligand 1* (PSGL-1)<sup>94</sup> és lligand de totes 3 selectines quan es troba correctament glicosilat i s'expressa en tots els leucòcits i cèl·lules endotelial. La E-Selectina també es pot unir a altres lligands en els leucòcits com ara la forma glicosilada de CD44 o a ESL1 (*E-Selectin Ligand 1*)<sup>95</sup>. Les interaccions de les selectines amb els seus lligands permeten el primer contacte del limfòcit amb l'endoteli inflamat en condicions de flux sanguini degut a la gran velocitat en que les interaccions es generen i es trenquen (tenen un excepcional *on- and off-rate*)<sup>96</sup>. Les L- i P-Selectines requereixen del *shear stress* (mesura de la força exercida pel flux sanguini en cada cm<sup>2</sup> de superfície endotelial) per permetre l'adhesió, ja que estudis *in vitro* han demostrat que l'aturada del flux resulta en una aturada del *rolling*<sup>97</sup>.

- Activació per quimiocines

Durant la inflamació les cèl·lules endotelials són activades per citocines pro-inflamatòries, fet que provoca l'expressió de molècules d'adhesió i la síntesis de quimiocines que seran presentades a la superfície cel·lular per HSPGs (secció 2.3 de la introducció). Certes quimiocines s'uneixen amb elevada afinitat als seus respectius *G-Protein Coupled Receptor* (GPCRs) provocant així un canvi de conformació en les integrines (veure "La integrina LFA-1" en aquesta secció de la introducció), responsables de l'aturada del limfòcit T.

La senyalització intracel·lular de GPCRs a activació d'integrines compren almenys 900 proteïnes i més de 6000 interaccions proteïna-proteïna<sup>93</sup>. Tot i això, els punt crítics d'aquest procés són coneguts i aporten una idea simplificada de la regulació d'aquesta via. L'activació de PLC per part de les GPCRs porta a la generació d'IP<sub>3</sub>, la conseqüent sortida de Ca<sup>2+</sup> del reticle endoplasmàtic que permet l'entrada del Ca<sup>2+</sup> de l'exterior a través dels CRAC. Aquest fet en concert amb la generació del DAG, permet l'activació de GEFs com CALDAG-GEF1, DOCK2 o VAV1 que activen *small GTPases* com RAP1 i RHOA que provocaran el canvi de conformació de les integrines LFA-1 i VLA-4 a través de la unió i regulació de proteïnes d'unió a actina com Talin1.

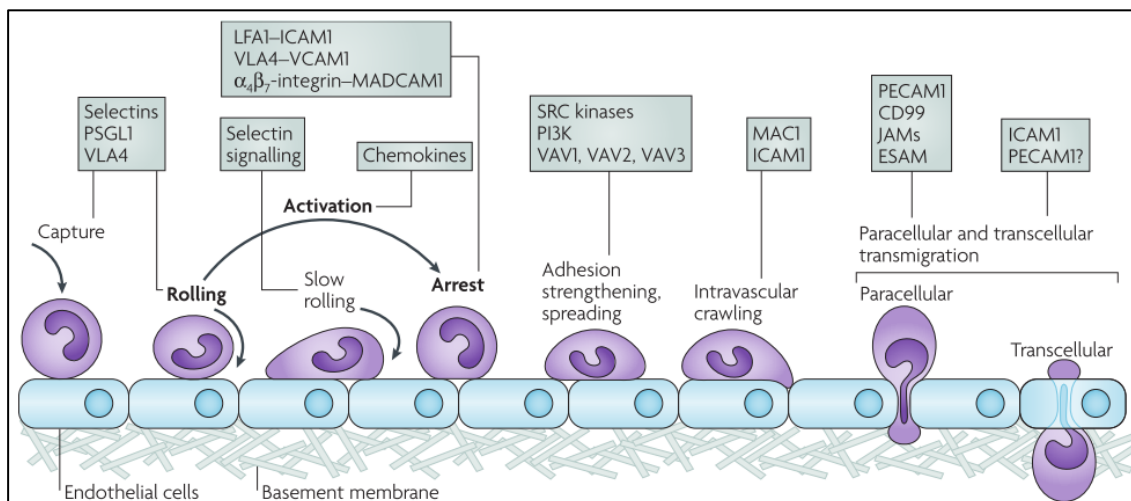
- *Arrest* o aturada dels limfòcits T a l'endoteli

L'aturada dels limfòcits T després del *rolling* ve donada per la unió de les integrines LFA-1 i VLA-4 als seus lligands ICAM-1 i VCAM-1, respectivament, presents en les cèl·lules

endotelials <sup>98</sup>. Apart de la seva funció com a molècules d'adhesió també generen senyals intracel·lulars (l'anomenat *outside-in signalling*) a través de la formació de *signalosomes*. Després de la unió al seu lligand les integrines s'agrupen (l'anomenat *clustering*), fet que origina una forta unió amb el citoesquelet a través de Talin1 <sup>99</sup>. Les forces generades promouen el reclutament de noves molècules implicades en la senyalització i la regulació del citoesquelet, i, a mesura que les adhesions maduren, el *clúster* d'integrines es converteix en un mòdul de regulació de la senyalització que modula l'aturada dels limfòcits T a l'endoteli <sup>99</sup>. Malgrat que es coneixen múltiples exemples, encara no hi ha una visió global i acceptada d'aquest procés, el qual també haurà d'incloure la terminació de l'adhesió com a fenomen que permetrà la posterior migració transendotelial.

- Transmigració endotelial

L'últim pas de la migració endotelial és la transmigració endotelial, és a dir passar de la circulació sanguínia al interior del teixit inflamat, que es pot donar entre cèl·lules endotelials (paraendotelial) o a través de les cèl·lules endotelials (transendotelial). Abans de la transmigració endotelial es produeix el *crawling*, o generació de protrusions per determinar on es troben les zones d'unió entre cèl·lules per a que es produeixi la migració paraendotelial. La migració preferent és la paraendotelial ja que és més ràpida (<2-5 minuts) que la transendotelial (>5-15 minuts). Donat que en aquesta tesis no hem aprofundit en l'estudi de la transmigració endotelial, no es defineix aquest procés en més detall (revisat a <sup>93</sup>).



**Figura 115.** Migració dels limfòcits T al teixit inflamat <sup>93</sup>.

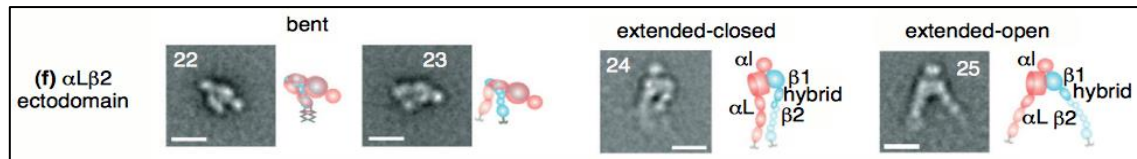
### La integrina LFA-1

En dues de les activitats comentades anteriorment, la migració dels limfòcits T i la formació de la sinapsis immunitària, la integrina LFA-1 juga un paper fonamental. La regulació de l'activació d'aquesta integrina és clau per a un correcte funcionament del sistema immunitari i la seva alteració porta a immunodeficiències greus com són els tres tipus coneguts de *Leucocyte Adhesion Deficiency*, desordres caracteritzats per una severa immunodeficiència que condueix a la presentació d'infeccions recurrents.

Com a membre de la família de les integrines, LFA-1 és un heterodímer transmembrana tipus I que consta de dues subunitats no unides covalentment, la α<sub>L</sub> i la β<sub>2</sub>. Es troba expressada en tots

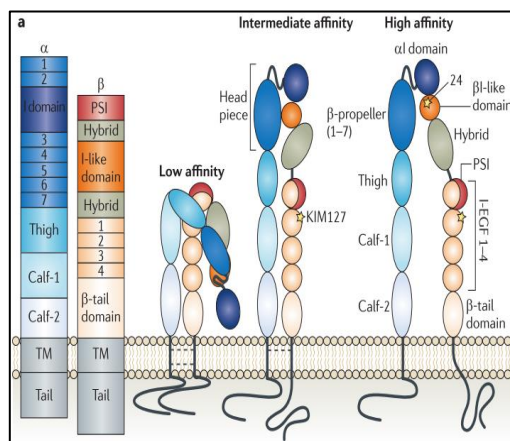
els leucòcits i permet l'adhesió a cèl·lules que expressen els seus lligands ICAM-1, -2, -3 i -5, encara que ICAM-1 és el lligand pel qual presenta una major afinitat <sup>100</sup>. L'adhesió cel·lular dependent de LFA-1 requereix d'un senyal activador com pot ser la unió de quimiocines <sup>101</sup> o l'activació a través del complex TCR/CD3 <sup>102</sup>. LFA-1 transmet senyals a través de la membrana citoplasmàtica de manera bidireccional. Les vies de senyalització intracel·lular provoquen la separació de les cues citoplasmàtiques i activen el domini extracel·lular de LFA-1 en un procés anomenat *inside-out signalling* <sup>103</sup>, mentre que la unió a lligand induïx el *clustering* de LFA-1 i promou l'anomenat *outside-in signalling* <sup>104</sup>.

LFA-1 es pot trobar en 3 diferents conformacions que poden ser classificades per l'afinitat d'unió a ICAM-1 (Figura I16):



**Figura I16.** Fotografies de microscopia electrònica (esquerra) i estructura esquemàtica (dreta) de les 3 diferents conformacions de LFA-1: baixa afinitat (22 i 23), afinitat intermèdia (24) i elevada afinitat (25) (Barra= 10 nm) <sup>105</sup>.

En la conformació de baixa afinitat (*bent*) les regions extracel·lulars de les subunitats  $\alpha$  i  $\beta$  es troben corbades cap a la membrana. En la conformació d'afinitat intermèdia (*extended-closed*), les dues subunitats són desplegades i, finalment, en la conformació d'elevada afinitat (*extended-open*) la regió globular anomenada *headpiece* s'obre i la subunitat  $\beta$  es veu desplaçada (Figura I17). Les regions transmembrana de les dues subunitats es troben juntes per 2 unions, una de les quals es trenca en adquirir la conformació d'afinitat intermèdia i són inexistents en la conformació d'elevada afinitat, permetent que les cues citoplasmàtiques de les dues subunitats es separin i puguin exercir les seves funcions.



**Figura I17.** Dominis i estats d'afinitat de LFA-1 <sup>106</sup>.

### 1.3.3. Migració dels limfòcits T memòria centrals i efectors

Després d'una infecció, la majoria de limfòcits T moren però els s'han diferenciat a limfòcits T memòria no. Aquests migren a diferents òrgans i duen a terme funcions diferencials i presenten diferències fenotípiques en base a aquesta repartició.

Els limfòcits T memòria es poden dividir en dos subtipus: els centrals i els efectors. De manera similar al limfòcits T naïve, els limfòcits T memòria centrals es defineixen per la presència de molècules de *homing* als ganglis limfàtics, ciclen entre els òrgans limfoides secundaris i la sang, tenen capacitat d'excretar elevades quantitats d'IL-2 i de proliferar després de ser activats a través del TCR <sup>107</sup>. En canvi, els limfòcits T memòria efectors es caracteritzen per l'absència de molècules de *homing* als ganglis limfàtics i per mantenir funcions similars a les de limfòcits T efectors activats sense necessitat de re-diferenciar-se. Aquest últim subtipus és objecte de



múltiples discussions en l'actualitat ja que s'han observat limfòcits T memòria efectors amb capacitat de circular a certs teixits com per exemple la pell o la mucosa intestinal, i limfòcits T memòria efectors de residència a llarg termini a diferents òrgans com la pell, l'intestí o el cervell, és a dir, que depenent de la localització i la funció, presenten unes característiques fenotípiques diferents però la contribució a la protecció de l'organisme és la mateixa <sup>108</sup>: un cop s'intercepta el patògen en el teixit infectat els limfòcits T memòria efectors presents en aquell moment (ja siguin residents o amb capacitat migradora) duen a terme les funcions similars a limfòcits T efectors activats per tal d'eliminar *in situ* la infecció, però si aquesta no és superada s'inicia la proliferació i retenció dels limfòcits T memòria efectors i l'acumulació de limfòcits T memòria efectors amb capacitat migradora provinents de la sang i s'inicia el procés inflamatori. En paral·lel, els limfòcits T memòria centrals presents en els ganglis limfàtics es reactiven i comencen a proliferar, i al cap d'uns dies envien una nova onada de limfòcits efectors activats i diferenciats cap a la zona de la infecció per fer més robusta la resposta contra el patògen <sup>108</sup>.

## 2. Sindecà-2

La interacció dels limfòcits T amb l'ambient extracel·lular és clau per tots els processos descrits anteriorment. Els proteoglicans (PGs) són una superfamília de molècules caracteritzades per la unió covalent d'una proteïna amb una o més cadenes de glicosaminoglicans (GAG), es poden trobar a la superfície cel·lular i la matriu extracel·lular i es troben implicats en la regulació de fenòmens tant diversos com la proliferació, la senyalització o l'adhesió i migració cel·lular en multitud de tipus cel·lulars, però la seva funció en els limfòcits es troba actualment poc definida. Els GAGs són cadenes d'heteropolisacàrids carregats negativament que es caracteritzen per la repetició linear de disacàrids que determinen un dels quatre subtipus al qual pertanyen, els heparà-sulfat (HS), condrotin-sulfat (CS), queratin-sulfat i dermatan-sulfat.

En el cas dels heparà-sulfat proteoglicans (HSPGs), es coneixen 5 classes de PGs que sempre presenten cadenes HS unides, són els anomenats HSPGs a temps complert. Els que són expressats en la superfície cel·lular són els 4 membres de la família dels sindecans, els qual són proteïnes transmembrana, i els 6 membres de la família dels glipicans, els quals s'uneixen a la superfície cel·lular per unió a GPI (*Glycosylphosphatidylinositol*)<sup>109</sup>. La resta són el perlecà, l'agrina i el col·lagen de tipus XVIII, els quals són components de la matriu extracel·lular<sup>110</sup>. Apart, existeixen molècules que en certes condicions presenten cadenes HS unides, són els HSPGs a temps parcial, els més estudiats dels quals són el CD44, el testicà i el betaglicà<sup>109</sup>.

En aquest treball s'ha estudiat la funció de Sindecà-2 en els limfòcits T CD4<sup>+</sup>, un HSPG que, com a tal, es troba implicat en la regulació de fenòmens com l'endocitosi o l'adhesió cel·lular.

### 2.1. Els sindecans

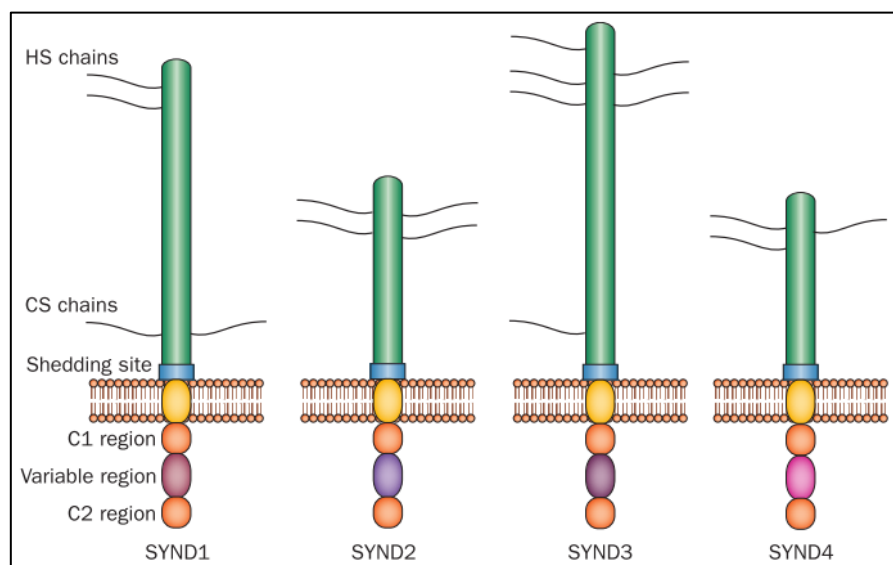
Els sindecans (SDC) són una família de proteoglicans transmembrana de tipus I amb cadenes HS o CS unides al seu *core protein*. En els mamífers aquesta família està composta per 4 membres: sindecà-1 (SDC1), sindecà-2 (SDC2), sindecà-3 (SDC3) i sindecà-4 (SDC4). Tot i això, en els invertebrats només trobem un membre<sup>111</sup>, el D-sindecà, indicant que en mamífers la família va aparèixer per duplicació gènica, amb posterior evolució divergent del gen ancestral ja que la seqüència d'aminoàcids d'aquests 4 HSPGs ens permet subdividir-los en 2 subfamílies per homologia de la seqüència: la subfamília formada per SDC1 i SDC3 i la formada per SDC2 i SDC4.

L'expressió dels SDCs depèn del tipus cel·lular, el teixit, l'estat d'activació o diferenciació de la cèl·lula, l'estadi del desenvolupament o d'una situació patològica com ara la tumorigènesis<sup>112</sup>. Tot i això tres dels quatre SDCs presenten una distribució tissular característica. És el cas de SDC1 que s'expressa generalment en l'epiteli, teixits mesenquimals en desenvolupament i alguns leucòcits com ara les cèl·lules plasmàtiques productores d'anticossos. El SDC2 es troba en fibroblasts i en el teixit neuronal en desenvolupament. SDC3 es troba expressat de forma elevada en el teixit neuronal i durant el desenvolupament del sistema musculoesquelètic. En canvi, SDC4 es troba distribuït de forma àmplia en multitud de tipus cel·lulars. Així doncs, almenys un membre de la família dels SDCs es troba expressat en gairebé tots els tipus cel·lulars nucleats<sup>112</sup>, indicant una regulació gènica constant per almenys un membre de la família.

Els 4 gens que codifiquen pels diferents membres de la família es troben en cromosomes independents, però comparteixen una estructura formada per 5 exons. El primer codifica per la regió 5'-UTR i el pèptid senyal, el segon per la regió N-terminal d'unió a GAGs, el tercer per la regió espaïadora del domini extracel·lular, el quart per la regió extracel·lular proximal a la membrana d'unió a GAGs i els primers 10 aminoàcids de la regió transmembrana i, finalment, el cinquè codifica per la resta de la regió transmembrana, el curt domini intracel·lular i la regió 3'-UTR <sup>113</sup>.

### 2.1.1 Estructura proteica dels sindecans

En definitiva, trobem una estructura proteica compartida per tots el SDCs i que és estructurada en una llarga regió extracel·lular N-terminal, un domini transmembrana i una curta regió citoplasmàtica C-terminal (Figura I18).



**Figura I18.** Estructura esquemàtica dels diferents membres de la família dels SDCs <sup>114</sup>.

### Regió extracel·lular N-terminal

La regió extracel·lular dels SDCs és una regió que ha divergit molt entre tots els membres de la família, tot i que manté dominis conservats implicats en la funció dels SDCs <sup>115</sup>. El primer es troba a prop de l'extrem N-terminal i és el domini d'unió de cadenes HS, que consta de dues o tres repeticions del dipèptid serina-glicina amb un clúster proper de residus àcids <sup>116</sup>. Generalment es troben unides a cada SDC entre 3 i 5 cadenes HS, les quals presenten una llargada d'entre 50 i 150 disacàrids i es troben unides a la proteïna per mitjà d'un tetrasacàrid format per una xilosa, per on s'unirà a la serina present en el lloc d'unió a HS present en els proteoglicans, seguit de dues galactoses i un residu d'àcid glucurònic (GlcA) (Figura I19). A partir d'aquí, la cadena és formada per l'alternació de residus GlcA i N-acetilglucosamina (GlcNAc) que poden patir modificacions com N-deacetilació i N-sulfatació en el cas dels residus GlcNAc, epimerització dels residus GlcA a àcid idurònic i O-sulfatació a varies posicions en els dos casos (Figura I19). Les cadenes ja formades presenten regions de baixa modificació, o dominis *N-acetylated*, i regions d'alta modificació, o dominis *N-sulfated*, flanquejats per regions de modificació intermèdia <sup>117</sup> (Figura I19). Aquest procés no és al atzar i es troba sota control cel·lular en el complex de Golgi, encara que es desconeix l'organització



## Regió transmembrana

La regió transmembrana dels SDCs és de tipus I i es troba altament conservada entre els diferents membres de la família (Figura I20), permetent la formació d'homodímers i d'heterodímers a través del domini de dimerització GXXXG<sup>121</sup>. Aquestes interaccions són claus per certes funcions dels SDCs, com per exemple la formació d'adhesions focals i l'activació de PKC $\alpha$  en el cas de SDC4, o bé la migració cel·lular en el cas de SDC2<sup>122</sup>. A més a més, permet localitzar els SDCs dins de microdominis de la membrana<sup>123</sup>.

	Transmembrane	C1	Variable	C2
SDC3	KSILERKE VLVAVIVGG VVGALFAAFLVTL LIY	RMKKKDEGSYTLLEPKQASVT	YQ KP	DKQEEFYA
SDC1	QGLLDRKE VLGVIAGG LVGLIFAVCLVAF MLY	RMKKKDEGSYSLEEPKQANGG	AYQ KP	TKQEEFYA
SDC2	DNFLKRTE VLAAVIAGG VIGFLFAIFLILL LVI	RMRKKDEGSYDLGERKPSS	AAYQ K	APTK EFYA
SDC4	SNIFERTE VLAALIVGG VVGILFAVFLILL LVI	RMKKKDEGSYDLG KKPI	Y KK	APTN EFYA
Dr. SDC	SSFFSQPG ILAAVI GGAVVGLLCA ILVVMFIVY	RMRKKDEGSYALDEPKRSPANNYS	AKNA	NNREFYA
C. e. SDC	FHETLANG FYAA IAGGVLVAVITA ILLVLFVVF	RIRKKDEGSYALDEPKQARPYASYGYTK	ASTK	EFYA

**Figura I20.** Seqüència aminoacídica dels SDC1-4 humans, SDC de *Drosophila* (Dr.) i SDC de *C. elegans* (C. e.).

## Regió citoplasmàtica C-terminal

Els SDCs no presenten activitat enzimàtica i la regulació de les respostes cel·lulars es dona per la capacitat de fosforilació de cert aminoàcid presents en aquesta regió, permetent la interacció amb altres proteïnes. Així doncs, es troben 3 tirosines i 1 serina conservades en tots els membres de la família i també es troben varies serines no conservades (Figura I20). La reduïda llargada de la regió citoplasmàtica junt amb l'elevat nombre de possibles lligants significa que existeix una forta competència durant els processos d'interacció, fet que té repercussions amb la resposta iniciada. Aquesta cua citoplasmàtica es troba composta d'entre 28 i 34 aminoàcids i consta de 2 dominis conservats entre els 4 membres de la família i que permeten la interacció comú amb varies proteïnes, els quals flanquegen un domini variable que és específic per cadascun d'ells (Figura I20).

El domini C1 és la regió més pròxima a la membrana plasmàtica i és gairebé idèntic per tots els SDCs, inclús el d'invertebrats, suggerint una funció específica (Figura I20). Aquest domini s'ha associat amb la interacció amb el citoesquelet<sup>124</sup> i en la formació de complexes per a la senyalització intracel·lular a través de la unió a *Ezrin* en el cas de SDC2<sup>125,126</sup> o a través de la unió a un complex format per *cortactin*, tubulina, Fyn, c-Src, entre d'altres, que regula el creixement de les neurites en el cas de SDC3<sup>127</sup>.

El domini variable aporta a cada membre de la família la capacitat d'interaccionar amb un ventall diferent de proteïnes. En el cas de SDC2, la fosforilació per part de PKC $\gamma$  de dues serines presents en el domini variable permet la regulació de l'eix esquerra-dreta durant el desenvolupament de *Xenopus laevis*<sup>128</sup>.

El domini C2, o EFYA, es troba a la part més distal de la regió C-terminal de la proteïna i es compon per 4 aminoàcids, els quals són un àcid glutàmic (E), una fenilalanina (F), una tirosina (Y) fosforilable i una alanina (A). Aquest domini és un lloc d'unió per proteïnes amb dominis d'unió PDZ, fet que comporta la participació dels SDCs en fenòmens com ara la senyalització

intracel·lular a través de Tiam1 (actuant com a GEF de Rac1)<sup>129,130</sup>, la regulació del tràfic a través de *synbindin*<sup>131</sup> o *synectin*<sup>132</sup> o la regulació del reciclatge a través de *syntenin* (fent de pont amb Arf6)<sup>133-135</sup>.

## 2.2. Rol dels sindecans durant l'adhesió cel·lular

La interacció de les cèl·lules amb la *Extracellular Matrix* (ECM) dota a la cèl·lula d'un suport físic, regula la posició i promou la transducció de senyals per al correcte inici de l'adhesió i la migració. Així doncs, una desorganització de la ECM o bé una alteració en la interacció cèl·lula - ECM pot originar situacions patològiques. Aquest és el cas de la malignitat tumoral que correlaciona amb alteracions en l'adhesió a la ECM, o bé de les malalties inflamatòries, on s'altera la capacitat de migració de les cèl·lules<sup>136</sup>. Els receptors cel·lulars més importants implicats en aquests fenòmens són els membres de la família dels SDCs i de les integrines. Aquests dos tipus de molècules cooperen per regular els processos que es donen durant tots els passos de l'adhesió cel·lular, amb una sèrie de mecanismes molt diversos que depenen del context en que la cèl·lula es trobi<sup>137</sup>.

Les integrines són una família de glicoproteïnes transmembrana que formen heterodímers amb unions no covalents entre una cadena  $\alpha$  i una cadena  $\beta$ . En mamífers hi ha 18 gens que codifiquen per cadenes  $\alpha$  i 8 gens que codifiquen per cadenes  $\beta$ , la combinació de les quals produeix 24 receptors  $\alpha\beta$  diferents<sup>138</sup>. Les integrines interaccionen amb diversos lligands, entre els quals destaquen proteïnes de la ECM i proteïnes de la superfície cel·lular.

Les interaccions entre SDCs i integrines es poden donar tant per interaccions intracel·lulars com per extracel·lulars. Per exemple, es produeixen interaccions intracel·lulars entre les integrines  $\beta_1$  i SDC1<sup>139</sup> o la integrina  $\alpha_6\beta_4$  i els SDCs<sup>140</sup>. En el cas de les interaccions extracel·lulars, s'ha descrit que SDC1 interacciona amb les integrines  $\alpha_v\beta_3$  i  $\alpha_v\beta_5$ , fet que a permès sintetitzar un pèptid corresponent a la seqüència d'interacció a SDC1, *synstatin*, que té la capacitat de bloquejar aquesta interacció i en conseqüència inhibir la angiogènesis en un model murí d'angiogènesis *in vivo* i la inhibició de la tumorigènesis en un model murí de càncer de mama *in vivo*<sup>141</sup>. Aquests estudis evidencien la importància de l'estudi de la regulació entre SDCs i integrines.

### Senyalització a través de Rho GTPases

En la regulació de l'adhesió i migració per part de les integrines i els SDCs, la família de les Rho GTPases juguen un paper molt important ja que són el nòdul per a gran part dels senyals intracel·lulars originats per part dels dos tipus de receptors. Per a dur a terme la seva funció es troben canviant constantment d'un estat d'activació a un d'inactivació, depenent de si es troben units a GTP o GDP, respectivament. Tot i que s'han descrit més de 20 membres de Rho GTPases en mamífers, les més estudiades són RhoA, Rac1 i Cdc42<sup>142</sup>. La literatura existent al respecte és molt extensa i amb multitud de fenòmens que semblen contradictoris entre ells, i dóna idea de la complexitat de la regulació d'aquestes vies de senyalització. Les integrines i els SDCs regulen les Rho GTPases de la mateixa manera que aquestes regulen a les primeres d'una manera que és depenent de multitud de variables com ara el tipus cel·lular, la localització de les molècules o el moment en que el procés es du a terme. En cèl·lules COS-1, la sobre-expressió de SDC2 promou la formació de fil·lopodis per mitjà de l'activitat de Cdc42<sup>143</sup>, tanmateix, la sobre-expressió de la integrina  $\beta_1$  en la línia cel·lular de ratolí epitelial GE11, però no la de  $\beta_3$ ,

provoca l'activació de RhoA, en canvi, l'activitat de Rac1 es veu inalterada <sup>144</sup>. L'endocitosis de SDC4 induïda per *Fibroblast growth factor 2* (FGF2) és dependent de l'activitat de Rac1, fet que regula la seva activació i creant així un *loop* entre SDC4 i Rac1 <sup>145</sup>. En el cas de LFA-1 ( $\alpha_1\beta_2$ ), RhoA i Rac1 regulen el canvi de conformació d'aquesta integrina a un estat d'elevada afinitat després de l'estimulació dels limfòcits T amb CXCL12, en canvi, Cdc42 actua com a regulador negatiu d'aquest mateix procés <sup>146</sup>. En definitiva, el context cel·lular determina les característiques de les adhesions formades per mitjà de les mateixes vies de senyalització.

### Rol dels sindecans en el reciclatge de les integrines

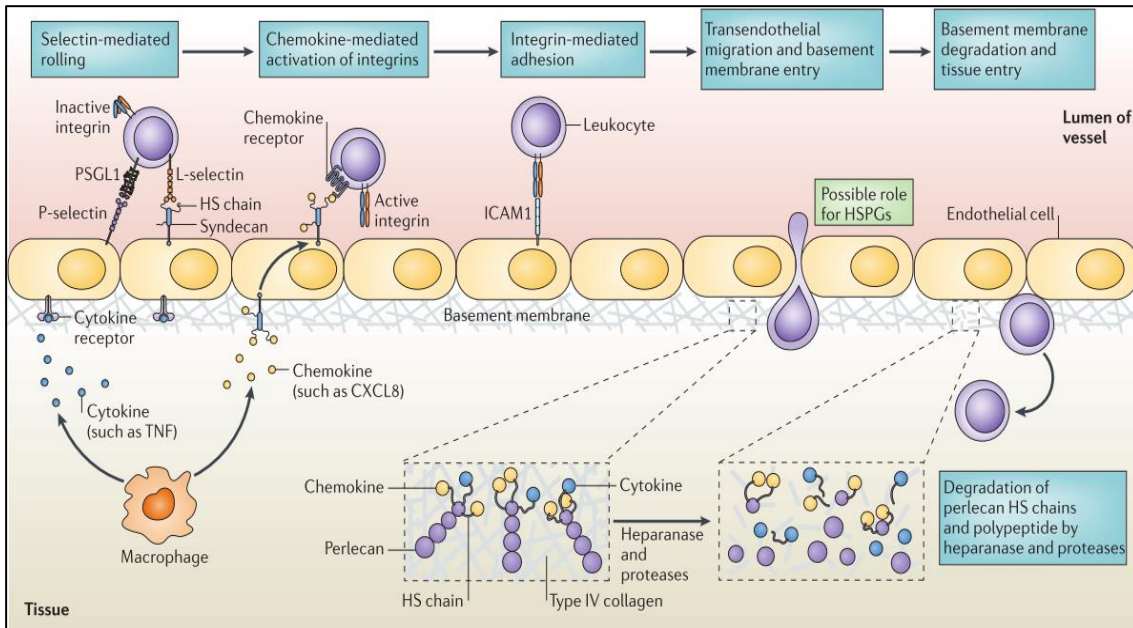
Les adhesions focals són estructures que es formen en la zona de contacte cèl·lula - ECM i es troben compostes per clústers d'integrines unides a centenars de proteïnes del citoesquelet i de senyalització. La regulació en l'espai i temps de la estabilització i el *turnover* de les adhesions focals és un requeriment per a una migració cel·lular eficient, per tant, el reciclatge de les integrines juga un paper molt important en aquest fenomen <sup>147</sup>. Els SDCs no es troben entre les proteïnes que formen els clústers proteics de les adhesions focals, tot i això, es troben implicats en la regulació d'aquestes <sup>137</sup>.

Les integrines d'unió a fibronectina  $\alpha_5\beta_1$  <sup>148</sup> i  $\alpha_v\beta_3$  <sup>149</sup> presenten diferents propietats biomecàniques i de senyalització que influeixen directament en la resposta cel·lular a la interacció amb la ECM <sup>150</sup>. SDC4 actua com a regulador del reciclatge d'aquestes dues integrines i, en conseqüència, actua com a coordinador de la dinàmica de les adhesions focals i la migració cel·lular. La fosforilació de SDC4 per part de c-Src permet la unió de *Syntenin* en el domini citoplasmàtic C2, fenomen que regula l'activitat d'Arf6, que actua com un interruptor molecular per determinar si  $\alpha_5\beta_1$  o  $\alpha_v\beta_3$  són enviades a la membrana citoplasmàtica per exercir les seves funcions <sup>151</sup>. A més a més, el segon domini PDZ de *Syntenin* presenta la capacitat d'unir-se a PIP<sub>2</sub> fet que també regula l'activitat d'Arf6 i porta a la regulació del tràfic a la membrana citoplasmàtica dels SDCs <sup>135</sup>.

### **2.3. Rol dels sindecans durant la inflamació**

En resposta a la ferida d'un teixit o qualsevol altra alteració que promogui un procés inflamatori, s'inicia una cascada de senyals químiques amb l'objectiu de reclutar leucòcits per tal de solucionar el problema en el teixit afectat. Un cop al interior, els leucòcits durant a terme funcions com ara secreció de citocines per reclutar altres leucòcits, eliminació de patògens o reparació tissular <sup>152</sup>. En el context de la inflamació, és important destacar la presència dels SDCs en els diferents tipus cel·lulars: els 4 membres de la família dels SDCs es troben expressats en diferents tipus de cèl·lules endotelials i la seva expressió pot ser modulada per citocines pro-inflamatòries <sup>153</sup>, els limfòcits pre-B i les cèl·lules plasmàtiques presenten nivells elevats de SDC1 <sup>154</sup>, els limfòcits T activats augmenten l'expressió de SDC2 i SDC4 <sup>155</sup>, els neutròfils i els monòcits circulants expressen nivells baixos de SDC4 <sup>153</sup> i aquests últims augmenten l'expressió de SDC2 al ser activats per IL-1 $\beta$  <sup>156</sup> i la seva diferenciació a macròfags resulta en un augment de SDC1, SDC2 i SDC4 <sup>157</sup>. La presència dels SDCs és important per els diferents passos que es requereixen pel pas dels leucòcits de la sang a la zona afectada travessant la barrera endotelial (Figura I21), un procés multifactorial anomenat migració transendotelial (secció 1.3.2 de la introducció): contacte inicial i *rolling* dels leucòcits sobre l'endoteli, activació per part de les quimiocines presents en la superfície de les cèl·lules

endotelials, adhesió ferma dels leucòcits activats al endoteli i migració cap al teixit de manera paracel·lular o transcel·lular sense dany en l'endoteli per mitjà de gradients de quimiocines.



**Figura I21.** Rol dels HSPGs durant la inflamació <sup>152</sup>.

Inicialment, les selectines són necessàries perquè es donin els contactes inicials entre el leucòcit i la cèl·lula endotelial. Tant la P-selectina com la L-selectina tenen la capacitat d'unir-se a heparina i HS *in vitro* <sup>158</sup>, però la P-selectina té com a lligand d'elevada afinitat a PSGL-1 present en els limfòcits i probablement és la molècula amb la que contacta durant la resposta inflamatòria. En canvi, la L-selectina té com a lligand d'elevada afinitat les PNAd en les HEVs, però aquestes no són presents en l'endoteli inflamat. S'ha demostrat que les cèl·lules endotelials del ratolí *knock-out* per la *N-acetyl glucosamine N-deacetylase-N-sulphotransferase*, un enzim que uneix N-sulfats a les cadenes HS, mostren una disminució en l'entrada de neutròfils al teixit inflamat en varis models d'infecció <sup>159</sup>, en canvi, l'entrada dels leucòcits d'aquest ratolí *knock-out* no presenten alteracions en la seva capacitat de migrar al interior d'un teixit inflamat amb un endoteli no alterat genèticament. Aquest estudi demostra que els HS són lligands per a L-selectina en l'endoteli inflamat, sent els SDCs presents en la superfície de les cèl·lules endotelials uns fermes candidats per a actuar com a lligands.

L'activació de les integrines mediada per quimiocines és un altre procés regulat pels SDCs, ja que les quimiocines tenen la capacitat d'unir-se a HS <sup>160</sup>, tot i que la unió es dona en seqüències característiques per a cada quimiocina. L'acció reguladora dels SDCs sobre les quimiocines en el context de la inflamació es dona de tres maneres diferents: induint la seva oligomerització i protegint-les de la proteòlisis <sup>161</sup>, immobilitzant-les en la superfície de les cèl·lules endotelials i creant gradients <sup>162</sup> i transportant-les a través de la barrera endotelial (*transcytosis*), com és el cas de CXCL8 <sup>163</sup>.

Un cop els leucòcits han travessat la monocapa endotelial, la membrana basal de l'endoteli actua com a barrera física per la migració al teixit inflamat. Aquesta es troba parcialment composta per HSPGs (perlecà, col·lagen tipus XVIII i agrina) i per passar a través d'ella els leucòcits requereixen de l'heparanasa, un enzim amb capacitat de degradar HSPGs, que es pot



trobar a la membrana cel·lular unida als SDCs ja que les cadenes HS d'aquests actuen tant de substrats com de reguladors de l'heparanasa <sup>164</sup>. Així doncs, existeixen evidències que els SDCs actuen com a reguladors en moltes de les etapes del procés d'entrada de leucòcits al teixit inflammat.

Apart del seu rol en la inflamació, recentment s'ha descrit un rol per els HSPGs durant el *homing* dels limfòcits T. El ratolí *knock-out* condicional per Ext1, una glicosiltransferasa essencial per la formació del les cadenes HS, en les HEVs dels ganglis limfàtics presenta una disminució del 30-40% del *homing* dels limfòcits T degut a la disminució de la presència de CCL21 en les HEVs <sup>165</sup>. A més a més, les DCs del ratolí *knock-out* per heparanasa, una  $\beta$ -D-endoglucuronidasa, mostren una reducció en la capacitat de migrar de la pell fins els ganglis limfàtics <sup>166</sup>, reforçant així la idea sobre la importància dels SDCs per a que es dugui a terme una correcta migració de les cèl·lules responsables de coordinar una bona resposta immunitària. Malgrat la gran quantitat d'estudis existents en aquest camp es desconeix la funció dels SDCs presents en els leucòcits, però l'augment dels seus nivells en la membrana de diversos leucòcits durant els processos inflamatoris porta a pensar en una possible activitat d'aquests durant la inflamació.

#### Sindecans en els limfòcits T CD4<sup>+</sup>

La primera evidència que els HSPGs jugaven un rol important pels limfòcits T CD4<sup>+</sup> va ser durant l'estudi del mecanisme d'extravasació de cèl·lules leucèmiques <sup>167</sup>. El grup del Dr. Eto va demostrar que cèl·lules ATL (o *Adult T cell Leukemia*) adhireixen espontàniament a HUVEC estimulades amb IL-1 $\beta$  degut a la presència de la citocina MIP-1 $\beta$  unida a les cadenes HS presents en la superfície cel·lular d'aquestes cèl·lules.

Multitud de virus han evolucionat per usar els HSPGs com a porta d'entrada a les cèl·lules. Tant el HIV-1 (o *Human Immunodeficiency Virus-1*) com el HSV-1 (o *Herpes Simple Virus type 1*) presenten la capacitat d'infectar *in vitro* multitud de línies cel·lulars com ara les H9, una línia derivada de Hut-78, un limfoblast T CD4<sup>+</sup>, fenomen revertit al modificar enzimàticament les cèl·lules per mitjà del tractament amb heparitinasa, però en canvi no són capaços d'infectar *Peripheral Blood Lymphocytes* (PBLs) *in vitro* <sup>168</sup>. De la mateixa manera que els limfòcits T CD4<sup>+</sup> adhireixen a HUVEC amb MIP-1 $\beta$  unida als HSPGs de la seva superfície cel·lular, el HIV-1 és presentat en *trans* degut a la unió de la proteïna gp120 als HSPGs <sup>169</sup>. Tot i que aquesta última és una via important per la entrada del HIV-1 i d'altres virus als limfòcits T CD4<sup>+</sup>, l'entrada es pot donar per infecció directa. Els limfòcits humans T CD4<sup>+</sup> primaris en estat quiescent presenten uns nivells difícilment detectables de HSPGs, en canvi, després de l'activació es produeix un augment d'aquests en la membrana correlacionant amb un augment de la infectivitat *in vitro* per part de HTLV-1 (o *Human T-cell Leukemia Virus-1*), una infectivitat que es redueix dràsticament després del tractament de les cèl·lules amb heparitinasa <sup>170</sup>.

No va ser fins el 2008 que es va caracteritzar l'expressió dels SDCs en el limfòcits T CD4<sup>+</sup> <sup>155</sup>. L'expressió de SDC4 és incrementada per efecte de l'activació *in vitro* amb anti-CD3 $\epsilon$ , igual que la de SDC2, encara que la d'aquest últim en menor mesura. A més a més, els limfòcits T memòria CD4<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup> expressen a la seva superfície cel·lular SDC1, SDC2 i SDC4 <sup>171</sup>. La proteïna p17 del HIV-1 co-localitza *in vitro* a la superfície cel·lular amb SDC2 i SDC4 en

limfòcits T humans CD4<sup>+</sup> activats i afecta la producció de TNF-a i IL-2<sup>172</sup>, revelant SDC2 i SDC4 com a dianes per al HIV-1 en aquestes cèl·lules.

També en els limfòcits T CD4<sup>+</sup> activats, SDC4 actua com a lligant de DC-HIL present en les APCs<sup>173</sup> i inhibeix l'activació T a través de l'activitat fosfatasa de CD148<sup>174</sup>. L'expressió constitutiva de SDC4 en els limfòcits del síndrome de Sézary, un limfoma T cutani (CTCL), es troba augmentada respecte limfòcits T de donants sans o d'altres malalties cutànies no CTCL<sup>175</sup>. La modulació d'aquesta via permet frenar T al·loreactius<sup>176</sup> i té la capacitat de regular respostes autoimmunitàries<sup>177</sup>.

La funció de SDC4 en els limfòcits T CD4<sup>+</sup> ha estat àmpliament estudiada els darrers anys, malgrat això, en el moment d'iniciar aquesta tesis doctoral es desconeixia la funció de SDC2 en aquest tipus cel·lular. Així doncs, en aquest projecte hem treballat per definir les funcions i els mecanismes pels quals actua SDC2 en els limfòcits T CD4<sup>+</sup> en un model de sobre-expressió d'aquest SDC en la línia cel·lular Jurkat, derivades d'una leucèmia T aguda àmpliament estudiada per determinar els mecanismes d'activació dels limfòcits T CD4<sup>+</sup><sup>178</sup>.

## 2.4. Sindecà-2

Apart dels rols en l'adhesió i migració cel·lular i en la inflamació ja comentats anteriorment, SDC2 du a terme multitud de funcions. Malgrat que la generació de *knock-outs* en ratolí és una eina poderosa per conèixer les funcions d'una proteïna en mamífers, el *knock-out* de SDC2 encara no ha estat generat<sup>112</sup>, per tant, altres aproximacions s'han dut a terme per a dilucidar el paper d'aquest HSPG en diversos contextos.

Una de les situacions és la comunicació cèl·lula-cèl·lula, ja que SDC2 té la capacitat d'unir-se a multitud de factors de creixement i citocines com ara FGF-2, *Vascular endothelial growth factor* (VEGF), varis membres de la família de TGF-β o IL-8, i s'ha proposat que els seus mecanismes d'acció poden ser molt diversos, ja sigui presentant les molècules als seus respectius receptors, presentant les molècules i associant-se als seus receptors o bé actuant directament en la regulació de la senyalització<sup>179</sup>. SDC2 també juga un paper en la comunicació cèl·lula-cèl·lula a través de la biogènesi d'exosomes, per mitjà de les interaccions amb *Syntenin* i ALIX, una proteïna que interactua amb varies proteïnes ESCRT implicades en els processos de formació i abscisió dels exosomes<sup>180</sup>.

D'altra banda, varis estudis suggereixen un rol per a SDC2 en la organització i coordinació dels processos de senyalització entre el mesènquima i l'epiteli dels teixits en desenvolupament. En el cas del desenvolupament de *Danio rerio* i *Mus musculus*, SDC2 és expressat en les cèl·lules mesenquimals que envolten els vasos sanguinis<sup>181</sup>. A més a més, s'ha detectat una elevada expressió de SDC2 en cèl·lules d'origen mesenquimal del ronyó, pulmó i estómac, i també en cèl·lules del cartílag i de l'os<sup>182</sup>.

A més a més, SDC2 pot crear dominis en la membrana especialitzats en la coordinació de la senyalització intracel·lular. Això ho pot aconseguir gràcies a la capacitat de multimeritzar a través del domini transmembrana<sup>121</sup>, però també a través de la fosforilació de dues tirosines del domini C1 i V, com en el cas de les espines dendrítiques de la membrana neuronal post-sinàptica, on el receptor tirosina quinasa EphB2 fosforila les tirosines promovent així la clusterització de SDC2 i posterior formació de les espines dendrítiques<sup>183</sup>.

Donat el seu rol en l'adhesió i la migració i la seva capacitat d'actuar com a co-receptor, la desregulació de SDC2 es troba implicada en multitud de càncers. En cèl·lules de melanoma l'expressió de SDC2 és augmentada per l'expressió de MC1R (*Melanocortin 1 receptor*) a través de la inhibició de l'activació de p38 provocant un augment en la migració cel·lular<sup>184</sup>. En el cas del fibrosarcoma, SDC2 modula la regulació transcripcional de TGFβ2 a través de Smad2 per tal de facilitar l'adhesió de cèl·lules HT1080<sup>185</sup>. Els nivells de SDC2 es troben augmentats en MDA-MB231, una línia cel·lular de carcinoma de mama, fet que promou la capacitat invasiva d'aquestes cèl·lules en part a través de l'activació de RhoA<sup>186</sup>. RKIP/PEBP1 és una quinasa que inhibeix SDC2 per mitjà de la disminució de HMGA2, un oncogen, i això indueix la apoptosi i disminueix el creixement del tumor i metastasis de xenotransplants en ratolí de cèl·lules 1833, una altra línia cel·lular de carcinoma de mama<sup>187</sup>. La funció de SDC2 en el càncer de còlon és la més estudiada degut a la seva elevada activitat tumoral. En el medi de cultiu de varies línies cel·lulars de càncer de còlon (HCT116, LoVo, CaCo-2 i HT29) es troben alts nivells de la regió extracel·lular de SDC2 donat a l'acció proteolítica de *Metalloproteinase-7* (MMP-7)<sup>120</sup>, regió implicada en la interacció amb fibronectina en les HCT116, augmentant la migració d'aquest tipus cel·lular<sup>188</sup>. La metilació aberrant del gen de SDC2 durant els estadis inicials del tumor el converteix en un biomarcador per a la detecció precoç d'aquest tipus de càncer per mitjà de tests sanguinis<sup>189</sup>.

### Treballs previs del laboratori en la biologia dels HSPGs

L'estudi de la funció de SDC2 en els limfòcits T CD4<sup>+</sup> presentat en aquesta tesi és un nou treball en la llarga llista d'aportacions que el grup Dr. Reina a dut a terme en el camp dels HSPGs. L'interès per el món dels HSPGs es va iniciar a finals de la dècada dels 80 quan els estudis del grup per caracteritzar l'activitat i la distribució tissular i cel·lular de la lipoproteïna lipasa<sup>190-195</sup> van portar a definir els HSPGs com a receptors d'aquest enzim en la superfície de les cèl·lules endotelials i van elucidar el rol del citoesquelet d'actina en la distribució i agregació en la superfície cel·lular d'aquests HSPGs<sup>196,197</sup>. El creixent interès de la comunitat científica en el camp dels HSPGs va conduir a la definició d'aquestes molècules com a receptors de múltiples lligands solubles i com a molècules d'adhesió a la matriu extracel·lular<sup>124</sup>, i va començar a definir la seva funció cel·lular i el seu rol en múltiples patologies<sup>113</sup>. Aquest fet va fer reconduir les línies d'investigació del laboratori, desplaçant les aportacions en el camp de la lipoproteïna lipasa cap als estudis de la funció dels HSPGs, fent especial èmfasi en SDC2.

Es va demostrar que la sobre-expressió de SDC2 en cèl·lules COS-1 originava la formació de fil·lopodis a través de l'activació de la GTPasa Cdc42<sup>143</sup> i es va determinar *Ezrin* com a lligand intracel·lular de SDC2<sup>125</sup> en la regió C1<sup>126</sup>. En la sobre-expressió de SDC2 en fibroblasts Swiss 3T3, es va observar que aquest SDC indueix la proliferació i l'adhesió<sup>198</sup> i la inducció d'apoptosis en cas de privar les cèl·lules de sèrum, per mitjà de la redistribució en *lipid rafts* de Fas i el seu receptor<sup>199</sup>. En paral·lel es va clonar i caracteritzar el SDC3 humà<sup>200</sup>, determinant que la citoplasmàtica com a regió clau per a la generació de fil·lopodis en cèl·lules CHO-K1<sup>201</sup>. Aprofitant els coneixements assolits en els treballs en el camp de la transició epiteli-mesènquima en hepatòcits<sup>202</sup> i en cèl·lules epitelials de la retina<sup>203</sup>, es va estudiar el rol de SDC2 en aquest fenomen. La sobre-expressió de SDC2 en HT-29 M6 origina un fenotip migrador i relaciona aquesta molècula amb el fenomen transició epiteli-mesènquima, implicat en la tumorigenesis<sup>204</sup> i, a més, es va demostrar el paper de SDC2 en la angiogènesis<sup>205-207</sup>.

HIPÒTESI I OBJECTIUS

---



Degut a l'experiència del grup del Dr. Reina en el món dels HSPG i als coneixements del grup del Dr. Espel en el camp de la immunologia, l'any 2005 es va iniciar una col·laboració per tal d'estudiar el rol dels SDCs en els limfòcits T CD4<sup>+</sup>. En el primer treball publicat es va mostrar que l'expressió en membrana de SDC2 i SDC4 augmenta durant l'activació dels limfòcits T CD4<sup>+</sup> <sup>155</sup>.

La funció de SDC4 en els limfòcits T CD4<sup>+</sup> ha estat àmpliament estudiada en els darrers anys, malgrat això, en el moment d'iniciar aquesta tesis doctoral es desconeixia la funció de SDC2 en aquest tipus cel·lular. Així doncs, i degut a la presència d'un domini intracel·lular amb capacitat de transmetre senyals, la hipòtesi de treball és que **SDC2 podria regular la funció dels limfòcits T CD4<sup>+</sup> a través de la modulació de la senyalització intracel·lular.**

Basant-nos en aquesta hipòtesi, l'objectiu principal de la present tesis doctoral és definir la funció de SDC2 en els limfòcits T CD4<sup>+</sup>. Els objectius específics marcats per tal d'assolir aquest objectiu són els següents:

- Determinar la funció de SDC2 durant l'adhesió de les Jurkat-SDC2 a l'endoteli i a les APCs.
- Determinar la funció de SDC2 durant l'activació de les Jurkat-SDC2.

Complementàriament a l'estudi de la funció de SDC2 en els limfòcit T CD4<sup>+</sup>, vam observar que el *knock-down* d'ERK5 en la línia cel·lular Jurkat provocava un increment en els nivells en superfície del complex TCR/CD3. Així doncs, la nostra hipòtesi de treball paral·lela és que **ERK5 podria regular l'expressió en la superfície cel·lular del complex TCR/CD3.**

L'objectiu principal va ser determinar el rol d'ERK5 en la regulació del nivell en membrana del complex TCR/CD3 mitjançant l'estudi del *knock-down* d'ERK5 en la línia cel·lular Jurkat, l'estudi de la inhibició farmacològica d'ERK5 en limfòcit T CD4<sup>+</sup> primaris humans i l'estudi del *knock-out* d'ERK5 en el limfòcits T de ratolí.



MATERIAL I MÈTODES

---





# 1. Material i reactius

## 1.1 Taules de material i reactius usats regularment

### 1.1.1 Taula de tampons

Nom	Composició
D-PBS (Tampó fosfat salí Dulbecco's) 1X	100 mM NaCl 2,6 M KCl 1,4 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 8 mM Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> en H <sub>2</sub> O i pH 7,4
D-PBS-EDTA 1X	D-PBS 0,5 M EDTA en H <sub>2</sub> O i pH 7,4
D-PBS-Ca <sup>2+</sup> -Mg <sup>2+</sup> 1X	D-PBS 0,5 mM MgCl <sub>2</sub> 1,12 mM CaCl <sub>2</sub> en H <sub>2</sub> O i pH 7,4

### 1.1.2 Taula de medis de cultiu

Nom	Casa comercial; Referència
RPMI 1640	Lonza; BE12-702F
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Lonza; BE12-707F
MEM 199 (Medi Essencial Mínim 199) o M199	Gibco; 11150-059

### 1.1.3 Taula de suplementes als medis de cultiu

Nom	Estoc	Casa comercial; Referència
Fetal Bovine Serum (FBS)	100%	Lab Clinic; A15-101
Hyclone FBS, Super Low IgG	100%	GE HealthCare Life Sciences; SH3015103IH
L-Glutamina (L-Gln)	200 mM (100X)	Lonza; 17905C
Penicil·lina i estreptomina (P/S)	10 kU/mL – 10 g/L (100X)	Lonza; DE17062F
$\beta$ -Mercaptoetanol	55 mM	Gibco; 21985-023
HEPES	1 M	Lonza; BE17-737
Piruvat sòdic	100 mM	Lonza; BE13-115
Heparina	10 g/L	Sigma; H3149
Endothelial Cell Growth Supplement from bovine pituitary (ECGS)	3 g/L	Upstate; 02-102
Geneticina (G418)	500 g/L	Gibco; 11811-031
Puomicina	50 g/L	Sigma; P7255
Zeocina	100 g/L	ThermoFisher Scientific; R250-01
Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA)	1 g/L	Sigma; P1585
Fitohemaglutinina (PHA)		Sigma; L1668
anti-CD28	Sobrenedant	Dr. Pedro Romero; clon CK248 (IgM)
hIL-2 (Interleucina-2 humana)	-	Immunotools; 11340025
hIL-1 $\beta$ (Interleucina-1 $\beta$ humana)	-	Immunotools; 11340013
hIL-23 (Interleucina-23 humana)	-	Immunotools; 11340232
hTNF- $\alpha$ (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ humana)	-	Immunotools; 11343015

### 1.1.4 Taula d'oligonucleòtids

Nom	Tipus	Seqüència (5' → 3')	Temperatura d'hibridació	Espècie
SDC2	Forward	TCGGCGGAGTCGGAGCAGAG	60 °C	Humà
	Reverse	CAGAAGCGTAGTCATCGTCATCA		
CD11a	Forward	AAATGGAAGGACCCTGATGCTC	57,5 °C	
	Reverse	TGTAGCGGATGATGTCTTTGGC		
CD18	Forward	GTGCTGAAGCTGACCAACAA	56 °C	
	Reverse	AAATGGAAGCCGTCATCAGT		
ERK5	Forward	GCCTATGGAGTGGTGTCTC	56 °C	
	Reverse	GGTCGCTTTCCATCAGGTC		
TCR $\zeta$	Forward	CAGCTCTTTCTGAGGGAAA	56 °C	
	Reverse	TCTCAGGAACAAGGCAGTGA		
IL-2	Forward	AACTCACCAGGATGCTCACA	56,5 °C	
	Reverse	GCACTTCCTCCAGAGGTTTG		
RORC	Forward	TTTTCCGAGGATGAGATTGC	60 °C	
	Forward	CTTTCCACATGCTGGCTACA		
18S		TATAA Biocenter (#RRN18S)	58 °C	
pSecTag	Forward	AGAGGGCCCAACAATCAAGC	59,5 °C	Cloning SDC2-IgG2a
	Reverse	ACCAGTGGAACCTGGAACC		
SDC2 (Extracel·lular)	Forward	TCCAGGTTCCACTGGT GAGTCGAGAGCAGAGCTGA	58 °C	
	Reverse	TGATTGTGGGCCCTCTTTTAAA CAGACTGTCTGAGTGT		
ERK5 fl/fl	Forward	TCCATGCTGTTAGTCCTTTGG	57 °C	Ratolí
	Reverse	AGCGGCTGTGAAGAGTGAAT		
CRE	Forward	CGAGTGATGAGGTTGCAAG	56,2 °C	
	Reverse	ATCTTCAGGTTCTGCGGGAA		
ERK5 (genòmic)	Forward	GCTTCTCCCTGTGATGTGAG	61 °C	
	Reverse	TGAGCTGTCACGGGCTTTTCG		
Foxp3	Forward	TCCAGAGAGAAGTGGTGCAGTCTC	61 °C	
	Reverse	GTGGCTACGATGCAGCAAGAGCTC		
TCR $\zeta$	Forward	AGCCCTGTACCTGAGAGCAA	57 °C	
	Reverse	CTGTTTGCCCTCCCATCTCTG		

### 1.1.5 Taula de plasmidis

Insert_ Plasmidi	Definició	Selecció	Procedència
pcDNA3	Plasmidi control sense insert	G418	-
hSDC2_pcDNA3	SDC2 humà	G418	Dr. Enric Espel
hSDC2-ΔEFYA_pcDNA3	SDC2 humà sense el domini citoplasmàtic C2	G418	Dr. Enric Espel
hSDC2-FAAF_pcDNA3	SDC2 humà amb les mutacions Y179F, S187A, S188A i Y192F en el domini citoplasmàtic	G418	Dr. Enric Espel
pEGFP-C1	Plasmidi control sense insert	G418	-
mTalin1-Head_pEGFP	Domini N-terminal (aa 1-433) de Talin1 murí	G418	Dra. Anna Huttenlocher (Addgene; 32856)
2PH-PLCδ_pEGFP	2 dominis <i>pleckstrin homology</i> de PLCδ en tàndem	G418	Dra. Sergio Grinstein (Addgene; 35142)
pcDNA3-EGFP	Plasmidi control sense insert	-	-
RhoA-T19N_pcDNA3-EGFP	RhoA humà dominant negatiu	-	Dr. Gary Bokoch (Addgene; 12967)
RhoA-Q63L_pcDNA3-EGFP	RhoA humà constitutivament actiu	-	Dr. Gary Bokoch (Addgene; 12968)
Rac1-T17N_pcDNA3-EGFP	Rac1 humà dominant negatiu	-	Dr. Gary Bokoch (Addgene; 12982)
Rac1-Q61L_pcDNA3-EGFP	Rac1 humà constitutivament actiu	-	Dr. Gary Bokoch (Addgene; 12981)
Cdc42-T17N_pcDNA3-EGFP	Cdc42 humà dominant negatiu	-	Dr. Gary Bokoch (Addgene; 12976)
Cdc42Q61L_pcDNA3-EGFP	Cdc42 humà constitutivament actiu	-	Dr. Gary Bokoch (Addgene; 12986)
HA-hARF6_pcDNA3	ARF6 humà	G418	Dr. Thomas Roberts (Addgene; 10834)
HA-hARF6-T27N_pcDNA3	ARF6 humà dominant negatiu	G418	Dr. Thomas Roberts (Addgene; 10831)
pLKO.1	Plasmidi control sense insert	Puromicina	Sigma
shScrambled_pLKO.1	Small hairpin RNA control	Puromicina	Sigma
shERK5_pLKO.1	<i>Small hairpin</i> RNA contra l'exó 2 d'ERK5 humà	Puromicina	Sigma

1.1.6 Taula d'anticossos

Anticòs	Clon (Isotip)	Estoc	Procedència	Consideracions
anti-hSDC2	186.C (mIgG1)	1 g/l	Dr. Espel	Anticòs generat en el nostre laboratori
anti-hCD11a	MEM-25 (mIgG1)	1 g/l	ImmunoTools	-
anti-hCD18	MEM-48 (mIgG1)	1 g/l	ImmunoTools	-
anti-hCD29	MEM-101A	1 g/l	ImmunoTools	Conjugat amb FITC
anti-hCD49d	BU49	1 g/l	ImmunoTools	Conjugat amb FITC
anti-hCD2	LT2	1 g/l	ImmunoTools	Conjugat amb APC
anti-hCD50	MEM-171	1 g/l	ImmunoTools	Conjugat amb PE
anti-hCD54	1H4 (mIgG2b)	1 g/l	ImmunoTools	-
anti-hCD58	MEM-63	1 g/l	ImmunoTools	Conjugat amb PE
anti-hCD18	mAb24	1g/l	Novus Biologicals	Detecta la conformació d'elevada afinitat de LFA-1
anti-hCD3ε	33-2A3 (IgG2a)	2,6 g/l	Dr. Vilella	-
anti-hTCRα/β	IP26 (IgG1)	0,5 g/l	Biolegend	-
anti-hTCRζ	6B10.2 (IgG1)	0,2 g/l	Santa Cruz	Reconeix mTCRζ
anti-hTCRζ-agarosa	6B10.2 (IgG1)	0,5 g/l	Santa Cruz	25% agarosa
anti-hCD25	MAR.93	SN	Dr. Lopez Botet	Hibridoma
anti-hCD69	FN50 (mIgG1)	1 g/l	ImmunoTools	-
anti-hErk1/2	Policlonal (Conill)	1 g/l	Cell Signalling	Reconeix mERK1/2
anti-h-fosfo-ERK1/2	Policlonal (Conill)	1 g/l	Cell Signalling	Reconeix domini TEY Reconeix fosfo-ERK5
anti-hCD28	CK248(mIgM)	SN	Dr. Pedro Romero	Hibridoma
Anti-hTfR	RVS10 (mIgG1)	1 g/l	ImmunoTools	-
Anti-hCD4	RPA-T4	1 g/l	Becton Dickinson	Conjugat amb APC
Anti-hCD95	LT95	1 g/l	ImmunoTools	Conjugat ambFITC
Anti-hMHC-I (hHLA-A/B/C)	W6/32 (mIgG2a)	1 g/l	ImmunoTools	-
anti-hCD161	DX12 (mIgG1)	0,5 g/l	Becton Dickinson	-
anti-hCD196	G034E3 (mIgG2b)	0,5 g/l	Biolegend	-
anti-hERK5	Policlonal (Conill)	1 g/l	Cell Signalling	Reconeix mERK5
anti-hLAMP1	Policlonal (Conill)	1 g/l	Sigma	Conjugat amb Cy3

anti-Ubiquitina	P4D1 (mIgG1)	0,2 g/l	Santa Cruz	Múltiples espècies
anti- $\beta$ -actina	AC-40 (mIgG2a)	1 g/l	Sigma	Múltiples espècies
anti-mCD3 $\epsilon$	145-2C11	0,5 g/l	Biologend	Conjugat amb APC
anti-mCD4	RM4-5	0,5 g/l	Biologend	Conjugat amb APC
anti-mCD8	53-6.3	0,5 g/l	Biologend	Conjugat amb FITC
anti-mCD25	3C7	0,5 g/l	Biologend	Conjugat amb PE
anti-mCD3 $\epsilon$	145-2C11 (hàmsster IgG1)	0,5 g/l	Becton Dickinson	Purificat, sense azida i baixa presència d'endotoxines

- Tots els secundaris són de Thermo Fisher Scientific.

### 1.1.7 Taula d'equips

Nom	Casa comercial
Campana de flux laminar vertical Bio-II-A	Telstar
Incubador Jouan IGO150 <i>Cell Life</i>	Thermo Fisher Scientific
Microcentrífuga refrigerada	Eppendorf; 5424R
Ultracentrífuga refrigerada Jouan CR4.12	Thermo Fisher Scientific
Milli-Q <sup>®</sup> Integral Water Purification System	Millipore
Microscopi de contrast de fases TS100	Nikon
Microscopi de contrast de fases Axiovert 40C	Zeiss
Microscopi de fluorescència invertit BX61	Olympus
Càmara DP70	Olympus
Microscopi confocal TSC SP2	Leica Biosystems
Sistema de quantificació de luminiscència LAS3000	Fujifilm
Micròtom RA303	Leica Biosystems
Fluorímetre Infinite <sup>®</sup> M200PRO	Tecan
Termociclador PCR	Eppendorf
Termociclador PCR-RT StepOne <sup>®</sup> System	Applied Biosystems
Citòmetre FC500 (Analitzador)	Beckman Coulter
Citòmetre Gallios (Analitzador)	Beckman Coulter
Citòmetre FACS Aria III (Separador)	BD Biosciences
Multiporator <sup>®</sup> Electroporation System	Eppendorf
Bomba peristàltica P-1 + Tub de 140 mm de llargada i 2,1 mm de diàmetre intern	GE HealthCare Life Sciences (18-1110-91 + 19-4691-01)
Scepter 2.0 Handheld Automatic Cell Counter	Millipore

### 1.1.8 Taula de kits

Nom	Casa comercial; referència
QIAprep Spin Miniprep kit	Qiagen; 27104
QIAprep Spin Midiprep kit	12643
QIAprep Spin Maxiprep kit	12263
PureLink <sup>®</sup> RNA Mini kit	Life Technologies; 12183018A
BCA protein Assay kit	Pierce; 23225
Super Script <sup>®</sup> III First-Strand Synthesis SuperMix	ThermoFisher Scientific; #11752
GoTaq <sup>®</sup> PCR Master Mix 2X i <i>Buffer Green</i>	Promega; A600A, M791A
Human T CD4 <sup>+</sup> Recovery Column kit	Cedarlane; CL100-5
In Situ Cell Death Detection kit	Roche; 11684795910

### 1.1.9 Taula d'altres reactius

Nom	Estoc	Casa comercial; referència
Dimetil sulfòxid (DMSO)	> 99,5% (especial per biologia molecular)	Sigma; D8418
Tripsina-EDTA	0,5 g/L – 0,2 g/L	Sigma; T3924
Tripsina-EDTA Endo	2,5 g/L – 0,38 g/L	Gibco; 25200-056
Gelatina tipus A porcina	1% (P/V)	Sigma; G1890
Etanol absolut	100%	Panreac; 131086
Isopropanol	> 99,5%	Panreac; 631090
hFibronectina	1 g/L	BD; 356008
Betadine	100%	Meda; 997437.4
Ficoll Histopaque Lymphoprep	1,007 g/l	Axis-Shield, Reactiva; 1114545
dNTPs	10mM	Invitrogen; 10297-018
Tampó de lisis d'eritròcits	-	Cedarlane; RBC-100
DAPI	20 g/L	Sigma; D4592
Annexina V-FITC	-	Immunotools; 31490013
Iodur de Propidi	> 94%	Sigma; 81845
Re-Blot Plus Strong Solution	-	Millipore; #2504
Barreja d'inhibidors de proteases	100X	Sigma; P8340
Barreja d'inhibidors de fosfatases o PhosSTOP	20X	Sigma; 000000004906845001
Biotina unida a agarosa	-	Sigma; B0519
Tampó HipoOsmolar per electroporació	-	Eppendorf; 940002001
Tampó IsoOsmolar per electroporació	-	Eppendorf; 940002109
Calcein-AM	-	ThermoFisher Scientific; C3100MP
Medi de muntatge <i>Vectashield</i> amb DAPI	-	Vector Laboratories; H-1200



Poli-D-lisina (pLys)	-	Becton Dickinson; 354210
PKH67	-	Sigma; PKH67GL
Hoechst 33342	-	Sigma; B2261
Sthapylococcal Enterotoxin D (SED)	-	Toxin Technology; DT303
Pvu I	10 unitats/ $\mu$ L	ThermoFisher Scientific; 25420-118
REact <sup>®</sup> 7 buffer 10X	-	Invitrogen; 16307-019
TMB Substrate Reagent		Becton Dickinson; BDB555214
Bioreactor CELLline CL 100	-	Integra Biosciences; 90005
HiTrap rProtein A Fast Flow	-	GE HealthCare Life Sciences; 17-5079-01

## 1.2 Consideracions generals

- Els cultius cel·lulars s'han dut a terme en condicions d'esterilitat per evitar contaminacions. S'ha usat una campana de flux laminar prèviament esterilitzada amb llum UV i etanol 70%, el material plàstic per a cultiu sempre ha estat nou i estèril, els altres materials usats han estat esterilitzats prèvia utilització i els reactius i medis de cultiu han sigut estèrils.
- Tots els medis usats per el cultiu cel·lular han sigut prèviament escalfats durant 15 minuts a 37°C en un bany, excepte si s'especifica el contrari.
- Per a la seva correcta identificació, en els criovials usats per a la congelació de cèl·lules s'ha escrit el tipus cel·lular, el *pase*, la concentració cel·lular, la data de congelació i el nom de la persona que ha congelat les cèl·lules
- L'incubador s'ha mantingut a 37°C i 5% CO<sub>2</sub>.
- El comptatge cel·lular s'ha dut a terme usant la cambra de Neubauer, excepte si s'especifica el contrari.
- El FBS usat en aquesta tesis ha estat sempre prèviament de-complementat (30 minuts a 56°C).
- L'experimentació usant bacteries s'ha dut a terme al costat d'una flama per preservar l'esterilitat. El material usat per treballar amb DNA ha estat prèviament autoclavat.
- S'han usat puntes amb filtre al treballar amb RNA.
- L'aigua ha estat purificada per mitjà del *Milli-Q<sup>®</sup> Integral Water Purification System* de Millipore. Al llarg d'aquesta tesis aquesta aigua s'ha abreviat com a mQ H<sub>2</sub>O.

## 2. Línies cel·lulars, cultius primaris i ratolins

### 2.1 Cèl·lules en suspensió

#### Material

- Solució criopreservadora → 90% FBS + 10% DMSO (usar-la a 4°C)

## Procediment

- a. Descongelació** → Extreure el criovial d'interès del tanc de N<sub>2</sub> i descongelar el tub en un bany a 37°C durant 5-10 minuts. Afegir medi de cultiu a 37°C gota a gota amb una *Pasteur* de plàstic, agitar suaument durant el procés, mesclar amb un total d'uns 20 mL de medi, centrifugar a 1000 rpm durant 4 minuts per a separar el medi amb DMSO i, finalment, afegir aquestes cèl·lules a un flascó amb medi.
- b. Manteniment** →
- Jurkat: Les cèl·lules Jurkat és una línia immortalitzada de limfòcits T humans provinents d'una leucèmia T aguda, la qual ha estat el model més utilitzat per a l'estudi de la senyalització a través del TCR. En aquest estudi s'han usat dues línies diferents, les Jurkat-8B (CD4<sup>-</sup>) obtingudes del laboratori del Dr. Óscar De la Calle (Hospital de Sant Pau, Barcelona) i les Jurkat-E6.1 (CD4<sup>+</sup>) comprades a ATCC. És un cultiu de cèl·lules en suspensió que s'ha de mantenir entre 0,2 x 10<sup>6</sup> cèl·lules /mL i 10<sup>6</sup> cèl·lules/mL. Cultivar en medi RPMI 1640 amb el 10% FBS, 1% L-Gln, 1% P/S en un incubador humidificat a 37°C i al 5% CO<sub>2</sub>.
  - Daudi: Les cèl·lules Daudi és una línia immortalitzada de limfòcits B humans provinents d'un limfoma de Burkitt. És un cultiu de cèl·lules en suspensió que s'ha de mantenir entre 0,2 x 10<sup>6</sup> cèl·lules /mL i 10<sup>6</sup> cèl·lules/mL. Cultivar en medi RPMI 1640 amb el 10% FBS, 1% L-Gln, 1% P/S en un incubador humidificat a 37°C i al 5% CO<sub>2</sub>.
  - Raji: Les cèl·lules Raji és una línia immortalitzada de limfòcits B humans provinents d'un limfoma de Burkitt. És un cultiu de cèl·lules en suspensió que s'ha de mantenir entre 0,2 x 10<sup>6</sup> cèl·lules /mL i 10<sup>6</sup> cèl·lules/mL. Cultivar en medi RPMI 1640 amb el 10% FBS, 1% L-Gln, 1% P/S en un incubador humidificat a 37°C i al 5% CO<sub>2</sub>.
  - THP-1: La línia cel·lular THP-1 és una línia immortalitzada de monòcits humans provinents d'una leucèmia monocítica aguda. És un cultiu de cèl·lules en suspensió que s'ha de mantenir entre 0,2 x 10<sup>6</sup> cèl·lules /mL i 0,8 x 10<sup>6</sup> cèl·lules/mL. Cultivar en medi RPMI 1640 amb el 10% FBS, 1% L-Gln, 1% P/S i 50µM β-mercaptoetanol en un incubador humidificat a 37°C i al 5% CO<sub>2</sub>.
  - 300.19: La línia cel·lular 300.19 és un limfoblast pre-B murí immortalitzar que es va obtenir del laboratori del Dr. Pablo Engel (Grup de receptors del sistema innat i adaptatiu, Hospital Clínic, UB). És un cultiu de cèl·lules en suspensió que s'ha de mantenir entre 0,2 x 10<sup>6</sup> cèl·lules /mL i 10<sup>6</sup> cèl·lules/mL. Cultivar en medi DMEM amb el 10% FBS, 1% L-Gln, 1% P/S i 50µM β-mercaptoetanol en un incubador humidificat a 37°C i al 5% CO<sub>2</sub>.
  - Cèl·lules mononuclears de sang perifèrica o *peripheral blood mononuclear cells* (PBMCs): Els PBMCs es van obtenir de concentrats de capa leucocitària de mostres de sang perifèrica de donants sans del Banc de Sang i Teixits de Barcelona (Departament de Salut de la Generalitat de Catalunya). Cultivar en medi RPMI 1640 amb el 10% FBS, 1% L-Gln, 1% P/S en un incubador humidificat a 37°C i al 5% CO<sub>2</sub>.
  - Limfòcits T CD4<sup>+</sup>: Els limfòcits T CD4<sup>+</sup> es van aïllar a partir dels concentrats de capa leucocitària de mostres de sang perifèrica de donants sans del Banc de Sang i Teixits de Barcelona per mitjà de cromatografia d'afinitat per selecció negativa (veure secció 3.1 de material i mètodes). Cultivar en medi RPMI 1640 amb el 10% FBS, 1% L-Gln, 1% P/S en un incubador humidificat a 37°C i al 5% CO<sub>2</sub>.

- c. **Congelació** → Centrifugar les cèl·lules 1500 rpm durant 5 minuts, ressuspènere en 1 mL de solució criopreservadora i afegir-ho en el criovial prèviament rotulat, ràpidament introduir el criovial a la caixa de congelació que es troba a 4°C (*freezing container nalgene*) i deixar-la a -80°C. Després de 24-48 hores, introduir el criovial en el tanc de N<sub>2</sub> líquid.

## 2.2 Cèl·lules en adhesió

### 2.2.1 CHO-K1

Les cèl·lules CHO-K1 són cèl·lules epitelials derivades com a sub-clon de la línia cel·lular CHO, unes cèl·lules hipo-diploides provinents d'una biòpsia d'ovari d'un hàmtster xinès (*Cricetulus barabensis*). És la línia cel·lular més utilitzada en l'actualitat per a la producció de proteïnes recombinants degut a la seva elevada capacitat de producció proteica i la seva facilitat en ser transfectades.

#### Material

- Medi de cultiu → DMEM
- Medi complet → DMEM-10% FBS, 1% L-gln, 1% P/S
- PBS-EDTA
- Tripsina-EDTA
- Solució criopreservadora: 90% FBS, 10% DMSO (usar-la a 4°C)

#### Procediment

- a. **Descongelació** → Extreure el criovial d'interès del tanc de N<sub>2</sub> i descongelar el tub en un bany a 37°C durant 5-10 minuts. Afegir medi de cultiu a 37°C gota a gota amb una *Pasteur* de plàstic, agitar suaument durant el procés i, finalment, afegir aquestes cèl·lules a un flascó amb medi.
- b. **Manteniment** → És important observar el cultiu diàriament per conèixer l'estat de les cèl·lules. Cada dos dies, si les cèl·lules presenten un bon estat i una confluència inferior al 80%, aspirar el medi i afegir 10 mL de medi complet a 37°C.
- c. **Tripsinització** → Si la confluència és superior al 80% s'ha de realitzar un sub-cultiu. Aspirar el medi i afegir 10 mL de PBS-EDTA (2 mM) a 37°C. Aspirar el PBS-EDTA, afegir 10 mL de PBS-EDTA (2 mM) a 37°C i incubar durant 10 minuts a 37°C i al 5% CO<sub>2</sub>. Aspirar el PBS-EDTA, afegir 1 mL de tripsina a 37°C gota a gota amb una *Pasteur* de plàstic i incubar durant 1 minut a 37°C i al 5% CO<sub>2</sub>. Immediatament observar al microscopi si les cèl·lules s'han desadherit, sinó ho han fet tornar les cèl·lules a 37°C i repetir el procés. Nota: No colpejar el flascó ja que es poden fer grumolls. Afegir ràpidament 9 mL de medi complet, ressuspènere i fer un sub-cultiu de rati 1:4 o 1:8 (depenent del percentatge de confluència al començar la tripsinització).
- d. **Congelació** → Centrifugar les cèl·lules a 1000 rpm durant 5 minuts. Aspirar el sobrenedant, disgregar manualment el pellet, ressuspènere en 2 mL de solució criopreservadora i afegir-ho en dos criovials prèviament rotulats. Ràpidament introduir el criovial a la caixa de congelació a 4°C (*freezing container nalgene*) i guardar a -80°C. Després de 24-48 hores, introduir el criovial en el tanc de N<sub>2</sub> líquid.

## 2.2.2 Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC)

Les cèl·lules HUVEC són cèl·lules endotelials humanes primàries, aïllades dels vasos sanguinis de cordons umbilicals humans seguint un protocol de digestió amb col·lagenasa dut a terme prèviament en el laboratori per el Dr. Noguer. Tots els experiments duts a terme en aquesta tesis han estat efectuats usant HUVEC de 3<sup>a</sup> a 6<sup>a</sup> generació.

### Material

- Medi de cultiu → M199
- Medi de manteniment → M199-20% FBS, 1% L-gln, 1% P/S, 1% piruvat sòdic, 2% HEPES
- Medi complet → Medi de manteniment, 1% heparina, 1% ECGS
- Gelatina
- Tripsina-EDTA Endo
- Solució criopreservadora → 70% medi de manteniment, 20% FBS, 10% DMSO (usarla a 4°C).

### Procediment

- Descongelació** → Afegir 2 mL de gelatina 1% a 37°C en un flascó T75 i deixar-ho a 37°C durant mínim 2 hores. Aspirar la gelatina, rentar amb 7 mL M199, aspirar el M199, afegir 7 mL de M199 i deixar-ho mínim 20 minuts a 37°C. Aspirar el medi, afegir 9 mL de medi de manteniment i deixar-ho a 37°C mentre es descongelen les cèl·lules. Extreure el criovial d'interès del tanc de N<sub>2</sub> i descongelar el tub en un bany a 37°C durant 10 minuts. Afegir medi de manteniment a 37°C gota a gota amb una *Pasteur* de plàstic, agitar suaument durant el procés i afegir aquestes cèl·lules al flascó prèviament preparat. Després de 2 hores a 37°C, aspirar el medi que conté DMSO i afegir 10 mL de medi complet.
- Manteniment** → És important observar el cultiu diàriament per conèixer l'estat de les cèl·lules. Cada dos dies, si les cèl·lules presenten un bon estat i una confluència inferior al 80-90%, aspirar el medi i afegir 10 mL de medi complet a 37°C.
- Tripsinització** → Si la confluència és superior al 80-90% s'ha de realitzar un subcultiu. Aspirar el medi i afegir 10 mL de PBS-EDTA (2 mM) a 37°C. Aspirar el PBS-EDTA, afegir 10 mL de PBS-EDTA (2 mM) a 37°C i incubar durant 10 minuts a 37°C i al 5% CO<sub>2</sub>. Aspirar el PBS-EDTA, afegir 1 mL de tripsina-EDTA endo a 37°C gota a gota amb una *Pasteur* de plàstic i incubar durant 1 minut a 37°C i al 5% CO<sub>2</sub>. Immediatament observar al microscopi si les cèl·lules s'han desadherit, sinó ho han fet, colpejar suaument. Afegir ràpidament 5 mL de medi complet, ressuspendre i traspasar 2 mL a un nou flascó (que conté 8 mL de medi complet i prèviament recobert en gelatina, com s'ha explicat en l'apartat de descongelació). La resta de cèl·lules (4 mL) han de ser congelades.
- Congelació** → Centrifugar els 4 mL a 1000 rpm durant 5 minuts. Aspirar el sobrenedant, disgregar manualment el pellet, ressuspendre en 2 mL de solució criopreservadora i afegir-ho en dos criovials prèviament rotulats. Ràpidament introduir el criovial a la caixa de congelació a 4°C (*freezing container nalgene*) i guardar a -80°C. Després de 24-48 hores, introduir el criovial en el tanc de N<sub>2</sub> líquid.

## 2.3 Ratolins

Tots els ratolins usats en aquesta tesi són de *background* C57BL/6 i els experiments duts a terme van ser efectuats usant-los a les 4 setmanes d'edat. Els ratolins *Erk5<sup>loxP/loxP</sup>* van ser facilitats per la Dra. Tournier (Universitat de Manchester, Manchester, Regne Unit), els ratolins *Vav-Cre* pel Dr. Graf (Centre de Regulació Genòmica, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Espanya) i els ratolins *Foxp3<sup>EGFP</sup>* pel Dr. Stratmann (Universitat de Barcelona, Barcelona, Espanya). Els animals van ser tractats seguint les directrius institucionals i lleis nacionals i els procediments van ser aprovats pel Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural de la Generalitat de Catalunya.

### 2.3.1 Genotipat

#### Material

- NaOH 50 mM
- Tris-HCl 0,5 M pH 6,8
- dNTPs
- GoTaq<sup>®</sup> qPCR Master Mix i Buffer Green

#### Procediment

**a. Obtenció del DNA del ratolí** → Obtenir una biòpsia de teixit del ratolí d'interès per mitjà d'un pírcing a l'orella i situar-la en un tub eppendorf. Afegir 400 µL NaOH 50 mM i escalfar a 95°C durant 5 minuts. Pipetejar per tal de disgregar el teixit i escalfar a 95°C durant 5 minuts. Afegir 100 µL Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 i escalfar a 95°C durant 5 minuts. Centrifugar durant 10 o 15 minuts a 15000 rpm per baixar les restes de teixit. Adquirir el sobrenedant (on es troba DNA).

**b. Amplificació** →

Preparar la següent reacció:

Reactiu	Volum (µL)
DNA	2
Forward primer 10 µM	0,4
Reverse primer 10 µM	0,4
GoTaq <sup>®</sup> qPCR Master Mix	10
H <sub>2</sub> O mQ	7

Seguint les següents condicions d'amplificació:

Temperatura (°C)	Cicles	Temps
95	1	1 min
95	30	10 seg
60 (o una altra temperatura en funció dels primers)		20 seg
72		20 seg (o un altre temps depenent de l'allargada de l'amplicó)
72	1	3 min
4	1	∞

- c. Preparar un gel d'agarosa al 1,5%, carregar les mostres i deixar córrer a 70 V durant 30-60 minuts. Observar el resultat en una làmpada de llum UV en la foscor i fer una fotografia.

### 3. Aïllaments cel·lulars

#### 3.1 Aïllament de limfòcits T CD4<sup>+</sup> humans

##### Material

- *Ficoll Histopaque Lymphoprep*
- *Human T CD4<sup>+</sup> Recovery Column kit*
- Concentrat de capa leucocitària (Banc de Sang i Teixits de Barcelona)
- Medi de cultiu → RPMI
- Medi complet → RPMI-10% FBS, 1% L-Gln, 1% P/S
- Xeringa (10 mL) i agulla (19G)
- PHA
- anti-CD28 (Sobrenedant de hibridoma CK248)
- hIL-2

##### Procediment

- a. Treure el *Ficoll Histopaque Lymphoprep* de 4°C, deixar-lo a temperatura ambient 15 minuts abans de començar l'experiment i preparar un tub de 50 mL amb 10 mL de *Ficoll Histopaque Lymphoprep* per a cada donant a processar. Escalfar el RPMI i el RPMI-10% FBS a 37°C.
- b. **Obtenció dels PBMCs** → Agitar la bossa amb sang de donants sans que conté el concentrat de capa leucocitària i esterilitzar amb etanol 70% la zona on s'introduirà l'agulla. Introduir l'agulla i extreure la sang. Nota: Aquest és un pas crític, fer-ho lentament per evitar la lisis cel·lular i posterior formació de grumolls en la mostra degut a l'alliberament de DNA. Afegir lentament 15 mL de sang a sobre del tub amb Ficoll, evitant que es barregin. Centrifugar a 2000 rpm durant 20 minuts a temperatura ambient i sense el fre de la centrífuga per evitar turbulències i que es barregi un cop acabada la centrifugació. Recuperar la capa de PBMCs en un tub cònic de 15 mL, afegir RPMI (a 37°C) fins a 12 mL, barrejar per inversió i centrifugar a 1600 rpm durant 8 minuts a temperatura ambient i sense el fre de la centrífuga. Descartar el sobrenedant, ressuspendre mecànicament, afegir 10 mL de RPMI (a 37°C), barrejar per inversió i centrifugar a 1500 rpm durant 5 minuts a temperatura ambient i sense el fre de la centrífuga. Descartar el sobrenedant, ressuspendre mecànicament, afegir 5 mL de RPMI-10% FBS (a 37°C), barrejar per inversió i fer un comptatge amb la cambra de Neubauer. Finalment, ressuspendre els PBMCs a una concentració de 10<sup>7</sup> cèl·lules/mL en RPMI-10% FBS.
- c. **Enriquiment de limfòcits i/o monòcits** → Nota: La capacitat d'adherència dels monòcits al plàstic permet fer un fàcil enriquiment de les poblacions de limfòcits i monòcits. Afegir 20 mL dels PBMCs del pas anterior a un flascó de T175 i incubar 20 minuts a 37°C. Recuperar els 20 mL en un tub net, fer un comptatge amb la cambra de Neubauer i ressuspendre els limfòcits a una concentració de 10<sup>7</sup> cèl·lules/mL en RPMI-10% FBS. Afegir 20 mL de RPMI-10% FBS en el flascó de T175 si es vol utilitzar els monòcits adherits a la placa.

- d. **Aïllament de limfòcits T CD4<sup>+</sup> humans per columnes de cromatografia d'afinitat** → Usar les columnes del *Human T CD4<sup>+</sup> Recovery Column kit* seguint el protocol descrit per Cedarlane. La puresa cel·lular obtinguda és superior al 95% (Figura MM1).
- e. **Activació de limfòcits T CD4<sup>+</sup> humans** → Estimular amb 10 µg/mL PHA, anti-CD28 (CK248) i 20 U/mL de hIL-2, incubar durant 3 dies, rentar 3 vegades amb PBS i incubar almenys 24 hores en medi complet abans d'usar-los en els experiments.

### 3.2 Generació de clons de limfòcits T CD4<sup>+</sup> Th17 humans

#### Material

- *Human T CD4<sup>+</sup> Recovery Column kit*
- Medi de cultiu → RPMI
- Medi complet → RPMI-10% FBS, 1% L-Gln, 1% P/S
- Anti-CD161
- Anti-CD196 (CCR6)
- Goat anti Mouse IgGs-Alexa633
- *Goat anti Mouse IgG2b-Alexa488*
- PHA
- Citocines: hIL-1β, hIL-2, hIL-23
- Donant 1 → Per a la purificació
- Donant 2 → Per a la irradiació

#### Procediment

- a. **Preparació de limfòcits T CD4<sup>+</sup> humans** → Seguir el protocol descrit en l'apartat 3.1.
- b. **Irradiació de PBMCs** → Seguir el protocol descrit en l'apartat 3.1. Un cop aïllats els PBMCs, ressuspendre a 10<sup>7</sup> cèl·lules/mL en RPMI. Fer 4 cicles d'irradiació a 25 Gy en el servei d'hematologia i oncologia del Hospital Clínic. Nota: Congelar alíquotes per utilitzar PBMCs irradiats després del dia de la irradiació.
- c. **Sorting de la població CD161/CCR6** → Ressuspendre 20 x 10<sup>6</sup> cèl·lules en 4 mL RPMI-10% FBS. Centrifugar les cèl·lules a 1500rpm durant 5 minuts, aspirar el sobrenedant, afegir 4 mL de la MIX del anti-CD161 (2,5 µg anti-CD161(IgG1)/mL PBS-1% FBS) i incubar 30 minuts a 4°C. Afegir 10 mL PBS-1% FBS, barrejar per inversió, centrifugar les cèl·lules a 1500 rpm durant 5 minuts, aspirar el sobrenedant, afegir 4 mL de la barreja del secundari *Goat anti Mouse IgGs-a633* (2 µg GaM-IgGs-a633/mL PBS-1% FBS) i incubar 30 minuts a 4°C. Afegir 10mL PBS-1% FBS, barrejar per inversió, centrifugar les cèl·lules a 1500 rpm durant 5 minuts, aspirar el sobrenedant, afegir 4 mL de la barreja del anti-CD196 (2,5 µg anti-CD196(IgG2b)/mL PBS-1% FBS) i incubar 30 minuts a 4°C. Afegir 10 mL PBS-1% FBS, barrejar per inversió, centrifugar les cèl·lules a 1500 rpm durant 5 minuts, aspirar el sobrenedant, afegir 4 mL de la barreja del secundari *Goat anti Mouse IgG2b-a488* (0,66 µg GaM-IgG2b-a488/mL PBS-1% FBS) i incubar 30 minuts a 4°C. Afegir 10 mL PBS-1% FBS, barrejar per inversió, centrifugar les cèl·lules a 1500 rpm durant 5 minuts, aspirar el sobrenedant i ressuspendre les 20 x 10<sup>6</sup> cèl·lules en 1,5 mL FBS. Efectuar la separació cel·lular en el FACSaria (Figura MM1).
- d. **Cultiu i estimulació** → Repartir les cèl·lules en plaques de 96 pous a raó d'una cèl·lula en cada pou, el volum final del qual serà 100 µL.

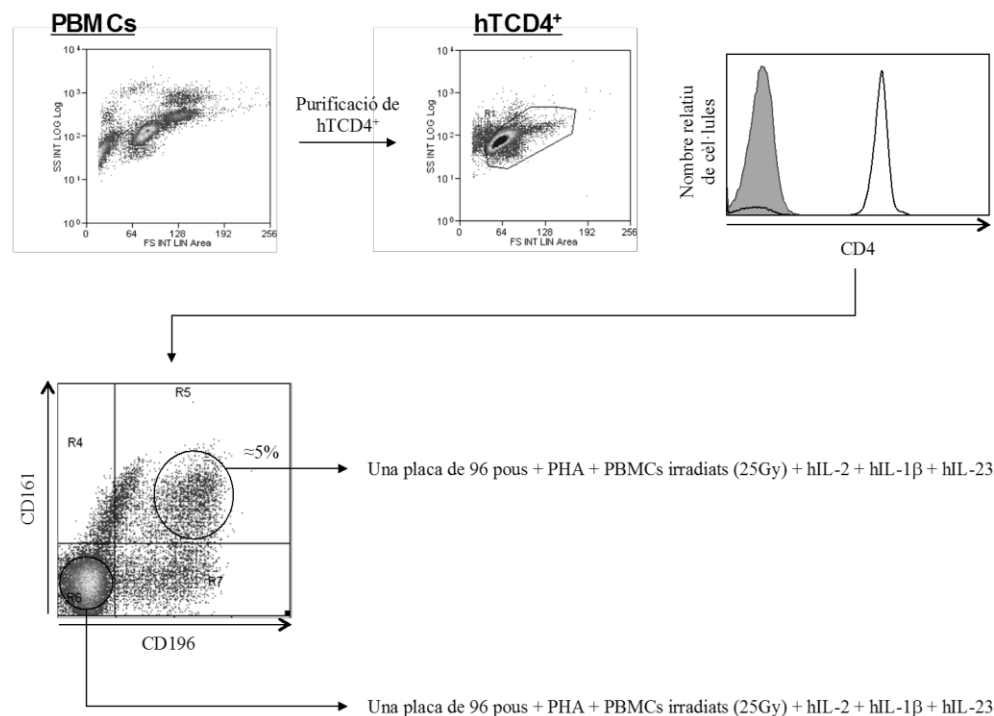
Dia 0	PBMCs al·logènics irradiats	PHA	hIL-2	hIL-1β	hIL-23
CD4 <sup>+</sup> CD161 <sup>-</sup> CD196 <sup>-</sup>	0,2 x 10 <sup>6</sup> cèl·lules	2,5 µg/mL	5 ng/mL	10 ng/mL	20 ng/mL
CD4 <sup>+</sup> CD161 <sup>+</sup> CD196 <sup>+</sup>	0,2 x 10 <sup>6</sup> cèl·lules	2,5 µg/mL	5 ng/mL	10 ng/mL	20 ng/mL

Estimular el cultiu setmanalment durant 4 setmanes.

Dia 7, 14 i 21	PBMCs al·logènics irradiats	PHA	hIL-2	hIL-1β	hIL-23
CD4 <sup>+</sup> CD161 <sup>-</sup> CD196 <sup>-</sup>	0,1 x 10 <sup>6</sup> cèl·lules	-	5 ng/mL	10 ng/mL	20 ng/mL
CD4 <sup>+</sup> CD161 <sup>+</sup> CD196 <sup>+</sup>	0,1 x 10 <sup>6</sup> cèl·lules	-	5 ng/mL	10 ng/mL	20 ng/mL

En cada placa sembrar un pou amb 100 cèl·lules com a control positiu de creixement i un pou amb 100 cèl·lules però sense PBMCs irradiats i un pou amb PBMCs irradiats però sense cap cèl·lula com a controls negatius de creixement.

- e. **Anàlisi dels clons obtinguts** → Analitzar el mRNA de *RORC* per mitjà de RT-PCR com a marcador de limfòcits CD4<sup>+</sup> Th17.



**Figura MM1.** Esquema del *sorting* per a la generació de Th17.

### 3.3 Aïllament de cèl·lules de la melsa i del tim dels ratolins

#### Material

- Ratolins a analitzar
- Medi de cultiu → RPMI
- Medi complet → RPMI-10% FBS, 1% L-Gln, 1% P/S
- Material quirúrgic (prèviament autoclavat)
- PBS-5% Betadine
- Tampó de lisis d'eritròcits



## Procediment

- a. **Eutanàsia i extracció de l'òrgan** → Sacrificar l'animal per dislocació cervical. Clavar les potes amb agulles per accedir amb comoditat al ventre. Obrir el peritoneu, extreure la melsa i situar-la en una placa de Petri amb PBS a 4°C. Nota: Mantenir l'òrgan permanentment a 4°C. Tallar el diafragma, obrir el tòrax, extreure el tim i situar-lo en una placa de petri amb PBS a 4°C. Nota: Anar amb compte per no rebentar cap artèria ni vena.
- b. **Esterilització i disgregació** → Aspirar el PBS, afegir un volum suficient de PBS-Betadine que permeti cobrir tot l'òrgan per tal d'esterilitzar-lo i incubar 5 minuts a 4°C. Aspirar i fer 3 rentats amb PBS. Afegir 5 mL de PBS-2% FBS en la placa de Petri, col·locar l'òrgan entre les bandes rugoses de dos portaobjectes i disgregar físicament. Nota: S'observa com el PBS-2% PBS es torna tèrbol, indicant la presència de les cèl·lules.
- c. **Lisis d'eritròcits** → Recollir els 5 mL i traspasar-los a un tub de 15 mL. Rentar la placa de Petri 3 vegades amb 2 mL de PBS-2% FBS per obtenir el màxim de cèl·lules i traspasar cada rentat al mateix tub de 15 mL. Mantenir les cèl·lules a 4°C durant 5 minuts, recollir 10,5 mL i traspasar-los a un nou tub de 15 mL. Nota: El pellet són restes de teixit connectiu. Mantenir les cèl·lules a 4°C durant 5 minuts, recollir 10 mL i traspasar-los a un nou tub de 15 mL. Centrifugar a 1500 rpm durant 5 minuts, descartar el sobrenedant i ressuspendre en 2 mL de tampó de lisis d'eritròcits. Incubar 5 minuts a temperatura ambient i donar cops suaus ocasionals, afegir 8 mL PBS-2% FBS, centrifugar a 1500 rpm durant 5 minuts i descartar el sobrenedant. Repetir el procés fins que el pellet passi de vermell a blanc. Finalment, ressuspendre en RPMI-10% FBS i traspasar les cèl·lules a una placa T75 per incubar les cèl·lules a 37°C.

## 4. Tècniques cel·lulars, moleculars, bioquímiques i histològiques

### 4.1 Citometria de flux i separació cel·lular (FACS)

#### 4.1.1 Marcatge extracel·lular per citometria de flux

##### Material

- Tampó de rentat → PBS, 1% FBS
- Tampó de marcatge → PBS, 1% FBS, anticòs (1 µg d'anticòs per cada 10<sup>6</sup> cèl·lules)
- DAPI

##### Procediment

- a. Agafar en un eppendorf 0,2 x 10<sup>6</sup> cèl·lules d'interès per punt experimental.
- b. **Marcatge amb l'anticòs primari** → Aspirar el sobrenedant i ressuspendre les cèl·lules durant 30 minuts en gel en 0,1 mL de tampó de marcatge de l'anticòs primari. Afegir 0,4 mL de tampó de rentat, barrejar per inversió i centrifugar les cèl·lules a 2200 rpm durant 1 minut, girar el tub 180° per a millor focalitzar el precipitat cel·lular i centrifugar-les a 2200 rpm durant 2minuts.
- c. **Marcatge amb l'anticòs secundari** → Aspirar el sobrenedant i ressuspendre les cèl·lules durant 30 minuts en gel i a la foscor, en 0,1 mL de tampó de marcatge de l'anticòs secundari. Afegir 0,4 mL de tampó de rentat, barrejar per inversió i centrifugar

les cèl·lules a 2200 rpm durant 1 minut, girar el tub 180° i centrifugar-les a 2200 rpm 2 minuts. Aspirar el sobrenedant i ressuspendre en 0,5 mL de tampó de rentat.

- d. **FACS** → Dur les mostres en gel i a la foscor, afegir DAPI i fer l'anàlisi per citometria de flux sobre les cèl·lules vives (DAPI-negatives) en els citometres Gallios o FC500 de Beckman Coulter.

#### 4.1.2 Anàlisi d'apoptosis mitjançant la unió d'Annexina V

##### Material

- Annexina V-FITC
- Tampó d'unio amb Annexina V → 10 mM HEPES NaOH pH 7,4, 140 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, Annexina V-FITC (dilució 1:20)
- Tampó de rentat → 10 mM HEPES NaOH pH 7,4, 140 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>
- DAPI
- Iodur de Propidi

##### Procediment

- Agafar en un eppendorf 0,2 x 10<sup>6</sup> cèl·lules d'interès per punt experimental.
- Marcatge amb Annexina V** → Aspirar el sobrenedant i ressuspendre les cèl·lules durant 15 minuts a temperatura ambient en 0,1 mL de tampó d'unio amb Annexina V. Afegir 0,4 mL de tampó d'unio (sense Annexina V), contenint DAPI o PI, barrejar per inversió.
- FACS** → Dur les mostres en gel i a la foscor, i fer l'anàlisi per citometria de flux en els citometres Gallios o FC500 de Beckman Coulter.

#### 4.1.3 Marcatge intracel·lular per citometria de flux

##### Material

- Tampó de fixació → PBS, 1% FBS, 1% CH<sub>2</sub>O
- Tampó de permeabilització → PBS, 1% FBS, 0,2% Saponina
- Tampó de rentat → PBS, 1% FBS
- Tampó de marcatge → PBS, 1% FBS, 0,2% Saponina, anticòs (1 µg d'anticòs per cada 10<sup>6</sup> cèl·lules)
- DAPI

##### Procediment

- Agafar en un eppendorf 0,5 x 10<sup>6</sup> cèl·lules d'interès per punt experimental.
- Fixació** → Centrifugar les cèl·lules a 2200 rpm durant 1 minut, girar el tub 180° i centrifugar-les a 2200 rpm durant 2 minuts. Aspirar el sobrenedant i fixar les cèl·lules durant 10 minuts a temperatura ambient en 0,2 mL de tampó de fixació. Nota: Les cèl·lules fixades en aquest pas poden ser directament congelades a -80°C per usar-les més endavant. Al descongelar, les cèl·lules s'han de posar a 37°C i seguir el protocol. Afegir 1 mL de tampó de rentat, barrejar per inversió i centrifugar les cèl·lules a 2200 rpm durant 1 minut, girar el tub 180° i centrifugar-les a 2200 rpm durant 2 minuts.
- Permeabilització** → Aspirar el sobrenedant i permeabilitzar les cèl·lules durant 35 minuts en gel en 0,5 mL de tampó de permeabilització. Centrifugar les cèl·lules a 2200 rpm durant 1 minut, girar el tub 180° i centrifugar-les a 2200 rpm durant 2 minuts.
- Marcatge amb l'anticòs primari** → Aspirar el sobrenedant i ressuspendre les cèl·lules durant 1 hora en gel en 0,1 mL de tampó de marcatge amb l'anticòs primari. Afegir 1

mL de tampó de permeabilització (per a diluir l'anticòs), barrejar per inversió i incubar 15 minuts a temperatura ambient. Centrifugar les cèl·lules a 2200 rpm durant 1 minut, girar el tub 180° i centrifugar-les a 2200 rpm durant 2 minuts.

- e. **Marcatge amb l'anticòs secundari** → Aspirar el sobrenedant i ressuspendre les cèl·lules durant 45 minuts en gel i a la foscor, en 0,1 mL de tampó de marcatge amb l'anticòs secundari. Afegir 1 mL de tampó de permeabilització (per a diluir l'anticòs), barrejar per inversió i incubar 45 minuts a temperatura ambient en la foscor. Centrifugar les cèl·lules a 2200 rpm durant 1 minut, girar el tub i centrifugar-les a 2200 rpm 2 minuts. Aspirar el sobrenedant i ressuspendre en 0,5 mL de tampó de rentat.
- f. **FACS** → Dur les mostres en gel i a la foscor, afegir DAPI i fer l'anàlisi per citometria de flux en els citòmetres Gallios o FC500 de Beckman Coulter.

#### 4.1.4 Separació cel·lular per citometria o *Fluorescence-activated cell sorting* (FACS)

##### Material

- Tampó de rentat → PBS, 1% FBS
- Tampó de marcatge → PBS, 1% FBS, anticòs (1 µg d'anticòs per cada 10<sup>6</sup> cèl·lules).

##### Procediment

- a. Agafar un mínim de 10<sup>7</sup> cèl·lules d'interès per punt experimental i repartir-los en 2 eppendorfs. La conveniència d'agafar més o menys quantitat de cèl·lules depèn del percentatge de la població d'interès dins de la barreja cel·lular.
- b. **Marcatge amb l'anticòs primari** → Aspirar el sobrenedant i ressuspendre 5 x 10<sup>6</sup> de cèl·lules durant 30 minuts en gel en 0,4 mL de tampó de marcatge de l'anticòs primari (1 µg d'anticòs/10<sup>6</sup> cèl·lules). Afegir 0,4 mL de tampó de rentat, barrejar per inversió i centrifugar les cèl·lules a 2200 rpm durant 1 minut, girar el tub 180° i centrifugar-les a 2200 rpm durant 2 minuts.
- c. **Marcatge amb l'anticòs secundari** → Aspirar el sobrenedant i ressuspendre les cèl·lules durant 30 minuts en gel i a la foscor, en 0,4 mL de tampó de marcatge de l'anticòs secundari. Afegir 0,4 mL de tampó de rentat, barrejar per inversió i centrifugar les cèl·lules a 2200 rpm durant 1 minut, girar el tub 180° i centrifugar-les a 2200 rpm durant 2 minuts. Aspirar el sobrenedant i ressuspendre en 0,5 mL de tampó de rentat.
- d. **FACS** → Dur les mostres en gel i a la foscor i fer la separació usant el FACSaria de BD.

## 4.2 Extracció de RNA i RT-PCR

### 4.2.1 Extracció de RNA

##### Material

- *PureLink*<sup>®</sup> *RNA Mini Kit*
- β-mercaptoetanol
- Tampó de lisis → *Lysis buffer* del kit, 1% β-mercaptoetanol
- Etanol pur i H<sub>2</sub>O mQ
- Puntetes de pipeta Gilson *RNase-free*. Nota: Usar-les és clau per evitar la degradació del RNA

### Procediment

- a. Agafar en un eppendorf  $0,5 \times 10^6$  cèl·lules d'interès per punt experimental i mantenir-les en gel.
- b. **Lisis** → Centrifugar les cèl·lules a 2200 rpm durant 1 minut, girar el tub  $180^\circ$  i centrifugar-les a 2200 rpm durant 2 minuts. Aspirar el sobrenedant, ressuspendre en 350  $\mu\text{L}$  de tampó de lisis i pipetejar fins a obtenir un lisat homogeni. Afegir 350  $\mu\text{L}$  de 70% etanol en  $\text{H}_2\text{O}$  mQ, homogeneïtzar i transferir els 700  $\mu\text{L}$  al *Spin Cartridge*.
- c. **Unió, rentat i elució del RNA** → Seguir els passos detallats en el protocol de *Thermo Fisher* ([https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/purelink\\_rna\\_mini\\_kit\\_man.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/purelink_rna_mini_kit_man.pdf)).
- d. Quantificar la concentració de RNA obtinguda amb la placa *NanoQuant* pel *Tecan Infinite<sup>®</sup> 200*. Mantenir el RNA en gel si ha de ser usat immediatament o bé guardar-lo a  $-80^\circ\text{C}$  per evitar la seva degradació.

### 4.2.2 Síntesi del cDNA

#### Material

- *Super Script<sup>®</sup> III First-Strand Synthesis SuperMix* que inclou el *2X Reaction Mix* (oligo(dT)<sub>20</sub>, hexàmers al atzar,  $\text{MgCl}_2$  i dNTPs) i el *Enzyme Mix* (amb la Transcriptasa reversa M-MLV o Moloney Murine Leukemia Virus).

#### Procediment

- a. **Preparar la barreja per a la reacció** → Mesclar en gel 5  $\mu\text{L}$  *2X Reaction Mix* i 1  $\mu\text{L}$  *Enzyme Mix* per cada mostra.
- b. **Preparar la reacció** → Nota: Per tal de minimitzar l'ús dels reactius, vam testar varis volums i aquí s'exemplifica una opció que donava bons resultats.

	Volum ( $\mu\text{L}$ )
Barreja per a la reacció	6
RNA	7

- c. **Retrotranscripció** → Situar les reaccions en el termociclador.

Temperatura ( $^\circ\text{C}$ )	Temps (min)
25	5
50	30
85	5
4	$\infty$

- d. Quantificar la concentració de cDNA obtinguda amb la placa *NanoQuant* pel *Tecan Infinite<sup>®</sup> 200*. Mantenir el cDNA en gel si ha de ser usat immediatament o bé guardar-lo a  $-20^\circ\text{C}$ .

### 4.2.3 RT-PCR o PCR a Temps Real

#### Material

- GoTaq<sup>®</sup> qPCR Master Mix

## Procediment

- a. Preparar el cDNA** → Per a cada punt experimental a testar, fer triplicats: 2,25 µL cDNA (3 x 0,75 µL) + 27,75 µL H<sub>2</sub>O mQ (3 x 9,25 µL). Per un dels punts experimentals, preparar una dilució 1:10 i una dilució 1:100 i preparar els triplicats per a ells per a conèixer l'eficiència de la RT-PCR. Finalment, preparar un tub eppendorf amb només H<sub>2</sub>O mQ com a control negatiu.
- b. Preparar la barreja per a la reacció** → Preparar una barreja per a: (número de punts experimentals x 3) + (dilució 1:10 x 3) + (dilució 1:100 x 3) + (control negatiu x 3) + (3 d'excés). Nota: Per tal de minimitzar l'ús dels reactius, vam testar varis volums i l'ús d'un 80% de *SybrGreen GoTaq® qPCR Master Mix* dona els mateixos resultats que el volum recomanat.

	Volum per a 1X (µL)
<i>GoTaq® qPCR Master Mix</i>	8
<i>Forward primer 10 µM</i>	0,2
<i>Reverse primer 10 µM</i>	0,2
H <sub>2</sub> O mQ	1,6

- c. Preparar la placa** → Pipetejar 9 µL de la barreja per a la reacció a cada pou sense fer bombolles. Un cop tota la placa està repartida, afegir 9 µL del cDNA sense fer bombolles.
- d. Reacció en cadena de la polimerasa** → Situar la placa en el termociclador *StepOne™ Real-Time PCR* i seguir el programa d'amplificació següent:

Passos per l'amplificació	Cicles	Temperatura (°C)	Temps
Activació per calor	1	95	10 min
Desnaturalització	42	95	13 seg
Unió del primer		60*	15 seg
Elongació de la cadena		72	15 seg**

\*Depèn de la parella d'oligonucleòtids utilitzats, \*\*Depèn de l'allargada de l'amplicó

- e. Obtenció i processament de les dades** → Obtenir les corbes d'amplificació per a cada mostra i determinar el *threshold cycle* (Ct) usant el software *StepOne™ V2.1* d'*Applied Biosystems*. Nota: Els triplicats han de presentar una diferència menor de 0.3 Ct per acceptar la mostra com a vàlida. Calcular l'expressió relativa del gen d'interès usant com a control de càrrega els nivells de 18S.

## 4.3 Western Blot

### Material

- Tampó de càrrega (5x) → 7% SDS, 20% glicerol, 62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8) i 0,001% blau de bromofenol. En el cas que interressi condicions reductores en el tractament de les mostres, a aquest tampó se li afegeix 5% β-mercaptoetanol.
- Gels:

	Gel separador 8%	Gel separador 10%	Gel separador 12%	Gel concentrador 4%
H <sub>2</sub> O	3082 µL	3082 µL	3082 µL	1790 µL
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	1750 µL	1750 µL	1750 µL	-
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	-	-	-	730 µL
Acrilamida 30%	2333,3 µL	2333,3 µL	2333,3 µL	400 µL
SDS 10%	140 µL	140 µL	140 µL	60 µL
APS 20%	35 µL	35 µL	35 µL	15 µL
TEMED	10 µL	10 µL	10 µL	5 µL

- Sistema d'electroforesis Mini-Protean de BioRad
- Marcador de pes molecular
- Membrana de nitrocel·lulosa
- Tampó d'electroforesis → 30 g Trizma, 144 g glicina i 10 g de SDS per preparar 1 litre de solució 10X
- Tampó de transferència → 3 g Trizma, 14,42 g glicina, 0,5 g SDS i 200 mL metanol per preparar un volum d'1 litre.
- TBS → 50 mL Tris-HCl 1 M pH 7,4, 150 mL NaCl 5 M i 300 mL H<sub>2</sub>O per preparar 500 mL de solució 10X
- TBS-Tween20 → TBS, 0,1% Tween20
- Tampó de bloqueig → TBS-Tween20, 5% llet descremada
- Kit de quimioluminescència
- Casset per a revelar
- Pel·lícula fotogràfica *BioMax Light Film*
- Solució reveladora i solució fixadora
- Tampó d'*stripping* o de borrat: 4 mL *Re-Blot Plus Strong Solution* + 36 mL H<sub>2</sub>O mQ

### Procediment

- a. **Preparació del gel** → Preparar 7 mL de solució pel separador per cada gel, introduir-lo entre els vidres, posar a sobre una capa d'aigua i deixar reposar en posició vertical fins que polimeritzi. Preparar 3 mL de solució pel concentrador per cada gel, retirar l'aigua de sobre el gel separador, introduir-lo entre el vidres i posar la pinta. Un cop polimeritzat, retirar la pinta i introduir el gel en el recipient ple de tampó d'electroforesis on es durà a terme la electroforesis.
- b. **Preparació de la mostra** → Les mostres provinents dels experiments desitjats han estat prèviament lisades amb el tampó de carrega. Bullir durant 20 minuts a 95°C.
- c. **Electroforesis** → Carregar les mostres en els pous, afegint sempre el marcador de pes molecular en un dels pous. Generalment la electroforesis es duu a terme a 100 V constants, tot i que el voltatge pot variar depenent de les necessitats. Un cop acabada la electroforesis tenim el gel amb les proteïnes separades per pes molecular.
- d. **Transferència** → Preparar el sandvitx en condicions permanentment humides amb el tampó de transferència i evitar la formació de bombolles. Col·locar primer l'esponja, després un paper Whatman 3MM, el gel, la membrana de nitrocel·lulosa, un paper Whatman 3MM i una esponja. Col·locar el sandvitx en el recipient corresponent en el qual es posa un bloc fred i realitzar la transferència a 120 V durant 50 minuts a temperatura ambient. Rentar la membrana en TBS un cop finalitzada la transferència.
- e. **Bloqueig** → Incubar la membrana en tampó de bloqueig 1 hora a temperatura ambient en agitació.
- f. **Incubació amb el primari** → Incubar la membrana en tampó de bloqueig amb el anticòs primari o/n a 4°C en agitació. Rentar la membrana amb TBS-Tween20 un mínim de 4 vegades, cadascun dels quals durant un mínim de 5 minuts.
- g. **Incubació amb el secundari** → Incubar la membrana en tampó de bloqueig amb el anticòs secundari conjugat a HRP 1 hora a temperatura ambient en agitació. Rentar la membrana amb TBS-Tween20 un mínim de 4 vegades, cadascun dels quals durant un mínim de 5 minuts. Rentar la membrana amb TBS un mínim de 3 vegades, cadascun dels quals durant un mínim de 5 minuts.

- h. **Revelat** → Incubar la membrana amb el ECL i exposar i revelar amb la solució reveladora i fixadora per mitjà de film o bé usar el LAS3000 per una lectura directa de la intensitat de la quimioluminescència.
- i. **Stripping** → En cas necessari, rentar la membrana amb TBS un mínim de 3 vegades, cadascun dels quals durant un mínim de 5 minuts. Incubar la membrana en el tampó de *stripping* durant 15 minuts a temperatura ambient. Rentar la membrana amb TBS-Tween20 un mínim de 3 vegades, cadascun dels quals durant un mínim de 5 minuts i finalment procedir amb el bloqueig i posteriors incubacions amb els anticossos.

#### 4.4 Co-immunoprecipitació per el anàlisi de l'estat d'ubiquitinació de TCRζ

##### Material

- Barreja d'inhibidors de proteases
- Barreja d'inhibidors de fosfatases o *PhoSTOP*
- Anticòs contra TCRζ unit a agarosa
- Agarosa-biotina
- Tampó de rentat → 10 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 2,5 mM DTT, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 1X barreja d'inhibidors de proteases, 1X *PhoSTOP* en H<sub>2</sub>O mQ
- Tampó de lisis → 9 mL tampó de rentat + 1 mL Triton-X-100 (20%)

##### Procediment

- a. **Aïllament dels PBMCs** → Aïllar els PBMCs de sang de donants sans tal i com s'ha descrit a l'apartat 3.1 de material i mètodes. Agafar el volum corresponent a 10<sup>8</sup> cèl·lules i resuspendre en 20 mL RPMI-10% FBS.
- b. **Tractament** → Separar els 20 mL en 2 tubs cònics de 50 mL (50 x 10<sup>6</sup> PBMCs per punt experimental), afegir 1 µL de DMSO o l'inhibidor BIX02188, barrejar per inversió i incubar a 37°C durant 1 hora. Afegir a cada punt experimental 1,15 µL d'anti-CD3ε (clon 33-2A3), barrejar per inversió i incubar a 37°C durant 6 hores amb agitació periòdica. Un cop passat el tractament, centrifugar les cèl·lules a 1500 rpm durant 5 minuts, aspirar el sobrenedant i resuspendre en 10 mL de PBS a 4°C. Posteriorment, centrifugar les cèl·lules a 1500 rpm durant 5 minuts, aspirar el sobrenedant i resuspendre en 1 mL de PBS a 4°C. Transferir el volum a eppendorfs de 1,5 mL, centrifugar les cèl·lules a 2200 rpm durant 1 minut, girar el tub 180° i centrifugar-les a 2200 rpm durant 2 minuts. Aspirar el sobrenedant i trencar el pellet per mitjà d'un breu ús del vòrtex.
- c. **Lisis** → Nota: D'aquest punt en endavant tots els reactius han d'estar a 4°C i els procediments s'han de dur a terme en gel i en una centrifuga refrigerada. Resuspendre el pellet en 0,5 mL de tampó de rentat i pipetejar suaument. Immediatament afegir 0,5 mL de tampó de lisis (resulta en una concentració final de Triton-X-100 del 1%), pipetejar suaument 10 vegades evitant la formació de bombolles i incubar durant 15 minuts en gel. Centrifugar el lisat cel·lular a 12000 g durant 15 minuts en una centrifuga a 4°C, recuperar 950 µL del sobrenedant i transferir-lo a un nou tub eppendorf. Els nuclis es trobaran en el pellet, els quals seran guardats a -20°C. Nota: El sobrenedant pot ser guardat a -20°C i continuar l'experiment en un altre moment.
- d. **Pre-clearing** → Afegir en el lisat cel·lular 55 µL d'agarosa-biotina i incubar durant 4 hores a 4°C en agitació constant. Nota: Si el sobrenedant va ser guardat, afegir de nou inhibidors de proteases i fosfatases. Centrifugar el lisat cel·lular a 12000 g durant 15 minuts en una

centrífuga a 4°C i transferir 900 µL del sobrenedant a un nou tub eppendorf. Rentar el pellet 3 vegades en 0,5 mL de tampó de rentat pipetejant suaument 10 vegades i centrifugant a 12000 g durant 1 minut en una centrífuga a 4°C, afegir 0,5 mL de tampó de rentat i incubar durant 1 hora a 4°C en agitació constant. Finalment, centrifugar a 12000 g durant 1 minut en una centrífuga a 4°C, descartar el sobrenedant, fer un rentat en PBS, ressuspendre en 100 µL tampó de càrrega de SDS-PAGE i guardar a -80°C.

- e. **Immunoprecipitació** → Afegir en el lisat cel·lular 15 µL de l'anticòs contra TCRζ unit a agarosa i incubar o/n a 4°C en agitació constant. Centrifugar el lisat cel·lular a 12000 g durant 15 minuts en una centrífuga a 4°C i transferir 900 µL del sobrenedant a un nou tub eppendorf. Nota: El sobrenedant es pot usar per a fer co-immunoprecipitacions seqüencials. Rentar el pellet 3 vegades en 0,5 mL de tampó de rentat pipetejant suaument 10 vegades i centrifugant a 12000 g durant 1 minut en una centrífuga a 4°C, afegir 0,5 mL de tampó de rentat i incubar durant 1 hora a 4°C en agitació constant. Finalment, centrifugar a 12000 g durant 1 minut en una centrífuga a 4°C, descartar el sobrenedant, fer un rentat en PBS, ressuspendre en 100 µL tampó de càrrega de SDS-PAGE i guardar a -80°C.
- f. **Anàlisi de l'estat d'ubiquitinació de TCRζ per mitjà de Western blot** → Amb les mostres obtingudes en aquest experiment, determinar l'estat d'ubiquitinació de TCRζ per mitjà de Western blot, usant el protocol descrit en l'apartat 4.3 de material i mètodes.

#### 4.5 Transfecció per electroporació i generació de línies estables

##### Material

- Jurkat → Protocol adaptat per les Jurkat, altre tipus cel·lulars poden requerir variacions.
- Multiporator Eppendorf
- Tampó HipoOsmolar
- Medi de cultiu → RPMI
- Medi complet → RPMI-10% FBS, 1% L-Gln, 1% P/S
- Cubetes d'electroporació (4 mm d'amplada)

##### Procediment

- a. **Preparació de les cèl·lules** → Ressuspendre  $2 \times 10^6$  cèl·lules en 5 mL RPMI. Centrifugar les cèl·lules a 1500 rpm durant 5 minuts, aspirar el sobrenedant, afegir 800 µL tampó HypoOsmolar i incubar durant 15 minuts a temperatura ambient. *Nota: El temps màxim en que les Jurkat poden estar en HypoOsm no pot excedir els 30 minuts.* Afegir el plasmidi a transfectar a una concentració de 4 µg/mL.
- b. **Electroporació** → Transferir les cèl·lules amb compte a la cubeta d'electroporació i electroporar amb el *Multiporator* usant la següent configuració:

Mode: eukaryotes o “(·)”
Voltage: 630 V
Time constant: 40µs
Pulse number: 1

- c. **Sembra** → Deixar reposar 10 minuts a temperatura ambient, transferir les cèl·lules a un eppendorf amb una *Pasteur* de plàstic i centrifugar a 2000 rpm durant 2 minuts. Ressuspendre en 5 mL RPMI-10% FBS i incubar a 37°C i 5% CO<sub>2</sub>.



- d. **Selecció usant antibiòtics** → Afegir l'antibiòtic de resistència i esperar uns dies fins a l'aparició dels primers clons resistents. Amplificar el cultiu, testar els nivells de la molècula d'interès (per citometria de flux o Western Blot) i congelar les línies d'interès.

## 4.6 Microscopia de fluorescència i confocal

### 4.6.1 Marcatge extracel·lular per microscopia

#### Material

- Tampó de rentat → PBS-1% FBS
- Tampó de marcatge → PBS-1% FBS, anticòs (1 µg d'anticòs per cada 10<sup>6</sup> cèl·lules).
- Tampó de fixació → PBS-1% FBS, 1% CH<sub>2</sub>O
- Medi de muntatge *Vectashield* amb DAPI

#### Procediment

- a. Agafar en un eppendorf 0,2 x 10<sup>6</sup> cèl·lules d'interès per punt experimental.
- b. **Marcatge amb l'anticòs primari** → Aspirar el sobrenedant i ressuspèndre les cèl·lules durant 30 minuts en gel en 0,1 mL de tampó de marcatge de l'anticòs primari. Afegir 0,4 mL de tampó de rentat, barrejar per inversió i centrifugar les cèl·lules a 2200 rpm durant 1 minut, girar el tub 180° i centrifugar-les a 2200 rpm durant 2 minuts.
- c. **Fixació** → Aspirar el sobrenedant i afegir 500 µL de tampó de fixació durant 10 minuts a temperatura ambient per fixar les cèl·lules. *Nota: Les cèl·lules fixades en aquest pas poden ser directament congelades a -80°C per usar-les més endavant.* Barrejar per inversió i centrifugar les cèl·lules a 2200 rpm durant 1 minut, girar el tub 180° i centrifugar-les a 2200 rpm durant 2 minuts. Aspirar el sobrenedant i repetir el procés 3 vegades amb tampó de rentat.
- d. **Marcatge amb l'anticòs secundari** → Aspirar el sobrenedant i ressuspèndre les cèl·lules durant 30 minuts en gel i a la foscor, en 0,1 mL de tampó de marcatge de l'anticòs secundari. Afegir 0,4 mL de tampó de rentat, barrejar per inversió i centrifugar les cèl·lules a 2200 rpm durant 1 minut, girar el tub 180° i centrifugar-les a 2200 rpm durant 2 minuts.
- e. **Muntatge del portaobjectes i visualització** → Aspirar el sobrenedant i ressuspèndre les cèl·lules en 7 µL medi de muntatge. Procedir al muntatge del cobreobjectes en el portaobjectes. Finalment, visualitzar les cèl·lules usant el microscopi de fluorescència Olympus BX61 i prenent les fotos amb la càmera Olympus DP70, o bé, usant el microscopi confocal Leica TCS SP2 i prenent les imatges usant l'objectiu Leitz Plan-Apochromatic 63X (1,32 NA).

### 4.6.2 Marcatge intracel·lular per microscopia

#### Material

- pLys
- Tampó de fixació → PBS-1% FBS, 1% CH<sub>2</sub>O
- Tampó de permeabilització → PBS-1% FBS, 0,2% Saponina
- Tampó de rentat → PBS-1% FBS
- Tampó de marcatge → PBS-1% FBS, 0,2% Saponina, anticòs (1 µg d'anticòs per cada 10<sup>6</sup> cèl·lules).

- Medi de muntatge *Vectashield* amb DAPI

#### Procediment

- Preparació dels cobreobjectes** → Col·locar un cobreobjecte en un pou d'una placa de 12 pous. Afegir 10 µg/mL de pLys, assegurar que el cobreobjecte es troba completament cobert i incubar durant 2 hores a 37°C. Aspirar la pLys Nota: Pot ser reutilitzada, i efectuar 3 rentats en PBS per tal d'eliminar l'excés de pLys.
- En el pou on es troba el cobreobjectes, afegir  $0,5 \times 10^6$  cèl·lules d'interès en 500 µL de tampó de rentat. Esperar que sedimentin i s'adhereixin a la pLys.
- Fixació** → Afegir 500 µL de tampó de fixació durant 10 minuts a temperatura ambient per fixar les cèl·lules. *Nota: Les cèl·lules fixades poden ser directament congelades a -80°C per usar-les més endavant.* Aspirar i rentar 3 vegades amb tampó de rentat.
- Permeabilització** → Aspirar i permeabilitzar les cèl·lules durant 30 minuts en gel en 500 µL de tampó de permeabilització.
- Marcatge amb l'anticòs primari** → Aspirar i marcar les cèl·lules durant 1 hora en gel en 100 µL de tampó de marcatge de l'anticòs primari. Afegir 1 mL de tampó de permeabilització (per diluir l'anticòs) i incubar 15 minuts a temperatura ambient.
- Marcatge amb l'anticòs secundari** → Aspirar i marcar les cèl·lules durant 45 minuts en gel i a la foscor, en 100 µL de tampó de marcatge de l'anticòs secundari. Afegir 1 mL de tampó de permeabilització (per diluir l'anticòs) i incubar 45 minuts a temperatura ambient en la foscor.
- Muntatge del portaobjectes i visualització** → Aspirar el sobrenedant i muntar els cobreobjectes en els portaobjectes usant una gota del medi de muntatge. Finalment, visualitzar les cèl·lules usant el microscopi de fluorescència Olympus BX61 i prenent les fotos amb la càmera Olympus DP70, o bé, usant el microscopi confocal Leica TCS SP2 i prenent les imatges usant l'objectiu Leitz Plan-Apochromatic 63X (1,32 NA).

#### **4.7 Inclusió de teixits en parafina**

##### Material

- Tampó de fixació → 4 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  + 6,5 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  + 100mL *Strong formalin* + 900 mL  $\text{H}_2\text{O}$  mQ
- EDTA
- Etanol
- Butanol
- Parafina

##### Procediment

- Fixació** → Fixar els teixits durant 24 hores a temperatura ambient i en agitació en 10 mL de tampó de fixació en un tub cònic de 15 mL. Rentar en PBS i procedir a la deshidratació en el cas del tim i la melsa, o bé a la descalcificació en el cas de les tíbies i els fèmurs.
- Descalcificació** → Col·locar els ossos en un tub de 15 mL i descalcificar-los en tampó 14% EDTA en PBS en un pH 7,5. Aquest tampó ha de ser canviat cada 2 o 3 dies al llarg de dues setmanes. Finalment, comprovar la completa descalcificació per mitjà d'una prova química de punt i final.

- c. **Deshidratació** → Deshidratar progressivament els òrgans per mitjà d'incubacions de 30 minuts amb etanol 30%, 50% i 70%. Nota: Les mostres es poden mantenir a 4°C en etanol 70% fins el moment de ser incloses en parafina.
- d. **Inclusió en parafina** → Deshidratar les mostres en etanol 70% progressivament per mitjà d'incubacions de 30 minuts amb etanol 80%, 90%, 95% i 100%. Incubar les mostres durant una hora a temperatura ambient amb butanol. Descartar el butanol i fer tres rentats d'una hora amb parafina a 60°C, per tal d'extreure l'excés de butanol. Incloure l'òrgan en parafina i assecat-lo a temperatura ambient. Tallar les mostres en seccions de 10 µm, usant el micròtom RA303 de Leica.

#### 4.8 TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling)

##### Material

- Xilè
- Etanol
- *In Situ Cell Death Detection kit*

##### Procediment

- a. **Desparafinació i re-hidratació** → Incubar les mostres en xilè O/N a temperatura ambient. Hidratar-les per mitjà de rentats successius d'una hora a temperatura ambient en etanol 100%, 70%, 50% i, finalment, H<sub>2</sub>O mQ.
- b. **Tractament amb proteïnasa K** → Incubar la secció de teixit en tampó proteïnasa K durant 30 minuts a 37°C. Rentar dues vegades amb PBS.
- c. **Marcatge** → Rentar una tercera vegada amb PBS i assecat l'àrea al voltant de la mostra a marcar. Afegir 50 µL de tampó de marcatge i incubar durant 1 hora a 37°C, en la foscor i en un ambient humit. Rentar tres vegades amb PBS.
- d. **Anàlisi per microscopia de fluorescència** → Dur les mostres en la foscor i fer l'anàlisi en el microscopi de fluorescència Olympus BX61 usant l'objectiu X20 i prenent les fotografies amb la càmera Olympus DP70.

## 5. Assajos funcionals

### 5.1 Assaig d'adhesió en estàtic

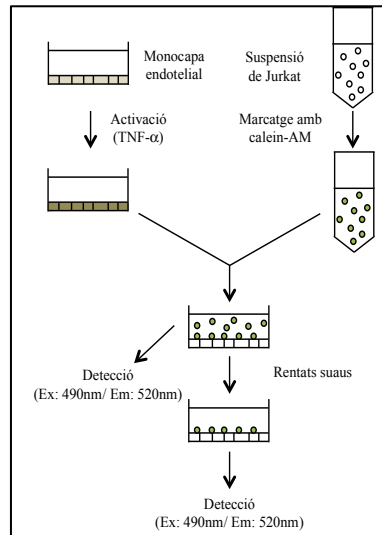
##### Material

- hTNF-α
- Calcein-AM
- PMA
- Medi de cultiu → RPMI
- Medi complet → RPMI-10% FBS, 1% L-Gln, 1% P/S

## Procediment

- a. **Cultiu de les HUVEC** → Cultivar les HUVEC en plaques de 96 pous de fons pla a una densitat de  $0,5 \times 10^4$  cèl·lules per pou. Mantenir el cultiu fins que arribi al 90% de confluència i activar (o no) amb 1 ng/mL de hTNF- $\alpha$  durant 18 hores a 37°C. Rentar la placa un mínim de tres vegades amb RPMI a 37°C i finalment afegir 50  $\mu$ L RPMI-10% FBS en cada pou.
- b. **Marcatge i activació de les Jurkat** → Rentar les Jurkat un mínim de tres vegades amb RPMI a 37°C i ressuspèndre en RPMI + 2  $\mu$ M Calcein-AM durant 30 minuts a 37°C. Rentar les Jurkat un mínim de tres vegades amb RPMI a 37°C i activar-les (o no) en RPMI-10% FBS + 10 ng/mL PMA durant 30 minuts a 37°C. Rentar les Jurkat un mínim de tres vegades amb RPMI a 37°C i ressuspèndre en RPMI-10% FBS a una densitat de  $10^5$  cèl·lules per cada 50  $\mu$ L.
- c. **Adhesió en estàtic** → Afegir 50  $\mu$ L de Jurkat marcades a cada pou i incubar durant 1 hora a 37°C. Nota: Cada condició es duta a terme per quintuplicat. Quantificar en el lector de fluorescència TECAN la fluorescència total a 490 nm d'excitació i 520 nm d'emissió. Rentar amb PBS la placa suaument tres vegades, cadascun donant tres cops en un coixí de paper absorbent per tal d'eliminar les cèl·lules no adherides. Quantificar en el lector de fluorescència TECAN la fluorescència de les Jurkat adherents a 490 nm d'excitació i 520 nm d'emissió. Visualitzar les cèl·lules en el microscopi de fluorescència per comprovar que els resultats són coherents. Finalment, calcular el percentatge de Jurkat adherides a HUVEC en cadascuna de les diferents condicions per mitjà de la fórmula:

$$\text{Adhesió (\%)} = (\text{fluorescència de les Jurkat adherents} / \text{fluorescència total}) * 100$$



**Figura MM2.** Esquema del procediment de l'assaig d'adhesió en estàtic.

## 5.2 Assaig d'extensió cel·lular o *spreading*

### Material

- pLys
- Medi de cultiu → RPMI
- Medi complet → RPMI-10% FBS, 1% L-Gln, 1% P/S

## Procediment

- a. **Preparació dels cobreobjectes** → Col·locar un cobreobjecte en un pou d'una placa de 12 pous. Afegir 10 µg/mL de pLys, assegurar que el cobreobjecte es troba completament cobert i incubar durant 2 hores a 37°C. Aspirar la pLys Nota: Pot ser reutilitzada, i efectuar 3 rentats en PBS per tal d'eliminar l'excés de pLys.
- b. **Activació de les Jurkat** → Rentar les Jurkat un mínim de tres vegades amb RPMI a 37°C i activar-les (o no) en RPMI-10% FBS + 10 ng/mL PMA durant 30 minuts a 37°C. Rentar les Jurkat un mínim de tres vegades amb RPMI a 37°C i ressuspendre en RPMI-10% FBS a una densitat de  $0,2 \times 10^6$  cèl·lules per cada 1 mL.
- c. **Extensió cel·lular en estàtic** → Afegir 1 mL de Jurkat activades a cada pou i incubar durant 4 hores a 37°C. Finalment, visualitzar les cèl·lules usant el microscopi Olympus BX61 i fer les fotos amb la càmera Olympus DP70.

## 5.3 Assaig de migració transendotelial

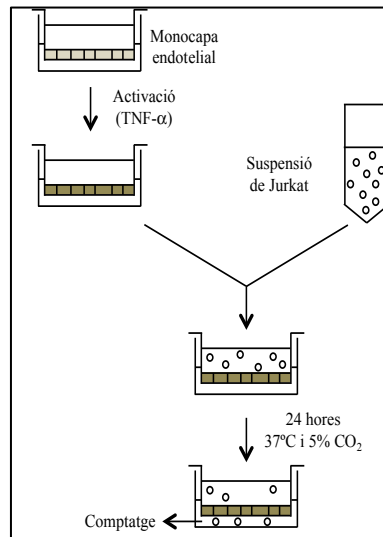
### Material

- Fibronectina
- *Transwells* de *Falcon* (porus de 8 µm i 2 cm<sup>2</sup> d'àrea)
- hTNF-α
- PMA
- Medi de cultiu → RPMI
- Medi complet → RPMI-10% FBS, 1% L-Gln, 1% P/S

### Procediment

- a. **Preparació dels *Transwells*** → Recobrir els *Transwells* amb PBS + 10 µg/mL fibronectina i incubar-los 3 hores a 37°C. Aspirar la fibronectina i efectuar 3 rentats en PBS per tal d'eliminar-ne l'excés. Cultivar les HUVEC en els *Transwells* a una densitat de  $2,5 \times 10^4$  cèl·lules/*Transwell* i mantenir el cultiu fins que arribi al 85-90% de confluència. Activar les HUVEC (o no) amb 1 ng/mL de hTNF-α durant 18 hores a 37°C i 5% CO<sub>2</sub>. Rentar tres vegades els *Transwells* amb RPMI a 37°C i finalment afegir 100 µL RPMI-10% FBS a la part superior de cada *Transwell* i 400 µL RPMI-10% FBS a la part inferior de cada *Transwell*.
- b. **Migració transendotelial de les Jurkat** → Ressuspendre les Jurkat en RPMI-10% FBS a una densitat de  $1,25 \times 10^6$  cèl·lules/mL. Afegir 200 µL de Jurkat a la part superior de cada *Transwell* i incubar durant 24 hores a 37°C i 5% CO<sub>2</sub>. Contar el nombre de cèl·lules present en la cambra inferior mitjançant la *Scepter 2.0 Handheld Automatic Cell Counter*. Calcular el percentatge de cèl·lules que han migrat per mitjà de la fórmula:

$$\text{Migració (\%)} = (\text{Número de Jurkat presents en la cambra inferior} / 0,25 \times 10^6) * 100$$



**Figura MM3.** Esquema del procediment de l'assaig de migració transendotelial.

## 5.4 Assaig de conjugació

### Material

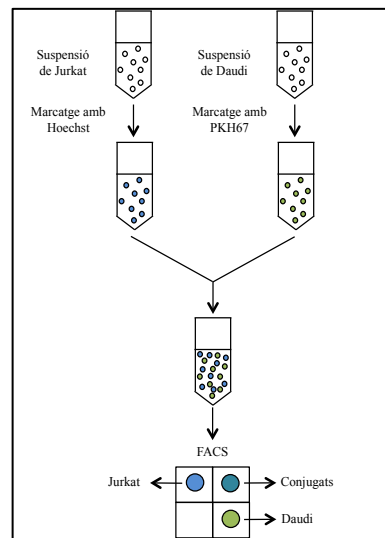
- *Working Solution* → 249 µL diluent C (del kit de marcatge) + 1µL PKH67
- Hoechst 33342
- Superantigen SED
- ZnSO<sub>4</sub>
- Medi de cultiu → RPMI
- Medi complet → RPMI-10% FBS, 1% L-Gln, 1% P/S

### Procediment

- a. Marcatge de les Jurkat** → Rentar tres vegades les Jurkat amb RPMI a 37°C (per eliminar el FBS) i ressuspensar 10<sup>6</sup> cèl·lules en 0,5 mL RPMI. Afegir 1 µg Hoechst 33342 en 0,5 mL de RPMI i barrejar-ho amb els 0,5 mL on tenim les Jurkat per incubar en agitació durant 30 minuts a 37°C. Centrifugar les cèl·lules a 2200 rpm durant 1 minut, girar el tub 180° i centrifugar-les a 2200 rpm durant 2 minuts, després aspirar el sobrenedant i ressuspensar en 1 mL de RPMI-10% FBS. Repetir aquest rentat un mínim de tres vegades per eliminar totalment el Hoechst 33342 no unit. Deixar reposar un mínim de 3 hores a 37°C per tal que el colorant s'estabilitzi. Centrifugar les cèl·lules a 2200 rpm durant 1 minut, girar el tub 180° i centrifugar-les a 2200 rpm durant 2 minuts, després aspirar el sobrenedant i ressuspensar en 0,5 mL de RPMI-10% FBS. Mantenir les Jurkat marcades a 37°C.
- b. Marcatge de les Daudi** → Rentar tres vegades les Daudi amb RPMI a 37°C (per eliminar el FBS) i ressuspensar 10<sup>6</sup> cèl·lules en 0,5 mL RPMI. Preparar la *Working Solution*. Centrifugar les cèl·lules a 2200 rpm durant 1 minut, girar el tub 180° i centrifugar-les a 2200 rpm durant 2 minuts, després aspirar el sobrenedant i ressuspensar en 0,25 mL de la *Working Solution*, mesclar usant la pipeta immediatament i incubar 5 minuts en agitació constant a 37°C. Aturar el marcatge afegint 500 µL FBS i esperant 1 minut a temperatura ambient. Centrifugar les cèl·lules

a 2200 rpm durant 1 minut, girar el tub 180° i centrifugar-les a 2200 rpm durant 2 minuts, després aspirar el sobrenedant i ressuspendre en 0,5 mL de RPMI-10% FBS. Mantenir les Daudi marcades a 37°C.

- c. **Preparació de les Daudi amb superantigen** → Preparar 0,5 mL de RPMI-10% FBS + 1 µg SED + 0,5 mM ZnSO<sub>4</sub>. Barrejar-ho amb els 500 µL de Daudi marcats i incubar 30 minuts a 37°C. Centrifugar les cèl·lules a 2200 rpm durant 1 minut, girar el tub 180° i centrifugar-les a 2200 rpm durant 2 minuts, després aspirar el sobrenedant i ressuspendre en 1 mL de RPMI-10%FBS.
- d. **Comptatge** → Comptar tots els punts experimentals amb el Scepter 2.0 Handheld Automatic Cell Counter. Nota: El comptatge és clau per afegir el mateix nombre de cada tipus cel·lular.
- e. **Conjugació** → Barrejar 0,2 x 10<sup>6</sup> Daudi (amb o sense SED) amb 0,2 x 10<sup>6</sup> Jurkat i barrejar usant la pipeta. Centrifugar a 500 rpm durant 5 minuts a 20°C i incubar 30 minuts a 37°C. Pipetejar suaument 10 vegades per tal de separar les unions que no siguin conjugat Jurkat-Daudi. Centrifugar les cèl·lules a 2200 rpm durant 1 minut, girar el tub 180° i centrifugar-les a 2200 rpm durant 2 minuts, després aspirar el sobrenedant i ressuspendre en 0,5 mL de PBS-1% FBS.
- f. **FACS** → Dur les mostres en gel i a la foscor i fer l'anàlisi per citometria de flux.



**Figura MM4.** Esquema del procés del assaig de conjugació.

### 5.5 Assaig d'activació de limfòcits T i downregulació del TCR

L'activació dels limfòcits T i la downregulació del TCR poden ser analitzades de múltiples maneres. Degut a això, en l'apartat de resultats es descriu el procediment en el peu de figura de cada experiment en que s'ha dut a terme un d'aquests assajos.

## 5.6 Assaig d'internalització i reciclatge del TCR

### Material

- Limfòcits T
- anti-hCD3 $\epsilon$  (clon 33-2A3)
- Tampó àcid  $\rightarrow$  0,5 M NaCl + 0,5 M àcid acètic (pH 2,2)
- FBS

### Procediment per l'estudi de la internalització

- Marcatge extracel·lular del TCR/CD3**  $\rightarrow$  Agafar  $2 \times 10^6$  limfòcits en 2 mL de medi complet i incubar durant 20 minuts a 4°C. Afegir 2  $\mu$ g d'anti-hCD3 $\epsilon$ , barrejar per inversió i incubar durant 30 minuts a 4°C. Centrifugar les cèl·lules a 2200 rpm durant 1 minut, girar el tub 180° i centrifugar-les a 2200 rpm durant 2 minuts, després aspirar el sobrenedant i ressuspendre en 1 mL de tampó de marcatge amb l'anticòs secundari. Centrifugar les cèl·lules a 2200 rpm durant 1 minut, girar el tub i centrifugar-les a 2200 rpm 2 minuts, després aspirar el sobrenedant i ressuspendre en 2 mL RPMI-10% FBS.
- Estudi de la internalització**  $\rightarrow$  Dividir en 10 tubs a raó de 0,2 mL/tub. Incubar durant diferents temps a 37 °C amb les diferents estimulacions d'interès, per tal de promoure la internalització del complex TCR/CD3. Nota: El rang d'interès és la primera hora. Situar el tub a 4°C un cop passat el temps pertinent. Eliminar el TCR/CD3 no internalitzat mitjançant l'adició de 0,2 mL de tampó àcid durant 10 segons, traspasar els 0,4 mL a un tub eppendorf amb 0,6 mL FBS Nota: No barrejar, situar les cèl·lules a sobre del FBS amb compte, centrifugar immediatament i ressuspendre en 0,5 mL PBS-1% FBS. Analitzar el TCR/CD3 internalitzat mitjançant citometria de flux.

### Procediment per l'estudi del reciclatge

- Marcatge total del TCR/CD3**  $\rightarrow$  Agafar  $2 \times 10^6$  limfòcits en 2 mL de medi complet i afegir 2  $\mu$ g d'anti-hCD3 $\epsilon$ , barrejar per inversió i incubar durant 1 hora a 37°C per promoure el marcatge de tot el TCR/CD3 de la cèl·lula (intracel·lular i extracel·lular). Centrifugar les cèl·lules a 2200 rpm durant 1 minut, girar el tub 180° i centrifugar-les a 2200 rpm durant 2 minuts, després aspirar el sobrenedant i ressuspendre en 1 mL RPMI-10% FBS.
- Estudi del reciclatge**  $\rightarrow$  Eliminar l'anti-hCD3 $\epsilon$  unit al TCR/CD3 no internalitzat mitjançant l'adició de 1 mL de tampó àcid durant 10 segons, traspasar els 2 mL a un tub amb 3 mL FBS Nota: No barrejar, situar les cèl·lules a sobre del FBS amb compte, centrifugar immediatament i ressuspendre en 2 mL PBS-1% FBS. Dividir en 10 tubs a raó de 0,2 mL/tub. Incubar durant diferents temps a 37°C amb les diferents estimulacions d'interès, per tal de promoure el reciclatge del complex anti-hCD3 $\epsilon$ -TCR/CD3. Situar el tub a 4°C un cop passat el temps pertinent. Centrifugar les cèl·lules a 2200 rpm durant 1 minut, girar el tub 180° i centrifugar-les a 2200 rpm durant 2 minuts, després aspirar el sobrenedant i incubar en 0,1 mL de tampó de marcatge amb l'anticòs secundari durant 30 minuts a 4°C. Centrifugar les cèl·lules a 2200 rpm durant 1 minut, girar el tub 180° i centrifugar-les a 2200 rpm durant 2 minuts, després aspirar el sobrenedant i ressuspendre en 0,5 mL PBS-1% FBS. Analitzar el TCR/CD3 que ha reciclat a la membrana cel·lular mitjançant citometria de flux.



## 6. Generació de la proteïna recombinant SDC2-IgG2a

### 6.1 Cloning de SDC2-IgG2a a pSecTag

La regió extracel·lular de SDC2 (aminoàcids 19-141) va ser amplificada per PCR usant els oligonucleòtids descrits en la taula de l'apartat 1.1.4 de material i mètodes. El plasmidi SecTag que codifica per la fracció constant (Fc) d'IgG2a va ser amplificat per PCR usant els oligonucleòtids descrits en la taula de l'apartat 1.1.4 de material i mètodes. Previ tractament amb DpnI, els dos productes de PCR van ser mesclats per a la transformació de bacteries competents XL-1 *blue*. Es va efectuar una mini-prep de les colònies resistents i el producte va ser confirmat per seqüenciació. Finalment, el plasmidi d'interès va ser produït a major escala mitjançant maxi-prep.

### 6.2 Transfecció estable de CHO-K1 amb SDC2-IgG2a\_pSecTag

#### Material

- Cèl·lules CHO-K1 en creixement exponencial
- Medi de cultiu → DMEM
- Medi complet → DMEM-10% FBS, 1% L-Gln, 1% P/S
- Tripsina-EDTA
- Zeocin
- DNA a transfectar (SDC2-IgG2a\_pSecTag)
- Pvu I → En aquest cas específic aquest enzim de restricció només talla un cop el plasmidi (en la resistència a ampicil·lina)
- *REact*<sup>®</sup> 7 *buffer* 10X → Per preparar-lo al laboratori (mantenir a -20°C): 500 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 mM KCl i 500 mM NaCl.
- Tampó 166 mOsm/Kg → 40% tampó IsoOsmolar + 60% tampó HypoOsmolar
- Cubetes d'electroporació (4 mm d'amplada)

#### Procediment

- Linearització del plasmidi** → Digerir 10 µg del plasmidi afegint 1 µL Pvu I i 20 µL *REact*<sup>®</sup> 7 *buffer* 10X en un volum final de 200 µL, i incubar 2 hores a 37°C. Nota: Fer un gel d'agarosa per confirmar el tall. Passar el tub a 80°C durant 20 minuts per tal d'inactivar l'enzim de restricció. Afegir 3 volums (600 µL) d'etanol i centrifugar 15 minuts a 13000 rpm en una microcentrífuga a 4°C. Descartar el sobrenedant i deixar assecar en la campana de flux per, finalment, afegir 20 µL d'H<sub>2</sub>O. Conservar a -20°C. Nota: En aquest cas específic el plasmidi digerit es troba a una concentració de 0.5 g/l.
- Tripsinització de les CHO-K1** → Seguir el procediment descrit en l'apartat 2.2.1 de material i mètodes.
- Transfecció de les CHO-K1** → Ressuspendre 2 x 10<sup>6</sup> cèl·lules en 0,4 mL de tampó 166 mOsm/Kg i afegir 4 µL del plasmidi linealitzat. Transferir les cèl·lules amb compte a la cubeta d'electroporació de 4 mm d'amplada i electroporar amb el *Multiporator* usant la següent configuració:

<i>Mode: eukaryotes</i> o “(·)”
<i>Voltage: 150 V</i>
<i>Time constant: 70 μs</i>
<i>Pulse number: 3</i>

- d. Sembra de les CHO-K1** → Deixar reposar 3 minuts a temperatura ambient i transferir amb una pipeta *Pasteur* de plàstic a 30 mL de medi complet sense P/S. Barrejar amb compte, repartir el volum en plaques de 12 pous a raó de 500 μL per pou i incubar a 37°C. Un dia més tard, afegir a cada pou 100 μL de medi complet + 120 μg/mL Zeocin i incubar a 37°C. Cada 2 o 3 dies, observar el cultiu i canviar el medi, el qual progressivament augmentarà la concentració de Zeocin dels 20 μg/mL inicials als 400 μg/mL. Analitzar les línies resistents a Zeocin per la secreció de SDC2-IgG2a en els pous on hi hagi creixement després de 30 dies i congelar varis vials de les línies que presentin una major producció.

### 6.3 Selecció de línies productores de SDC2-IgG2a

#### 6.3.1 ELISA

##### Material

- Plaques de 96-pous i fons pla NUNC, especials per ELISA
- mIgG2a
- Goat anti-Mouse IgG2a i HRP-anti-Mouse IgG
- Tampó d'unió → 100 mM Carbonat de sodi pH 9,5 (8,40 g NaHCO<sub>3</sub> + 3,56 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en 1 litre)
- Tampó de rentat → PBS, 0,05% Tween-20
- TMB
- HCl 3N

##### Procediment

- a. Preparació de l'anticòs de captura** → Afegir a cada pou 50 μL de *Goat anti-Mouse IgG2a* diluït 1:1000 en tampó d'unió, tancar amb *Parafilm M*<sup>®</sup> i guardar o/n a 4°C. Nota: Es pot fer la unió a 37°C durant 2 hores, però el volum a de ser superior per evitar alteracions degut a l'evaporació. Aspirar els pous i fer 3 rentats amb 200 μL de tampó de rentat. Bloquejar la placa amb DMEM-5% FBS durant 1 hora a temperatura ambient. Aspirar els pous i fer 3 rentats amb 200 μL de tampó de rentat.
- b. Adició de la mostra a testar** → Aspirar els pous i afegir 50 μL del sobrenedant de cada cultiu de CHO-K1 transfectades i resistents a Zeocin. Nota: Cada mostra es testa en duplicat. Afegir també un control negatiu i una corba de calibratge usant concentracions conegudes de mIgG2a. Després d'una hora a temperatura ambient, aspirar els pous i fer 3 rentats amb 200 μL de tampó de rentat.
- c. Revelat** → Aspirar els pous, afegir a cada pou 50 μL de *HRP-anti-Mouse IgG* diluït 1:300 en DMEM-1% FBS i incubar durant 1 hora a temperatura ambient. Aspirar els pous i fer 6 rentats amb 200 μL de tampó de rentat, esperant 1 minut a cada rentat. Afegir a cada pou 100 μL de TMB (volum/volum solució A + B), incubar 10 minuts a temperatura ambient i en la foscor i afegir 30 μL HCl 3N per aturar la reacció. Llegir a 450 nm en el TECAN abans que passin 30 minuts.

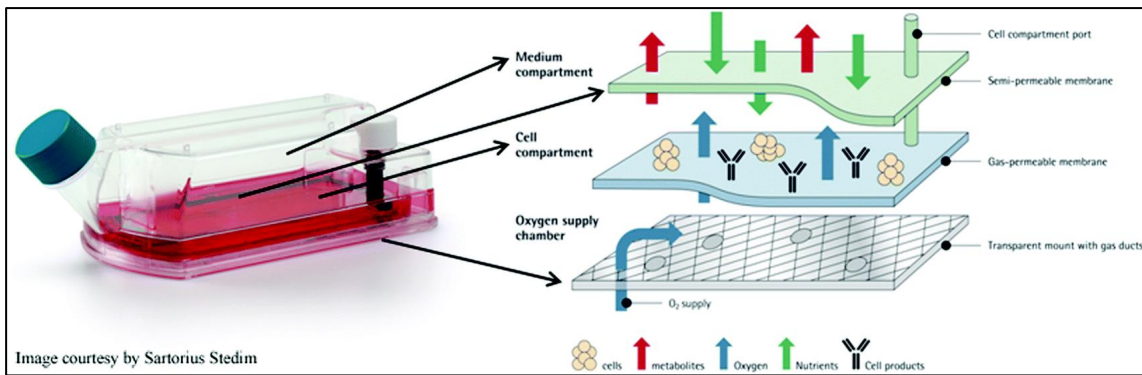
### 6.3.1 Marcatge extracel·lular per citometria de flux

Seguir el protocol detallat en l'apartat 4.1.1 de material i mètodes, usant l'anticòs anti-SDC2 per marcar la proteïna recombinant expressada a la superfície cel·lular.

## 6.4 Producció de SDC2-IgG2a

Per a la producció de SDC2-IgG2a vam decidir utilitzar el *Two-Compartment Bioreactor CELLine* ([http://www.integra-biosciences.com/sites/pdf/operating\\_instructions/90100\\_V04\\_OI\\_CELLine\\_EN.pdf](http://www.integra-biosciences.com/sites/pdf/operating_instructions/90100_V04_OI_CELLine_EN.pdf)). La tecnologia en la que es basa aquest bioreactor permet una elevada expressió proteica per part de les línies cel·lulars productores gràcies a un eficient cultiu d'elevada densitat donat a una aportació òptima d'oxigen i nutrients en el mateix moment que s'eliminen productes nocius.

Bàsicament, la presència d'un compartiment pel medi de cultiu i un altre per les cèl·lules separats per mitjà d'una membrana semi-permeable d'acetat de cel·lulosa permet la difusió de molècules menors de 10 kDa entre compartiments, mentre que les molècules d'una mida superior es troben confinades en el compartiment de les cèl·lules. El canvi de medi en el primer compartiment evita la interferència mecànica amb el cultiu en creixement, al mateix moment que aporta nous nutrients i elimina productes de rebuig inhibitoris. A més a més, la part inferior del compartiment cel·lular és una membrana de silicona que permet el subministrament d'O<sub>2</sub>, alhora que es produeix l'eliminació del CO<sub>2</sub>.



**Figura MM5.** Representació esquemàtica del *Two-Compartment Bioreactor CELLine*. Adaptat de <http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2014/tx/c3tx50112d>.

### Material

- Bioreactor CELLine CL 100
- CHO-K1.b5 (és el nom donat a la línia obtinguda amb una major producció de SDC2-IgG2a) en creixement exponencial.
- Medi complet → DMEM-10% FBS, 1% L-Gln, 1% P/S + 400 µg/mL Zeocin.
- Hyclone FBS, Super Low IgG
- Medi sense IgG → DMEM-15% Hyclone FBS, Super Low IgG, 1% L-Gln, 1% P/S + 400 µg/mL Zeocin.

### Procediment

- Preparar les cèl·lules** → Tripsinitzar les cèl·lules seguint el procediment descrit en l'apartat 2.2.1 de material i mètodes. Efectuar 3 rentats amb PBS per tal d'eliminar les IgG que acompanyen el FBS. Ressuspensar 25 x 10<sup>6</sup> cèl·lules en 20 mL de medi sense IgG.

- b. Preparar el bioreactor** → Afegir 50 mL de medi complet en el compartiment pel medi de cultiu i esperar 5 minuts per tal d'equilibrar la membrana d'acetat de cel·lulosa.
- c. Inoculació en el bioreactor** → Obrir lleugerament el tap verd del bioreactor (Figura MM5) per evitar el trencament de la membrana d'acetat de cel·lulosa per la pressió de l'aire. Amb una pipeta *Pasteur* aspirar les cèl·lules que hauran de ser introduïdes en el bioreactor, obrir el tap blanc (Figura MM5), inserir la pipeta *Pasteur* en el tub negre de silicona (Figura MM5) i introduir les cèl·lules. Repetir el procés fins que totes les cèl·lules que es vol introduir estiguin a dins i aspirar les bombolles que s'hagin format durant el procés usant la mateixa pipeta *Pasteur*. Netejar el líquid que quedi en la superfície del tub negre, esterilitzar-ho i tancar el tap blanc. Afegir 950 mL de medi complet en el compartiment pel medi de cultiu i situar el bioreactor en un incubador a 37°C i 5 % CO<sub>2</sub>.
- d. Recollida del sobrenedant i cicles de cultiu** → Inicialment, monitoritzar diàriament el cultiu prenent mostra de les cèl·lules i del medi per conèixer la viabilitat cel·lular i la concentració de SDC2-IgG2a en el medi. En funció d'això, recollir el sobrenedant cada X dies per procedir a la seva purificació i re-omplir el compartiment per les cèl·lules iniciant el procediment en l'apartat "a".

## 6.5 Purificació de SDC2-IgG2a

### 6.5.1 Purificació per cromatografia d'afinitat

#### Material

- Sobrenedant de CHO-K1.b5
- *HiTrap rProtein A Fast Flow*
- Bomba peristàltica P-1
- Tub de 140 mm de llargada i 2,1 mm de diàmetre intern
- Tampó d'unió → 50mM Tris-HCl pH 8 + 150 mM NaCl
- Tampó d'elució → 40 mM citrat sòdic pH 3,7
- Tampó de recollida → 1M Tris-HCl pH 9

#### Consideracions prèvies

- El pH d'unió òptim d'IgG2a a proteïna A es troba entre 7,0 i 8,0. El pH d'elució entre 3,5 i 5,5.
- La capacitat màxima teòrica de la columna *HiTrap rProtein A Fast Flow* de 1 mL és de 23 mg d'IgG2a.
- El flux òptim de la columna *HiTrap rProtein A Fast Flow* de 1 mL és de 1 mL/minut, i el màxim de 4 mL/minut.
- Un volum sortint de 1 mL en la columna *HiTrap rProtein A Fast Flow* de 1 mL equival aproximadament a 30 gotes.
- El flux de líquid a través de la columna *HiTrap rProtein A Fast Flow* de 1 mL ha de ser constant per evitar la formació de bombolles que la podrien danyar.
- La columna *HiTrap rProtein A Fast Flow* de 1 mL pot ser re-utilitzada però sempre per a la purificació de la mateixa proteïna i pot ser utilitzada en sèrie si es necessita escalar per a l'obtenció d'una major quantitat de proteïna.
- El procediment descrit a continuació és el que ens ha permès l'obtenció d'una major quantitat de SDC2-IgG2a, però les condicions poden variar al purificar diferents proteïnes recombinants.

## Procediment

- a. Preparació de la mostra i els tampons** → Preparar els tampons amb reactius purs, ajustar el pH i filtrar-los usant un filtre de 0,22 µm. Ajustar la mostra a la composició del tampó d'unió mitjançant l'addició de 1 M Tris-HCl pH 8 i filtrar-la amb un filtre de 0,22 µm. Nota: Pre-escalfar la mostra i els tampons a 37°C és un pas crític per evitar la formació de bombolles en la columna. Preparar 4 tubs eppendorf de 1,5 mL amb 60 µL de tampó de recollida. Nota: Aquest tampó permet contrarestar les condicions àcides de l'elució per conservar l'activitat de la proteïna recombinant.
- b. Purificació** → Rentar la columna amb 5 mL d'H<sub>2</sub>O mQ. Regenerar la columna amb 5 mL de tampó d'elució. Equilibrar la columna amb 5 mL de tampó d'unió. Aplicar la mostra amb un flux de 1 mL/minut i recollir el que hagi passat per la columna per confirmar que la proteïna recombinant ha quedat unida. Rentar la columna amb 5 mL de tampó d'unió. Afegir 3 mL de tampó d'elució i recollir l'elutit usant els tubs eppendorf amb el tampó de recollida. En el primer tub recollir 0,5 mL, en el segon i el tercer 1 mL i, finalment, 0,5 mL en l'últim tub. Rentar la columna amb 5 mL d'etanol al 20% per evitar el creixement bacterià, segellar-la i guardar-la a 4°C.
- c. Conservació de SDC2-IgG2a** → Quantificar l'absorció a 260/280 nm, mesclar les fraccions amb el millor rati i dialitzar o/n a 4°C vers 50 mM Tris-HCl pH 7,4. Conservar les fraccions a 4°C si es volen utilitzar immediatament, o bé generar un estoc a -80°C.

### 6.5.2 Purificació per precipitació per (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

#### Material

- Sobrenedant de CHO-K1.b5
- (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> saturat → 5,72 M en H<sub>2</sub>O a 20°C
- 25 mM Tris-HCl pH 7,4 + 25 mM NaCl

#### Procediment

- a. Salting out** → Barrejar el volum de sobrenedant de SDC2-IgG2a amb el volum necessari de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> saturat per tal d'obtenir una concentració del 45% d'aquest últim, incubar a 4°C durant 20 minuts i centrifugar 6000 g durant 10 minuts en una centrífuga a 4°C. Descartar el sobrenedant, ressuspendre el pellet en (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 45%, incubar a 4°C durant 20 minuts i centrifugar 6000 g durant 10 minuts en una centrífuga a 4°C. Descartar el sobrenedant, dissoldre el pellet en una desena part del volum original en 25 mM Tris-HCl pH 7,4 + 25 mM NaCl, incubar a 4°C durant 20 minuts i centrifugar 6000 g durant 10 minuts en una centrífuga a 4°C.
- b. Dialitzar** → Descartar el pellet, introduir el sobrenedant en una bossa de diàlisi i dialitzar durant 24 hores a 4°C vers un volum 100X de 2,5 mM Tris-HCl pH 7,4 + 2,5 mM NaCl. Filtrar el SDC2-IgG2a usant un filtre de 0,22 µm.

### 6.5.3 Confirmació de la purificació de SDC2-IgG2a

Adaptar el protocol descrit en l'apartat 6.3 de material i mètodes.

## 7. Anàlisi estadístic

Els resultats presentats en aquesta tesi són expressats com a mitjana  $\pm$  desviació estàndard de tres o més experiments, excepte que s'indiqui el contrari. Comparacions entre 2 grups han estat analitzades usant el test *t*-Student i les comparacions entre grups i 2 variables independents han estat analitzades usant una ANOVA de 2 factors seguida per el test *post-hoc* de Bonferroni. L'anàlisi estadístic s'ha dut a terme usant el *software* GraphPad Prism 6.0. Diferències significatives indicades quan el p-valor és inferior a 0,05 (\*), 0,01 (\*\*) o 0,001 (\*\*\*)



RESULTATS

---





# 1. Funció de SDC2 en els limfòcits T CD4<sup>+</sup>

## 1.1. Descripció del model a estudiar

### 1.1.1. Transfecció estable de SDC2 en Jurkat

Els limfòcits T CD4<sup>+</sup> humans expressen SDC2 en la superfície cel·lular<sup>155,171,172</sup> (Figura R1.A). Amb l'objectiu de determinar la funció de SDC2 en els limfòcits T CD4<sup>+</sup>, vam transfectar de manera estable la línia cel·lular Jurkat amb un plasmidi que codifica per el cDNA de *SDC2* humà (Figura R1.B). Les Jurkat no transfectades, anomenades Jurkat-wt en aquest estudi, presenten nivells indetectables de SDC2 en la superfície cel·lular (Figura R1.E), malgrat que l'expressió del mRNA es pot detectar per mitjà de PCR (Figura R1.C-D). Després de la transfecció amb el cDNA de *SDC2*, les línies estables obtingudes i anomenades Jurkat-SDC2 expressaven abundants nivells del mRNA de SDC2 (Figura R1.D) però una discreta expressió de la proteïna en la membrana (Figura R1.E) i comparable a la observada en limfòcits T CD4<sup>+</sup> humans, excepte en el cas de la línia estable Jurkat-SDC2-A21.

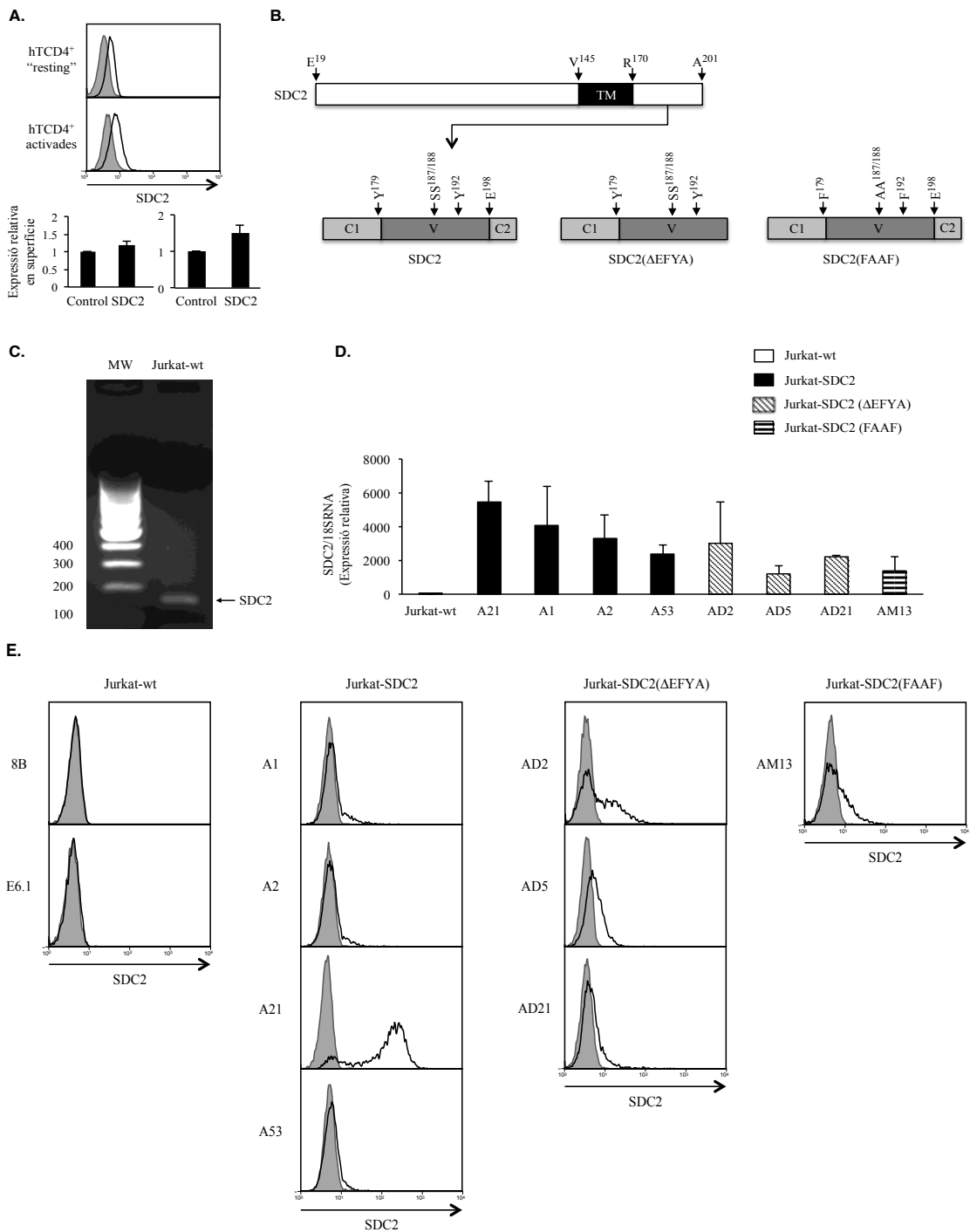
La conservació dels últims quatre aminoàcids de la cua citoplasmàtica en tots els membres de la família dels SDCs indica la importància d'aquest domini per a la funció de SDC2. Així doncs, vam eliminar aquests quatre aminoàcids (*SDC2(ΔEFYA)*) i es va procedir a l'establiment de línies que sobre-expressessin establement aquest mutant de SDC2, anomenades Jurkat-SDC2(ΔEFYA) (Figura R1.B). Com en el cas de la transfecció amb *SDC2*, les línies mostraven uns nivells elevats del mRNA de *SDC2(ΔEFYA)* (Figura R1.D), malgrat que en membrana s'observaven uns nivells d'expressió de la proteïna discrets (Figura R1.E).

Per tal d'estudiar el rol de les tirosines Y179 i Y192 i de les serines S187 i S188 presents en el domini citoplasmàtic de SDC2, aquestes van ser mutades per mutagènesis dirigida a fenilalanina i alanina, respectivament. El cDNA mutant *SDC2(FAAF)* va ser transfectat a les Jurkat aconseguint l'establiment d'una única línia estable que l'expressava, anomenada Jurkat-SDC2(FAAF)-AM13 (Figura R1B). Com amb les altres línies estables, aquesta presentava uns nivells elevats del mRNA de *SDC2(FAAF)* però una baixa expressió en la membrana. Cal destacar les dificultats per a generar línies estables al expressar aquest cDNA, suggerint una possible implicació de les tirosines i serines en la supervivència cel·lular.

### 1.1.2. Consideracions generals

Totes les línies transfectades van ser cultivades en presència del antibiòtic G418 i es van fer controls rutinaris d'expressió en membrana de SDC2 al llarg de tot l'estudi. Tot i que es van obtenir més línies estables transfectades amb aquests cDNAs, les línies més usades al llarg del estudi són les mostrades aquí com a representatives.

Al llarg del estudi les Jurkat-wt van ser usades com a control, malgrat això, també disposàvem de línies Jurkat que sobre-expressaven de manera estable un plasmidi control. Els resultats obtinguts en aquestes línies van ser comparables als obtinguts en les Jurkat-wt (dades no mostrades).



**Figura R1.** Nivells del mRNA i presència en la superfície de SDC2 en limfòcits T CD4<sup>+</sup> humans i en Jurkat transfectades usades en aquest estudi. **A.** Histogrames mostrant l'expressió de SDC2 en la superfície dels limfòcits T CD4<sup>+</sup> humans *resting* (n=6) o activats durant 3 dies amb PHA, anti-CD28 i IL-2 (n=4). Les cèl·lules van ser incubades amb anti-SDC2 (clon 186.C), seguit d'un marcatge amb un anticòs secundari F(ab')<sub>2</sub> anti-ratolí conjugat a Alexa-488, per finalment analitzar les cèl·lules per citometria de flux. **B.** Esquema de SDC2 i dels mutants usats en aquest estudi. TM, regió transmembrana; C1 i C2 regions citoplasmàtiques constants homòlogues als 4 SDCs; V, regió variable específica per a cada SDC. **C.** RNA total de les Jurkat per analitzar el mRNA de SDC2 per transcripció reversa i PCR convencional. MW, marcador de pes molecular. **D.** Expressió del mRNA de SDC2. El mRNA de SDC2 va ser analitzat per transcripció reversa del RNA total i RT-PCR. Els valors de SDC2 : 18S van ser calculats i normalitzats a les Jurkat-wt, a les que se'ls hi va donar el valor de 1. L'anàlisi es va dur a terme per a cadascuna de les línies usades en l'estudi i la mitjana +/- SD de tres experiments independents és mostrat. **E.** Nivells de SDC2 en la superfície de les Jurkat-wt i les Jurkat transfectades establement amb SDC2, SDC2(ΔEFYA) o SDC2(FAAF). Les cèl·lules van ser marcades i analitzades com en "A". Resultats representatius dels controls d'expressió rutinaris fets al llarg del estudi.

## 1.2. Rol de SDC2 en l'adhesió dels limfòcits T CD4<sup>+</sup>

### 1.2.1. La lligació de SDC2 incrementa la polarització cel·lular

Durant l'adhesió cel·lular els SDCs modulen l'activitat de les integrines <sup>208</sup>. Inicialment vam analitzar el rol de SDC2 en l'adhesió cel·lular en un model independent de la contribució d'integrines. Per tal d'aconseguir-ho vam usar pLys, un substrat no biològic que és lligand d'elevada afinitat per als SDCs <sup>209</sup> i que no adhereix integrines. Treballs anteriors descriuen un augment en el *spreading* sobre pLys de cèl·lules que sobre-expressen SDC1 <sup>209</sup> i SDC3 <sup>210</sup>, igual que en plaques recobertes per anticossos dirigits contra algun dels quatre SDCs <sup>211,212</sup>. Vam sembrar les Jurkat-SDC2 sobre pLys i ràpidament vam observar un augment en el *spreading* si aquestes eren prèviament activades amb PMA. En contrast amb les Jurkat-wt que generalment mostren una morfologia esfèrica, després d'una incubació de quatre hores a 37°C la majoria de cèl·lules Jurkat-SDC2 mostraven una morfologia polaritzada (Figura R2.A). Aquests resultats indiquen que la lligació específica de SDC2 pot portar al *spreading* i polarització cel·lular i suggereix un possible rol d'aquesta molècula en l'adhesió dels limfòcits T.

### 1.2.2. SDC2 redueix l'adhesió a les cèl·lules endotelials

Vam decidir analitzar si SDC2 té la capacitat de modular l'adhesió dels limfòcits T a les cèl·lules endotelials primàries. Per tal de fer-ho, vam dur a terme un assaig d'adhesió en estàtic sobre cèl·lules endotelials humanes de cordó umbilical (HUVEC). L'expressió de SDC2 porta a una disminució d'aproximadament el 33% en l'adhesió de les Jurkat sobre les HUVEC (Figura R2.B). Encara que els valors obtinguts en diferents línies varien s'observa la mateixa resposta, suggerint que SDC2 disminueix l'expressió o modula la funció de les molècules d'adhesió.

Com que les integrines juguen un paper important en l'adhesió dels limfòcits al endoteli <sup>93</sup>, vam voler avaluar la seva contribució en aquest procés. Per tal de fer-ho vam estimular les Jurkat-wt i les Jurkat-SDC2 amb PMA, un activador de les integrines, i després d'aquest tractament vam poder observar un augment en l'adhesió dels limfòcits al endoteli (dades no mostrades). Malgrat això, inclús quan activem les Jurkat-SDC2 amb PMA aquestes adhereixen menys que les control (Figura R2.B).

L'efecte inhibitor de SDC2 també va ser observat durant l'adhesió a endoteli inflammat. Així, l'estimulació de les HUVEC amb hTNF- $\alpha$  incrementa l'adhesió de les Jurkat-wt i les Jurkat-SDC2, però aquestes últimes segueixen sense adherir-se tant bé com les control (Figura R2.B), inclús si han estat activades amb PMA (Figura R2.B). L'estimulació amb hTNF- $\alpha$  provoca un augment de l'adherència dels leucòcits pel fet d'augmentar els nivells en membrana dels lligands d'integrines ICAM-1 i VCAM-1 en les cèl·lules endotelials <sup>213</sup>, suggerint que la funció de les integrines es trobava alterada en les Jurkat-SDC2.

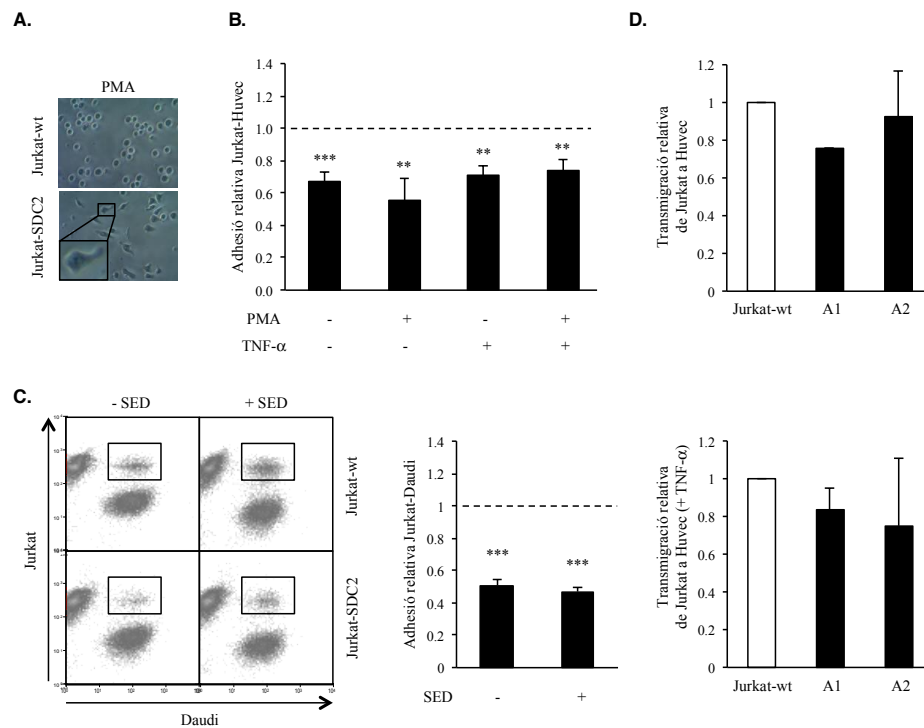
### 1.2.3. SDC2 redueix l'adhesió als limfòcits B

Per tal de conèixer si el fenomen d'inhibició de l'adhesió era específic a l'adhesió a cèl·lula endotelial vam analitzar l'adhesió en un altre model. L'adhesió entre el limfòcit T i una APC és el primer pas en la formació de la SI <sup>214</sup>, per tant, vam analitzar el rol de SDC2 en la formació

de conjugats entre les Jurkat i les Daudi, una línia limfocítica B, en presència o absència del superantigen SED. La formació de conjugats es veu reduïda per efecte de l'expressió de SDC2 en les Jurkat (Figura R2.C), un fenomen que és independent de la presència de superantigen (Figura R2.C). Aquests resultats correlacionen amb la disminució de l'adhesió de Jurkat-SDC2 a HUVEC vist en l'apartat 1.2.2, suggerint un possible rol de SDC2 durant l'adhesió del limfòcit T.

#### 1.2.4. SDC2 no afecta la transmissió de les Jurkat

L'adhesió dels limfòcits al endoteli és un pas important per la transmissió endotelial<sup>93</sup>. Així doncs, vam testar si l'alteració de la capacitat d'adhesió de les Jurkat-SDC2 al endoteli provocava deficiències en la capacitat de transmigrar d'aquestes cèl·lules. Per a testar aquesta hipòtesi vam cultivar una monocapa de HUVEC sobre *Transwells* amb porus de 8 µm, recoberts amb fibronectina. Les HUVEC van ser estimulades o no amb hTNF-α per simular un endoteli inflammat i es van situar les Jurkat en el compartiment superior. En comparació a les Jurkat-wt, les Jurkat-SDC2 no mostren canvis significatius en el nombre de cèl·lules que van migrar en el compartiment inferior, ni en la transmissió en l'endoteli en repòs ni en la de l'endoteli inflammat (Figura R2.D). En resum, aquest resultat suggereix que la disminució en la capacitat d'adhesió al endoteli que observem en les Jurkat-SDC2 no implica una alteració en la capacitat migradora d'aquestes cèl·lules.



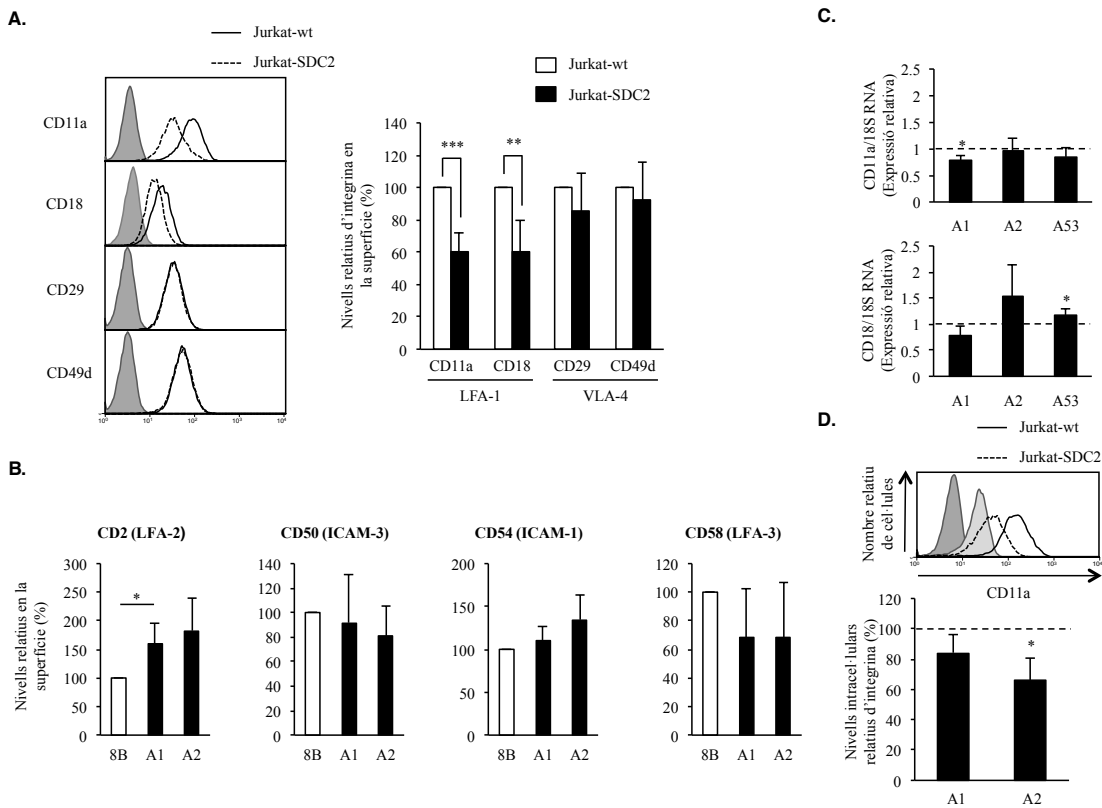
**Figura R2. SDC2 redueix l'adhesió de les Jurkat.** **A.** Adhesió de Jurkat a pLys. Imatges representatives de les Jurkat-wt i les Jurkat-SDC2 activades amb PMA (10 ng/mL) durant 30 minuts a 37°C i adherides en plaques recobertes amb pLys durant 4 hores a 37°C. **B.** Adhesió de les Jurkat a les HUVEC. Les Jurkat van ser tenyides amb Calcein-AM i activades o no amb PMA (10 ng/mL) durant 30 minuts a 37°C. Les cèl·lules tenyides es van situar a sobre de la monocapa de HUVEC prèviament estimulada o no amb hTNF-α (1 ng/mL) i es van incubar durant 1 hora a 37°C. Les cèl·lules adherides es van quantificar per mitjà d'un lector de fluorescència. El gràfic de barres representa la mitjana d'adhesió +/- SD de tres línies

Jurkat-SDC2, cadascuna analitzada en un mínim de 2 experiments independents duts a terme en quintuplicats i normalitzats al valor d'adhesió de les Jurkat-wt, a les quals se li va donar el valor arbitrari 1 a la seva capacitat d'adherir-se (línia puntejada). **C.** Adhesió de les Jurkat a les Daudi. (Esquerra) Dot-plots representatius de la formació de conjugats entre les Jurkat-SDC2 o les Jurkat-wt i les Daudi carregades o no amb superantigen. En l'interior dels rectangles s'observen els conjugats formats. (Dreta) Mitjana de la formació de conjugats  $\pm$  SD de tres experiments independents fets en una línia Jurkat-SDC2 i normalitzat al nombre de conjugats formats per les Jurkat-wt, al qual se li va donar el valor arbitrari de 1 (línia puntejada). **D.** Transmigració endotelial de les Jurkat-wt. Les Jurkat-SDC2 o les Jurkat-wt van ser situades en el compartiment superior del *Transwell* recobert amb fibronectina on prèviament s'havia fet créixer una monocapa de HUVEC, les quals van ser estimulades o no amb hTNF- $\alpha$  (10 ng/mL), i es van incubar durant 24 hores a 37°C. Les cèl·lules que van transmigrar al compartiment inferior van ser contades amb una pipeta automàtica. Els gràfics de barres representen la mitjana  $\pm$  SD de tres experiments independents amb dues línies Jurkat-SDC2 independents transmigrant l'endoteli en repòs (a dalt) o l'endoteli inflammat (a baix). Els resultats són normalitzats respecte la transmigració obtinguda en les Jurkat-wt en cadascun dels casos.

### 1.2.5. SDC2 disminueix el nivell en membrana de LFA-1

Els SDCs són necessaris per l'expressió en superfície de receptors de factors de creixement<sup>135</sup> i pel reciclatge d'integrines a la membrana citoplasmàtica<sup>151</sup>. Degut que l'adhesió dels limfòcits al endoteli és depenent de LFA-1 i VLA-4<sup>93</sup> i que l'adhesió a les APC és depenent de LFA-1<sup>8</sup>, vam analitzar si l'efecte inhibitori de SDC2 en l'adhesió era conseqüència d'una disminució en el nivell en membrana de les integrines. El nivell en la superfície de les diferents subunitats de les integrines LFA-1 i VLA-4 va ser determinat per citometria de flux. En comparació a les Jurkat-wt, el nivell en la superfície cel·lular de les dues subunitats de LFA-1 es trobava significativament reduït en les Jurkat-SDC2, en canvi, el nivell de les dues subunitats de VLA-4 es mostrava inalterat (Figura R3.A). A més a més, l'anàlisi del nivell en membrana d'altres molècules d'adhesió com LFA-2, LFA-3, ICAM-1 i ICAM-3 mostra uns nivells similars als de les Jurkat-wt (Figura R3.B). Així doncs, la reducció del nivell de LFA-1 en la superfície cel·lular de les Jurkat-SDC2 correlaciona amb la disminució de l'adhesió a endoteli i cèl·lula B observat anteriorment (Figura R2.B i C).

Per tal de conèixer el mecanisme pel qual les Jurkat-SDC2 mostren un nivell de LFA-1 en la superfície inferior a les Jurkat-wt, vam analitzar els nivells dels mRNA de les dues subunitats. La disminució en el nivell en membrana no va ser conseqüència d'una disminució de l'expressió transcripcional, ja que els nivells dels mRNA de CD11a i CD18 són similars als observats en les Jurkat-wt (Figura R3.C). Això suggereix que LFA-1 es pot trobar retinguda al interior cel·lular. Per tal de respondre a aquesta pregunta vam analitzar el nivell total (en superfície i intracel·lular) de CD11a. L'anàlisi per citometria de flux mostra una disminució en el nivell total de CD11a en les Jurkat-SDC2 en comparació amb les Jurkat-wt (Figura R3.D). En resum, aquests resultats suggereixen que la disminució del nivell en membrana de LFA-1 podria ser causat per una disminució en la taxa de traducció del mRNA de CD11a o bé per una reducció de l'estabilitat de la proteïna.



**Figura R3. SDC2 disminueix el nivell en membrana de LFA-1.** **A.** Nivells de LFA-1 (CD11a i CD18) i VLA-4 (CD49d i CD29) en la superfície de les Jurkat-SDC2. Les cèl·lules van ser incubades amb anti-CD11a (clon MEM-25) o CD18 (clon MEM-48), seguit d'un marcatge amb un anticòs secundari F(ab')<sub>2</sub> anti-ratolí conjugat a Alexa-488, o bé amb FITC-anti-CD49d (clon BU49) o FITC-anti-CD29 (clon MEM-101A), per finalment analitzar les cèl·lules per citometria de flux. (Esquerra) Histogrames representatius. (Dreta) Quantificació dels marcatges. L'expressió relativa va ser calculada a partir dels valors de MFI obtinguts en les Jurkat-SDC2 versus els obtinguts en les Jurkat-wt. Mitjana +/- SD de 4 línies independents. **B.** Nivells de LFA-2 (CD2), ICAM-3 (CD50), ICAM-1 (CD54) i LFA-3 (CD58) en la superfície de les Jurkat-wt (8B a la figura) i les Jurkat-SDC2. Les cèl·lules van ser incubades amb anti-CD54 (clon 1H4) seguit d'un marcatge amb un anticòs secundari F(ab')<sub>2</sub> anti-ratolí conjugat a Alexa-488, o bé per APC-anti-CD2 (clon LT2), PE-anti-CD50 (clon MEM-171) o PE-anti-CD58 (clon MEM-63), per finalment analitzar les cèl·lules per citometria de flux. Els gràfics de barres representen la mitjana +/- SD de tres experiments independents amb dues línies Jurkat-SDC2. **C.** Expressió del mRNA de LFA-1. Els mRNA de CD11a i CD18 van ser analitzats per transcripció reversa del RNA total i RT-PCR. Els valors de CD11a : 18S i CD18 : 18S van ser calculats i normalitzats a les Jurkat-wt, a les que se'ls hi va donar un valor de 1 (línia puntejada). L'anàlisi es va dur a terme en tres línies independents i la mitjana +/- SD de tres experiments independents és mostrat. **D.** Expressió total de CD11a. (A dalt) Histograma representatiu. Les cèl·lules van ser fixades, permeabilitzades i incubades com en "A." amb anti-CD11a. El pic gris fosc és el control de marcatge extracel·lular i el pic gris clar el control d'isotip en les cèl·lules ja permeabilitzades. (A baix) Quantificació dels marcatges. El MFI es representa com a percentatge dels valors obtinguts en les Jurkat-wt (línia puntejada). L'anàlisi es va repetir en 2 línies independents i la mitjana +/- SD de tres experiments independents és mostrat.

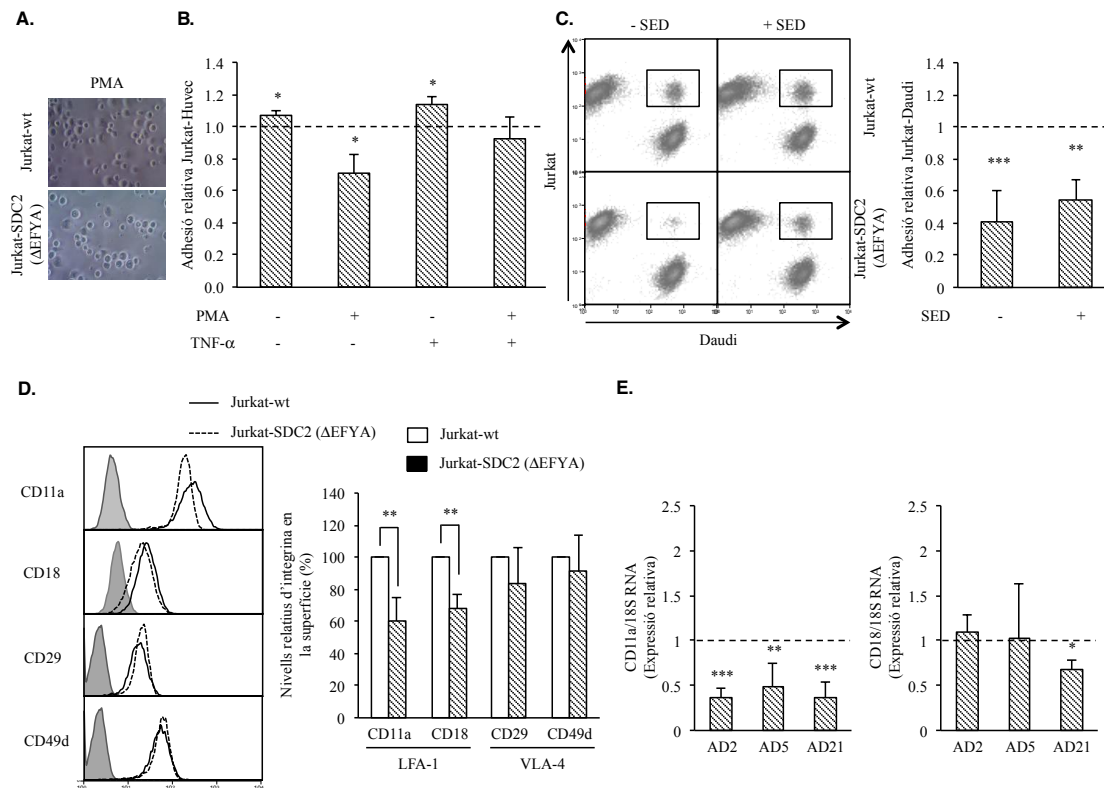
### 1.2.6. Rol del domini EFYA de SDC2 en l'adhesió

La proteïna *Syntenin* s'uneix al domini EFYA de SDC2 i participa en el control del reciclatge d'integrines, l'adhesió i la migració cel·lular<sup>93,215</sup>. Per tal de determinar el rol d'aquest domini en l'efecte inhibidor de SDC2 en l'adhesió vam utilitzar els transfectants estables de SDC2 on havíem eliminat el domini EFYA (Figura R1).

L'adhesió de Jurkat-SDC2( $\Delta$ EFYA) a HUVEC *resting* o estimulades amb hTNF- $\alpha$  incrementa en comparació a les Jurkat-SDC2, eliminant l'efecte negatiu de SDC2-wt i recuperant els nivells d'adhesió observats en les Jurkat-wt (Figura R4.B) i indicant que el domini EFYA contribueix a inhibir l'adhesió cel·lular. Malgrat tot, les Jurkat-SDC2( $\Delta$ EFYA) estimulades amb PMA adhereixen menys que les Jurkat-wt a les cèl·lules endotelials (Figura R4.B), suggerint que hi ha altres elements reguladors presents en el domini citoplasmàtic de SDC2( $\Delta$ EFYA) que també estan implicats en la disminució de l'adhesió. A més a més, les Jurkat-SDC2( $\Delta$ EFYA) activades amb PMA i sembrades durant 4 hores sobre pLys no mostren una morfologia polaritzada (Figura R4.A), indicant una alteració en el patró de senyalització intracel·lular en les Jurkat-SDC2( $\Delta$ EFYA) en comparació a les Jurkat-SDC2. Aquests resultats indiquen que SDC2 inhibeix l'adhesió de les Jurkat a les cèl·lules endotelials a través del domini EFYA i suggereix la presència d'elements reguladors addicionals en la cua citoplasmàtica. Per determinar si l'eliminació del domini EFYA reverteix la inhibició de l'adhesió de les Jurkat-SDC2 a les Daudi vam dur a terme un assaig de conjugació. S'observa una disminució en el percentatge de formació de conjugats entre les Jurkat-SDC2( $\Delta$ EFYA) i les Daudi en comparació a les Jurkat-wt (Figura R4.C), tant en la presència com en l'absència de superantigen. Aquests resultats indiquen que altres dominis de SDC2 es troben implicats en la disminució de la capacitat d'adhesió del limfòcit T, confirmant l'efecte observat al activar les Jurkat-SDC2( $\Delta$ EFYA) amb PMA en la figura R4.B.

La recuperació de la capacitat d'adherir correctament al endoteli suggereix que els nivells de LFA-1 en les Jurkat-SDC2( $\Delta$ EFYA) es podrien trobar revertits a nivells de Jurkat-wt. En contra del esperat, l'expressió de LFA-1 en la superfície de les Jurkat-SDC2( $\Delta$ EFYA) es troba a uns nivells similars als observats en les Jurkat-SDC2 (Figura R4.D), suggerint que l'efecte negatiu en l'adhesió de SDC2 per efecte de la disminució de LFA-1 es veu compensat per algun altre mecanisme com ara l'activació de LFA-1 per augment de l'afinitat o l'avidesa (veure apartat 1.2.7). A més a més, en contra del observat en les Jurkat-SDC2, tot i que els nivells del mRNA de CD18 no es troben alterats, els nivells del mRNA de CD11a es troben disminuïts (Figura R4.E). Tot i això, si això es deu a un augment de la degradació del mRNA de CD11a o a una reducció de la transcripció del gen no ha estat estudiat.





**Figura R4. El domini EFYA de SDC2 regula l'adhesió de les Jurkat.** **A.** Adhesió de Jurkat a pLys. Imatges representatives de les Jurkat-SDC2(ΔEFYA) i les Jurkat-wt activades i adherides com en la figura R2.A. **B.** Adhesió de les Jurkat a les HUVEC. Les Jurkat van ser tenyides amb Calcein-AM i activades com en la figura R2.B. Les cèl·lules tenyides es van situar a sobre de la monocapa de HUVEC prèviament estimulada o no amb hTNF-α (1 ng/mL) i es van incubar durant 1 hora a 37°C. Les cèl·lules adherides es van quantificar per mitjà d'un lector de fluorescència. El gràfic de barres representa la mitjana d'adhesió +/- SD de tres línies Jurkat-SDC2(ΔEFYA), cadascuna analitzada en 3 experiments independents duts a terme en quintuplicats i normalitzats al valor d'adhesió de les Jurkat-wt, a les quals se li va donar el valor arbitrari 1 a la seva capacitat d'adherir-se (línia puntejada). **C.** Adhesió de les Jurkat a les Daudi. (Esquerra) Dot-plots representatius de la formació de conjugats entre les Jurkat-SDC2(ΔEFYA) o les Jurkat-wt i les Daudi carregades o no amb superantigen. En l'interior dels rectangles s'observen els conjugats formats. (Dreta) Mitjana de la formació de conjugats +/- SD de tres experiments independents fets en una línia Jurkat-SDC2(ΔEFYA) i normalitzat al nombre de conjugats formats per les Jurkat-wt, al qual se li va donar el valor arbitrari de 1 (línia puntejada). **D.** Nivells de LFA-1 (CD11a i CD18) i VLA-4 (CD49d i CD29) en la superfície de les Jurkat-SDC2(ΔEFYA). Les cèl·lules van ser marcades com en la figura R3.A. (Esquerra) Histogrames representatius. (Dreta) Quantificació dels marcatges. L'expressió relativa va ser calculada a partir dels valors de MFI obtinguts en les Jurkat-SDC2(ΔEFYA) versus els obtinguts en les Jurkat-wt. Mitjana +/- SD de 3 línies independents, cadascuna analitzada almenys en tres experiments independents. **E.** Expressió del mRNA de LFA-1. Els mRNA de CD11a i CD18 van ser analitzats per transcripció reversa del RNA total i RT-PCR. Els valors de CD11a : 18S i CD18 : 18S van ser calculats i normalitzats a les Jurkat-wt, a les que se'ls hi va donar un valor de 1 (línia puntejada). L'anàlisi es va dur a terme en tres línies Jurkat-SDC2(ΔEFYA) independents i la mitjana +/- SD de tres experiments independents és mostrat.

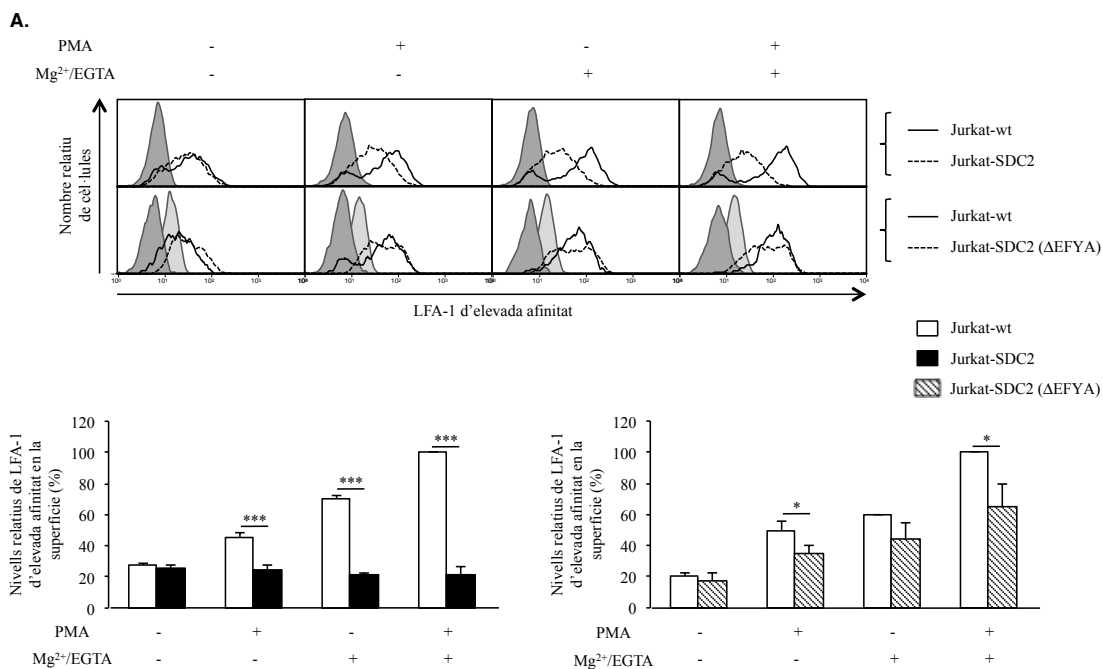
1.2.7. SDC2 inhibeix la formació de l'estat d'elevada afinitat de LFA-1 per PMA i  $Mg^{2+}$ , però no del *clustering*, a través del domini EFYA.

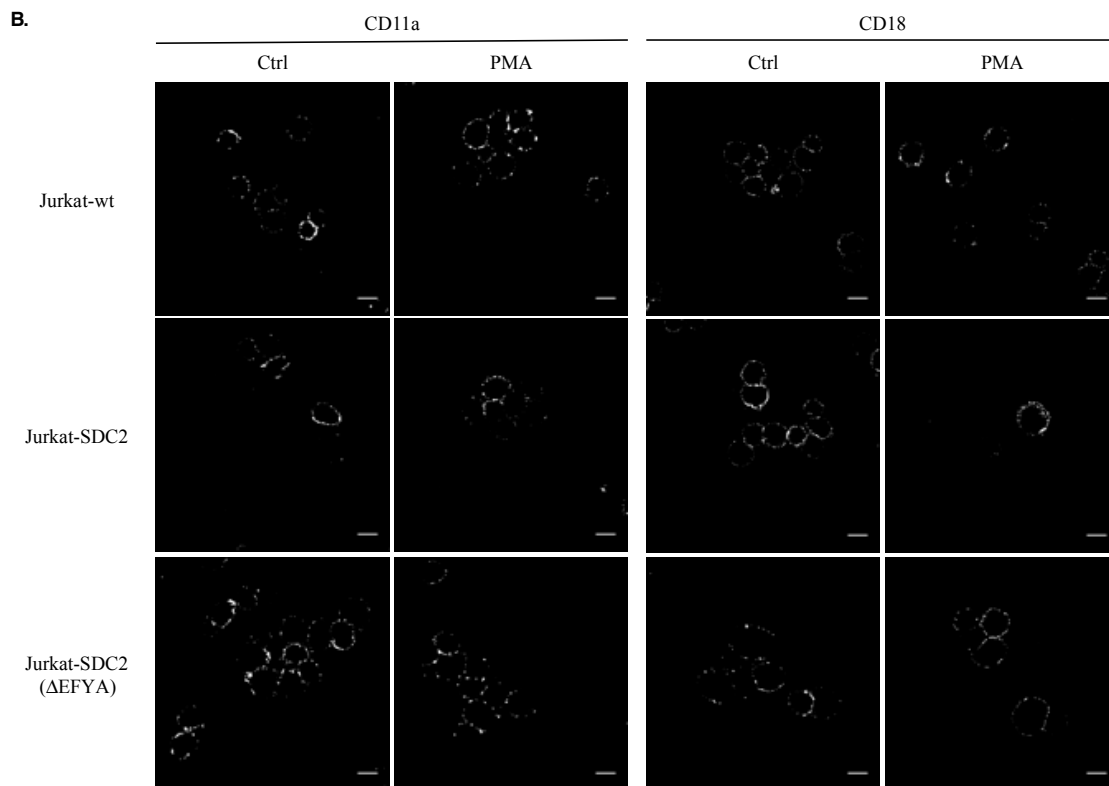
Els resultats observats en els apartats 1.2.2, 1.2.4 i 1.2.5 mostren que les Jurkat-SDC2(ΔEFYA) adhereixen millor a les cèl·lules endotelials que les Jurkat-SDC2, malgrat que presenten unes densitats de LFA-1 en la membrana similars. La capacitat d'adherir de LFA-1 ve determinat per

la modulació de l'afinitat (conformació) o de l'avidesa (*clustering*). Quan els limfòcits T contacten amb les quimiocines presents en el *glycocalyx* de la superfície del endoteli es produeix l'activació de LFA-1 via senyalització *inside-out*. Així doncs, les diferències en l'adhesió entre Jurkat-SDC2 i Jurkat-SDC2( $\Delta$ EFYA) podrien ser degudes a canvis en la capacitat d'activar LFA-1, ja sigui per modulació de la conformació o del *clustering*.

Per testar aquesta hipòtesi, vam analitzar el nivell d'elevada afinitat de LFA-1 usant l'anticòs mAb24 que uneix específicament al domini beta2 I de CD18 quan aquest es troba desplegat <sup>216</sup>. Vam observar que en condicions basals les Jurkat-wt, Jurkat-SDC2 i les Jurkat-SDC2( $\Delta$ EFYA) mostren uns nivells similars de LFA-1 d'elevada afinitat (Figura R5.A). Llavors vam passar a activar la senyalització *inside-out* de les cèl·lules amb PMA i vam tractar les cèl·lules amb l'activador d'integrines  $Mg^{2+}$  <sup>217</sup>. Els dos tractaments, tant sols com combinats incrementen l'afinitat de LFA-1 en les Jurkat-wt i, en menor mesura, també en les Jurkat-SDC2( $\Delta$ EFYA) (Figura R5.A). En contra, l'augment de l'afinitat de LFA-1 en les Jurkat-SDC2 no pot ser assolida per cap d'aquests dos tractaments (Figura R5.A). Malgrat que en les Jurkat-SDC2( $\Delta$ EFYA) podem observar un augment en l'afinitat, en el cas d'activació per PMA les cèl·lules no poden assolir els nivells observats en les Jurkat-wt, correlacionant amb les diferències en l'adhesió a cèl·lula endotelial observades al estimular les Jurkat-wt i les Jurkat-SDC2( $\Delta$ EFYA) amb PMA, suggerint que existeixen elements inhibitoris addicionals en SDC2 apart del domini EFYA.

També vam analitzar la formació de clústers de LFA-1 activant les cèl·lules amb PMA, molècula amb capacitats d'induir la formació de *clusters*. No es poden observar diferències en cap de les diferents línies analitzades (Figura R5.B). Aquests resultats indiquen que, en les Jurkat-SDC2, LFA-1 es troba bloquejat en un estat de baixa afinitat, i que el domini EFYA de SDC2 juga un paper important en la regulació d'aquest fenomen.





**Figura R5.** SDC2 inhibeix la formació de l'estat d'elevada afinitat de LFA-1 per PMA i  $Mg^{2+}$ , però no del *clustering*, a través del domini EFYA. **A.** Detecció de la conformació activa de LFA-1. Les Jurkat van ser estimulades o no amb PMA (10 ng/mL) durant 30 minuts a 37°C, incubades amb el anti-LFA-1 (clon mAb24) conjugat amb un anticòs secundari  $F(ab')_2$  anti-ratolí conjugat a Alexa-488 en presència o absència de 1 mM  $Mg^{2+}$  i 1 mM EGTA, seguit del anàlisi per citometria de flux. (A dalt) Histogrames representatius dels marcatges obtinguts. (A baix) Quantificació dels marcatges. El percentatge d'expressió va ser calculat a partir dels valors de MFI obtinguts en les Jurkat-wt estimulades amb PMA i  $Mg^{2+}$ -EGTA. Els resultats representen la mitjana +/- SD de tres experiments independents amb una línia Jurkat-SDC2 i una línia Jurkat-SDC2(ΔEFYA). **B.** Distribució a la superfície de CD11a i CD18. Les cèl·lules van ser estimulades o no amb PMA (10 ng/mL) i marcades amb anti-CD11a o anti-CD18. L'anàlisi es va dur a terme en dos línies Jurkat-SDC2, tal i com està descrit en la secció materials i mètodes. Escala: 10  $\mu$ m.

### 1.2.8 L'expressió de Talin1-*head* no rescata l'afinitat de LFA-1 en les Jurkat-SDC2

L'activació de l'afinitat de les integrines via senyalització *inside-out* és regulada per talin<sup>218</sup>. El domini *head* de Talin1 regula l'afinitat i l'afinitat de les integrines<sup>219,220</sup>, i és necessari per l'activació de LFA-1 per senyalització *inside-out*<sup>221</sup>. Per tal d'identificar un possible rol de Talin1 en la inhibició de LFA-1 d'elevada afinitat per SDC2, vam transfectar un plasmidi que codificava per Talin1-*head* unit a EGFP tant en les Jurkat-wt com en les Jurkat-SDC2. Les cèl·lules van ser estimulades amb PMA i  $Mg^{2+}$  per activar la forma d'elevada afinitat de LFA-1 i van ser marcades amb el anticòs mAb24. En contra del esperat, la sobre-expressió del domini Talin1-*head* no incrementa els nivells de LFA-1 d'elevada afinitat en les Jurkat-SDC2 (Figura R6.A), indicant que degut a la sobre-expressió de SDC2 la integrina es troba bloquejada en un estat de baixa afinitat.

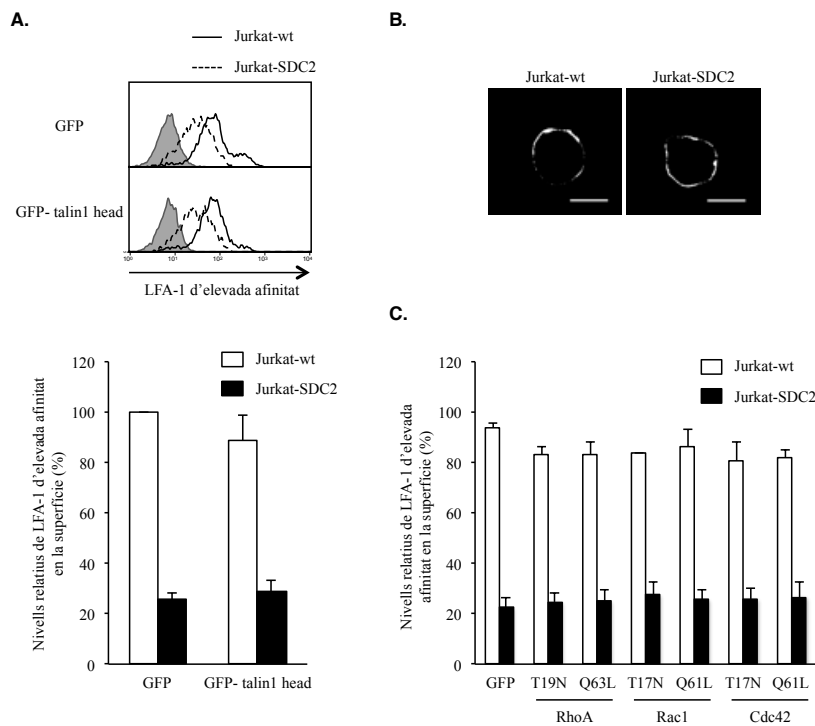
El fosfatidilinositol 4,5-bifosfat (PtdIns[4,5]P<sub>2</sub>) permet la unió de talin a la cadena  $\beta$  de LFA-1<sup>222</sup> i els SDCs tenen la capacitat de modular el tràfic intracel·lular de PtdIns[4,5]P<sub>2</sub><sup>223</sup>, per tant la

distribució de PtdIns[4,5]P<sub>2</sub> es podria trobar alterada en les Jurkat-SDC2, posicionant-se inaccessible a Talin1 i LFA-1. Per analitzar-ho, vam visualitzar els *pools* de PtdIns[4,5]P<sub>2</sub> mitjançant l'expressió del domini homòleg a *pleckstrin* de la PLC unida a GFP<sup>224</sup>. Aquest domini de la PLC uneix PtdIns[4,5]P<sub>2</sub> i és usat com a sensor de la seva localització. La distribució del PtdIns[4,5]P<sub>2</sub> en les Jurkat-wt i les Jurkat-SDC2 és similar i majoritàriament en la membrana (Figura R6.B). Això indica que l'absència d'efecte al sobre-expressar *Talin1-head* en les Jurkat-SDC2 no era degut a diferències en la localització cel·lular dels PtdIns[4,5]P<sub>2</sub>. Així doncs, la pèrdua de la capacitat d'activació de LFA-1 d'elevada afinitat en les Jurkat-SDC2 expressant *Talin1-head* suggereix que LFA-1 no es troba accessible a la interacció amb Talin1.

### 1.2.9 L'expressió de RhoA, Rac1 i Cdc42 no reverteix el bloqueig de l'afinitat de LFA-1 en les Jurkat-SDC2

Per tal de determinar si el bloqueig de l'afinitat de LFA-1 en les Jurkat-SDC2 era degut a una alteració en la senyalització intracel·lular, ens vam centrar en tres *small GTPases* conegudes pel seu rol en el control de la funció de les integrines<sup>146</sup>. SDC4 regula la direcció de la migració en resposta a una matriu extracel·lular per mitjà de l'activació de RhoA i Rac1<sup>149</sup>, a més, l'augment en l'activitat de RhoA i Rac1 es troba lligat a un augment de l'activitat de les integrines<sup>146</sup>. Així doncs, vam sobre-expressar els cDNA de RhoA i Rac1 constitutivament actius (*RhoA-Q63L* i *Rac1-Q61L*) o dominants negatius (*RhoA-T19N* i *Rac1-T17N*) fusionats a *EGFP* per determinar si el bloqueig de l'afinitat de LFA-1 per SDC2 es podia veure revertit. Ni l'expressió de les formes actives o inhibidores de RhoA o Rac1 tenen cap efecte en la inhibició de LFA-1 d'elevada afinitat de SDC2 (Figura R6.C).

Estudis previs mostren la funció de Cdc42 com a regulador negatiu de l'afinitat de LFA-1<sup>146</sup>. Apart, la sobre-expressió de SDC2 en cèl·lules COS-1 correlaciona amb una activació de Cdc42<sup>143</sup>, la qual és requerida per la inducció de fil·lopodis. Per tal de determinar si el bloqueig de LFA-1 en un estat de baixa afinitat en les Jurkat-SDC2 és degut a una activació de Cdc42 vam sobre-expressar el dominant negatiu *Cdc42-T17N* fusionat a *EGFP* (Figura R6.C). Comparat amb les cèl·lules no transfectades, les Jurkat-SDC2 transfectades amb *Cdc42-T17N* no mostren canvis en la conformació de LFA-1 (Figura R6.C). A més a més, també vam testar si la sobre-expressió del mutant constitutivament actiu *Cdc42-Q61L* alterava l'estat basal d'afinitat de LFA-1 en les Jurkat-SDC2, amb resultats negatius (Figura R6.C). Aquests resultats suggereixen que les *small GTPases* RhoA, Rac1 i Cdc42 no es troben implicades en la regulació de l'afinitat de LFA-1 duta a terme per SDC2.



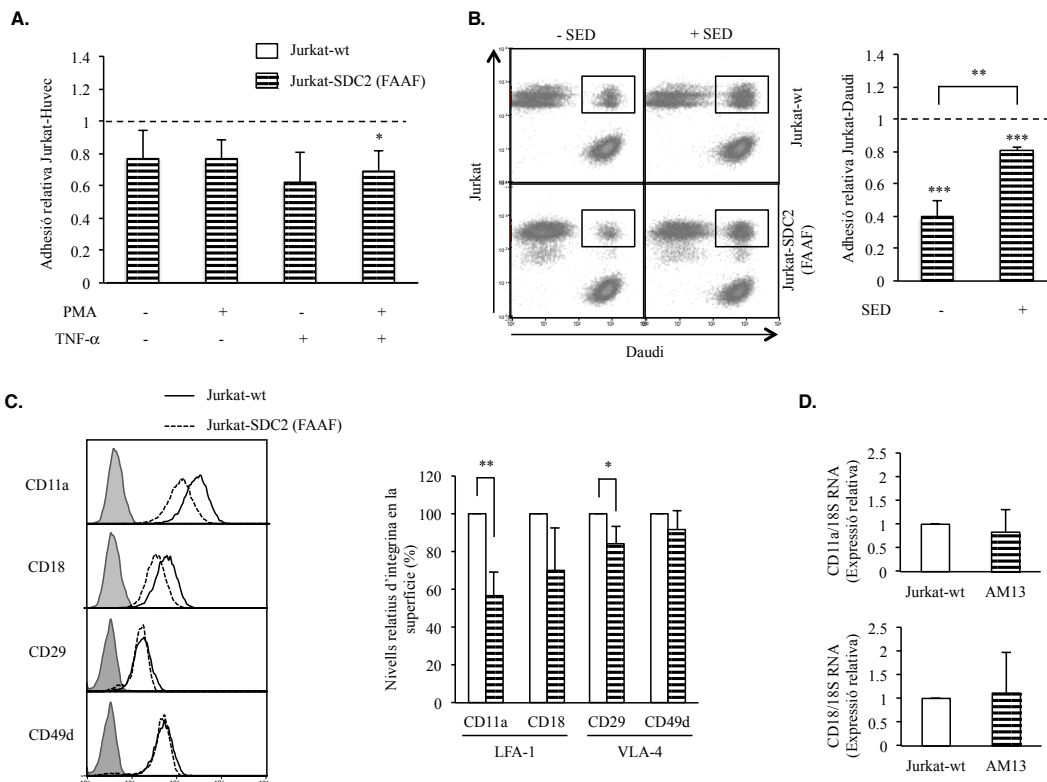
**Figura R6.** El bloqueig de l'activació de LFA-1 per SDC2 no pot ser revertit per l'expressió de Talin1-head o de Rho-GTPases. **A.** La transfecció de Talin1-head no reverteix el bloqueig de l'afinitat de LFA-1 per part de SDC2. Les Jurkat-wt i les Jurkat-SDC2 van ser transfectades per electroporació amb els cDNAs de *EGFP-Talin1-head* o *GFP*. Després de 24 hores, les cèl·lules van ser estimulades amb PMA (10 ng/mL) durant 30 minuts a 37°C i marcades amb el anti-LFA-1 (mAb24) conjugat amb un anticòs secundari F(ab')<sub>2</sub> anti-ratolí conjugat a Alexa-633 en presència de 1 mM Mg<sup>2+</sup> i 1 mM EGTA, seguit del anàlisi per citometria de flux i selecció de cèl·lules GFP<sup>+</sup>. (A dalt) Histogrames representatius dels marcatges obtinguts. (A baix) Quantificació dels marcatges. El percentatge d'expressió va ser calculat a partir dels valors de MFI obtinguts en les Jurkat-wt estimulades amb PMA i Mg<sup>2+</sup>-EGTA. Els resultats representen la mitjana +/- SD de tres experiments independents en una línia Jurkat-SDC2. **B.** Localització de PtdIns[4,5]P<sub>2</sub>. Les Jurkat-wt i les Jurkat-SDC2 van ser transfectades per electroporació amb el cDNA *2PH-PLCdelta-GFP*. Després de 24 hores les cèl·lules es van fixar i es van analitzar per microscòpia confocal. Imatges representatives d'una de les dues línies analitzades. Escala: 10 μm. **C.** Les Rho-GTPases no es troben implicades en el bloqueig de l'afinitat de LFA-1 per part de SDC2. Les Jurkat-wt i les Jurkat-SDC2 van ser transfectades per electroporació amb els cDNAs de *EGFP-RhoA-T19N* (Dominant Negatiu), *-Q63L* (Constitutivament Actiu), *EGFP-Rac1-T17N* (Dominant Negatiu), *-Q61L* (Constitutivament Actiu), *EGFP-Cdc42-T17N* (Dominant Negatiu), *-Q61L* (Constitutivament Actiu) o *GFP*. Després de 24 hores, les cèl·lules van ser estimulades amb PMA (10 ng/mL) durant 30 minuts a 37°C i marcades amb el anti-LFA-1 (mAb24) conjugat amb un anticòs secundari F(ab')<sub>2</sub> anti-ratolí conjugat a Alexa-633 en presència de 1 mM Mg<sup>2+</sup> i 1 mM EGTA, seguit del anàlisi per citometria de flux i selecció de cèl·lules GFP<sup>+</sup>. El MFI de les cèl·lules Alexa-633 positives en les cèl·lules GFP positives es representa com a percentatge del màxim obtingut en les Jurkat-wt. Els resultats representen la mitjana +/- SD de tres experiments independents en una línia Jurkat-SDC2.

### 1.2.10 Rol de les tirosines i serines citoplasmàtiques de SDC2 en l'adhesió cel·lular

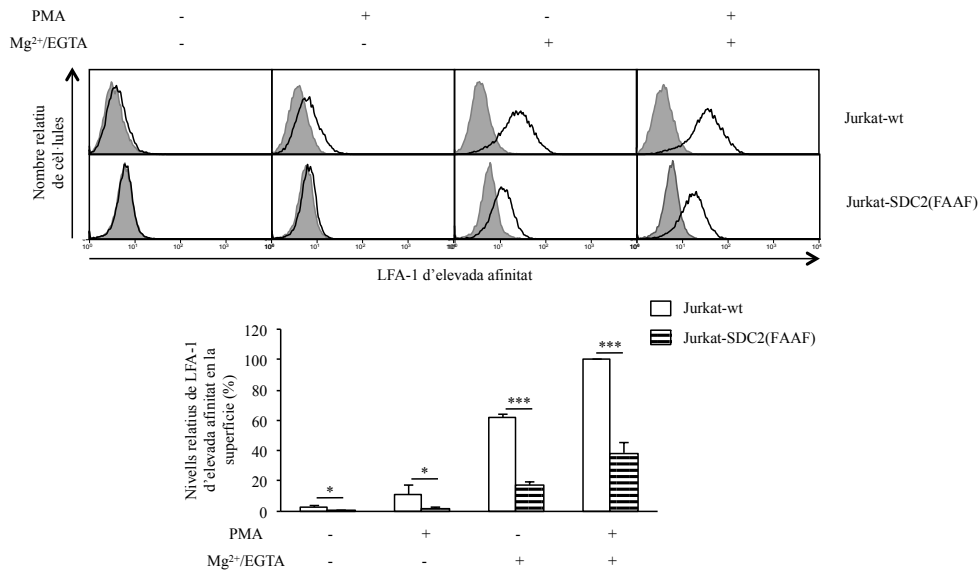
La recuperació incompleta de l'adhesió a HUVEC de les Jurkat-SDC2(ΔEFYA) estimulades per PMA suggereix que d'altres motius apart del domini EFYA podrien tenir un rol en el control de l'adhesió. La fosforilació de la tirosina 180 present a la regió citoplasmàtica de SDC4 es troba implicada en el reciclatge d'integrines i la migració cel·lular<sup>151</sup>. Apart, la fosforilació de SDC2 per EphB2 és necessària per la formació de les espines dendrítiques<sup>183</sup>. Així doncs, per tal de determinar el rol de les tirosines 179 i 192 i de les serines 187 i 188, vam mutar-les a

fenilalanina i alanina, respectivament. El mutant *SDC2(FAAF)* va ser transfectat de manera estable a les Jurkat (Jurkat-*SDC2(FAAF)*) i l'adhesió a HUVEC i Daudi va ser analitzada. En el cas de l'adhesió a les cèl·lules endotelials, el patró d'adhesió de les Jurkat-*SDC2(FAAF)* és similar al de les Jurkat-*SDC2*, malgrat que només arriba a significança quan ambdós tipus cel·lular són estimulats (Figura R7.A). Curiosament, encara que l'adhesió de les Jurkat-*SDC2(FAAF)* a les Daudi no estimulades es troba inhibida, en el cas en que els limfòcits B s'estimulen amb el superantigen SED, les Jurkat-*SDC2(FAAF)* adhireixen gairebé tant bé com les Jurkat-wt (Figura R7.B). Les Jurkat-*SDC2(FAAF)* també mostren uns nivells de CD11a en membrana disminuïts (Figura R7.C), però això no és degut a una inhibició del mRNA (Figura R7.D). Tal i com s'observa en les Jurkat-*SDC2(ΔEFYA)*, l'expressió del *SDC2(FAAF)* no bloqueja LFA-1 en un estat de baixa afinitat (Figura R7.E), malgrat que no arriben als nivells observats en les Jurkat-wt.

En resum, aquests resultats suggereixen que *SDC2* podria regular l'adhesió dels limfòcits T  $CD4^+$  per mitjà de la reducció de l'expressió en membrana de LFA-1 i el bloqueig d'aquesta mateixa integrina en un estat de baixa afinitat via senyalització iniciada en el domini citoplasmàtic de *SDC2*.



E.



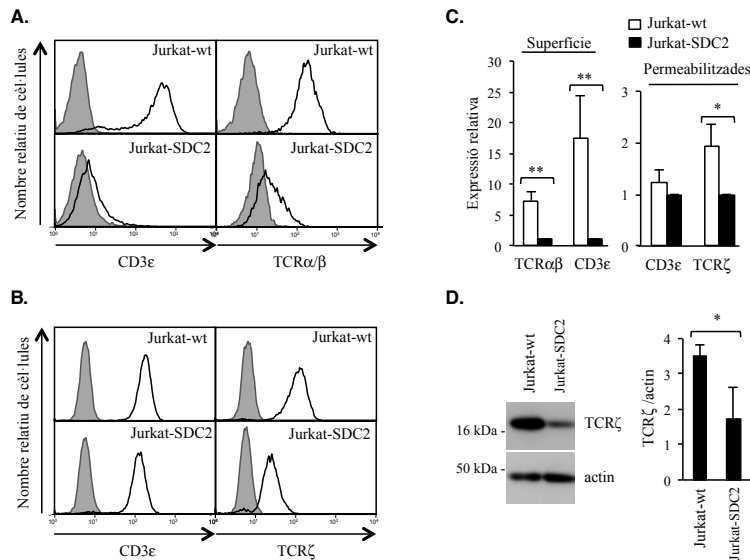
**Figura R7. Rol de les tirosines i serines de la regió citoplasmàtica de SDC2 en l'adhesió de les Jurkat.**

**A.** Adhesió de les Jurkat a les HUVEC. Les Jurkat van ser tenyides amb Calcein-AM activades com en la figura R2.B. Les cèl·lules tenyides es van situar a sobre de la monocapa de HUVEC prèviament estimulada o no amb hTNF-a (1 ng/mL) i es van incubar durant 1 hora a 37°C. Les cèl·lules adherides es van quantificar per mitjà d'un lector de fluorescència. El gràfic de barres representa la mitjana d'adhesió +/- SD d'una línia Jurkat-SDC2(FAAF) analitzada en 3 experiments independents duts a terme en quintuplicats i normalitzats al valor d'adhesió de les Jurkat-wt, a les quals se li va donar el valor arbitrari 1 a la seva capacitat d'adherir-se (línia puntejada). **B.** Adhesió de les Jurkat a les Daudi. (Esquerra) Dot-plots representatius de la formació de conjugats entre les Jurkat-SDC2(FAAF) o les Jurkat-wt i les Daudi carregades o no amb superantigen. En l'interior dels rectangles s'observen els conjugats formats. (Dreta) Mitjana de la formació de conjugats +/- SD de tres experiments independents fets en una línia Jurkat-SDC2(FAAF) i normalitzat al nombre de conjugats formats per les Jurkat-wt, al qual se li va donar el valor arbitrari de 1 (línia puntejada). **C.** Nivells de LFA-1 (CD11a i CD18) i VLA-4 (CD49d i CD29) en la superfície de les Jurkat-SDC2(FAAF). Les cèl·lules van ser marcades com en la figura R3.A. (Esquerra) Histogrames representatius. (Dreta) Quantificació dels marcatges. L'expressió relativa va ser calculada a partir dels valors de MFI obtinguts en les Jurkat-SDC2(FAAF) versus els obtinguts en les Jurkat-wt. Mitjana +/- SD d'una línia Jurkat-SDC2(FAAF) analitzada en tres experiments independents. **D.** Expressió del mRNA de LFA-1. Els mRNA de CD11a i CD18 van ser analitzats per transcripció reversa del RNA total i RT-PCR. Els valors de CD11a : 18S i CD18 : 18S van ser calculats i normalitzats a les Jurkat-wt, a les que se'ls hi va donar un valor de 1. L'anàlisi es va dur a terme en una línia Jurkat-SDC2(FAAF) i la mitjana +/- SD de tres experiments independents és mostrat. **E.** Detecció de la conformació activa de LFA-1. Les Jurkat van tractades com en la figura R5.A. (A dalt) Histogrames representatius dels marcatges obtinguts. (A baix) Quantificació dels marcatges. El percentatge d'expressió va ser calculat a partir dels valors de MFI obtinguts en les Jurkat-wt estimulades amb PMA i Mg<sup>2+</sup>-EGTA. Els resultats representen la mitjana +/- SD de tres experiments independents en una línia Jurkat-SDC2(FAAF).

### 1.3. SDC2 podria promoure la downregulació del complex TCR/CD3

#### 1.3.1. SDC2 disminueix el nivell en membrana del complex TCR/CD3

Durant la caracterització fenotípica de les Jurkat-SDC2 vam observar per citometria de flux que aquestes línies mostraven una marcada reducció del nivell en membrana del complex TCR/CD3, tant al analitzar el CD3 $\epsilon$  com al analitzar el TCR $\alpha/\beta$  (Figura R8.A i .C). Per tal d'examinar si la reducció del nivell en membrana del TCR/CD3 en les Jurkat-SDC2 era degut a una retenció del complex en l'interior cel·lular, vam fixar, permeabilitzar i incubar les cèl·lules amb anticossos anti-CD3 $\epsilon$  per analitzar el contingut total. Malgrat que la presència en superfície de CD3 $\epsilon$  mostra una marcada disminució en les Jurkat-SDC2, el nivell total (superfície i intracel·lular) és similar al comparar amb les Jurkat-wt (Figura R8.B-C). Degut que la subunitat TCR $\zeta$  és limitant per a l'expressió en membrana del complex TCR/CD3 vam analitzar el nivell total de TCR $\zeta$ , tant per marcatge del nivell total per citometria de flux com per anàlisi del nivell per WB, observant una disminució d'aproximadament el 50% en el nivell de TCR $\zeta$  en les Jurkat-SDC2 al comparar amb les Jurkat-wt (Figura R8.B-D). Aquests resultats indiquen que la sobre-expressió de SDC2 en Jurkat porta a una dràstica reducció del complex TCR/CD3 en la superfície cel·lular degut a una degradació de la subunitat TCR $\zeta$  i conseqüent acumulació de CD3 $\epsilon$  en l'interior cel·lular.

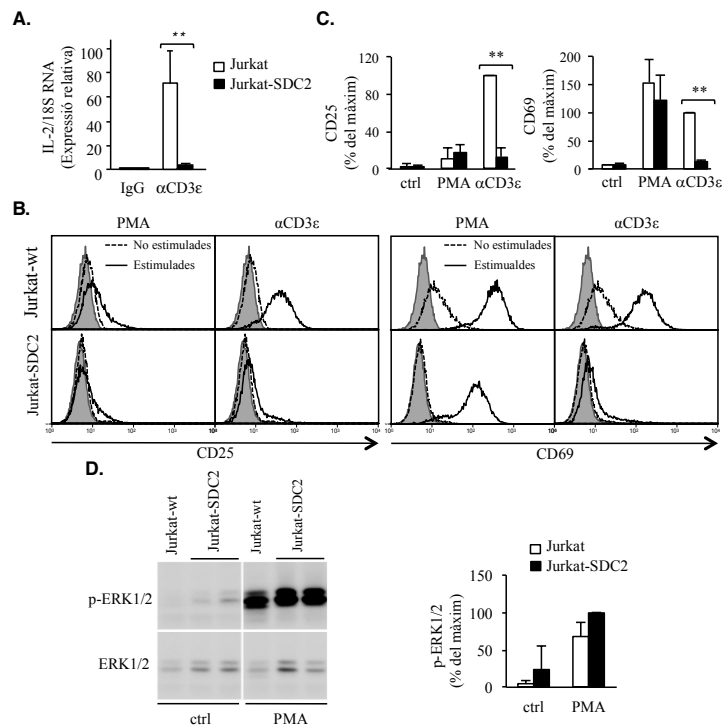


**Figura R8.** Les Jurkat-SDC2 mostren una reducció en els nivells en membrana del TCR/CD3. **A.** Nivells del TCR/CD3 en la superfície de les Jurkat-wt i les Jurkat-SDC2. Les cèl·lules van ser incubades amb anti-CD3 $\epsilon$  (clon 33-2A3) o anti-TCR $\alpha/\beta$  (clon IP26), seguit d'un marcatge amb un anticòs secundari F(ab')<sub>2</sub> anti-ratolí conjugat a Alexa-488, per finalment analitzar les cèl·lules per citometria de flux. **B.** Nivells totals de CD3 $\epsilon$  i TCR $\zeta$ . Les cèl·lules van ser fixades, permeabilitzades i marcades amb anti-CD3 $\epsilon$  (clon 33-2A3) o anti-TCR $\zeta$  (clon 6B10.2), seguit d'un marcatge amb un anticòs secundari F(ab')<sub>2</sub> anti-ratolí conjugat a Alexa-488, per finalment analitzar les cèl·lules per citometria de flux. **C.** Quantificació dels marcatges mostrats en "A." i "B.". L'expressió relativa va ser calculada a partir dels valors de MFI obtinguts en les Jurkat-wt versus els obtinguts en les Jurkat-SDC2. Mitjana +/- SD de 5 línies independents en el cas dels marcatges amb anti-CD3 $\epsilon$ , 3 línies independents en el de TCR $\alpha/\beta$  i 4 línies independents en el de TCR $\zeta$ . **D.** Anàlisi per Western blot de TCR $\zeta$ . El valor es relativitza per mitja de l'actina. La mitjana +/- SD representa el rati TCR $\zeta$  : actina de 5 línies Jurkat-SDC2 independents.



### 1.3.2. Les Jurkat-SDC2 no responen a l'estimulació amb anti-CD3ε

En línia amb els resultats presentats en l'apartat 1.3.1, les Jurkat-SDC2 mostren una capacitat reduïda a l'estimulació amb anti-CD3ε. L'anàlisi dels nivells del mRNA d'IL-2 i del nivell en membrana de CD25 i CD69, indicadors d'activació dels limfòcits T, mostren la incapacitat d'aquestes cèl·lules de respondre a l'activació amb anti-CD3ε lligat a placa (Figura R9.A-C). Malgrat això la resposta de les Jurkat-wt i les Jurkat-SDC2 al ser estimulades amb PMA és similar, indicant que les diferències en l'activació no són donades per alteracions en la maquinària de senyalització *downstream* del TCR/CD3 (Figura R9.B-C). L'anàlisi de la fosforilació d'ERK1/2 un cop les cèl·lules han estat incubades amb PMA confirmen que *downstream* de TCR/CD3 la senyalització en les Jurkat-SDC2 no es troba alterada (Figura R9.D). En resum, aquests resultats indiquen que la reduïda presència de TCR/CD3 en la superfície cel·lular de les Jurkat-SDC2 provoca que aquestes cèl·lules no puguin ser correctament activades per estimulació amb anti-CD3ε.

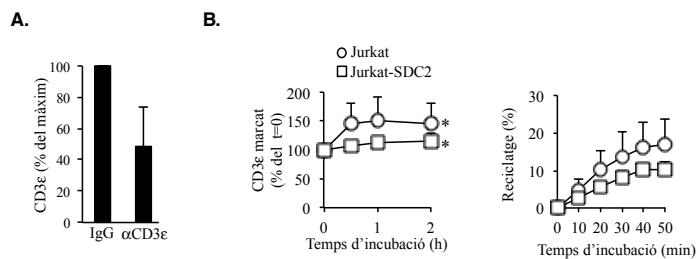


**Figura R9. Les Jurkat-SDC2 no responen a l'estimulació amb anti-CD3ε.** **A.** Expressió del mRNA d'IL-2. Les cèl·lules es van deixar en *starvation* durant tota la nit en RPMI-0,5% FBS i després van ser estimulades per anti-CD3ε (clon 33-2A3) lligat a placa o IgG (4 µg/mL) control durant 3 hores a 37°C. El mRNA d'IL-2 va ser analitzat per transcripció reversa del RNA total i RT-PCR. Els valors d'IL-2 : 18S van ser calculats i normalitzats a les Jurkat-wt, a les que se'ls hi va donar un valor de 1. L'anàlisi es va dur a terme en dues línies independents i la mitjana +/- SD de tres experiments independents d'una línia representativa és mostrat. **B.** Nivells de CD25 i CD69. Les cèl·lules van ser activades o no amb anti-CD3ε (clon 33-2A3) lligat a placa (4 µg/mL) o PMA (10 ng/mL) durant 24 hores a 37°C, incubades amb anti-CD25 o anti-CD69, seguit d'un marcatge amb un anticòs secundari F(ab')<sub>2</sub> anti-ratolí conjugat a Alexa-488, per finalment analitzar les cèl·lules per citometria de flux. **C.** Quantificació dels marcatges mostrats en "B.". La MFI obtinguda en els marcatges es representa com el percentatge obtingut en referència al màxim obtingut en les Jurkat-wt en l'estimulació amb anti-CD3ε lligat a placa. Mitjana +/- SD de 3 línies independents analitzades en 8 experiments. **D.** Anàlisi per Western blot d'ERK1/2 fosforilades. Les cèl·lules van ser estimulades o no amb PMA (10 ng/mL) durant 5 minuts a 37°C. El valors es relativitzen per mitja d'ERK1/2 total. La mitjana +/- SD representa el rati ERK1/2 fosforilades : ERK1/2 de 3 línies Jurkat-SDC2 independents, cadascuna analitzada en 2 experiments, on els valors obtinguts al estimular les Jurkat-SDC2 amb PMA reben el valor de 100.

### 1.3.3. La internalització i el reciclatge del TCR/CD3 en les Jurkat-SDC2 no es troba alterat

L'augment en el contingut intracel·lular de CD3 $\epsilon$  en les Jurkat-SDC2 és possiblement una causa directa de la disminució del nivell total de TCR $\zeta$ . Malgrat això, la inducció de la downregulació del TCR/CD3 també pot ser alterada per canvis en els ratis d'internalització i de reciclatge<sup>225</sup>. Així doncs vam analitzar la dinàmica d'internalització i reciclatge en les Jurkat-SDC2 per conèixer si canvis en aquests mecanismes podrien afectar la retenció intracel·lular del TCR/CD3 en aquestes línies. Malgrat el baix nivell en membrana del TCR/CD3 en les Jurkat-SDC2, ens vam preguntar si aquestes cèl·lules encara mantienien la capacitat de downregular el que quedava en membrana. Així doncs, vam estimular les cèl·lules amb un anticòs anti-CD3 $\epsilon$  agonista, inductor de la downregulació, i vam poder observar una disminució en els nivells en membrana (Figura R10.A), suggerint que la internalització del TCR no es trobava alterada en aquestes cèl·lules.

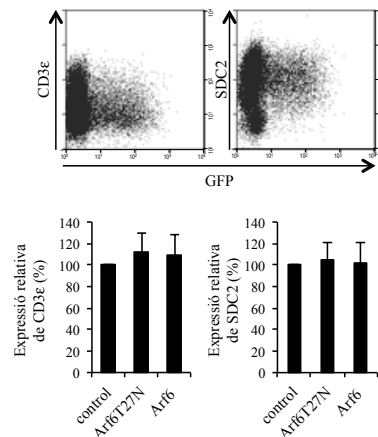
Per determinar si SDC2 regula el reciclatge del TCR/CD3 vam determinar el *pool* de CD3 $\epsilon$  que recicla. Les Jurkat-SDC2 van ser incubades amb anti-CD3 $\epsilon$  i un secundari anti-ratolí conjugat a Alexa-488 i les cèl·lules van ser mantingudes en gel o bé a 37°C durant 2 hores, moment en el que vam tornar a marcar el CD3 $\epsilon$ , per tal de marcar els complexos que havien sortit durant la incubació. Vam observar un increment en la fluorescència degut al reciclatge de complexos cap a la superfície cel·lular tant en les Jurkat-wt com en les Jurkat-SDC2 (Figura R10.B), proporcional als nivells en superfície de CD3 $\epsilon$  i independent del elevat reservori intracel·lular observat en les Jurkat-SDC2, suggerint que el *pool* intracel·lular de CD3 $\epsilon$  de les Jurkat-SDC2 contribueix marginalment al reciclatge. També vam mesurar el rati del reciclatge de CD3 $\epsilon$  i vam observar que el anti-CD3 $\epsilon$  internalitzat surt a la superfície de manera similar en Jurkat-wt i Jurkat-SDC2 (Figura R10.B). Aquests resultats suggereixen que canvis en la internalització i el reciclatge del TCR/CD3 no contribueixen de manera important en la reducció dels nivells en membrana del TCR/CD3 observada en les Jurkat-SDC2 i indiquen que la reducció en el nivell total de TCR $\zeta$  limita l'arribada del complex TCR/CD3 a la superfície d'aquestes cèl·lules.



**Figura R10. La internalització i el reciclatge en les Jurkat-SDC2 no es troba alterat.** A. Downregulació de CD3 $\epsilon$  en les Jurkat-SDC2. Les Jurkat-SDC2 van ser estimulades durant 2 hores a 37°C amb anti-CD3 $\epsilon$  soluble (clon 33-2A3; 0,3  $\mu$ g/ml) i analitzades com en la figura R8.A. Mitjana +/- SD de dos experiments independents duts a terme en dues línies Jurkat-SDC2. B. (Esquerra) Nivells de CD3 $\epsilon$  en superfície i reciclat. Les Jurkat-wt i les Jurkat-SDC2 van ser incubades amb anti-CD3 $\epsilon$  (clon 33-2A3) i un anticòs secundari F(ab')<sub>2</sub> anti-ratolí conjugat a Alexa-488, en gel per determinar els nivells de CD3 $\epsilon$  en la superfície cel·lular o bé incubats a 37°C durant els temps indicats per tal de marcar el CD3 $\epsilon$  de superfície i el reciclat. La MFI va ser determinada per citometria de flux i representada com a percentatge respecte el valor de les Jurkat-wt o Jurkat-SDC2 incubades en gel, destacant que el MFI és inferior en el cas de les últimes. Mitjana +/- SD de 5 experiments duts a terme en una línia Jurkat-SDC2, representativa de 3 línies. (Dreta) Reciclatge del anti-CD3 $\epsilon$  prèviament internalitzat. El percentatge de reciclatge és mostrat en referència al marcatge obtingut a temps 0 (veure materials i mètodes). Mitjana +/- SD de tres experiments duts a terme en una línia Jurkat-SDC2, representativa de dues.

### 1.3.4. La disminució del nivell en membrana del TCR/CD3 per SDC2 és independent de l'activitat d'Arf6

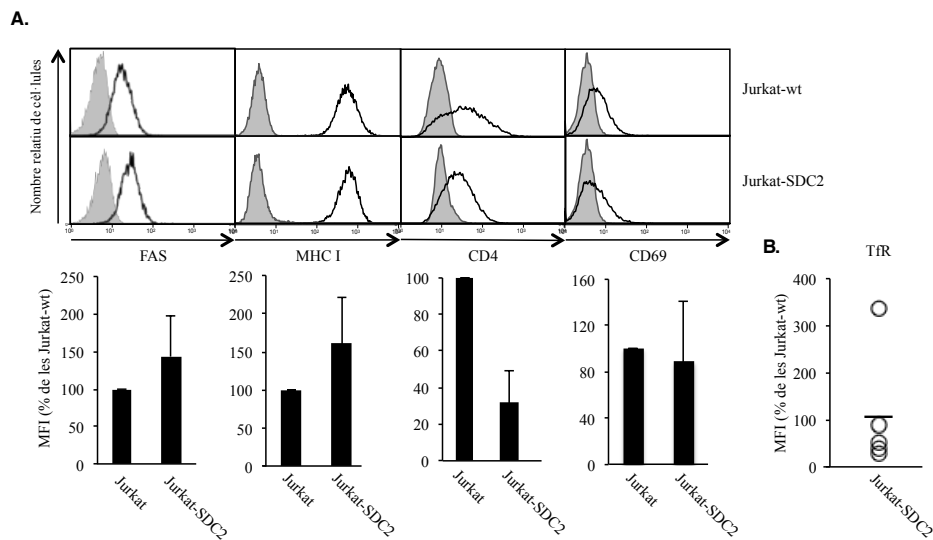
El reciclatge dels SDCs és parcialment dependent de la *GTPase* Arf6<sup>135</sup>. Per conèixer si l'activitat *GTPase* d'Arf6 es trobava implicada en la internalització del TCR/CD3 dependent de SDC2, vam transfectar Jurkat-wt i Jurkat-SDC2 amb un plasmidi que codifica per el cDNA *Arf6 wild-type* o el dominant negatiu *Arf6-T27N*, una forma d'Arf6 incapaç d'intercanviar GDP per GTP. L'anàlisi per citometria de flux indica que l'expressió d'Arf6 o d'Arf6-T27N no altera l'expressió en superfície ni de SDC2 ni de CD3ε (Figura R11), suggerint que l'activitat *GTPase* d'Arf6 no es necessària per reduir els nivells en superfície del TCR/CD3 en les Jurkat-SDC2.



**Figura R11.** La disminució dels nivells en membrana del TCR/CD3 per SDC2 és independent de l'activitat d'Arf6. Les Jurkat-SDC2 van ser transfectades amb el cDNA de *gfp* i *Arf6-WT* o *Arf6-T27N*, i 24 hores després de la transfecció es van analitzar per citometria de flux els nivells en membrana de CD3ε i SDC2 en les cèl·lules GFP positives. Els dot-plots són representatius dels marcatges en una línia Jurkat-SDC2 representativa i les mitjanes +/- SD corresponen a 3 línies, cadascuna transfectada 2 vegades.

### 1.3.5. Les Jurkat-SDC2 mostren alteracions en el nivell en membrana de receptors que ciclejaven per la via d'endocitosis dependent de clatrina

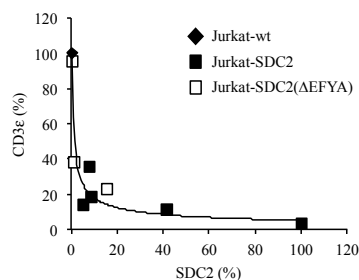
El receptor de transferrina (TfR) o CD71 és un receptor que comparteix via de tràfic endosomal amb el TCR/CD3 durant l'estimulació antigènica<sup>226</sup>. L'anàlisi de la presència en membrana d'aquesta molècula mostra una reducció dels nivells en 4 de les 5 línies analitzades (Figura R12.B), indicant que l'efecte de SDC2 no es troba actuant només sobre el TCR/CD3, podent ser un efecte sobre la via d'endocitosis dependent de clatrina. Aquesta hipòtesis ve reforçada pel fet que el CD4, un altre receptor que és internalitzat de manera coordinada amb el TCR/CD3 durant l'estimulació antigènica per la via dependent de clatrina, també mostra un nivell reduït de la seva expressió en la superfície de les Jurkat-SDC2 (Figura R12.A). Cal destacar que d'altres molècules presents en la superfície cel·lular com són Fas, CD69 o MHC-I no mostraven alteracions en el nivell en membrana (Figura R12.A).



**Figura R12.** Les Jurkat-SDC2 mostren alteracions en els nivells en membrana de receptors que cicleu via clatrina. **A.** Nivells en membrana de Fas, MHC-I, CD4 i CD69 en les Jurkat-SDC2 i les Jurkat-wt. Les cèl·lules van ser incubades amb anticossos contra el respectiu marcador, seguit d'un marcatge amb un anticòs secundari F(ab')<sub>2</sub> anti-ratolí conjugat a Alexa-488, per finalment analitzar les cèl·lules per citometria de flux. Els histogrames mostren les Jurkat-wt i una línia Jurkat-SDC2 representativa d'almenys 3. **B.** Nivells en membrana del Tfr en les Jurkat-SDC2 i les Jurkat-wt. Es mostren els nivells de 5 línies comparat als nivells de les Jurkat-wt (100%). La línia que expressa uns nivells més elevats és la Jurkat-SDC2-A21, que presenta un nivells elevats de SDC2 en la superfície.

### 1.3.6. El domini EFYA de SDC2 no és necessari per disminuir el nivell en membrana del TCR/CD3

El domini EFYA de SDC2 es troba implicat en el tràfic endosomal gràcies a la interacció amb *Syntenin*<sup>135</sup> i com hem vist anteriorment, participa en la regulació de l'expressió de LFA-1. Per tal de determinar el rol del domini EFYA en el control de l'expressió del TCR els nivells de CD3ε en les Jurkat-SDC2(ΔEFYA) van ser analitzats. Vam poder observar una correlació inversa entre els nivells de SDC2(ΔEFYA) i els de CD3ε, similar a la observada en les Jurkat-SDC2 (Figura R13). Aquest resultat indica que el domini EFYA no és essencial per a downregular el TCR/CD3, suggerint que el tràfic de SDC2 no està involucrat en la disminució dels nivells en membrana d'aquest receptor.

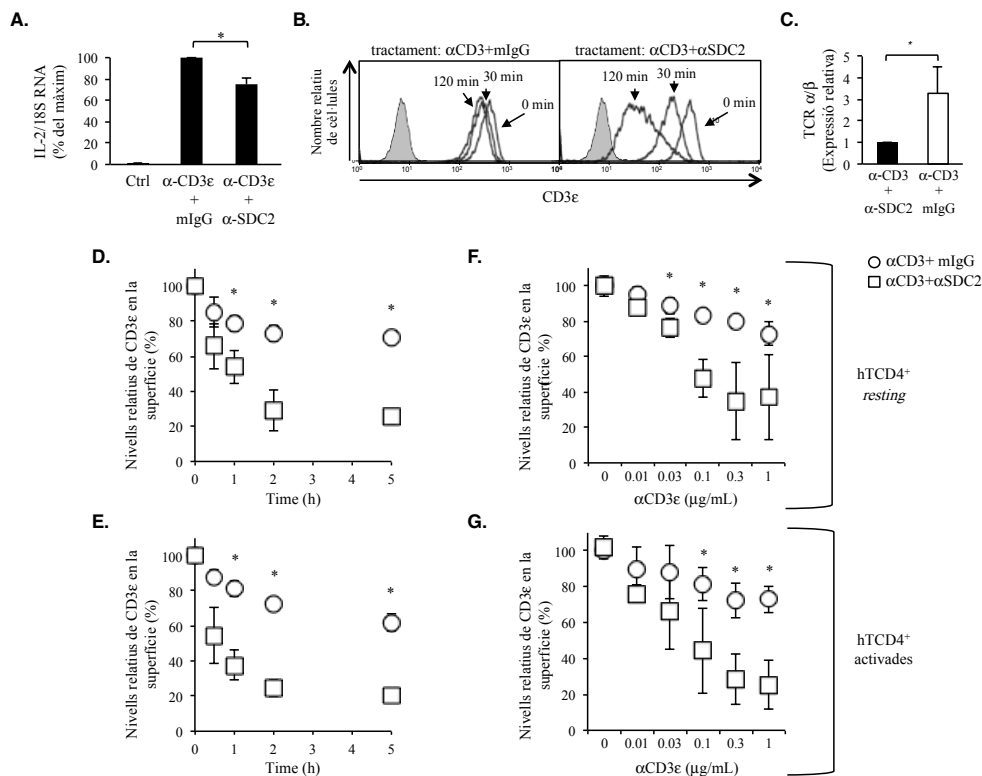


**Figura R13.** El domini EFYA de SDC2 no és necessari per disminuir els nivells en membrana del TCR/CD3. Correlació entre l'expressió en membrana de SDC2 i la de CD3ε en les Jurkat-wt (rombe negre), 5 línies Jurkat-SDC2 (quadrat negre) i 3 línies Jurkat-SDC2(ΔEFYA) (quadrat blanc). Les cèl·lules van ser incubades amb anti-CD3ε (clon 33-2A3), seguit d'un marcatge amb un anticòs secundari F(ab')<sub>2</sub> anti-ratolí conjugat a Alexa-488, per finalment analitzar les cèl·lules per citometria de flux.

1.3.7. Els limfòcits T CD4<sup>+</sup> humans primaris lligats amb anti-SDC2 mostren una disminució en el nivell del TCR/CD3 en membrana

Els resultats anteriors suggereixen un rol funcional per part de SDC2 en la downregulació del TCR/CD3. Per testar aquesta hipòtesi, vam usar un anticòs contra SDC2 (clon 186C), prèviament caracteritzat en el laboratori com a isotip IgG1<sup>155</sup>. L'especificitat d'aquest anticòs va ser comprovada per la unió a Jurkat que sobre expressen SDC2 (Figura R1.E). Aquest anticòs mostra una activitat inhibidora parcial en els nivells del mRNA d'IL-2 durant l'estimulació de limfòcits T CD4<sup>+</sup> humans primaris per mitjà d'anti-CD3ε (Figura R14.A).

Vam decidir testar si l'activitat inhibidora d'aquest anticòs es trobava associada a una alteració en la downregulació del TCR/CD3. Els limfòcits T CD4<sup>+</sup> humans primaris van ser estimulats amb anti-CD3ε soluble, per provocar la downregulació del TCR/CD3, en presència o absència d'anti-SDC2. Vam quantificar els nivells en superfície de CD3ε i TCRα/β, comprovant que la presència d'anti-SDC2 incrementa de manera pronunciada la downregulació del TCR/CD3 (Figura R14.B-G). La resposta dels limfòcits T CD4<sup>+</sup> humans primaris a l'anti-CD3ε incrementa en el rang de concentració d'anti-CD3ε que va de 0,01 μg/mL a 0,3 μg/mL, concentració en la que arriba a *plateau*, suggerint que la capacitat de SDC2 d'induir una forta downregulació del TCR/CD3 s'accentua amb l'augment de la intensitat de l'estimulació del TCR (Figura R14.F-G). Els limfòcits T CD4<sup>+</sup> *resting* i activats amb PMA, anti-CD28 i IL-2 durant 3 dies, mostren un patró similar de downregulació. Comparat amb l'estimulació amb anti-CD3ε, el tractament amb anti-SDC2 també augmenta el rati de downregulació, augmentant-la aproximadament 3 o 5 cops en limfòcits T CD4<sup>+</sup> humans primaris *resting* i activats, respectivament (Figura R14.D i E).



**Figura R14.** Els limfòcits T CD4<sup>+</sup> humans primaris lligats amb anti-SDC2 mostren una disminució en els nivells del TCR/CD3 en membrana. **A.** Expressió del mRNA d'IL-2. Les cèl·lules es van incubar en *starvation* durant tota la nit en RPMI-0,5% FBS i després van ser estimulades per anti-CD3ε (clon 33-2A3) lligat a placa i mIgG (20 μg/mL) o anti-SDC2 (clon 186.C; 20 μg/mL) durant 3 hores a 37°C. El mRNA d'IL-2 va ser analitzat per transcripció reversa del RNA total i RT-PCR. La mitjana +/- SD de tres

experiments independents és mostrat. **B.** Nivells de CD3 $\epsilon$  en la superfície dels limfòcits T CD4<sup>+</sup> humans primaris. Les cèl·lules van ser estimulades amb anti-CD3 $\epsilon$  soluble (clon 33-2A3; 0,3  $\mu$ g/mL) i mIgG (20  $\mu$ g/mL) o anti-SDC2 (clon 186.C; 20 $\mu$ g/mL) durant el temps indicats a 37°C per després passar-les a 4°C. Les cèl·lules es van incubar amb concentracions saturants d'anti-CD3 $\epsilon$  (clon 33-2A3), seguit d'un marcatge amb un anticòs secundari F(ab')<sub>2</sub> anti-ratolí conjugat a Alexa-488, per finalment analitzar les cèl·lules per citometria de flux. Figura representativa d'un experiment de quatre dels mostrats en "D". **C.** Nivells de TCR $\alpha/\beta$  en la superfície dels limfòcits T CD4<sup>+</sup> humans primaris. Les cèl·lules van ser estimulades com en "B" durant 2 hores a 37°C, es van incubar amb concentracions saturants d'anti-TCR $\alpha/\beta$  (clon IP26) i es van marcar i analitzar com en "B". Mitjana +/- SD de 3 donants independents. **D. i E.** Cinètica de la downregulació del TCR/CD3. Els limfòcits T CD4<sup>+</sup> van ser tractats com en "B" i es va usar el MFI per calcular el percentatge de CD3 $\epsilon$  en la superfície. El rati de downregulació es va calcular per mitjà del càlcul de la *first order decay function* ( $N(t)=N_0e^{-kt}$ ) entre els punts de 0,5 hores ( $N_0$ ) i 1 hora ( $N(t)$ ). El rati ( $k$ ) dels limfòcits T CD4<sup>+</sup> *resting* és de 0,0041 +/- 8,4x10<sup>-4</sup> (cercles) i 0,011 +/- 0,0022 (quadrats), i en el activats és de 0,0035 +/- 4,5x10<sup>-4</sup> (cercles) i 0,018 +/- 0,0022 (quadrats). **F. i G.** Dosi-resposta de la downregulació del TCR/CD3. Els limfòcits T CD4<sup>+</sup> van ser tractats com en "B", però amb concentracions creixents d'anti-CD3 $\epsilon$  (clon 33-2A3) durant 2 hores a 37°C. Les cèl·lules es van analitzar per citometria de flux i es va usar el MFI per determinar el percentatge de CD3 $\epsilon$  en superfície com en els apartats anteriors. La mitjana +/- SD representa els experiments que es van dur a terme en limfòcits T CD4<sup>+</sup> humans primaris *resting* ("D" i "F"; n=4) i en activats ("E", n=3; "G", n=4), usant-se 11 donants independents.

### 1.3.8. Presència de proteïna A en l'anti-SDC2 (clon 186.C): un artefacte experimental

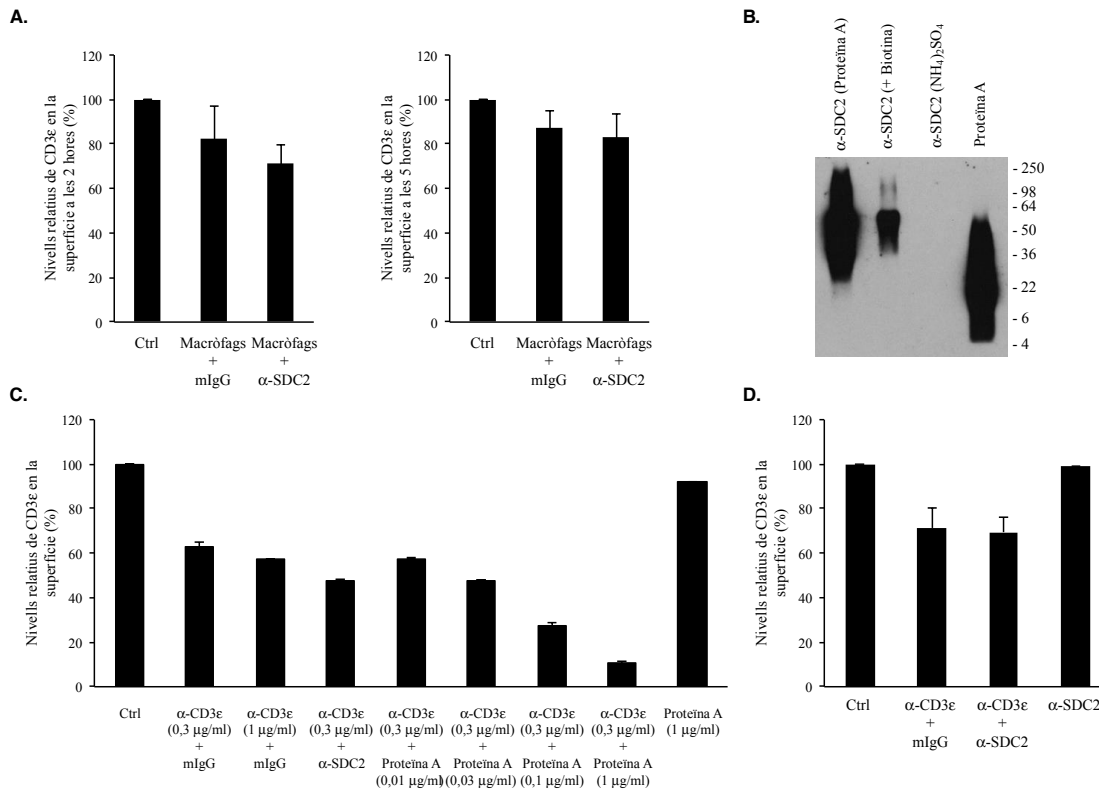
Per examinar el rol de SDC2 usant un estímul més fisiològic vam usar macròfags al·logènics per tal d'induir la downregulació del TCR/CD3 en els limfòcits T CD4<sup>+</sup> humans primaris. Després de 2 o 5 hores de co-incubació dels limfòcits amb el macròfags a un rati de 1:1 es va analitzar el nivell en superfície del TCR/CD3 (Figura R15.A). Malgrat que vam observar downregulació dels nivells en membrana del TCR/CD3 al co-incubar els limfòcits amb els macròfags, no vam detectar un augment al tractar amb anti-SDC2. L'ús de cromatografia d'afinitat amb proteïna A o G per tal de purificar anticossos és una pràctica estesa donada la seva facilitat. Malgrat això, la pèrdua de petites traces de proteïna A durant l'eluit de l'anticòs poden interferir en els resultats d'assajos funcionals. Al analitzar per WB l'anti-SDC2 que havíem estat fent servir fins aquell moment i que havia estat purificat per mitjà de cromatografia d'afinitat amb proteïna A, vam observar que hi havia una presència molt elevada de proteïna A (Figura R15.B; carril de l'esquerra). L'augment en el pes al comparar el carril de l'anticòs amb el carril on vam carregar proteïna A (carril de la dreta) purificada indica que la proteïna A present en el *stock* d'anti-SDC2 es trobava unida a l'anticòs.

El co-tractament dels limfòcits amb proteïna A i anti-CD3 $\epsilon$  ens permetria conèixer si l'efecte de l'alteració en la downregulació del TCR que havíem detectat en els assajos de la figura R14 podien ser deguts a la presència de la proteïna A. La resposta dels limfòcits T CD4<sup>+</sup> davant l'estimulació amb anti-CD3 $\epsilon$  i concentracions creixents de proteïna A ens permet observar que aquesta última té un efecte downregulador (Figura R15.C), tanmateix, aquest efecte no ve donat directament per la proteïna A ja que per si sola és incapaç de produir la downregulació del TCR/CD3 (Figura R15.C), sinó per la seva capacitat d'aglutinar anticossos gràcies al seus 5 dominis d'unió a immunoglobulines.

Finalment, per tal de determinar si la presència de proteïna A en el anti-SDC2 era la causant de les diferències en la downregulació del TCR/CD3, vam purificar l'anticòs per mitjà d'una purificació per precipitació amb sulfat d'amoni. No vam observar presència de proteïna A al

analitzar l'anticòs per WB (Figura R15.B; segon carril començant per la dreta) i, tal i com esperàvem, al analitzar la downregulació per mitjà d'anti-CD3ε en limfòcits T CD4<sup>+</sup> no vam observar cap efecte per part de l'anti-SDC2, ni sol ni amb anti-CD3ε (Figura R15.D).

La presència de proteïna A en el nostre *stock* d'anti-SDC2 va ser la causant dels efectes observats en la figura R14, ja que el fet de tenir una afinitat moderada per les IgG1 (anti-SDC2) de ratolí provocava que es produís un desplaçament cap a les IgG2a (anti-CD3ε), per les quals té elevada afinitat. En resum, aquesta determinació invalida els resultats de la figura R15 i indica que per estudiar la funció de SDC2 en els limfòcits T CD4<sup>+</sup> humans primaris s'hauran d'usar altres aproximacions.

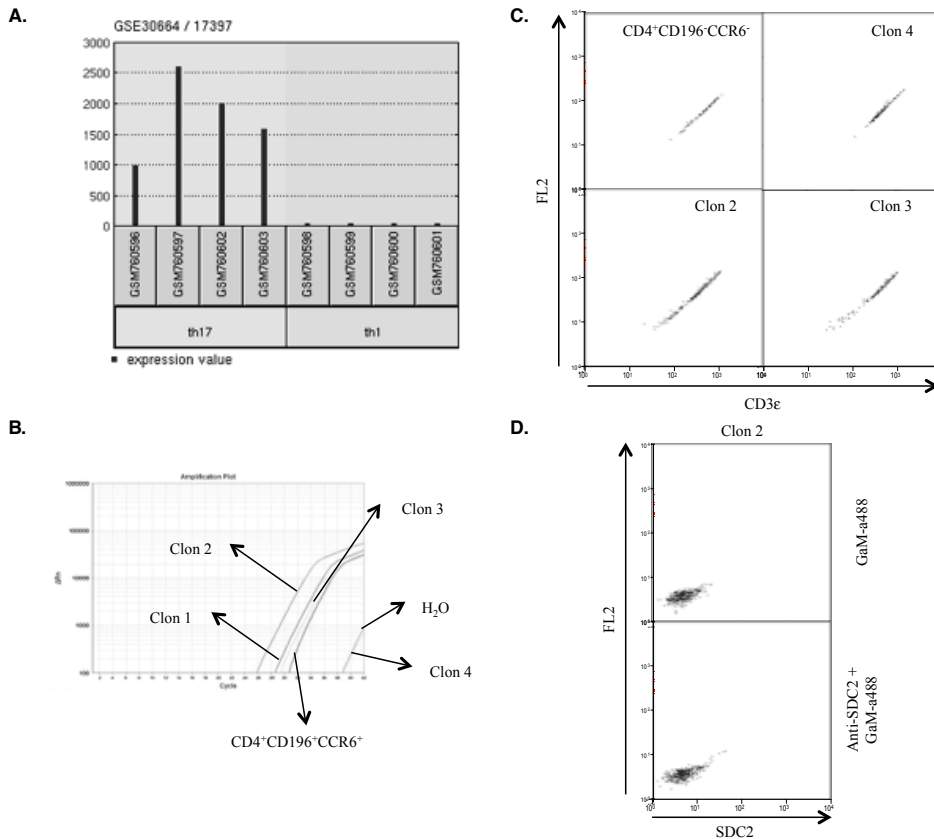


**Figura R15. Presència de proteïna A en el anti-SDC2 (clon 186.C).** **A.** Nivells de CD3ε en la superfície dels limfòcits T CD4<sup>+</sup> humans primaris al co-cultivar-los amb macròfags. Les cèl·lules van ser estimulades amb macròfags de donants al·logènics a un rati de 1:1 i mIgG (20 μg/mL) o anti-SDC2 (clon 186C; 20 μg/mL) durant el temps indicats a 37°C per després passar-les a 4°C. Les cèl·lules es van incubar amb concentracions saturants d'anti-CD3ε (clon 33-2A3), seguit d'un marcatge amb un anticòs secundari F(ab')<sub>2</sub> anti-ratolí conjugat a Alexa-488, per finalment analitzar les cèl·lules per citometria de flux. Mitjana +/- SD de 2 donants independents a les 2 hores i 9 donants independents a les 5 hores. **B.** Anàlisi per Western Blot de la presència de proteïna A en els *stocks* d'anti-SDC2. Es van carregar 0,1 μg d'anticòs o proteïna A en cada carril en condicions reductores i després del procediment normal es va "blotar" la membrana amb un secundari fet en ratolí i conjugat a HRP. **C.** Dosi-resposta de la downregulació del TCR/CD3. Els limfòcits T CD4<sup>+</sup> van ser tractats com en la figura R14.B, però en concentracions creixents de proteïna A durant 2 hores a 37°C. Les cèl·lules es van analitzar per citometria de flux i es va usar el MFI per determinar el percentatge de CD3ε en superfície. La mitjana +/- SD de 2 donants independents és mostrat. **D.** Nivells de CD3ε en la superfície dels limfòcits T CD4<sup>+</sup> humans primaris per efecte del anti-SDC2 purificat per precipitació amb sulfat d'amoni. Els limfòcits T CD4<sup>+</sup> van ser tractats com en la figura R14.B, però usant l'anti-SDC2 purificat per mitjà de precipitació amb sulfat d'amoni. Les cèl·lules es van analitzar per citometria de flux i es va usar el MFI per determinar el percentatge de CD3ε en la superfície. La mitjana +/- SD de 2 donants independents és mostrada.

### 1.3.9. Les Th17 no expressen SDC2 en la superfície cel·lular

Una de les teories actuals per explicar la reduïda presència de Th17 en els teixits inflamats en malalties degudes a alteracions en les Th17 és la inhabilitat d'aquestes per a proliferar i expandir-se en resposta a l'estimulació antigènica <sup>227</sup>. Les Th17 no proliferen en resposta a l'estimulació amb anti-CD3 i anti-CD28 degut, entre d'altres causes, a la seva incapacitat de produir IL-2 i a una expressió disminuïda de TCR $\zeta$ . Aquestes característiques són compartides amb les observades en les Jurkat-SDC2, així doncs, vam analitzar l'expressió de *SDC2* en el *microarray* dut a terme en el treball citat anteriorment (Figura R16.A). Podem observar una expressió augmentada de *SDC2* en els clons Th17 en comparació amb els clons Th1, que presenten uns nivells d'expressió gairebé inexistents, suggerint una possible implicació d'aquesta molècula en el fenotip característic de les Th17.

Inicialment, per determinar si SDC2 pot jugar algun rol en les Th17 vam decidir analitzar la seva presència en la superfície de les Th17. Després de fer créixer varis clons d'un mateix donant vam analitzar per qPCR l'expressió de *RORC* (Figura R16.B), un marcador de Th17, obtenint tres clons que l'expressen (clon 1-3) i un que no (clon 4). Així doncs, vam analitzar el nivell en superfície del CD3 $\epsilon$  en aquests clons (Figura R16.C), observant una població homogènia en el clon 4 que es correspon a la observada a limfòcits T CD4<sup>+</sup>CD196<sup>-</sup>CCR6<sup>-</sup>, en canvi, vam observar una disminució en el nivell en membrana de TCR/CD3 en els clons 2 i 3. El clon 1 va ser descartat ja que, tot i expressar *RORC*, no expressava TCR/CD3 en la membrana, és a dir, mostrava un fenotip estrany i no coherent amb la literatura existent. Finalment, per testar la validesa de la nostra hipòtesi vam fer un marcatge extracel·lular del clon 2 amb anti-SDC2 per detectar quina era la seva expressió en membrana (Figura R16.D). No vam detectar expressió de SDC2 en la membrana d'aquest clon, suggerint que aquesta molècula no es troba implicada en el desenvolupament d'aquest subtipus cel·lular.





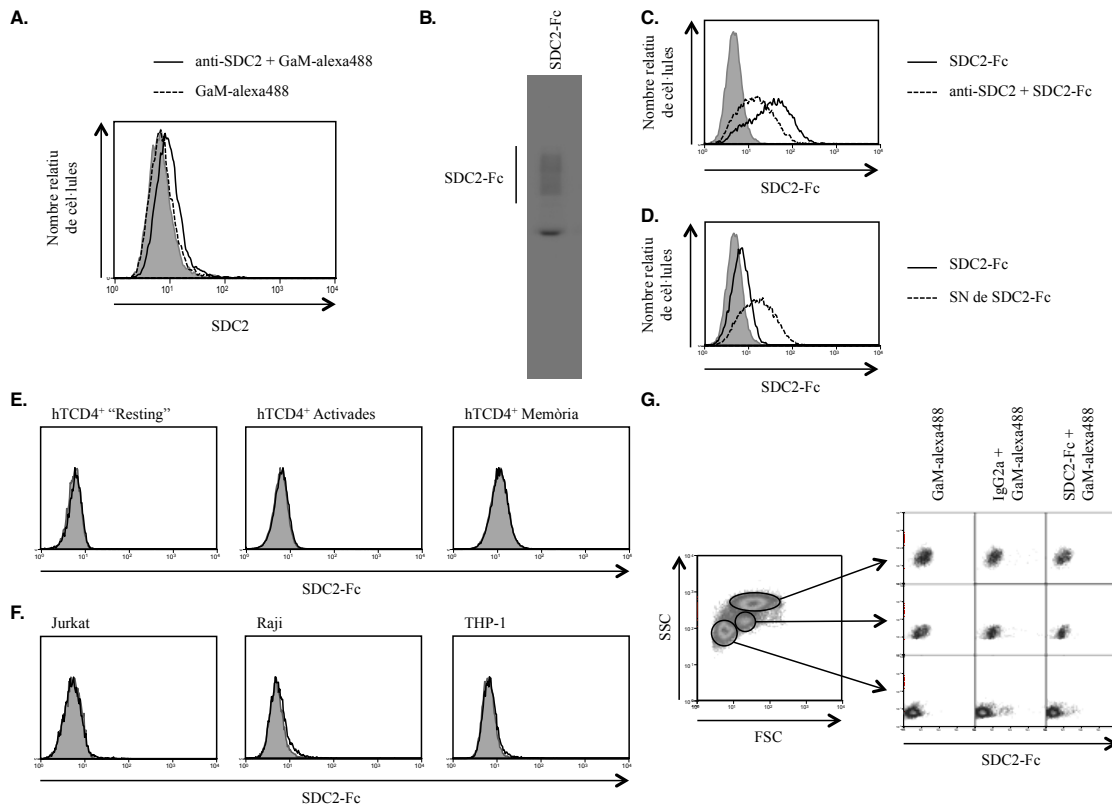
**Figura R16. Les Th17 no expressen SDC2 en la seva superfície cel·lular. A.** Nivells d'expressió de SDC2 en el *microarray* de <sup>227</sup>. **B.** Expressió del mRNA de RORC. El mRNA de RORC va ser analitzat per transcripció reversa del RNA total i RT-PCR. L'anàlisi es va dur a terme per a cadascun dels clons obtinguts en l'experiment de diferenciació descrit a l'apartat materials i mètodes, i el gràfic d'amplificació és mostrat. **C.** Nivells de CD3ε en la superfície dels diferents clons obtinguts. Les cèl·lules van ser incubades amb anti-CD3ε (clon 33-2A3), seguit d'un marcatge amb un anticòs secundari F(ab')<sub>2</sub> anti-ratolí conjugat a Alexa-488, per finalment analitzar les cèl·lules per citometria de flux. **D.** Nivells de SDC2 en la superfície del clon 2. Les cèl·lules van ser marcades i analitzades com en "A.". Les cèl·lules van ser incubades amb anti-SDC2 (clon 186.C) i tractades i analitzades com en "C".

### 1.3.10. Recerca del lligand de SDC2

SDC2 és un proteoglicà transmembrana de tipus I i, com a tal, pot actuar com a receptor <sup>112</sup>. Aquest fet, junt amb l'augment dels nivells en membrana de SDC2 després de l'activació del limfòcit T <sup>155</sup>, ens va portar a preguntar-nos per la presència d'un lligand de SDC2 en la superfície de les APCs. Es coneix que la funció inhibidora de SDC4 és via la unió a la molècula DC-HIL present en la superfície de les cèl·lules dendrítiques <sup>173</sup>, fet que ha portat a l'obtenció de SDC4 recombinant com a modulador de la resposta immunitària <sup>177</sup>. L'estratègia per tal de testar aquesta hipòtesi va ser la següent: generar una línia cel·lular que expressés el domini extracel·lular de SDC2 lligat a la fracció constant d'una IgG2a de ratolí (SDC2-Fc), concentrar la proteïna recombinant per obtenir suficient quantitat per tal de realitzar l'estudi i, finalment, caracteritzar les poblacions que expressen el lligand per mitjà de citometria de flux.

Per tal d'obtenir SDC2-Fc vam decidir usar un sistema àmpliament estès per a la producció de proteïnes recombinants, la transfecció de CHO.K1 amb el constructe, per usar aquestes cèl·lules per a la producció de SDC2-Fc. Després de la transfecció vam decidir seleccionar el clon CHO.K1 b5 ja que presentava un clar però discret marcatge de SDC2 en la superfície (Figura R17.A). Per a la producció de quantitats suficients de SDC2-Fc vam usar el Bioreactor CELLline CL-100 (veure material i mètodes d'aquesta tesi). Aquest mètode, tot i que ens va permetre obtenir SDC2-Fc per tal de realitzar la caracterització del lligand, no va arribar a generar les quantitats desitjades per un estudi a llarg termini. Per tal d'analitzar que estàvem obtenint la proteïna esperada vam analitzar-la per Western Blot (Figura R17.B), obtenint un patró clar d'expressió, on podem observar la fracció constant del anticòs, junt amb el patró de bandes característic de SDC2. Per comprovar que SDC2-Fc era una bona eina per a la detecció del lligand de SDC2 per citometria de flux, vam analitzar la capacitat de SDC2-Fc per unir-se a l'hibridoma secretor de l'anti-SDC2.186.C (Figura R17.C), observant un marcatge clar, el qual és parcialment bloquejat per l'adició d'anti-SDC2 en el medi. Degut als problemes que vam obtenir al purificar l'anti-SDC2 per mitjà de cromatografia d'afinitat, i la bona experiència amb la precipitació amb sulfat d'amoni, vam decidir usar aquesta última tècnica per a la purificació de SDC2-Fc. El marcatge del hibridoma secretor de l'anti-SDC2 amb SDC2-Fc purificat per precipitació amb sulfat d'amoni presenta un marcatge molt baix (Figura R17.D), i aquest fet és degut al baix grau de purificació d'aquesta proteïna recombinant amb aquesta tècnica, ja que al marcar l'hibridoma amb el sobrenedant de la purificació vam obtenir un bon marcatge. Aquest fet ens indica que, tot i que la purificació per mitjà de precipitació amb sulfat d'amoni és una bona opció per a purificar anticossos, no és una bona tècnica per a la producció d'altres proteïnes com ara SDC2-Fc. En definitiva, per tal de caracteritzar l'expressió del lligand de SDC2 vam usar el sobrenedant de les CHO.K1 b5 obtingut amb el CELLline CL-100.

Donat que les molècules de la família dels SDCs presenten capacitat d'unió a elles mateixes, vam preguntar-nos si SDC2-Fc podria unir-se al SDC2 expressat a la superfície dels limfòcits T CD4<sup>+</sup>. Vam usar SDC2-Fc per marcar limfòcits analitzant el marcatge per mitjà de citometria de flux (Figura R17.E), però no vam observar marcatge en cap dels estats del limfòcits T CD4<sup>+</sup> humans primaris: *resting*, activades durant 3 dies amb PHA, anti-CD28 i IL-2 o bé memòria. Aquest fet va ser corroborat amb l'anàlisi de les Jurkat (Figura R17.F), les quals tampoc presenten marcatge per SDC2-Fc. Com s'ha comentat anteriorment, vam suggerir la presència del lligand de SDC2 en les APCs i, inicialment, vam marcar amb SDC2-Fc les Raji, una línia limfocítica B, i les THP-1, una línia monocítica, observant en el cas de les Raji un lleuger desplaçament del pic (Figura R17.F). Per conèixer si aquesta observació es repetia en cèl·lules primàries, vam usar sang de donants sans per tal de marcar els leucòcits amb SDC2-Fc. No vam observar marcatge en cap població leucocitària (Figura R17.G), indicant que el lligand de SDC2 no es troba expressat en la superfície de les APCs en situació de repòs. Malgrat això, el lleuger marcatge obtingut en les Raji suggereix una possible presència del lligand de SDC2 en els processos d'activació, de manera anàloga a l'augment dels nivells de SDC2 en la superfície dels limfòcits T després de l'activació.



**Figura R17. Recerca del lligand de SDC2.** **A.** Nivells d'expressió de SDC2 en les CHO.K1 b5. Les cèl·lules van ser incubades amb o sense anti-SDC2 (clon 186.C), seguit d'un marcatge amb un anticòs secundari F(ab')<sub>2</sub> anti-ratolí conjugat a Alexa-488, per finalment analitzar les cèl·lules per citometria de flux. **B.** Anàlisi per Western Blot de SDC2-Fc. Es va carregar 75 ng de SDC2-Fc en un carril en condicions no reductores i després del procediment normal es va "blotar" la membrana amb un secundari contra ratolí i conjugat a HRP. **C.** Marcatge del hibridoma 186.C amb SDC2-Fc. Les cèl·lules van ser incubades amb SDC2-Fc (dilució 1:100), seguit d'un marcatge amb un anticòs secundari F(ab')<sub>2</sub> anti-ratolí conjugat a Alexa-488, per finalment analitzar les cèl·lules per citometria de flux. La línia puntejada indica l'addició al medi de cultiu de l'anti-SDC2.186.C per bloquejar la unió anterior. **D.** Marcatge del hibridoma 186.C amb SDC2-Fc purificat. Les cèl·lules van ser incubades amb SDC2-Fc purificat per mitjà de precipitació amb sulfat d'amoni, seguit d'un marcatge com en "C". La línia puntejada indica el marcatge amb el sobrenedant de la purificació. **E.** Marcatge de limfòcits T CD4<sup>+</sup> amb SDC2-Fc. Els

limfòcits T CD4<sup>+</sup> humans primaris van ser purificats i tractats com s'indica en la secció de material i mètodes d'aquesta tesi. Les cèl·lules van ser incubades amb SDC2-Fc (dilució 1:100), seguit d'un marcatge com en "C". Histogrames representatius de n=4 pels limfòcits T CD4<sup>+</sup> *resting* i activats i n=2 pels limfòcits T CD4<sup>+</sup> memòria. **F.** Marcatge de Jurkat, Raji i THP-1 amb SDC2-Fc. Les cèl·lules van ser incubades amb SDC2-Fc (dilució 1:100), seguit d'un marcatge com en "C". Histogrames representatius de n=2. **G.** Marcatge de leucòcits amb SDC2-Fc. La sang va ser tractada amb *lysis buffer* durant 10 minuts a temperatura ambient per tal de lisar els eritròcits. Les cèl·lules no lisades van ser incubades amb SDC2-Fc (dilució 1:100), seguit d'un marcatge com en "C". Per mitjà del FSC/SSC es poden separar 3 poblacions: la superior correspon en gran mesura als neutròfils, eosinòfils i basòfils, la població intermèdia correspon als monòcits i, finalment, la població inferior correspon als limfòcits i cèl·lules dendrítiques. Histogrames representatius de n=2.

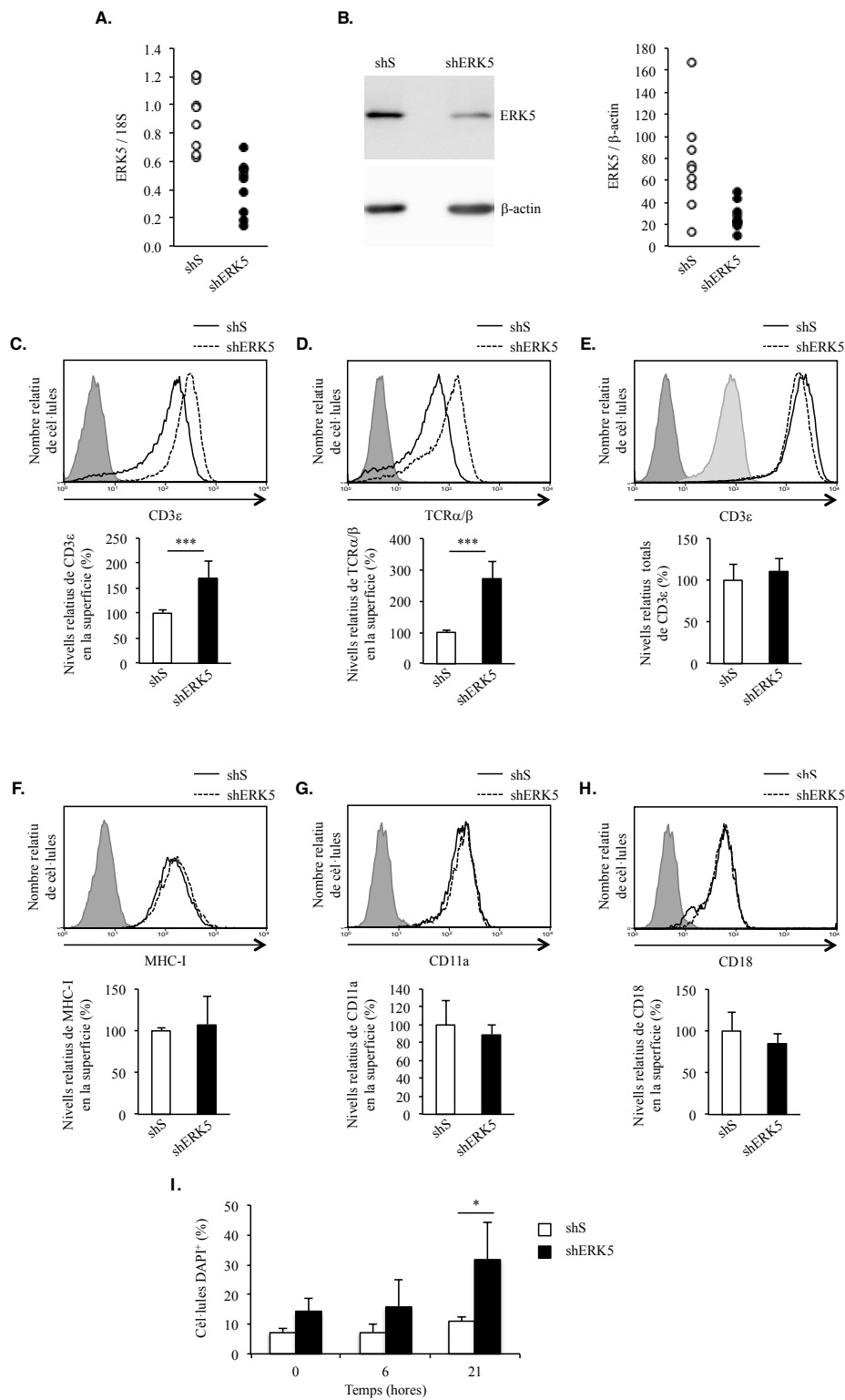
## 2. Funció d'ERK5 en la regulació de l'expressió en la superfície cel·lular del complex TCR/CD3

Resultats preliminars del laboratori suggerien que l'efecte inhibidor de SDC2 en limfòcits T podria ser degut, parcialment, a través de la quinasa ERK5. Tot i que finalment no s'ha trobat una connexió directe entre SDC2 i ERK5, aquests resultats van permetre desenvolupar el que ha sigut la segona part d'aquesta tesis, l'estudi de la funció d'ERK5 en la regulació de l'expressió en la superfície cel·lular del complex TCR/CD3 en els limfòcits T CD4<sup>+</sup>.

### 2.1 Rol d'ERK5 en la regulació dels nivells en membrana del complex TCR/CD3

2.1.1 El *knock-down* d'ERK5 en Jurkat mostra un augment en el nivell de TCR/CD3 a la superfície cel·lular

Per tal de definir el rol d'ERK5 en els limfòcits T, vam transfectar de manera estable la línia cel·lular Jurkat amb un plasmidi que codifica per un shRNA dirigit contra una regió conservada en el exó 2 d'ERK5. Vam generar 9 línies amb una expressió estable del shRNA control (Jurkat-shS) i 10 línies amb una expressió estable del shRNA contra ERK5 (Jurkat-shERK5) (Figura R18.A-B). Al analitzar per citometria de flux el nivell en membrana del complex TCR/CD3 vam observar un augment de CD3 $\epsilon$  (Figura R18.C) i TCR $\alpha/\beta$  (Figura R18.D) en les Jurkat-shERK5, en comparació amb les cèl·lules control Jurkat-shS. L'augment del nivell en superfície del complex TCR/CD3 no és degut a un increment en el nivell total de CD3 $\epsilon$  (Figura R18.E) i és específic ja que l'expressió en membrana d'altres molècules de la superfície cel·lular com ara MHC-I (Figura R18.F) o LFA-1 (CD11a/CD18) (Figura R18.G-H) no es va mostrar alterat. Aquest augment d'expressió del TCR observat en les Jurkat-shERK5 correlaciona amb un augment en la mort cel·lular induïda per activació, procés pel qual els limfòcits T activats a través del TCR/CD3 moren per apoptosi (Figura R18.I). Aquests resultats suggereixen un possible rol per ERK5 en la regulació del complex TCR/CD3 en la superfície cel·lular dels limfòcits T.



**Figura R18.** El *knock-down* d'ERK5 en Jurkat mostra un augment en el nivell de TCR/CD3 a la superfície cel·lular. **A.** Expressió del mRNA d'ERK5 en les Jurkat-shERK5. El mRNA d'ERK5 va ser analitzat per transcripció reversa del RNA total i RT-PCR. Els valors d'ERK5 : 18S van ser calculats i normalitzats a una de les línies control Jurkat-shS, a la qual se l'hi va donar un valor de 1. L'anàlisi es va dur a terme en nou línies Jurkat-shS independents i deu línies Jurkat-shERK5 independents. **B.** Nivells de la proteïna d'ERK5 en les Jurkat-shERK5. Western blot representatiu (esquerra) i rati ERK5 : actina (dreta). L'anàlisi es va dur a terme en nou línies Jurkat-shS independents i deu línies Jurkat-shERK5 independents. **C i D.** Nivells de CD3ε (C) i TCRα/β en la superfície de les Jurkat-shERK5. Les cèl·lules van ser incubades amb anti-CD3ε (clon 33-2A3) o anti-TCRα/β (clon IP26), seguit d'un

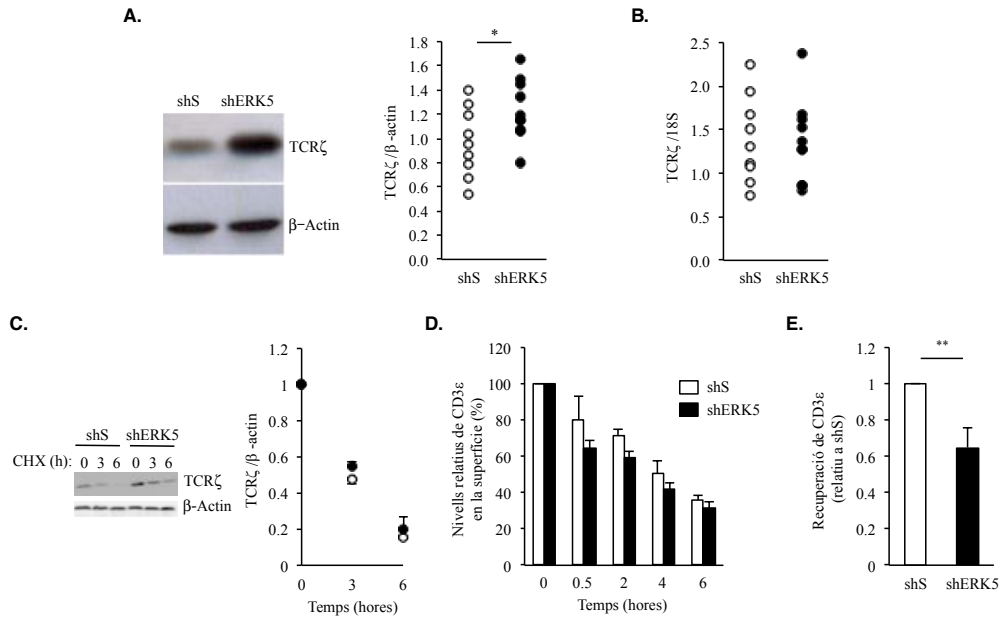
marcatge amb un anticòs secundari F(ab')<sub>2</sub> anti-ratolí conjugat a Alexa-488, per finalment analitzar les cèl·lules per citometria de flux. Histogrames representatius (A dalt). Quantificació dels marcatges (A baix). L'expressió relativa va ser calculada a partir dels valors de MFI obtinguts en les Jurkat-shS versus els obtinguts en les Jurkat-shERK5. Els anàlisis van ser repetits amb 2 línies Jurkat-shS independents i 2 línies Jurkat-shERK5 independents. Mitjana +/- SD de 3 experiments independents. **E.** Expressió total de CD3ε (extracel·lular + intracel·lular). Les cèl·lules van ser fixades, permeabilitzades i incubades amb anti-CD3ε. Histograma representatiu (A dalt). Quantificació dels marcatges (A baix). L'expressió relativa va ser calculada a partir dels valors de MFI obtinguts en les Jurkat-shS versus els obtinguts en les Jurkat-shERK5. Els anàlisis van ser repetits amb 2 línies Jurkat-shS independents i 2 línies Jurkat-shERK5 independents. Mitjana +/- SD de 3 experiments independents. **F - H.** Nivells de MHC-I (F), CD11a (G) i CD18 (H) en la superfície de les Jurkat-shERK5. Les cèl·lules van ser incubades amb anti-MHC-I, anti-CD11a o anti-CD18, seguit d'un marcatge amb un anticòs secundari F(ab')<sub>2</sub> anti-ratolí conjugat a Alexa-488, per finalment analitzar les cèl·lules per citometria de flux. Histogrames representatius (A dalt). Quantificació dels marcatges (A baix). L'expressió relativa va ser calculada a partir dels valors de MFI obtinguts en les Jurkat-shS versus els obtinguts en les Jurkat-shERK5. Els anàlisis van ser repetits amb 2 línies Jurkat-shS independents i 2 línies Jurkat-shERK5 independents. Mitjana +/- SD de 3 experiments independents. **I.** Mort cel·lular induïda per activació en Jurkat-shERK5. Les Jurkat-shS i Jurkat-shERK5 van ser tractades amb anti-CD3ε durant 6 h, es van rentar i incubar durant 15 h. Després es van marcar com en "C.". Mitjana +/- SD de 3 experiments independents amb una línia Jurkat-shS i una línia Jurkat-shERK5.

2.1.2 El *knock-down* d'ERK5 en Jurkat mostra un augment en el nivell total de TCRζ i una reducció en la capacitat de recuperar un nivell òptim de TCR/CD3 a la superfície després de l'estimulació amb anti-CD3ε

Com ja s'ha descrit anteriorment, el control del nivell total de TCRζ és un mecanisme clau per a la regulació de l'expressió del complex TCR/CD3 a la superfície, així doncs, vam analitzar el nivell total de TCRζ en les Jurkat-shERK5 i vam observar un increment en comparació amb les Jurkat-shS (Figura R19.A), sense que això sigui degut a un augment dels nivells del mRNA de TCRζ (Figura R19.B) i suggerint que la degradació de la cadena TCRζ es troba reduïda en les Jurkat-shERK5. Per tal de testar aquesta hipòtesis vam mesurar la vida mitja de TCRζ per mitjà de tractament amb CHX (Figura R19.C). Després de 3 hores d'incubació les Jurkat-shERK5 van presentar una tendència al increment de la vida mitja de TCRζ (p-valor = 0.061), una diferència que podria ser la causa del increment observat en la figura R19.A degut a que les Jurkat-shERK5 han estat cultivades a llarg termini. Aquests resultats suggereixen que l'increment de l'expressió de TCRζ en les Jurkat-shERK5 porta al augment del nivell en superfície del complex TCR/CD3 i suggereix un rol per ERK5 en la regulació de TCRζ.

Per tal de profunditzar en el rol d'ERK5 en la regulació del complex TCR/CD3 vam estimular les Jurkat-shERK5 amb anti-CD3ε soluble per tal de promoure la downregulació del complex TCR/CD3. La quantificació de la downregulació per mitjà del anàlisi del nivell en superfície de CD3ε a diferents temps d'estimulació amb anti-CD3ε va mostrar un patró de downregulació similar entre les Jurkat-shERK5 i les Jurkat-shS (Figura R19.D). La downregulació del complex TCR/CD3 en els limfòcits T estimulats és revertida després de remoure l'estímul<sup>225</sup>. Per tant, per tal d'establir si ERK5 controla la recuperació del nivell correcte del complex TCR/CD3 a la superfície cel·lular vam estimular les Jurkat-shERK5 amb anti-CD3ε durant 6 hores, vam rentar les cèl·lules per tal de remoure l'estímul i, finalment, vam cultivar les cèl·lules durant 18 hores. El nivell en superfície de CD3ε mostrava una reducció d'aproximadament el 40% en les Jurkat-shERK5 en comparació amb les Jurkat-shS (Figura R19.E), suggerint que ERK5 podria jugar un rol positiu en la recuperació del nivell correcte del complex TCR/CD3 després de l'estimulació antigènica. Així doncs, les dades aquí mostrades recolzen la hipòtesis que ERK5

podria alterar l'expressió en superfície del complex TCR/CD3 actuant en dues vies diferents, la degradació de TCR $\zeta$  i la recuperació del nivell correcte del complex TCR/CD3 en la superfície després de l'estimulació antigènica.



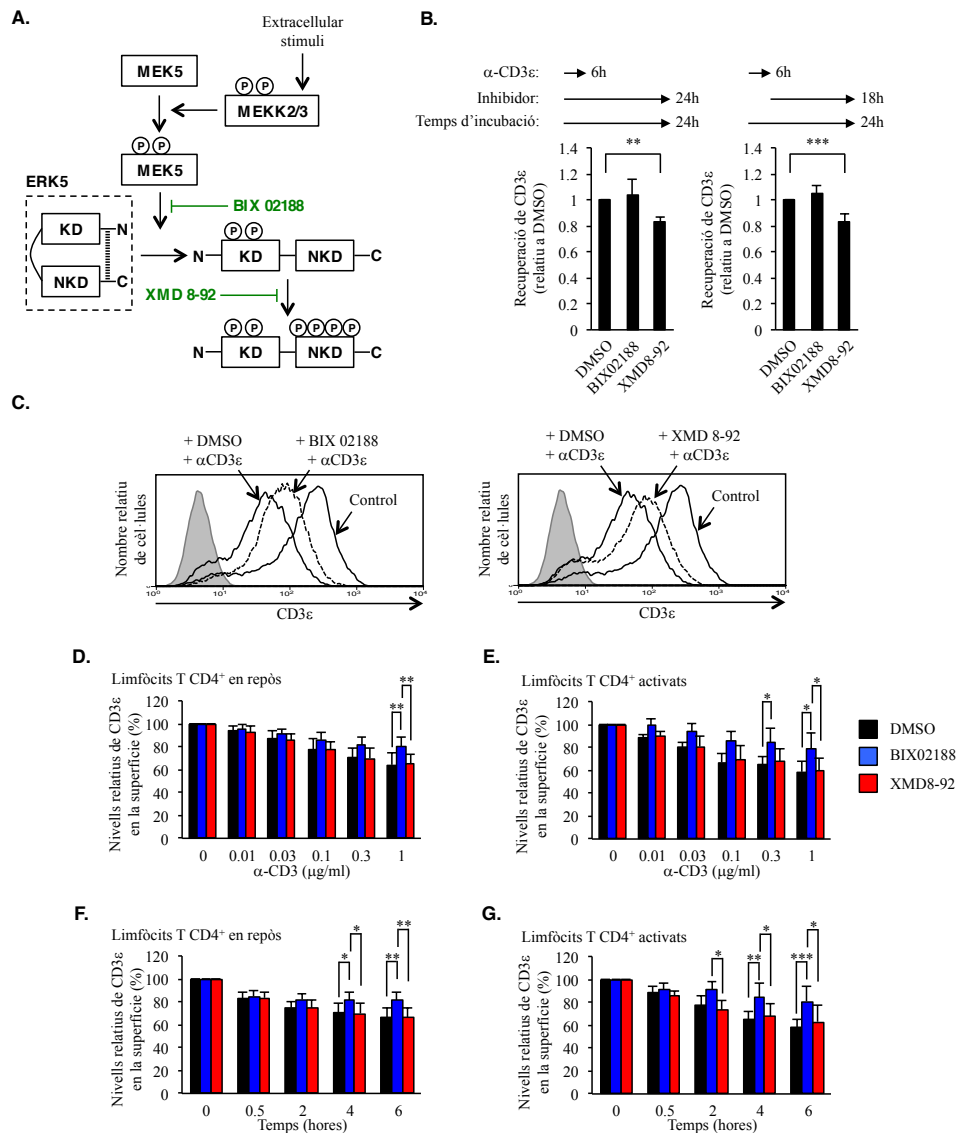
**Figura R19.** El *knock-down* d'ERK5 en Jurkat mostra un augment en el nivell total de TCR $\zeta$  i una reducció en la capacitat de recuperar un nivell òptim de TCR/CD3 a la superfície després d'una estimulació amb anti-CD3 $\epsilon$ . **A.** Nivells de TCR $\zeta$  en les Jurkat-shERK5. Western blot representatiu (esquerra) i rati TCR $\zeta$  : actina (dreta). L'anàlisi es va dur a terme en 9 línies Jurkat-shS independents i 9 línies Jurkat-shERK5 independents. **B.** Expressió del mRNA de TCR $\zeta$  en les Jurkat-shERK5. El mRNA de TCR $\zeta$  va ser analitzat per transcripció reversa del RNA total i RT-PCR. Els valors de TCR $\zeta$  : 18S van ser calculats i normalitzats a una de les línies Jurkat-shS, a la qual se l'hi va donar un valor de 1. L'anàlisi es va dur a terme en 9 línies Jurkat-shS independents i 9 línies Jurkat-shERK5 independents. **C.** Nivells de TCR $\zeta$  en les Jurkat-shERK5. Les línies Jurkat-shS i les Jurkat-shERK5 van ser cultivades en presència de CHX (25  $\mu$ g/mL) durant les hores indicades. Western blot representatiu (esquerra) i rati TCR $\zeta$  : actina (dreta). **D.** Cinètica de downregulació del complex TCR/CD3 en les Jurkat-shERK5. Les cèl·lules van ser estimulades a 37°C amb anti-CD3 $\epsilon$  (0,3  $\mu$ g/mL) durant diferents temps. Posteriorment van ser incubades en condicions saturants d'anti-CD3 $\epsilon$  en fred, es van marcar amb un anticòs secundari Alexa 488-F(ab') $_2$  i, finalment, van ser analitzades per citometria de flux. La MFI es representa com a percentatge en relació al valor obtingut a temps 0. **E.** Recuperació de TCR/CD3 a la superfície cel·lular en les Jurkat-shERK5 després de l'estimulació amb anti-CD3 $\epsilon$ . Les cèl·lules van ser estimulades durant 6 hores com en "D", rentades dues vegades per eliminar l'anticòs i, finalment, incubades en medi de cultiu. Després de 18 hores, les cèl·lules van ser marcades com en "D". La recuperació de TCR/CD3 a la superfície cel·lular va ser normalitzada a les Jurkat-shS, a les quals se'ls hi va atorgar un valor arbitrari de 1. (C-E) Mitjana  $\pm$  SD de 3 experiments independents amb una línia Jurkat-shS i una línia Jurkat-shERK5.

### 2.1.3 La inhibició farmacològica d'ERK5 frena la downregulació del complex TCR/CD3 i redueix la recuperació en membrana en limfòcits T CD4<sup>+</sup> estimulats

Per tal d'abordar des d'una altra perspectiva la hipòtesis que ERK5 regula l'expressió en superfície del complex TCR/CD3, vam inhibir la via de senyalització MEK5/ERK5 mitjançant l'ús d'inhibidors farmacològics. L'inhibidor BIX02188 suprimeix l'activitat catalítica de MEK5 i la fosforilació del domini quinasa d'ERK5, mentre que l'inhibidor XMD8-92 bloqueja l'auto-fosforilació d'ERK5 en el domini C-terminal (Figura R20.A) <sup>43</sup>. En les concentracions usades en aquest estudi, cap dels inhibidors afecta cap altre MAPK relacionada. Inicialment, vam determinar si la inhibició de la via de senyalització de MEK5/ERK5 afecta la capacitat de recuperar el nivell correcte en membrana del complex TCR/CD3 després de l'estimulació amb anti-CD3ε. Mentre que la inhibició de la fosforilació d'ERK5 depenent de MEK5 per mitjà de l'ús de BIX02188 en PBMCs CD3ε<sup>+</sup> de sang perifèrica de donants sans no afecta la capacitat de recuperar un nivell correcte en la superfície del complex TCR/CD3, en comparació amb els PBMCs CD3ε<sup>+</sup> tractats amb DMSO, l'ús de l'inhibidor XMD8-92 resulta en una capacitat reduïda de recuperar un valor normal (Figura R20.B). Aquestes dades suggereixen que ERK5 regula la recuperació d'un nivell normal del complex TCR/CD3 en superfície després de l'estimulació amb anti-CD3ε, a través de l'auto-fosforilació del seu domini C-terminal i independentment de la fosforilació del domini quinasa.

Per tal d'analitzar l'efecte d'ERK5 durant la downregulació del complex TCR/CD3 vam inhibir la via MEK5/ERK5 amb els inhibidors utilitzats anteriorment. Al induir la downregulació del complex TCR/CD3 per mitjà de l'estimulació amb anti-CD3ε soluble en cèl·lules Jurkat en presència de BIX02188 o XMD8-92, vam observar una reducció en la capacitat de downregular aquest complex (Figura R20.C). Per tal de confirmar aquest resultat en limfòcits T CD4<sup>+</sup> provinents de sang de donants sans, vam dur a terme el mateix experiment. L'estimulació amb diferents concentracions d'anti-CD3ε soluble de limfòcits T CD4<sup>+</sup> *resting* (Figura R20.D) o limfòcits T CD4<sup>+</sup> prèviament activats durant 3 dies amb PHA, anti-CD28 i IL-2 (Figura R20.E) va promoure la downregulació del complex TCR/CD3. El tractament de les cèl·lules amb BIX02188 redueix la capacitat de downregular el complex TCR/CD3, confirmant els resultats observats en Jurkat i suggerint un rol per part d'ERK5 en la regulació dels nivells en superfície del complex TCR/CD3. Malgrat això i en contra de l'esperat per l'efecte de XMD8-92 en Jurkat (Figura R20.C), la presència d'aquest inhibidor no altera la downregulació del complex TCR/CD3 durant l'estimulació amb anti-CD3ε en limfòcits T CD4<sup>+</sup> *resting* o activats, suggerint que l'auto-fosforilació del domini C-terminal d'ERK5 no es troba involucrat en la regulació de la downregulació del complex TCR/CD3 durant l'estimulació amb anti-CD3ε. La inhibició de la via de senyalització MEK5/ERK5 per part de BIX02188 no afecta la downregulació del complex TCR/CD3 durant els primers 30 minuts, però després d'aquest temps es pot observar una reducció de la downregulació tant en limfòcits T CD4<sup>+</sup> *resting* (Figura R20.F) com en prèviament activats (Figura R20.G). Les diferències observades en presència de XMD8-92 entre Jurkat i limfòcits T CD4<sup>+</sup> primaris podrien ser degudes a la downregulació més intensa observada en les primeres en la mateixa concentració d'anti-CD3ε (dades no mostrades), suggerint un rol per l'auto-fosforilació del domini C-terminal d'ERK5 en estimulacions fortes.



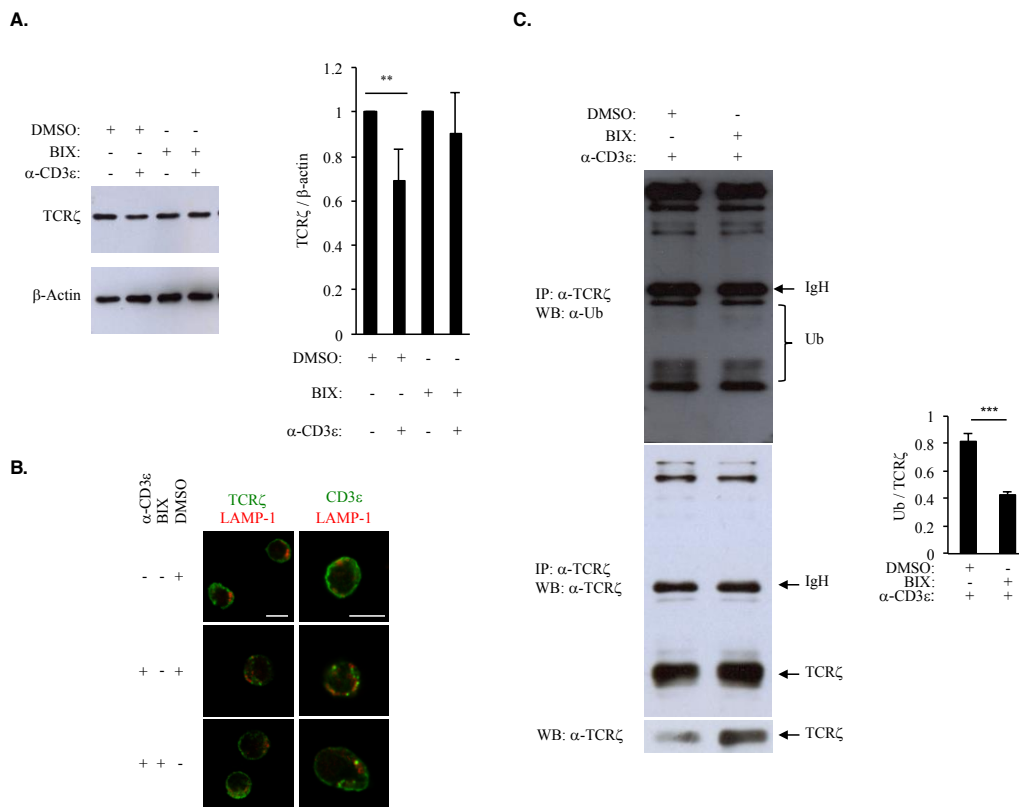


**Figura R20.** La inhibició farmacològica d'ERK5 frena la downregulació del complex TCR/CD3 i redueix la recuperació en membrana en limfòcits T CD4<sup>+</sup> estimulats. **A.** Representació esquemàtica del mecanisme d'acció dels inhibidors de la via de senyalització MEK5/ERK5. **B.** Recuperació de TCR/CD3 a la superfície cel·lular en els PBMCs CD3ε<sup>+</sup> després de l'estimulació amb anti-CD3ε. Les cèl·lules van ser estimulades durant 6 hores com en la figura R19.D, en presència o absència de DMSO, BIX02188 (10 μM) o XMD8-92 (10 μM), rentades dues vegades per eliminar l'anticòs i, finalment, incubades en medi de cultiu amb els fàrmacs. Després de 18 hores, les cèl·lules van ser marcades com en la figura R19.D. La recuperació de TCR/CD3 a la superfície cel·lular va ser normalitzada a les cèl·lules tractades amb DMSO, a les quals se'ls hi va atorgar un valor arbitrari de 1. Mitjana +/- SD de 3 experiments independents. **C.** Jurkat tractades amb DMSO, BIX02188 (10 μM) o XMD8-92 (10 μM). Després d'una hora a 37°C de tractament amb inhibidors, les cèl·lules van ser estimulades amb anti-CD3ε (0,3 μg/mL) durant 4 hores. Després, les cèl·lules van ser marcades com en la figura R19.D i analitzades per citometria de flux. Histograma representatiu de 3 experiments independents. **D.** i **E.** Dosi-resposta i **F.** i **G.** Cinètica de la downregulació del complex TCR/CD3 en limfòcits T CD4<sup>+</sup> humans en repòs (**D** i **F**) o prèviament activats (**E** i **G**). Les cèl·lules van ser tractades amb DMSO, BIX02188 (10 μM) o XMD8-92 (10 μM). Després d'una hora a 37°C de tractament amb inhibidors, les cèl·lules van ser estimulades amb anti-CD3ε (diferents concentracions) durant el temps indicat. La MFI es representa com a percentatge en relació al valor obtingut a temps 0. Mitjana +/- SD de 4 experiments independents.

#### 2.1.4 ERK5 controla la degradació i la ubiquitinació de TCR $\zeta$ durant la downregulació del complex TCR/CD3

Els resultats observats en Jurkat-shERK5 suggereixen un rol d'ERK5 en la regulació de la degradació de TCR $\zeta$ . Per tal de demostrar-ho utilitzant una altra aproximació, limfòcits T CD4<sup>+</sup> activats van ser tractats amb anti-CD3 $\epsilon$  soluble durant 6 hores per tal d'induir la degradació de TCR $\zeta$ , en presència o absència de BIX02188. Mentre que el nivell total de TCR $\zeta$  es veu reduït en les cèl·lules tractades amb anti-CD3 $\epsilon$ , el co-tractament amb BIX02188 bloqueja la degradació de TCR $\zeta$  (Figura R21.A). Per tal de confirmar l'efecte, vam visualitzar per microscòpia confocal la distribució de CD3 $\epsilon$  i TCR $\zeta$  en limfòcits T CD4<sup>+</sup> per efecte del tractament amb BIX02188. Tal i com era d'esperar per els experiments duts a terme en les figures R20.D-G i R21.A, l'estimulació amb anti-CD3 $\epsilon$  produeix la internalització de CD3 $\epsilon$  i TCR $\zeta$  i la degradació de TCR $\zeta$  (Figura R21.B), amb ambdós processos bloquejats per l'adició de BIX02188. Aquests resultats suggereixen que el domini quinasa d'ERK5 promou la degradació de TCR $\zeta$  durant la downregulació del complex TCR/CD3.

L'activació a través del complex TCR/CD3 promou la ubiquitinació de TCR $\zeta$  abans que aquesta cadena sigui degradada<sup>228</sup>. Així doncs, vam testar si el patró d'ubiquitinació de TCR $\zeta$  es veu afectat per l'activitat d'ERK5. PBMCs van ser estimulats amb anti-CD3 $\epsilon$  soluble en presència o absència de BIX02188 per tal d'induir la degradació de TCR $\zeta$  i, posteriorment, es van preparar els lisats cel·lulars per a dur a terme la immunoprecipitació de TCR $\zeta$ . La ubiquitinació de TCR $\zeta$  es va veure reduïda en les cèl·lules tractades amb BIX02188 (Figura R21.C), suggerint que el domini quinasa d'ERK5 promou la ubiquitinació de TCR $\zeta$ . En conjunt, els resultats d'aquest apartat suggereixen que el domini quinasa d'ERK5 promou la downregulació del complex TCR/CD3 durant l'estimulació amb anti-CD3 $\epsilon$  per mitjà de la ubiquitinació i posterior degradació de TCR $\zeta$ .



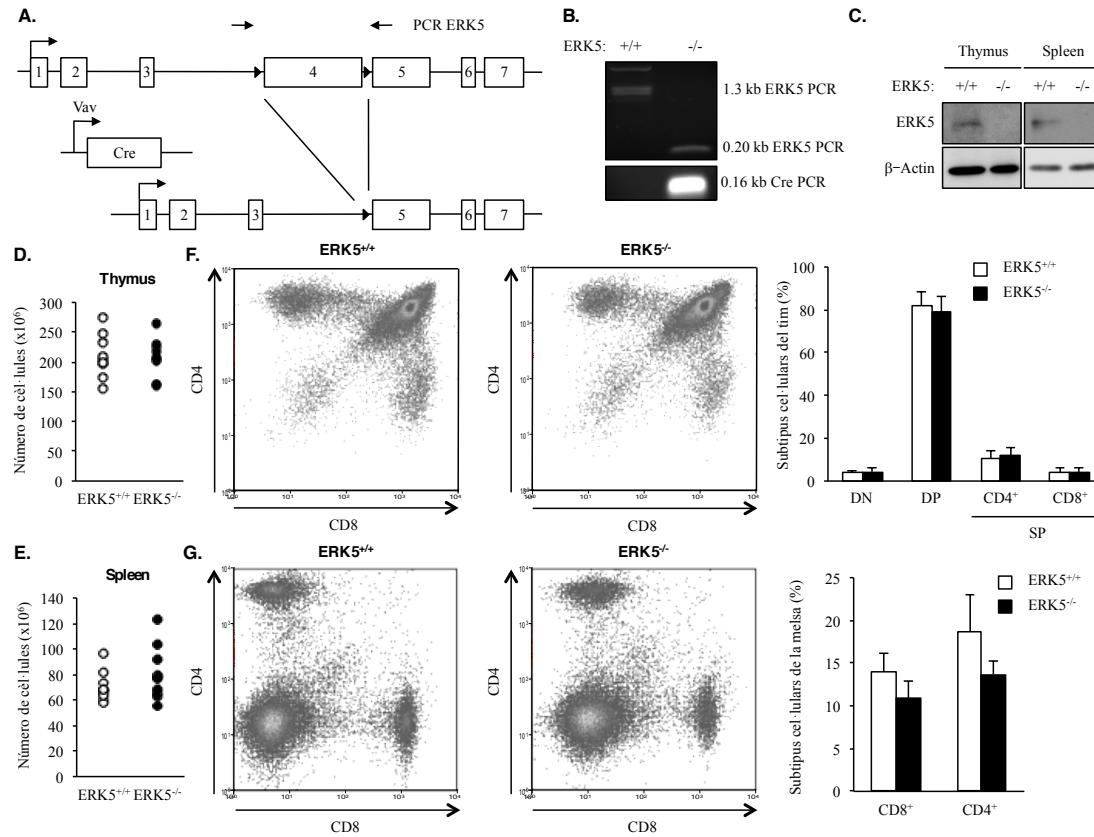
**Figura R21. ERK5 controla la degradació i la ubiquitinació de TCRζ durant la downregulació del complex TCR/CD3.** A. Degradació de TCRζ després de l'activació amb anti-CD3ε. Els limfòcits T CD4<sup>+</sup> prèviament activats van ser estimulats com en la figura R20.F durant 6 hores. Un Western blot representatiu (A dalt) i el rati TCRζ : actina de 7 experiments independents són mostrats (A baix). B. Localització sub-cel·lular de TCRζ (Esquerra) i CD3ε (Dreta). Els limfòcits T CD4<sup>+</sup> prèviament activats van ser tractats com en "A", permeabilitzats i marcats amb anti-LAMP-1 (vermell) i anti-TCRζ (verd) o anti-CD3ε (verd). Les mostres van ser visualitzades per microscòpia confocal. Imatges representatives de 2 experiments independents. Barra = 10 μm. C. Ubiquitinació de TCRζ. Els PBMCs van ser tractats com en "A" i, posteriorment, el TCRζ va ser immunoprecipitat. Un Western blot representatiu (Esquerra) i el rati ubiquitina : TCRζ de 3 experiments independents són mostrats (Dreta).

### 2.1.5 Limfòcits T de la melsa del ratolí ERK5<sup>-/-</sup> no mostren alteracions en la downregulació del complex TCR/CD3

Per tal de conèixer el rol d'ERK5 en la regulació del complex TCR/CD3 en un context *in vivo*, vam creuar el ratolí *Erk5*<sup>loxP/loxP</sup> amb el ratolí *Vav-Cre* per generar un deficiència d'ERK5 en el sistema hematopoietic (anomenat ERK5<sup>-/-</sup> en aquesta tesis) (Figura R22.A-C). Al analitzar el número de cèl·lules (Figura R22.D-E) i percentatge dels limfòcits T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> (Figura R22.F-G) en el tim i la melsa d'aquests ratolins, no vam observar una alteració per efecte de la manca d'ERK5, tal i com havia estat prèviament reportat<sup>53,58</sup> i confirmant que ERK5 no és necessari pel desenvolupament dels limfòcits T i el manteniment de les poblacions de limfòcits T en la perifèria.

Els resultats de les figures R18-21 suggereixen un rol d'ERK5 en la regulació del tràfic del complex TCR/CD3 i en la degradació de TCRζ. Malgrat això, el nivell en superfície de CD3ε en limfòcits T en estat basal de la melsa de ratolins ERK5<sup>-/-</sup> és comparable al observat en els ratolins ERK5<sup>+/+</sup> (Figura R23.A). A més a més, l'estimulació a diferents temps de limfòcits T de

la melsa de ratolins ERK5<sup>-/-</sup> i ERK5<sup>+/+</sup> per mitjà d'anti-CD3ε soluble va mostrar una cinètica de downregulació del complex TCR/CD3 similar en ambdós ratolins (Figura R23.B), suggerint que ERK5 no controla la downregulació del complex TCR/CD3 en els limfòcits T de la melsa de ratolí.



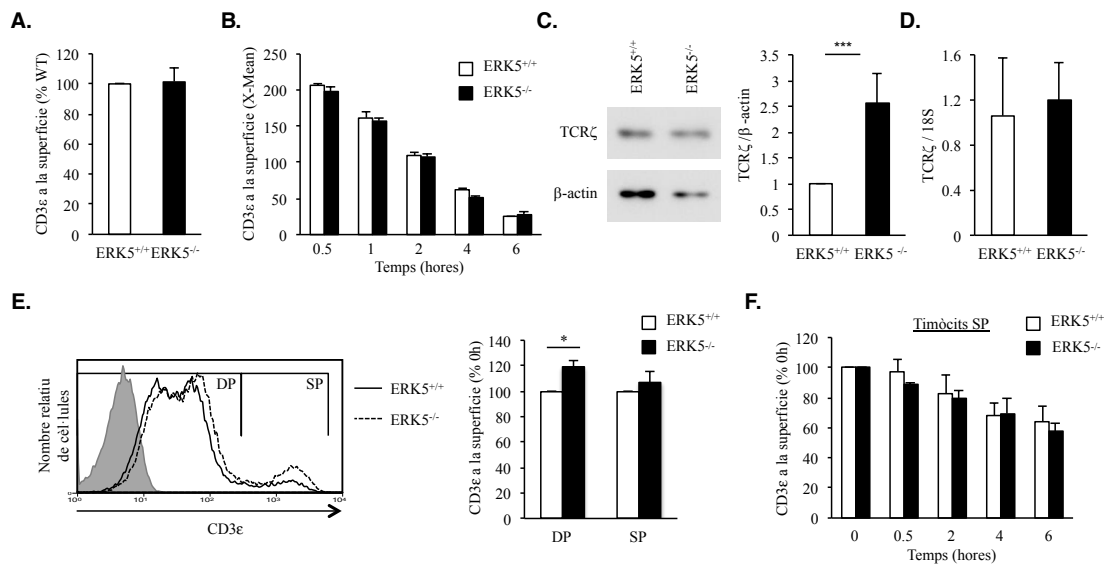
**Figura R22. ERK5 no és necessari pel desenvolupament i manteniment en perifèria dels limfòcits T.**

**A.** Representació esquemàtica de la generació del ratolí ERK5<sup>-/-</sup>. El ratolí *Erk5*<sup>loxP/loxP</sup> va ser creuat amb el ratolí *Vav-Cre* per tal de generar una deficiència d'ERK5 en el sistema hematopoètic. **B.** Els ratolins van ser genotipats a partir de biòpsies d'orella i per mitjà de PCR. **C.** Western blot representatiu de l'expressió d'ERK5 en el tim i la melsa dels ratolins ERK5<sup>-/-</sup> de 4 setmanes. **D.** Nombre total de cèl·lules en el tim del ratolí ERK5<sup>+/+</sup> (n=11) o ERK5<sup>-/-</sup> (n=11) de 4 setmanes. Cada cercle representa un animal. **E.** Nombre total de cèl·lules en la melsa del ratolí ERK5<sup>+/+</sup> (n=9) o ERK5<sup>-/-</sup> (n=9) de 4 setmanes. Cada cercle representa un animal. **F.** Percentatge dels subtipus cel·lulars del tim. Els timòcits isolats del ratolí ERK5<sup>+/+</sup> (n=9) o ERK5<sup>-/-</sup> (n=9) de 4 setmanes van ser marcats amb anti-CD4-APC i anti-CD8-FITC i, posteriorment, analitzats per citometria de flux. Perfil de FACS representatiu del marcatge (Esquerra). Mitjana +/- SD del percentatge de les poblacions CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> i CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> (Dreta). **G.** Percentatge dels subtipus cel·lulars de la melsa. Les cèl·lules isolades del ratolí ERK5<sup>+/+</sup> (n=3) o ERK5<sup>-/-</sup> (n=3) de 4 setmanes van ser marcats amb anti-CD4-APC i anti-CD8-FITC i, posteriorment, analitzats per citometria de flux. Perfil de FACS representatiu del marcatge (Esquerra). Mitjana +/- SD del percentatge de les poblacions CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> i CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> (Dreta).

### 2.1.6 El ratolí ERK5<sup>-/-</sup> mostra una reducció en la degradació de TCRζ en els timòcits DP

Els timòcits immadurs DP CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> presents en el tim expressen unes 10 vegades menys TCR/CD3 a la superfície cel·lular en relació a l'expressió que es pot observar en els timòcits SP CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> degut a l'ubiquitinació constitutiva de TCRζ<sup>229</sup>. Donat que ERK5 promou la ubiquitinació de TCRζ en limfòcits T CD4<sup>+</sup> provinent de sang perifèrica de donants humans després de l'estimulació amb anti-CD3ε (Figura R21.C), vam pensar que ERK5 podria jugar un rol en la regulació de TCRζ en els timòcits DP. Així doncs, vam analitzar el nivell total de

TCR $\zeta$  en els timòcits DP del ratolí ERK5<sup>-/-</sup> i vam observar un increment d'aproximadament 2,5 vegades comparat amb el ratolí ERK5<sup>+/+</sup> (Figura R23.C). L'expressió del mRNA de TCR $\zeta$  és similar en els ratolins ERK5<sup>-/-</sup> i els ERK5<sup>+/+</sup> (Figura R23.D), suggerint que ERK5 promou la degradació de TCR $\zeta$ . La degradació de TCR $\zeta$  en els timòcits DP regula l'expressió en membrana del complex TCR/CD3<sup>229</sup>, per tant, vam analitzar si ERK5 regula el nivell en superfície del complex TCR/CD3 en els timòcits DP. Degut a que els timòcits DP expressen unes 10 vegades menys TCR/CD3 en la superfície cel·lular en comparació als timòcits SP, vam analitzar per citometria de flux els timòcits DP i SP per la intensitat del marcatge amb anti-CD3 $\epsilon$  (Figura R23.E). Tal i com és d'esperar per l'anàlisi del nivell en membrana del complex TCR/CD3 en els limfòcits de la melsa (Figura R23.A-B), els timòcits SP en repòs del ratolí ERK5<sup>-/-</sup> i del ratolí ERK5<sup>+/+</sup> presenten un nivell similar del complex TCR/CD3 en superfície (Figura R23.E) i la mateixa cinètica de disminució del nivell en membrana de CD3 $\epsilon$  després del tractament amb anti-CD3 $\epsilon$  (Figura R23.F). Malgrat aquest fet, en els timòcits DP del ratolí ERK5<sup>-/-</sup> l'expressió en membrana del complex TCR/CD3 es troba lleugerament incrementat (Figura R23.E), en correlació amb l'increment del nivell total de TCR $\zeta$ . Així doncs, aquests resultats suggereixen que ERK5 controla el nivell en superfície del complex TCR/CD3 per mitjà de la degradació de TCR $\zeta$ .

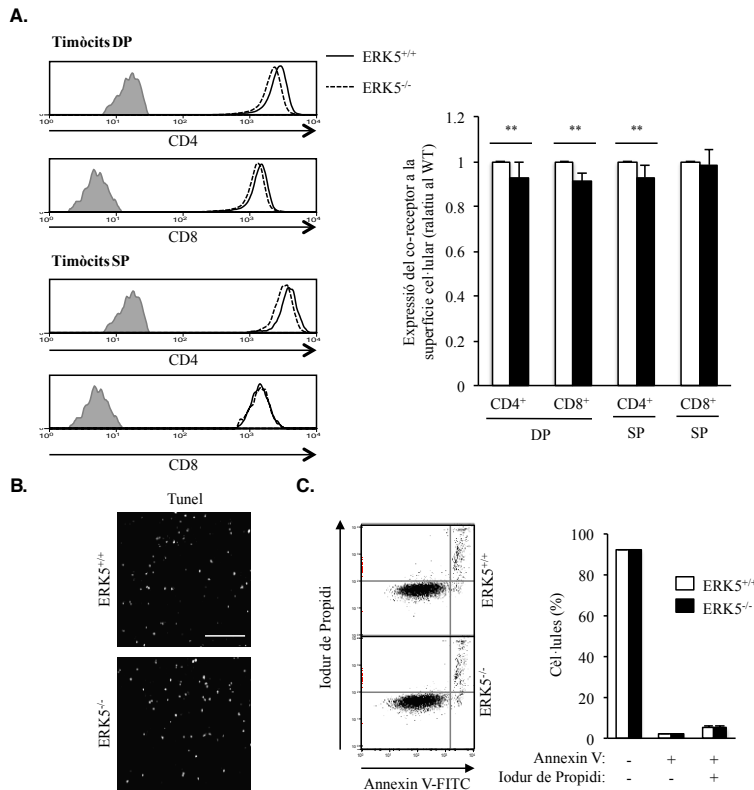


**Figura R23.** El ratolí ERK5<sup>-/-</sup> mostra una reducció en la degradació de TCR $\zeta$  en els timòcits DP. **A.**

Nivells de CD3 $\epsilon$  en la superfície de les cèl·lules de la melsa del ratolí ERK5<sup>-/-</sup>. Les cèl·lules van ser incubades amb anti-CD3 $\epsilon$  (clon 145-2C11), seguit per un marcatge amb un anticòs secundari Alexa 488-F(ab')<sub>2</sub> i, posteriorment, analitzats per citometria de flux. L'expressió relativa va ser calculada a partir dels valors de MFI obtinguts en el ratolí ERK5<sup>+/+</sup> versus els obtinguts en el ratolí ERK5<sup>-/-</sup>. Mitjana +/- SD de 6 parelles d'ERK5<sup>+/+</sup> i ERK5<sup>-/-</sup>. **B.** Cinètica de downregulació del complex TCR/CD3 en les cèl·lules de la melsa del ratolí ERK5<sup>-/-</sup>. Les cèl·lules van ser estimulades a 37°C amb anti-CD3 $\epsilon$  (1  $\mu$ g/mL) durant diferents temps. Posteriorment van ser incubades en fred en condicions saturants d'anti-CD3 $\epsilon$ , es van marcar amb un anticòs secundari Alexa 488-F(ab')<sub>2</sub> i, finalment, van ser analitzades per citometria de flux. Mitjana +/- SD de 3 ratolins ERK5<sup>+/+</sup> i 4 ratolins ERK5<sup>-/-</sup>. **C.** Nivells de TCR $\zeta$  en els timòcits DP del ratolí ERK5<sup>-/-</sup>. Western blot representatiu (esquerra) i rati TCR $\zeta$  : actina (dreta). Mitjana +/- SD de 3 parelles d'ERK5<sup>+/+</sup> i ERK5<sup>-/-</sup>. **D.** Expressió del mRNA de TCR $\zeta$  en els timòcits DP del ratolí ERK5<sup>-/-</sup>. El mRNA de TCR $\zeta$  va ser analitzat per transcripció reversa del RNA total i RT-PCR. Els valors de TCR $\zeta$  : 18S van ser calculats i normalitzats a un ratolí ERK5<sup>+/+</sup>, al qual se l'hi va donar un valor de 1. Mitjana +/- SD de 5 parelles d'ERK5<sup>+/+</sup> i ERK5<sup>-/-</sup>. **E.** Nivells de CD3 $\epsilon$  en la superfície dels timòcits del ratolí ERK5<sup>-/-</sup>. Els timòcits van ser tractats com en "A". Histograma representatiu de l'expressió de CD3 $\epsilon$  en timòcits

DP i SP (Esquerra). L'expressió relativa (Dreta) va ser calculada a partir dels valors de MFI obtinguts en el ratolí ERK5<sup>+/+</sup> versus els obtinguts en el ratolí ERK5<sup>-/-</sup>. Mitjana +/- SD de 8 parelles d'ERK5<sup>+/+</sup> i ERK5<sup>-/-</sup>. **F.** Cinètica de downregulació del complex TCR/CD3 en els timòcits SP del ratolí ERK5<sup>-/-</sup>. Els timòcits van ser tractats com en "B" i es van seleccionar els timòcits amb elevada expressió de CD3ε per dur a terme l'anàlisi. Mitjana +/- SD de 3 ratolins ERK5<sup>+/+</sup> i 4 ratolins ERK5<sup>-/-</sup>.

El nivell en superfície de CD4 i CD8 en els timòcits DP i de CD4 en els timòcits SP CD4<sup>+</sup> es troben lleugerament disminuïts en el ratolí ERK5<sup>-/-</sup>, en comparació amb el ratolí ERK5<sup>+/+</sup> (Figura R24.A). En aquest moment no sabem si aquest fet és degut a l'absència d'ERK5 o a l'augment en superfície del complex TCR/CD3, però canvis en el nivell en membrana del complex TCR/CD3 o els co-receptors CD4 i CD8 poden afectar els processos de selecció tímica a través de l'alteració dels senyals mínims o màxims que rebran els timòcits DP. La deficiència d'ERK5 en Jurkat correlaciona amb un augment en la mort cel·lular induïda per activació (Figura R18.I), i ha estat suggerit que la via MEK5/ERK5 presenta un rol en el procés de selecció negativa dels timòcits<sup>54</sup>. Tot i això, l'assaig de TUNEL per tal de determinar si la deficiència d'ERK5 en ratolí influeix la apoptosi dels timòcits mostra un nombre similar de timòcits apoptòtics TUNEL<sup>+</sup> en els ratolins ERK5<sup>-/-</sup> i ERK5<sup>+/+</sup> (Figura R24.B). A més a més, el marcatge amb Annexina V i iodur de propidi dels timòcits del ratolí ERK5<sup>-/-</sup> mostra el mateix percentatge de timòcits apoptòtics que el marcatge realitzat en els ratolins ERK5<sup>+/+</sup> (Figura R24.C). Aquest resultat indiquen que l'alteració en el nivell en superfície del complex TCR/CD3 i els co-receptors CD4 i CD8 en els timòcits DP del ratolí ERK5<sup>-/-</sup> no promou la seva apoptosi. Tot i així, l'existència de mecanismes compensatoris no es poden descartar en aquest moment.

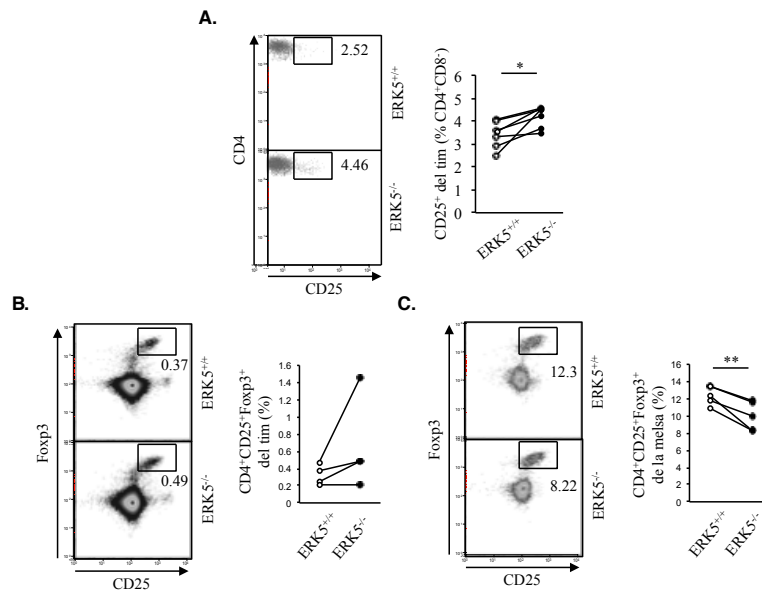


**Figura R24.** El ratolí ERK5<sup>-/-</sup> no presenta una alteració en l'apoptosi dels timòcits. **A.** Nivells de CD4 i CD8 en la superfície dels timòcits DP o SP. Els timòcits van ser marcats amb anti-CD4-APC i anti-CD8-FITC i, posteriorment, analitzats per citometria de flux. Histograma representatiu (Esquerra). L'expressió relativa (Dreta) va ser calculada a partir dels valors de MFI obtinguts en el ratolí ERK5<sup>+/+</sup> versus els obtinguts en el ratolí ERK5<sup>-/-</sup>. Mitjana +/- SD de 9 parelles d'ERK5<sup>+/+</sup> i ERK5<sup>-/-</sup>. **B.** Marcatge *in situ* de TUNEL en seccions de tim. Imatges representatives de 3 parelles de ratolins ERK5<sup>+/+</sup> i ERK5<sup>-/-</sup>.

Barra = 100  $\mu\text{m}$ . El contrast i la brillantor han estat ajustats per igual en ambdues figures per tal de facilitar la visualització. C. Apoptosi en els timòcits del ratolí ERK5<sup>-/-</sup>. Els timòcits van ser marcats amb Annexina V-FITC i iodur de propidi (0,4  $\mu\text{g/mL}$ ) i analitzats per citometria de flux. Perfil de FACS representatiu del marcatge d'Annexina V-FITC i PI (Esquerra). Percentatge de cèl·lules vives (Annexina V-negatives PI-negatives), apoptòtiques (Annexina V-positives PI-negatives) i mortes (Annexina V-positives PI-positives). Mitjana de 2 parelles d'ERK5<sup>+/+</sup> i ERK5<sup>-/-</sup> (Dreta).

### 2.1.7 El ratolí ERK5<sup>-/-</sup> mostra un increment en el percentatge de timòcits CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup> i una reducció de T<sub>reg</sub> en la melsa

L'augment en el nivell en membrana del complex TCR/CD3 influeix la força de la senyalització a través del complex TCR/CD3 per mitjà de l'alteració de l'avidesa per el complex pèptid-MHC<sup>64</sup>. Durant el desenvolupament, els tT<sub>regs</sub> CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> reben una senyalització més forta a través del TCR/CD3 que els limfòcits T convencionals, i una subpoblació enriquida en progenitors de tT<sub>regs</sub> (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>) reben estímuls inclús superiors<sup>230</sup>. Així doncs, l'augment en el nivell en membrana del complex TCR/CD3 observat en els timòcits DP podria incrementar la presència de timòcits CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup> en el ratolí ERK5<sup>-/-</sup>. Per tal d'analitzar l'efecte d'ERK5 en el desenvolupament d'aquesta subpoblació tímica, vam analitzar per citometria de flux el percentatge de timòcits CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup> en el tim. Comparat amb el ratolí ERK5<sup>+/+</sup>, l'absència d'ERK5 incrementa el percentatge de la població de timòcits CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup> en aquest òrgan (Figura R25.A), i suggerint que ERK5 limita la generació de timòcits CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup> per mitjà de la disminució dels nivells en membrana del complex TCR/CD3 en els timòcits DP a través de la degradació de la subunitat TCR $\zeta$ . Per tal d'analitzar en profunditat el rol d'ERK5 en el desenvolupament dels limfòcits T<sub>reg</sub>, vam creuar els ratolins *Vav-Cre/Erk5<sup>loxP/loxP</sup>* amb el ratolí *Foxp3<sup>EGFP</sup>* per tal de generar un ratolí amb el qual fer el seguiment dels limfòcits T<sub>reg</sub> ja que expressen Foxp3-EGFP. El ratolí ERK5<sup>-/-</sup> presenta un percentatge similar de T<sub>reg</sub> en el tim en comparació amb el ratolí ERK5<sup>+/+</sup> (Figura R25.B), suggerint un desenvolupament correcte dels tT<sub>reg</sub> malgrat l'enriquiment en la subpoblació rica en progenitors de tT<sub>reg</sub>. Curiosament, la deleció d'ERK5 resulta en una reducció del percentatge de T<sub>reg</sub> en la melsa en comparació amb el ratolí ERK5<sup>+/+</sup> (Figura R25.C). Aquests resultats mostren un augment en els progenitors de tT<sub>regs</sub> en el tim i una reducció de T<sub>reg</sub> en la melsa, amb aquests fenòmens aparentment no relacionats degut a desenvolupament correcte dels tT<sub>reg</sub> en el tim.



**Figura R25.** El ratolí ERK5<sup>-/-</sup> mostra un increment en el percentatge de timòcits CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> i una reducció de T<sub>reg</sub> en la melsa. **A.** Percentatge de timòcits CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. Els timòcits van ser marcats amb anti-CD4-APC, anti-CD8-FITC i anti-CD25-PE i analitzats per citometria de flux. Perfil de FACS representatiu del marcatge de CD25 en els timòcits CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (Esquerra). Percentatge de 7 parelles d'ERK5<sup>+/+</sup> i ERK5<sup>-/-</sup> (Dreta). Les diferències estadístiques es van analitzar mitjançant el test *t*-student aparellat. **B i C.** Anàlisi per citometria de flux del tim (B) i melsa (C) dels ratolins ERK5<sup>-/-</sup>-Foxp3<sup>EGFP</sup> i ERK5<sup>+/+</sup>-Foxp3<sup>EGFP</sup>. Les cèl·lules van ser marcades amb anti-CD4-APC i anti-CD25-PE i analitzades per citometria de flux. Perfil representatiu del marcatge de CD25 en les cèl·lules CD4<sup>+</sup> (Esquerra). Percentatge de 4 parelles d'ERK5<sup>+/+</sup> i ERK5<sup>-/-</sup> (Dreta). Les diferències estadístiques es van analitzar mitjançant el test *t*-student aparellat.





DISCUSSION

---



# 1. Funció de SDC2 en els limfòcits T CD4<sup>+</sup>

Els resultats presentats en aquesta tesi demostren que la sobre-expressió de SDC2 en limfòcits Jurkat inhibeix la seva capacitat d'adhesió i activació i revelen els mecanismes d'acció pels quals SDC2 regula aquests dos processos, suggerint així una funció de SDC2 durant l'adhesió i l'activació dels limfòcits T CD4<sup>+</sup>.

## 1.1 Funció de SDC2 durant l'adhesió dels limfòcits T CD4<sup>+</sup>

SDC2 presenta una funció pro-adhesiva en la majoria de tipus cel·lulars en el que és expressat, sobretot degut a la presència de cadenes HS<sup>185,231-234</sup>. Tot i això, en la secció 1.2 de l'apartat de resultats d'aquesta tesi es demostra que la sobre-expressió de SDC2 en les Jurkat provoca una disminució de la capacitat d'adhesió cel·lular *in vitro* i en estàtic en els dos models testats, l'adhesió a cèl·lula endotelial i l'adhesió a limfòcit B. En línia amb aquests resultats, s'ha publicat que PBMCs del ratolí *knock-out* per *Sdc1* mostren un augment en la seva capacitat d'adherir-se a HUVEC estimulades o no amb hTNF- $\alpha$ <sup>235,236</sup>. A més, la inhibició de la migració induïda per citocines per part de l'antitrombina en neutròfils, monòcits i limfòcits és via SDC4<sup>237,238</sup>. Aquestes dades suggereixen que la família dels SDCs també poden tenir un rol inhibitori en l'adhesió dels leucòcits al endoteli.

Durant la transmigració endotelial, el pas que segueix a l'adhesió del limfòcit T al endoteli és travessar la barrera endotelial. Malgrat la reducció en la capacitat d'adherir-se en estàtic a cèl·lula endotelial observada en les Jurkat-SDC2, la capacitat de transmigrar d'aquestes cèl·lules no es troba afectada. Cal destacar que els experiments d'adhesió en estàtic es van dur a terme en un interval de 30 minuts, en canvi, els experiments de transmigració es van dur a terme en un interval de 24 hores. Així doncs, un anàlisi de la transmigració a diferents temps podria respondre d'una manera més precisa a la pregunta de si SDC2 regula la transmigració de les Jurkat. Aquest fet no ha estat explorat en profunditat, però seria interessant dedicar-hi una especial atenció en el futur degut a la importància d'aquest fenomen durant la inflamació.

L'habilitat dels limfòcits T CD4<sup>+</sup> alhora d'adherir-se a d'altres cèl·lules és regulada per els nivells de les integrines en la superfície cel·lular<sup>93</sup>. Els tres cDNAs de *SDC2* transfectats (*SDC2*, *SDC2*( $\Delta$ EFYA), *SDC2*(FAAF)) condueixen a una disminució en els nivells de LFA-1 en la superfície cel·lular, malgrat això, aquest fenotip compartit és causat per diverses situacions. En el cas de les Jurkat-SDC2 i les Jurkat-SDC2(FAAF), LFA-1 es troba regulada post-traduccionalment, en canvi, en les Jurkat-SDC2( $\Delta$ EFYA) la disminució de LFA-1 és causada per una reducció en els nivells basals del mRNA de CD11a, però no dels de CD18. Alguns estudis han demostrat la presència de SDCs en el nucli<sup>239</sup> i identificat motius importants per la seva localització, com és el cas del motiu RMKKK, necessari per a la translocació al nucli de SDC1 en una línia cel·lular de fibrosarcoma<sup>240</sup>. Aquests resultats suggereixen que el motiu de SDC2 que s'uneix a dominis PDZ podria controlar l'activitat del gen de CD11a, mentre que els residus 179, 187, 188 i 191 (corresponents al mutant FAAF) de la cua citoplasmàtica de SDC2 no es troben implicats en la regulació del gen de CD11a. Els queratinòcits del ratolí KO per SDC1 mostren un increment en la transcripció de les integrines  $\alpha$ 3 i  $\alpha$ 9<sup>241</sup>, d'altra banda, la lligació de SDC4 promou l'endocitosis d'integrines, reduint l'avidesa per la fibronectina<sup>242</sup>,

exemples que indiquen un rol inhibidor dels SDCs en el control de l'expressió de les integrines, similar al que s'ha demostrat en aquest treball.

La deleció del domini de SDC2 d'unió a dominis PDZ, un domini conservat en tots els SDCs, condueix a una recuperació de l'adhesió a les cèl·lules endotelials, però no als limfòcits B. Aquest fet no és degut a una recuperació del nivell en membrana de LFA-1 en les Jurkat-SDC2( $\Delta$ EFYA), indicant l'existència d'un mecanisme alternatiu que expliqui aquest fenomen. Les Jurkat-SDC2 presenten la integrina LFA-1 bloquejada en una conformació de baixa afinitat, inclús quan tractem les cèl·lules amb PMA, reactiu que indueix l'adquisició d'una conformació d'elevada afinitat detectada per l'anticòs mAb24, o bé quan tractem amb  $Mg^{2+}$ /EGTA o una combinació dels dos tractaments, sense que el bloqueig de LFA-1 en la conformació de baixa afinitat pugui ser revertit per la transfecció del *head-domain* de Talin1 o l'expressió de mutants constitutivament actius de *small GTPases*, relacionades amb l'activació de LFA-1 com són RhoA i Rac1 <sup>146</sup>. La deleció del domini d'unió a PDZ de SDC2 permet revertir el bloqueig de la conformació de LFA-1, indicant que les diferències en l'adhesió a les cèl·lules endotelials per part de les Jurkat-SDC2 i les Jurkat-SDC2( $\Delta$ EFYA) són degudes a un control de la senyalització *inside-out* d'activació de LFA-1 per part del domini d'unió a PDZ. Cal destacar que malgrat que LFA-1 no es troba bloquejat en les Jurkat-SDC2( $\Delta$ EFYA), no s'observa una recuperació en l'adhesió a limfòcits B, probablement degut a la reducció dels nivells en membrana del complex TCR/CD3, la presència del qual és indispensable per a la formació de la sinapsis T-B.

Estudis previs han posat de manifest que una transició ràpida de LFA-1 d'un estat d'elevada afinitat a un de baixa afinitat és essencial per a dur a terme la seva funció. Actualment es coneix poc de la desactivació de LFA-1, però l'interès per aquest procés és creixent. El punt d'inflexió que va captar l'interès cap al procés de desactivació de LFA-1 va ser la demostració que una mutació que provoca que LFA-1 es trobi permanentment en un estat d'elevada afinitat provoca un fenotip *in vivo* similar al presentat per els limfòcits T *knock-out* per LFA-1 <sup>243</sup>. Aquests limfòcits són incapaços de promoure la transmigració endotelial i l'activació dels limfòcits T després del contacte amb APCs, demostrant així que la desactivació és un procés clau durant l'adhesió dels limfòcits T <sup>243</sup>. Les molècules intracel·lulars més ben estudiades que regulen aquest procés són la *small GTPase* Cdc42 <sup>146</sup>, RhoH a través de la inhibició de Rap1 <sup>244</sup> i la ubiquitin lligasa Cbl-b <sup>245</sup>, però una especial atenció ha rebut GDF-15, la primera citocina identificada com a inhibidora de la transmigració endotelial i de la qual actualment es desconeix el seu receptor, ja que s'han demostrat potencials beneficis terapèutics protectors contra la inflamació en un model d'infart de miocardi en ratolí <sup>246</sup>. Així doncs, les dades exposades en aquesta tesi demostren que SDC2 regula l'adhesió de les Jurkat a través de la regulació de l'estat d'afinitat de LFA-1 i suggereixen SDC2 com a nova molècula reguladora de l'adhesió *in vivo* dels limfòcits T CD4<sup>+</sup> a l'endoteli.

D'altra banda, la mutació dels residus 179, 187, 188 i 191, comporta un augment en l'adhesió als limfòcits B carregats amb superantigen en comparació amb els no carregats, però no mostra una recuperació en l'adhesió a les cèl·lules endotelials respecte l'observat en les Jurkat-SDC2. Tot i que les Jurkat-SDC2(FAAF) no presenten un bloqueig total de l'activació de LFA-1 com l'observat en les Jurkat-SDC2, no observem una recuperació com en les Jurkat-SDC2( $\Delta$ EFYA), fet que podria explicar la incapacitat d'adherir-se a les cèl·lules endotelials com ho fan les Jurkat-wt o les Jurkat-SDC2( $\Delta$ EFYA).

Els resultats aquí mostrats indiquen que el domini d'unió a PDZ i els residus 179, 187, 188 i 191 de SDC2 exerceixen un potent efecte inhibidor en la modulació de l'afinitat de LFA-1. És temptador especular que un mecanisme conservat en la família dels SDCs podria regular l'afinitat de les integrines  $\beta_2$  en leucòcits a través del domini conservat d'unió a PDZ i la tirosina 179. En línia amb aquesta especulació, els PBMCs del ratolí deficient en SDC1 mostren un augment en l'adhesió a ICAM-1, fenomen que pot ser revertit per l'adició d'un anticòs bloquejant dirigit contra la cadena  $\beta_2$  de LFA-1<sup>247</sup>. Malgrat els resultats aquí presentats, la tònica general de la informació referent a la funció dels SDC en adhesió és l'activació general de les integrines per part dels SDCs mostrant la sinèrgia existent durant l'adhesió a la matriu extracel·lular i la formació d'adhesions focals<sup>136</sup> i, suggerint que les relacions entre integrines i SDCs depenen del parell de molècules que interaccionen i del context cel·lular present en un determinat moment<sup>137</sup>.

## 1.2 Funció de SDC2 durant l'activació dels limfòcits T CD4<sup>+</sup>

En la secció 1.3 de l'apartat de resultats d'aquesta tesi es demostra que la sobre-expressió de SDC2 en les Jurkat redueix la capacitat d'aquestes cèl·lules a respondre a l'estimulació via TCR/CD3 degut a la disminució de l'expressió en membrana del complex TCR/CD3 a causa de la degradació de la subunitat TCR $\zeta$ . L'estimulació de les Jurkat-SDC2 amb anti-CD3 $\epsilon$  mostra una reducció de la capacitat d'activació d'aquestes cèl·lules, mentre que l'estimulació amb PMA permet una correcta activació. Aquests resultats indiquen un problema en la senyalització a través del TCR/CD3 en les Jurkat-SDC2 i suggereixen SDC2 com a receptor inhibidor dels limfòcits T. Resultats similars han sigut descrits prèviament per diferents grups usant la mateixa aproximació respecte la funció de múltiples proteïnes en l'activació dels limfòcits T ja que aquesta és una manera clàssica d'abordar aquest tipus de preguntes<sup>178</sup>.

El marcatge amb anti-CD3 $\epsilon$  i anti-TCR $\alpha/\beta$  per a l'anàlisi de la presència en membrana del complex TCR/CD3 en les Jurkat-SDC2 demostra que la sobre-expressió de SDC2 resulta en una disminució del TCR/CD3 en membrana. Tant en limfòcits T naïve com en activats el complex TCR/CD3 és internalitzat a través de la via dependent de clatrina, degut al motiu DxxxLL present en la cadena CD3 $\gamma$  que permet la interacció amb l'adaptador AP-2<sup>248</sup>, que uneix el TCR/CD3 amb la maquinària d'internalització dependent de clatrina. En concert amb aquest fet, la sobre-expressió de SDC2 en les Jurkat promou la reducció en membrana de CD4 i el Tfr, dues molècules que també són internalitzades a través de la via dependent de clatrina<sup>226,249</sup>, però no altera l'expressió en membrana de MHC-I, internalitzat per una via independent de clatrina i dinamina però dependent d'Arf-6<sup>250</sup>. Aquests resultats demostren que l'efecte de SDC2 no es troba restringit al complex TCR/CD3 i suggereixen que SDC2 podria regular l'endocitosi dependent de clatrina. Altres estudis han demostrat que la inhibició d'una via d'endocitosi pot afectar-ne d'altres<sup>251</sup>, per tant, és factible pensar que promoure una determinada via d'endocitosi pot acabar afectant-ne d'altres. Els SDCs han estat íntimament relacionats amb la regulació de les vies endocítiques<sup>252</sup>, particularment la via independent de clatrina i dinamina però dependent d'Arf-6<sup>135</sup>, però la falta d'efecte de l'expressió d'un dominant negatiu d'Arf6 en Jurkat-SDC2 suggereix que aquesta via no es troba implicada en la disminució dels nivells en membrana del complex TCR/CD3. En línia amb aquesta observació, anàlisis per microscòpia confocal de la localització sub-cel·lular de CD3 $\epsilon$  i SDC2 suggereixen que aquestes dues molècules no interactuen<sup>253</sup>. A més a més, la deleció del domini EFYA de

SDC2 no es tradueix en una reversió del fenomen de disminució del nivell en membrana del TCR/CD3, observació que va en contra d'una acció directa de SDC2 sobre el TCR/CD3. Així doncs, la disminució del nivell en membrana del TCR/CD3 per efecte de SDC2 podria ser, almenys en part, un efecte indirecte a través del control de vies endocítiques.

Al caracteritzar la sobre-expressió de SDC2 en les Jurkat s'ha observat que provoca una retenció intracel·lular de la subunitat CD3 $\epsilon$ , la qual es troba present en endosomes Rab4<sup>+</sup> i exclosa de lisosomes LAMP1<sup>+</sup> <sup>253</sup>, i una reducció del nivell total de la subunitat TCR $\zeta$ , la qual presenta una vida mitja d'aproximadament 5 hores enlloc de les 10 hores que presenta la situació control <sup>253</sup>. A més a més, els resultats presentats aquí també mostren que els processos d'internalització i de reciclatge del complex TCR/CD3, usant CD3 $\epsilon$  com a marcador, no es veuen afectats en les Jurkat per la sobre-expressió de SDC2. Aquests anàlisis permeten definir el rol de SDC2 durant el procés de la downregulació del TCR. Abans de contactar amb un antigen immunogènic, els complexos TCR/CD3 presents en la membrana citoplasmàtica d'un limfòcit T són constitutivament internalitzats per després ser reciclats de nou cap a la membrana o degradats en els lisosomes, amb un 70-80% dels complexos permanentment a la superfície cel·lular i un 20-30% en l'interior cel·lular <sup>66-68</sup>. Alteracions en aquests processos provoquen una alteració en el nivell en membrana del receptor. Un cop el limfòcit T contacta amb un pMHC immunogènic s'inicia l'activació i, com a conseqüència, el procés de downregulació del TCR de la membrana citoplasmàtica que evita una excessiva activació del limfòcit T. La downregulació del TCR és el resultat d'un increment en la internalització i una reducció del reciclatge del complex TCR/CD3 i d'un increment en la degradació de la cadena TCR $\zeta$  <sup>67</sup>. Almenys dues vies promouen la downregulació del TCR <sup>225</sup>: la primera és depenent de l'activitat PTK de LCK ja que promou la degradació de TCR $\zeta$  a través de la ubiquitin-lligasa c-Cbl i fosforila la cadena pesada de clatrina que promou la internalització del complex TCR/CD3 que ha contactat amb el pMHC, i la segona via és una depenent de PKC, la qual promou la internalització de complexos TCR/CD3 que no han contactat amb el pMHC. Les dades mostrades en aquesta tesi mostren la capacitat de SDC2 de disminuir l'expressió en membrana del complex TCR/CD3 i incrementar la degradació de TCR $\zeta$  en Jurkat, limitant la presència de receptors complets en la membrana, i portant a les Jurkat-SDC2 a una acumulació intracel·lular dels dímers CD3 $\epsilon\gamma$  i CD3 $\epsilon\delta$ . A més a més, resultats del laboratori mostren que SDC2 i TCR $\zeta$  co-localitzen parcialment <sup>253</sup>. Així doncs, en el context de la downregulació del TCR/CD3, és temptador especular que la sobre-expressió de SDC2 en Jurkat porta a un increment de la ubiquitinació de TCR $\zeta$ , dirigint-la als cossos multivesiculars per finalment ser degradada als lisosomes, fet que provocaria que la resta de les subunitats es trobessin retingudes en endosomes sense capacitat de reciclar de nou cap a la superfície cel·lular.

Recentment s'ha descrit el rol de multitud de proteïnes durant el procés de downregulació del TCR/CD3, resultats que han posat de manifest la complexitat de la regulació d'aquest fenomen. En els limfòcits T madurs, la proteïna *Intreflagellar Transport 20* transloca a la SI i regula el reciclatge del complex TCR/CD3 <sup>254</sup> i la proteïna adaptadora de l'endocitosis *Numb* es troba implicada en la degradació de TCR $\zeta$  a través de la seva unió amb c-Cbl <sup>255</sup>. Com s'ha dit abans, la internalització dels complexos TCR/CD3 que no han contactat amb el pMHC es duu a terme a través d'una via depenent de PKC i, recentment en un treball del Dr. Alarcón, s'ha descrit que aquest fenomen depèn de la fosforilació en la serina 163 de  $\beta$ -arrestin-1 per part de PKC activada a través del TCR/CD3, la qual contacta amb el TCR/CD3 no estimulat per promoure la seva internalització <sup>256</sup>. Una observació similar a la sobre-expressió de SDC2 en Jurkat es pot

observar en els limfòcits T *knock-out* per *Wash*, un activador d'Arp2/3 de la superfamília de proteïnes del síndrome de Wiskott-Aldrich, ja que l'absència de WASH provoca una reducció en la superfície cel·lular de TCR/CD3 i LFA-1 degut a una acumulació en el compartiment endosomal i posterior degradació en el lisosoma<sup>257</sup>. El fet que tant SDC2 com WASH regulin el citoesquelet d'actina permet especular amb una possible relació entre aquestes dues molècules durant la regulació de l'expressió en la membrana citoplasmàtica del complex TCR/CD3. D'altra banda, dos treballs han aportat dos conceptes nous en el paradigma actual de la downregulació del TCR/CD3. En el primer, s'ha demostrat que la proteïna TC21 associada amb el TCR/CD3 unit a pMHC regula la internalització del complex a través de la *small GTPase* RhoG però per una via d'internalització poc estudiada, la trogocitosis, per la qual també s'endocita el pMHC de la APC en contacte amb el complex TCR/CD3<sup>258</sup>. En el segon treball, el regulador de *small GTPases* DENND1B, del qual es coneixen variants del seu gen associades amb el desenvolupament d'asma, interacciona amb Rab35 i AP-2 per tal de regular la downregulació del TCR/CD3 específicament en els limfòcits Th2 però no en els Th1 o Th17, demostrant així per primera vegada un rol en la downregulació del TCR/CD3 en un subtipus específic de limfòcit T CD4<sup>+</sup>. Però si algun estudi ha revolucionat el camp de la downregulació del TCR/CD3 en els últims anys aquest és l'article del laboratori del Dr. Dustin titulat *Polarized release of T-cell-receptor-enriched microvesicles at the immunological synapse* publicat el 2014<sup>31</sup>. En aquest treball es demostra que el centre de la SI és una cavitat plena de microvesícules riques en TCR/CD3, demostrant així un nou mecanisme de downregulació del TCR/CD3. El reclutament de TCR/CD3 en microvesícules depèn de TSG101, el qual prèviament havia estat relacionat amb el procés de downregulació del TCR/CD3<sup>259</sup>, i l'escissió de la microvesícula depèn de VPS4. Com es regula la biogènesi d'aquestes microvesícules? Aquesta és una pregunta que s'haurà de respondre per entendre aquest procés. Un candidat potencial com a regulador de la biogènesi de les microvesícules és SDC2 ja que, apart del seu rol en la downregulació del TCR/CD3 demostrat en aquesta tesi, s'ha demostrat en altres tipus cel·lulars que la família dels SDCs regula la formació d'aquestes microvesícules a través de la interacció amb *Syntenin* i ALIX, la qual també promou la downregulació del TCR/CD3<sup>260</sup>. Curiosament, el mecanisme del qual SDC-*Syntenin*-ALIX depèn per a la formació de les microvesícules és el mateix que l'utilitzat en els limfòcits T per a generar les microvesícules riques en TCR/CD3 de la SI, és a dir, TSG101 pel reclutament i VPS4 per l'escissió.

Estudis de sobre-expressió en Jurkat com el d'aquesta tesi han permès la identificació del rol de proteïnes adaptadores com HIP-55<sup>261</sup> o TRIM<sup>262</sup> en la regulació dels nivells en superfície del TCR/CD3. A més a més, l'activació usant l'anticòs anti-CD90 clon LP5 que reconeix CD90 en limfòcits T de ratolí presenta la capacitat de modular l'expressió en la superfície cel·lular del TCR/CD3 i, en conseqüència, l'activació dels limfòcits T<sup>263</sup>. SDC2 és la primera molècula de la superfície dels limfòcits T humans de la qual s'ha descrit una capacitat de promoure la downregulació del TCR/CD3, així doncs, la possibilitat de modular l'activació dels limfòcits T usant anticossos dirigits contra SDC2 es presenta com una possibilitat temptadora.

Els resultats presentats en aquesta tesi suggereixen que SDC2 podria jugar un rol funcional en la regulació dels nivells en membrana del TCR/CD3. Per tal d'explorar aquesta possibilitat, s'han estimulat els limfòcits T CD4<sup>+</sup> purificats amb anti-CD3ε en presència d'un anticòs específic per SDC2. Malgrat els resultats inicials en que s'observa un increment en la capacitat de downregular del complex TCR/CD3 en els limfòcits estimulats amb anti-SDC2, s'ha observat que això és degut a la presència de proteïna A en el estoc del anticòs, sent la responsable de l'augment de la capacitat de downregular observada en els experiments. L'afinitat de la proteïna



A per les IgG2a és superior a la que té per les IgG1, i al afegir anti-SDC2 (IgG1) que conté proteïna A en combinació al anti-CD3ε (IgG2a) es produeix un entrecruament d'aquest últim anticòs, potenciant l'efecte d'aquest anticòs. L'ús de cromatografia d'afinitat amb proteïna A o G per a la purificació d'anticossos és una tècnica usada rutinàriament degut a la seva facilitat tècnica. Però la pèrdua de proteïna A o G de la matriu de cromatografia, en major o menor mesura, és un fenomen comú en els anticossos purificats, fet que s'hauria de tenir en compte en els assajos funcionals <sup>264</sup>. Per determinats estudis, la precipitació per sulfat d'amoni és una millor opció que la cromatografia d'afinitat <sup>265</sup>. El fet de no observar un efecte funcional quan s'usa anti-SDC2 suggereix que l'anticòs no mimetitza el lligand natural, el qual podria afectar la downregulació del TCR/CD3. Les dades mostrades en aquesta tesi indiquen que en condicions de no estimulació el lligand de SDC2 no es troba expressat en la superfície de cap subpoblació de PBMCs, però de la mateixa manera que l'expressió de SDC2 augmenta amb l'activació dels limfòcits T <sup>266</sup> un fet similar podria passar amb el hipotètic lligand de SDC2 present en APC. L'estudi del rol de SDC2 en els limfòcits T CD4<sup>+</sup> en un model més fisiològic podria aportar informació addicional de la seva capacitat de modular l'expressió en membrana del TCR/CD3.

De manera anàloga a SDC2, SDC4 es troba augmentat en els limfòcits T després de la seva activació <sup>266</sup>. En una publicació del grup del Dr. Ariizumi no es reporten canvis en l'expressió del TCR/CD3 en la superfície de les Jurkat amb sobre-expressió de SDC4 <sup>267</sup>, suggerint que SDC4 i SDC2 juguen rols diferents durant l'activació dels limfòcits T. En una altra publicació del mateix grup s'observa absència de SDC4 en la zona de contacte entre un limfòcit T i una cèl·lula dendrítica <sup>174</sup>, suggerint que aquesta molècula es troba exclosa de la SI. Aquesta observació pren sentit al tenir en compte un dels models d'activació dels limfòcits T que millor explica les teories actuals del *TCR triggering*, el *kinetic-segregation model* proposat pel Dr. Davis i el Dr. Van der Merwe l'any 1996 i elegantment corroborat pels mateixos autors 10 anys més tard <sup>268</sup>, en el que bàsicament es descriu que per a que l'activació del limfòcit T sigui exitosa es requereix l'exclusió de molècules inhibidores de grans dimensions de la zona de contacte del limfòcit T amb la APC. Com a exemple trobem CD45 i CD148 però SDC2 i SDC4 podrien patir la mateixa exclusió, i des del dSMAC regularien la inhibició del limfòcit.

En aquesta tesis s'ha demostrat que la sobre-expressió de SDC2 en Jurkat regula l'expressió en membrana del complex TCR/CD3 a través de la degradació de TCRζ i que regula l'adquisició d'un estat d'elevada afinitat de LFA-1 a través del domini EFYA. Tant el complex TCR/CD3 com LFA-1 són dues molècules claus per a la formació de la SI, per tant, els resultats aquí presentats suggereixen que SDC2 inhibeix l'activació dels limfòcit T no només a través de la regulació de TCR/CD3, sinó també a través de la regulació de LFA-1.

## 2. Funció d'ERK5 en els limfòcits T CD4<sup>+</sup>

### 2.1 Funció d'ERK5 en la regulació del nivell en membrana del complex TCR/CD3

En la secció 2.1 de l'apartat de resultats d'aquesta tesi es demostra que ERK5 presenta un rol dual amb efectes antagònics en la modulació de l'expressió en membrana del complex TCR/CD3. D'una banda, el *knock-down* d'ERK5 en Jurkat o la inhibició de l'auto-fosforilació d'ERK5 usant l'inhibidor XMD8-92 en limfòcits T humans primaris presenta una reducció en la capacitat de recuperar uns nivells correctes de TCR/CD3 a la superfície després de l'estimulació

amb anti-CD3ε. D'una altra banda, es mostren evidències que ERK5 regula la degradació de TCRζ i provocant així una alteració en l'expressió del complex TCR/CD3 a la superfície dels limfòcits T. Primer, el *knock-down* d'ERK5 en Jurkat provoca una acumulació de TCRζ sense afectar CD3ε, fet que provoca un augment de l'expressió del TCR/CD3 a la superfície cel·lular. Segon, la inhibició de la fosforilació d'ERK5 per part de MEK5 usant l'inhibidor BIX02188 en limfòcits T humans primaris redueix la capacitat d'aquestes cèl·lules de downregular el TCR/CD3. Aquests inhibidors d'ERK5 s'han proposat com a aproximació terapèutica per al tractament de diversos tipus de càncer <sup>269,270</sup>, però els resultats aquí exposats suggereixen que aquest tractament podria produir efectes indesitjables en els limfòcits T. Tercer, els timòcits DP del ratolí ERK5<sup>-/-</sup> mostren un increment en l'expressió total d'ERK5, probablement com a conseqüència d'una alteració de la ubiquitinació constitutiva d'aquesta subunitat, el qual és un mecanisme usat pels timòcits DP per a la regulació de l'expressió en superfície del complex TCR/CD3 <sup>229</sup>. L'observació d'un discret però significat increment del TCR/CD3 en membrana podria ser suficient per canviar el llindar de la selecció positiva i negativa i impactar així en el repertori T, tal i com suggereix l'increment observat dels limfòcits T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> i tal i com han suggerit d'altres <sup>271</sup>. Inesperadament, l'expressió en membrana del TCR/CD3 en els limfòcits T de la melsa del ratolí ERK5<sup>-/-</sup> és comparable a la del ratolí control i, a més a més, l'estimulació amb anti-CD3ε genera una downregulació per igual en ambdós ratolins. Malgrat aquest fet, no es pot descartar l'existència de fenòmens compensatoris o la possibilitat que l'ús de lligands del TCR/CD3 diferents d'anti-CD3ε o temps d'estimulació més llargs generin un efecte similar a l'observat en el ratolí *knock-out* per *Laptm5*, en el qual els limfòcits T de la melsa mostren una incapacitat de disminuir correctament l'expressió en membrana del TCR/CD3 després de l'activació amb anti-CD3ε degut a una menor degradació de TCRζ <sup>272</sup>. Aquest punt mereix una atenció especial en el futur.

S'ha observat una reducció de la ubiquitinació de TCRζ després d'estimular els limfòcits T amb anti-CD3ε en presència de l'inhibidor d'ERK5 BIX02188, així doncs, els resultats presentats aquí suggereixen que la ubiquitinació de TCRζ durant l'activació dels limfòcits T depèn d'ERK5. L'activació dels limfòcits T és acompanyada per un increment dels processos d'ubiquitinació en la SI <sup>273</sup> i múltiples estudis indiquen que la regulació d'aquest procés és fonamental per a la regulació de la senyalització a través del complex TCR/CD3 (revisat recentment <sup>228</sup>). Cal destacar que les proteïnes poden ser mono-ubiquitinades en una única lisina, procés relacionat amb la degradació en el lisosoma, mono-ubiquitinades en diferents lisines, procés relacionat amb la degradació en el proteasoma, o formar cadenes d'ubiquitines, procés relacionat amb el tràfic endosomal. Actualment es coneixen més de 600 gens que codifiquen per E3 ubiquitin-lligases i s'ha observat un efecte en la regulació de la senyalització a través del complex TCR/CD3 per part de 15 d'aquests enzims <sup>228</sup>. D'entre aquests enzims, la E3 ubiquitin-lligasa CHIP/STUB1 mereix una menció especial. El *knockdown* de CHIP/STUB1 en Jurkat resulta en una disminució de l'activació de NF-κB després de l'estimulació a través del TCR/CD3 degut a la ubiquitinació de CARMA1 <sup>274</sup>, suggerint un rol en la regulació de l'activació del limfòcit T. A més a més, després de l'activació a través del TCR/CD3, CHIP/STUB1 promou la ubiquitinació i posterior degradació de Foxp3 <sup>275</sup> en concert amb Cbl-b <sup>276</sup>. En cardiomiòcits s'ha descrit una interacció directa entre ERK5 i CHIP/STUB1 essencial per a l'activació de la E3 ubiquitin-lligasa, la qual és regulada negativament per la fosforilació en la serina 496 per part de p90RSK <sup>277</sup>. Si l'activació del limfòcit T a través del complex TCR/CD3 promou l'activació d'ERK5-CHIP/STUB1 promovent així la ubiquitinació i degradació de TCRζ, és una hipòtesi que mereix una atenció especial.

Recentment s'ha proposat que existeixen dues vies responsables de la degradació de TCR $\zeta$  <sup>271</sup>. Aquestes són la via dependent de SLAP/c-Cbl <sup>278</sup>, la qual promou la degradació del TCR $\zeta$  que ha estat recentment internalitzat des de la superfície cel·lular, i la via dependent de LAPTM5 <sup>271,272</sup>, la qual promou la degradació del TCR $\zeta$  intracel·lular abans del seu assemblatge en el Golgi amb la resta del complex TCR $\alpha\beta$ CD3 $\epsilon\gamma$ CD3 $\delta$  <sup>279</sup>. En aquesta tesi mostrem que els timòcits DP del ratolí ERK5<sup>-/-</sup> presenten un fenotip similar observat al ratolí LAPTM5<sup>-/-</sup> <sup>272</sup> però menys intens que l'observat en els ratolins SLAP<sup>-/-</sup> o c-Cbl<sup>-/-</sup> <sup>278</sup>. D'altra banda, la inhibició farmacològica d'ERK5 usant BIX02188 en limfòcits T humans primaris mostra que aquesta MAPK es troba involucrada en la ubiquitinació i posterior degradació del TCR $\zeta$  recent internalitzat, suggerint que ERK5 podria estar involucrat en les dues vies de degradació. Per tal de revelar la relació entre ERK5, SLAP, c-Cbl i LAPTM5 en la regulació del tràfic i degradació de TCR $\zeta$  es requeriran futurs estudis.

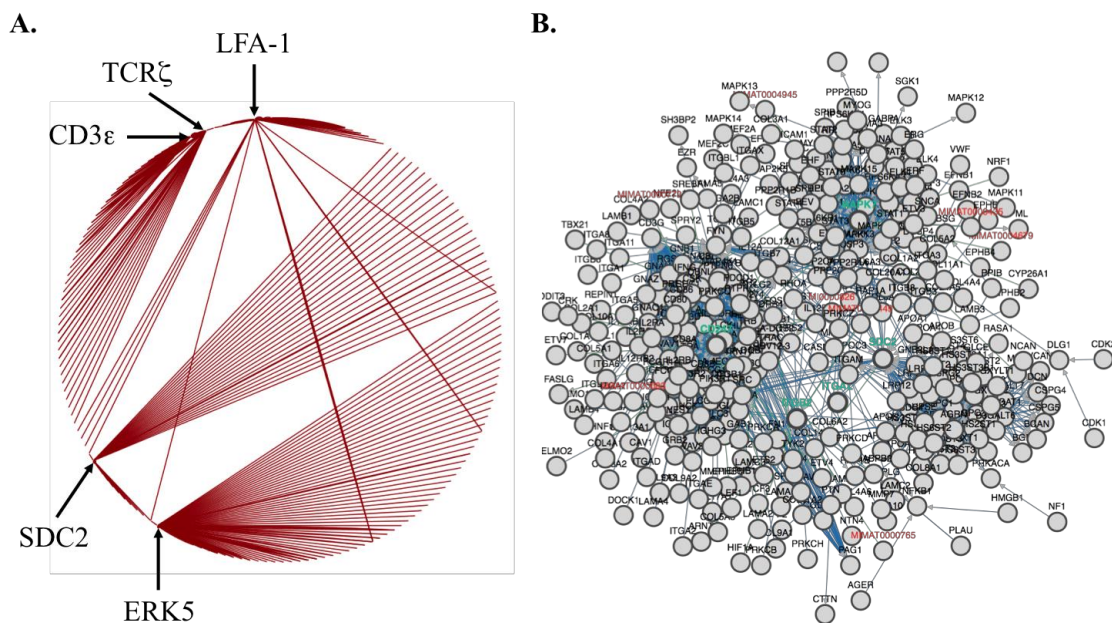
Múltiples evidències descrites al llarg d'aquesta tesi i en altres estudis indiquen un rol d'ERK5 en els limfòcits T. Malgrat això, l'estudi de *knock-outs* condicionals per *Erk5* en el llinatge limfoide T indica que ERK5 no és essencial pel desenvolupament T en el tim i el manteniment dels limfòcits T en la perifèria (referències <sup>53,58</sup> i resultats presentats en aquesta tesi). Actualment, en la base de dades *Ensembl* hi ha descrits 14 *splice variants* per *Erk5* de ratolí dels quals 4 codifiquen per a proteïna. Cal destacar que tots són eliminats en el *knock-out* descrit en aquest estudi ja que s'ha eliminat l'exó 4 d'*Erk5*, present en tots els *splice variants* descrits. En canvi, en humans es coneixen 18 *splice variants* per *Erk5* dels quals 8 codifiquen per a proteïna. En aquesta tesi s'ha usat un *shRNA* contra la seqüència codificada per l'exó 2 d'*Erk5* humà que ha permès el *knock-down* de 6 de les 8 isoformes d'ERK5, però 2 isoformes truncades de la proteïna poden estar presents i el rati d'enriquiment d'aquestes respecte les isoformes més comuns es pot haver vist afectat. L'estudi de les funcions de les diferents isoformes existents d'ERK5 en la regulació de l'expressió en membrana del complex TCR/CD3 permetria conèixer en més detall quin és el rol d'aquesta proteïna en aquest procés.

Els resultats d'aquesta tesi suggereixen un rol d'ERK5 en el desenvolupament del limfòcits T reguladors. El ratolí ERK5<sup>-/-</sup> presenta un increment en el percentatge de timòcits SP CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>, un percentatge normal de timòcits SP CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> o tT<sub>regs</sub> i un percentatge reduït de limfòcits T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> en la melsa. El desenvolupament dels tT<sub>regs</sub> presenta dos passos <sup>280,281</sup>: en el primer estadi s'expressa CD25, la subunitat d'elevada afinitat del *Interleukin-2 Receptor* (IL2R) i sent així timòcits SP CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>, i en el segon estadi, s'indueix *Foxp3*, sent així timòcits SP CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>. El primer estadi és dependent de la senyalització a través del TCR/CD3, en canvi, el segon estadi és independent de la senyalització a través del TCR/CD3 però dependent de la senyalització a través del IL2R <sup>280,281</sup>. L'increment en membrana del TCR/CD3 en els timòcits DP del ratolí ERK5<sup>-/-</sup> podria ser el causant de l'increment en el percentatge observat en la població de timòcits SP CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> del tim d'aquest ratolí. La E3 ubiquitin-lligasa CHIP/STUB1 promou la ubiquitinació i posterior degradació de Foxp3 <sup>275</sup>, un procés que podria estar regulat per ERK5 ja que s'ha descrit una associació directa d'ERK5 amb CHIP/STUB1 que promou la activació de la E3 ubiquitin-lligasa per part de la MAPK <sup>277</sup>. En contra de l'esperat, en el ratolí ERK5<sup>-/-</sup> no s'observa un increment en el percentatge de timòcits SP CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>. Tanmateix, en el ratolí SLAP<sup>-/-</sup> es pot observar un increment de les tT<sub>regs</sub> <sup>282</sup>, suggerint un rol de les vies que regulen la degradació de TCR $\zeta$  en el desenvolupament dels limfòcits T reguladors.

### 3. Funció de SDC2 i ERK5 en la regulació de TCR $\zeta$ i LFA-1

Els resultats presentats en aquesta tesi mostren que la sobre-expressió de SDC2 en Jurkat promou la degradació de TCR $\zeta$  i que el *knock-down* d'ERK5 en Jurkat, la inhibició farmacològica de la seva activació per MEK5 durant l'estimulació amb anti-CD3 $\epsilon$  en limfòcits T CD4<sup>+</sup> humans primaris i el *knock-out* d'*Erk5* en timòcits DP de ratolí presenten un augment en l'expressió total de TCR $\zeta$ . El *knock-down* d'ERK5 en cèl·lules Jurkat en les que s'ha sobre-expressat SDC2 permet revertir parcialment la inhibició de l'expressió del mRNA d'IL-2 després de l'activació d'aquestes cèl·lules amb anti-CD3 $\epsilon$ . Aquests últims són resultats previs del laboratori presentats en la tesi doctoral de la Dra. Teixé i suggereixen una possible relació entre SDC2 i ERK5 durant l'activació dels limfòcits T, per tant, és temptador especular que SDC2 podria regular la degradació de TCR $\zeta$  a través de l'activació d'ERK5. D'altra banda, la sobre-expressió de SDC2 en Jurkat promou la reducció de l'expressió en membrana de LFA-1, però LFA-1 no varia en analitzar el *knock-down* d'ERK5 en Jurkat. A més a més, la sobre-expressió de SDC2 en Jurkat bloqueja LFA-1 en un estat de baixa afinitat i aquest és un fet que tampoc és observat en el *knock-down* d'ERK5 en Jurkat (dades no mostrades). En conjunt, aquestes dades suggereixen que ERK5 no es veu implicat en la regulació de LFA-1 per part de SDC2.

Un avantatge de l'anàlisi de les interaccions moleculars, o interactoma, de diferents proteïnes és que permet conèixer si dues proteïnes comparteixen interaccions moleculars, permetent predir així una relació directa entre elles (Figura D1).



**Figura D1.** Interactoma de SDC2, ERK5, CD3 $\epsilon$ , TCR $\zeta$  i LFA-1 (CD11a i CD18) humans. **A.** Interaccions directes de SDC2, ERK5, CD3 $\epsilon$ , TCR $\zeta$  i LFA-1 (CD11a i CD18) analitzades usant el software Cytoscape 3.3.0. Cada línia representa una interacció proteïna-proteïna. La llista d'interaccions es pot obtenir usant la versió 3.4.134 de la base de dades BioGRID ([www.thebiogrid.org](http://www.thebiogrid.org)). **B.** Interactoma d'interaccions directes i indirectes de SDC2, ERK5, CD3 $\epsilon$ , TCR $\zeta$  i LFA-1 (CD11a i CD18) analitzades usant *Pathway Commons* ([www.pathwaycommons.org](http://www.pathwaycommons.org)).

En la última versió de la base de dades BioGRID, la 3.4.134, SDC2 presenta 35 interaccions directes, ERK5 presenta 64 interaccions directes, CD3 $\epsilon$  presenta 26 interaccions directes, TCR $\zeta$  presenta 28 interaccions directes i LFA-1 (CD11a i CD18) presenta 30 interaccions directes (Figura D1.A). Tal i com és d'esperar ja que formen part del complex TCR/CD3, CD3 $\epsilon$  i TCR $\zeta$  interaccionen entre elles i presenten 7 interaccions en comú, però no presenten cap interacció en comú amb SDC2 i ERK5, suggerint que la regulació de TCR $\zeta$  per part d'aquestes molècules és indirecte. Entre SDC2 i LFA-1 observem 3 interaccions en comú, PRKCA, PRKCB i PRKCG. Malgrat això, aquestes diferents isoformes de la PKC interaccionen per a la fosforilació i activació tant de SDC2<sup>283</sup> com de LFA-1<sup>284</sup>. El mateix passa entre SDC2 i ERK5, pel quals observem 1 única interacció en comú, PRKCA. En el cas d'ERK5 i LFA-1 observem 3 interaccions en comú, PRKCA, YWHAB i YWHAZ. Les dues últimes són 14-3-3  $\beta/\alpha$  i 14-3-3  $\zeta/\delta$ , respectivament, proteïnes adaptadores involucrades en la regulació de la senyalització cel·lular. En aquesta tesi no hem observat canvis en LFA-1 per acció d'ERK5, suggerint que potser LFA-1 activa ERK5 de la mateixa manera que activa altres molècules de la via de les MAPK per *outside-in signalling*. En resum, aquestes dades suggereixen que entre SDC2, ERK5, CD3 $\epsilon$ , TCR $\zeta$  i LFA-1 (CD11a i CD18) no existeix cap interacció directa que porti a pensar en la formació d'un complex de regulació, per tant, les diverses observacions descrites en aquest treball només es podrien dur a terme de manera indirecta a través d'altres proteïnes.

El conjunt d'interaccions directes i indirectes de SDC2, ERK5, CD3 $\epsilon$ , TCR $\zeta$  i LFA-1 (CD11a i CD18) resulta en 391 proteïnes amb 2088 interaccions entre elles (Figura D1.B). Cal destacar que només hi ha un solapament parcial entre els interactomes dels representats dels SDCs, MAPKs, complex TCR/CD3 i integrines, suggerint que aquestes molècules, en efecte, no es troben físicament associades i posant en evidència que exerceixen diferents funcions. D'altra banda, s'observa una gran connectivitat entre els diferents grups que no és sorprenent ja que la via dels SDCs coopera amb les integrines per regular l'adhesió cel·lular, la via del complex TCR/CD3 regula l'activació de les MAPKs i el complex TCR/CD3 juntament amb LFA-1 regula la formació de la SI i l'activació del limfòcit T. Aquesta connectivitat evidencia que SDC2 podria regular el complex TCR/CD3 i LFA-1 i que ERK5 podria regular el complex TCR/CD3, tal i com s'ha demostrat usant aproximacions experimentals *in vitro* en aquesta tesi.

CONCLUSIONS

---



Els resultats obtinguts en aquesta tesi han permès concloure el següent:

- La sobre-expressió de SDC2 en Jurkat redueix la capacitat d'adhesió *in vitro* a cèl·lula endotelial i limfòcit B.
- La sobre-expressió de SDC2 en Jurkat redueix l'expressió de la integrina LFA-1 en la membrana citoplasmàtica, però no redueix l'expressió d'altres molècules d'adhesió.
- La sobre-expressió de SDC2 en Jurkat bloqueja la integrina LFA-1 en una conformació de baixa afinitat.
- El domini d'unió a PDZ i els residus 179, 187, 188 i 191 de la regió citoplasmàtica SDC2 exerceixen un efecte inhibidor en l'adquisició d'una conformació d'elevada afinitat per part de la integrina LFA-1.
  
- La sobre-expressió de SDC2 en Jurkat redueix la capacitat d'activar-se després de l'estimulació *in vitro* amb anti-CD3 $\epsilon$ .
- La sobre-expressió de SDC2 en Jurkat redueix l'expressió del complex TCR/CD3, CD4 i Tfr en la membrana citoplasmàtica, però no redueix l'expressió d'altres molècules d'adhesió que s'endociten per vies independents de clatrina.
- La sobre-expressió de SDC2 en Jurkat redueix l'expressió de la cadena TCR $\zeta$  del complex TCR/CD3.
  
- ERK5 regula l'expressió del complex TCR/CD3 a la membrana citoplasmàtica.
- El *knock-down* d'ERK5 en Jurkat incrementa l'expressió de la cadena TCR $\zeta$  del complex TCR/CD3.
- El *knock-down* d'ERK5 en Jurkat redueix la recuperació de l'expressió del complex TCR/CD3 a la membrana citoplasmàtica després de l'activació *in vitro* amb anti-CD3 $\epsilon$ .
- La inhibició farmacològica en limfòcits T CD4<sup>+</sup> primaris de l'activitat catalítica de MEK5 i la fosforilació del domini quinasa d'ERK5 per part de BIX02188 redueix la ubiquitinació de TCR $\zeta$ , incrementa l'expressió de la cadena TCR $\zeta$  i redueix la capacitat de downregulació del complex TCR/CD3 després de l'activació *in vitro* amb anti-CD3 $\epsilon$ .
- La inhibició farmacològica en limfòcits T CD4<sup>+</sup> primaris de l'auto-fosforilació d'ERK5 en el domini C-terminal per part de XMD8-92 redueix la recuperació de l'expressió del complex TCR/CD3 a la membrana citoplasmàtica després de l'activació *in vitro* amb anti-CD3 $\epsilon$ .
- El *knock-out* condicional d'*Erk5* en el sistema hematopoètic de ratolí no altera el desenvolupament del llinatge T  $\alpha\beta$ .
- El *knock-out* d'*Erk5* en timòcits DP incrementa l'expressió de la cadena TCR $\zeta$  del complex TCR/CD3.





## BIBLIOGRAFIA

---



1. Smith-Garvin, J. E., Koretzky, G. & Jordan, M. S. T cell activation. *Annu. Rev. Immunol.* **27**, 591–619 (2009).
2. Germain, R. N. T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 309–22 (2002).
3. Masopust, D. & Schenkel, J. M. The integration of T cell migration, differentiation and function. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 309–20 (2013).
4. Fooksman, D. R. *et al.* Functional anatomy of T cell activation and synapse formation. *Annu. Rev. Immunol.* **28**, 79–105 (2010).
5. Irvine, D. J., Purbhoo, M., Krogsgaard, M. & Davis, M. M. Direct observation of ligand recognition by T cells. *Nature* **419**, 845–849 (2002).
6. Grakoui, A. *et al.* The immunological synapse: A molecular machine controlling T cell activation. *Science*. **285**, 221–227 (1999).
7. Monks, C. R., Freiberg, B. A., Kupfer, H., Sciaky, N. & Kupfer, A. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature*. **395**, 82–6 (1998).
8. Dustin, M. L. The Immunological Synapse. *Cancer Immunol. Res.* **2**, 1023–33 (2014).
9. Yu, Y., Smoligovets, A. & Groves, J. T. Modulation of T cell signaling by the actin cytoskeleton. *J. Cell Sci.* **126**, 1049–58 (2013).
10. Arechaga, I. *et al.* Structural characterization of the TCR complex by electron microscopy. *Int. Immunol.* **22**, 897–903 (2010).
11. Call, M. E. & Wucherpfennig, K. W. Common themes in the assembly and architecture of activating immune receptors. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 841–50 (2007).
12. Rothlein, R., Marlin, D. & Springer, T. A. A human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1. *J. Immunol.* **137**, 1270–74 (1986).
13. Fougerolles, A. R. De & Springer, T. A. Intercellular adhesion molecule 3 , a third adhesion counter-receptor for lymphocyte function-associated molecule 1 on resting lymphocytes. *J. Exp. Med.* **175**, 185-90 (1992).
14. Latour, S. *et al.* Binding of SAP SH2 domain to FynT SH3 domain reveals a novel mechanism of receptor signalling in immune regulation. *Nat. Cell Biol.* **5**, 149–54 (2003).
15. Kong, K.-F. *et al.* 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**, 1105–12 (2011).
16. Tseng, S.-Y., Waite, J. C., Liu, M., Vardhana, S. & Dustin, M. L. T cell-dendritic cell immunological synapses contain TCR-dependent CD28-CD80 clusters that recruit protein kinase C . *J. Immunol.* **181**, 4852–4863 (2008).
17. Inaba, K. *et al.* The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vitro. *J. Exp. Med.* **180**, 1849-60 (1994).
18. Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. & Janeway, C. A. Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. **388**, 6–9 (1997).
19. Xu, H. *et al.* Follicular T-helper cell recruitment governed by bystander B cells and ICOS-driven motility. *Nature*. **496**, 523–7 (2013).
20. Pentcheva-Hoang, T., Egen, J. G., Wojnoonski, K. & Allison, J. P. B7-1 and B7-2 selectively recruit CTLA-4 and CD28 to the immunological synapse. *Immunity* **21**, 401–13 (2004).
21. Egen, J. G. & Allison, J. P. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 accumulation in the immunological synapse is regulated by TCR signal strength. *Immunity*. **16**, 23–35 (2002).
22. Pentcheva-Hoang, T., Chen, L., Pardoll, D. M. & Allison, J. P. Programmed death-1 concentration at the immunological synapse is determined by ligand affinity and availability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 17765–70 (2007).
23. Yokosuka, T. *et al.* Programmed cell death 1 forms negative costimulatory microclusters that directly inhibit T cell receptor signaling by recruiting phosphatase SHP2. *J. Exp. Med.* **209**, 1201–17 (2012).
24. Shimaoka, M. *et al.* AL-57, a ligand-mimetic antibody to integrin LFA-1, reveals chemokine-induced affinity up-regulation in lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 13991–6 (2006).
25. Bromley, S. K. & Dustin, M. L. Stimulation of naïve T-cell adhesion and immunological synapse formation by chemokine-dependent and -independent mechanisms. *Immunology*. **106**, 289-98 (2002).
26. Lillemeier, B. F. *et al.* TCR and Lat are expressed on separate protein islands on T cell membranes and concatenate during activation. *Nat. Immunol.* **11**, 90–6 (2010).
27. Crites, T. J. *et al.* TCR Microclusters pre-exist and contain molecules necessary for TCR signal transduction. *J. Immunol.* **193**, 56–67 (2014).
28. Varma, R., Campi, G., Yokosuka, T., Saito, T. & Dustin, M. L. T cell receptor-proximal signals are sustained in peripheral microclusters and terminated in the central supramolecular activation cluster. *Immunity* **25**, 117–27 (2006).
29. Kaizuka, Y., Douglass, A. D., Varma, R., Dustin, M. L. & Vale, R. D. Mechanisms for segregating T cell receptor and adhesion molecules during immunological synapse formation in Jurkat T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 20296–301 (2007).
30. Yokosuka, T. *et al.* Spatiotemporal regulation of T cell costimulation by TCR-CD28 microclusters and protein kinase C theta translocation. *Immunity* **29**, 589–601 (2008).
31. Choudhuri, K. *et al.* Polarized release of T-cell-receptor-enriched microvesicles at the immunological synapse. *Nature*. **507**, 118-23 (2014).

32. van der Merwe, P. A. & Dushek, O. Mechanisms for T cell receptor triggering. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 47–55 (2011).
33. Zhang, W., Sloan-Lancaster, J., Kitchen, J., Tribble, R. P. & Samelson, L. E. LAT: The ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. *Cell.* **92**, 83–92 (1998).
34. Wardenburg, J. B. *et al.* Phosphorylation of SLP-76 by the ZAP-70 Protein-tyrosine Kinase Is Required for T-cell Receptor Function. *J. Biol. Chem.* **271**, 19641–44 (1996).
35. Sommers, C. L., Samelson, L. E. & Love, P. E. LAT: a T lymphocyte adapter protein that couples the antigen receptor to downstream signaling pathways. *Bioessays.* **26**, 61–7 (2004).
36. Liu, S. K., Fang, N., Koretzky, G. A. & McGlade, C. J. The hematopoietic-specific adaptor protein Gads functions in T-cell signaling via interactions with the SLP-76 and LAT adaptors. *Curr. Biol.* **9**, 67–75 (1999).
37. Koretzky, G. A., Abtahian, F. & Silverman, M. A. SLP76 and SLP65: complex regulation of signalling in lymphocytes and beyond. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 67–78 (2006).
38. Oh-hora, M. & Rao, A. Calcium signaling in lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol.* **20**, 250–8 (2008).
39. Vallabhapurapu, S. & Karin, M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* **27**, 693–733 (2009).
40. Roose, J. P., Mollenauer, M., Gupta, V. A., Stone, J. & Weiss, A. A diacylglycerol-protein kinase C-RasGRP1 pathway directs Ras activation upon antigen receptor stimulation of T cells. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 4426–41 (2005).
41. Roose, J. P., Mollenauer, M., Ho, M., Kurosaki, T. & Weiss, A. Unusual interplay of two types of Ras activators, RasGRP and SOS, establishes sensitive and robust Ras activation in lymphocytes. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 2732–45 (2007).
42. Kortum, R. L., Rouquette-Jazdanian, A. K. & Samelson, L. E. Ras and extracellular signal-regulated kinase signaling in thymocytes and T cells. *Trends Immunol.* **34**, 259–68 (2013).
43. Nithianandarajah-Jones, G. N., Wilms, B., Goldring, C. E. P., Müller, J. & Cross, M. J. ERK5: Structure, regulation and function. *Cell. Signal.* **24**, 2187–96 (2012).
44. Gaochao, Z., Bao, Z. Q. & Dixon, J. E. Components of a new human protein kinase signal transduction pathway. *J. Biol. Chem.* **270**, 12665–9 (1995).
45. Yan, C., Luo, H., Lee, J. D., Abe, J. I. & Berk, B. C. Molecular cloning of mouse ERK5/BMK1 splice variants and characterization of ERK5 functional domains. *J. Biol. Chem.* **276**, 10870–8 (2001).
46. Tanoue, T. & Nishida, E. Docking interactions in the mitogen-activated protein kinase cascades. *Pharmacol. Ther.* **93**, 193–202 (2002).
47. Kasler, H. G., Victoria, J., Duramad, O. & Winoto, A. ERK5 is a novel type of mitogen-activated protein kinase containing a transcriptional activation domain. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 8382–9 (2000).
48. Buschbeck, M. & Ullrich, A. The unique C-terminal tail of the mitogen-activated protein kinase ERK5 regulates its activation and nuclear shuttling. *J. Biol. Chem.* **280**, 2659–67 (2005).
49. Kondoh, K., Terasawa, K., Morimoto, H. & Nishida, E. Regulation of nuclear translocation of extracellular signal-regulated kinase 5 by active nuclear import and export mechanisms. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 1679–90 (2006).
50. Garaude, J., Kaminski, S., Cherni, S., Hipskind, R. A. & Villalba, M. The role of ERK5 in T-cell signalling. *Scand. J. Immunol.* **62**, 515–20 (2005).
51. Hehner, S. P. Tyrosine-phosphorylated Vav1 as a point of integration for T-cell receptor- and CD28-mediated activation of JNK, p38, and Interleukin-2 transcription. *J. Biol. Chem.* **275**, 18160–71 (2000).
52. Sohn, S. J., Li, D., Lee, L. K. & Winoto, A. Transcriptional regulation of tissue-specific genes by the ERK5 mitogen-activated protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 8553–66 (2005).
53. Ananieva, O. *et al.* ERK5 regulation in naïve T-cell activation and survival. *Eur. J. Immunol.* **38**, 2534–47 (2008).
54. Sohn, S. J., Lewis, G. M. & Winoto, A. Non-redundant function of the MEK5-ERK5 pathway in thymocyte apoptosis. *EMBO J.* **27**, 1896–906 (2008).
55. Enzler, T. *et al.* MEKK1 binds HECT E3 ligase Itch by its amino-terminal RING motif to regulate Th2 cytokine gene expression. *J. Immunol.* **183**, 3831–8 (2009).
56. Mazzucchelli, R. & Durum, S. K. Interleukin-7 receptor expression: intelligent design. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 144–54 (2007).
57. Carlson, C. M. *et al.* Kruppel-like factor 2 regulates thymocyte and T-cell migration. *Nature* **442**, 299–302 (2006).
58. Weinreich, M. A., Jameson, S. C. & Hogquist, K. A. Postselection thymocyte maturation and emigration are independent of IL-7 and ERK5. *J. Immunol.* **186**, 1343–7 (2011).
59. Kamakura, S., Moriguchi, T. & Nishida, E. Activation of the Protein Kinase ERK5/BMK1 by Receptor Tyrosine Kinases: Identification and characterization of a signaling pathway to the nucleus. *J. Biol. Chem.* **274**, 26563–71 (1999).
60. Tatake, R. J. *et al.* Identification of pharmacological inhibitors of the MEK5/ERK5 pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **377**, 120–5 (2008).
61. Yang, Q. & Lee, J.-D. Targeting the BMK1 MAP kinase pathway in cancer therapy. *Clin. Cancer Res.* **17**, 3527–32 (2011).
62. Yang, Q. *et al.* Pharmacological inhibition of BMK1 suppresses tumor growth through promyelocytic leukemia protein. *Cancer Cell.* **18**, 258–67 (2010).
63. Viola, A. & Lanzavecchia, A. T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds.

- Science*. **273**, 104–6 (1996).
64. Schrum, A. G., Turka, L. A. & Palmer, E. Surface T-cell antigen receptor expression and availability for long-term antigenic signaling. *Immunol. Rev.* **196**, 7–24 (2003).
  65. Naramura, M. *et al.* c-Cbl and Cbl-b regulate T cell responsiveness by promoting ligand-induced TCR down-modulation. *Nat. Immunol.* **3**, 1192–9 (2002).
  66. Valitutti, S., Müller, S., Salio, M. & Lanzavecchia, A. Degradation of T cell receptor (TCR)–CD3 complexes after antigenic stimulation. *J. Exp. Med.* **185**, 1859–64 (1997).
  67. Liu, H., Rhodes, M., Wiest, D. L. & Vignali, D. A. On the dynamics of TCR:CD3 complex cell surface expression and downmodulation. *Immunity* **13**, 665–675 (2000).
  68. von Essen, M. *et al.* Constitutive and ligand-induced TCR degradation. *J. Immunol.* **173**, 384–93 (2004).
  69. Dietrich, J., Hou, X., Wegener, A. M. & Geisler, C. CD3 gamma contains a phosphoserine-dependent dileucine motif involved in down-regulation of the T cell receptor. *EMBO J.* **13**, 2156–66 (1994).
  70. Monjas, A., Alcover, A. & Alarcón, B. Engaged and bystander T cell receptors are down-modulated by different endocytotic pathways. *J. Biol. Chem.* **279**, 55376–55384 (2004).
  71. Robins, H. S. *et al.* Comprehensive assessment of T-cell receptor  $\beta$ -chain diversity in  $\alpha/\beta$  T cells. *Blood* **114**, 4099–107 (2010).
  72. Wilson, A., MacDonald, H. R. & Radtke, F. Notch 1-deficient common lymphoid precursors adopt a B cell fate in the thymus. *J. Exp. Med.* **194**, 1003–12 (2001).
  73. Michie, A. *et al.* Clonal characterization of a bipotent T cell and NK cell progenitor in the mouse fetal thymus. *J. Immunol.* **164**, 1730–3 (2000).
  74. Godfrey, D. I., Kennedy, J., Suda, T. & Zlotnik, A. A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8- triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. *J. Immunol.* **150**, 4244–52 (1993).
  75. Koch, U. & Radtke, F. Mechanisms of T cell development and transformation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **27**, 539–562 (2011).
  76. Zhu, J., Yamane, H., Paul, W. E. & J, Z. J. Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annu. Rev. Immunol.* **28**, 445–489 (2010).
  77. Pipkin, M. E. & Rao, A. SnapShot: Effector and Memory T Cell Differentiation. *Cell* **138**, 20–21 (2009).
  78. Gowans, J. L. The recirculation of lymphocytes from blood to lymph in the rat. *J. Physiol.* **146**, 54–69 (1959).
  79. Mandl, J. N. *et al.* Quantification of lymph node transit times reveals differences in antigen surveillance strategies of naive CD4+ and CD8+ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 18036–41 (2012).
  80. Rosen, S. D. Ligands for L-selectin: homing, inflammation, and beyond. *Annu. Rev. Immunol.* **22**, 129–56 (2004).
  81. Bao, X. *et al.* Endothelial heparan sulfate controls chemokine presentation in recruitment of lymphocytes and dendritic cells to lymph nodes. *Immunity* **33**, 817–29 (2010).
  82. Kaiser, A., Donnadieu, E., Abastado, J.-P., Trautmann, A. & Nardin, A. CC chemokine ligand 19 secreted by mature dendritic cells increases naive T cell scanning behavior and their response to rare cognate antigen. *J. Immunol.* **175**, 2349–56 (2005).
  83. Lo, C. G., Xu, Y., Proia, R. L. & Cyster, J. G. Cyclical modulation of sphingosine-1-phosphate receptor 1 surface expression during lymphocyte recirculation and relationship to lymphoid organ transit. *J. Exp. Med.* **201**, 291–301 (2005).
  84. Kinzler, K. W. *et al.* GRK2-dependent S1PR1 desensitization. *Science*. **333**, 1898–903 (2011).
  85. Zidar, D. A., Violin, J. D., Whalen, E. J. & Lefkowitz, R. J. Selective engagement of G protein coupled receptor kinases (GRKs) encodes distinct functions of biased ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 9649–54 (2009).
  86. von Andrian, U. H. & Mempel, T. R. Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 867–78 (2003).
  87. Shioh, L. R. *et al.* CD69 acts downstream of interferon- $\alpha/\beta$  to inhibit S1P1 and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nature* **440**, 540–4 (2006).
  88. Hickman, H. D. *et al.* Chemokines control naive CD8+ T cell selection of optimal lymph node antigen presenting cells. *J. Exp. Med.* **208**, 2511–24 (2011).
  89. Guarda, G. *et al.* L-selectin-negative CCR7- effector and memory CD8+ T cells enter reactive lymph nodes and kill dendritic cells. *Nat. Immunol.* **8**, 743–52 (2007).
  90. Groom, J. R. *et al.* CXCR3 chemokine receptor-ligand interactions in the lymph node optimize CD4+ T helper 1 cell differentiation. *Immunity* **37**, 1091–103 (2012).
  91. Johansson-Lindbom, B. & Agace, W. W. Generation of gut-homing T cells and their localization to the small intestinal mucosa. *Immunol. Rev.* **215**, 226–42 (2007).
  92. Campbell, D. J. & Butcher, E. C. Rapid Acquisition of tissue-specific homing phenotypes by CD4+ T cells activated in cutaneous or mucosal lymphoid tissues. **195**, 135–142 (2002).
  93. Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M. I. & Nourshargh, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 678–89 (2007).
  94. McEver, R. P. & Cummings, R. D. Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *J. Clin. Invest.* **100**, 485–92 (1997).
  95. Hidalgo, A., Peired, A. J., Wild, M. K., Vestweber, D. & Frenette, P. S. Complete identification of E-Selectin ligands on neutrophils reveals distinct functions of PSGL-1, ESL-1, and CD44. *Immunity* **26**, 477–489 (2007).

96. Alon, R., Hammer, D. A. & Springer, T. A. Lifetime of the P-selectin-carbohydrate bond and its response to tensile force in hydrodynamic flow. *Nature* **374**, 539–542 (1995).
97. Lawrence, M. B., Kansas, G. S., Kunkel, E. J. & Ley, K. Threshold levels of fluid shear promote leukocyte adhesion through selectins (CD62L,P,E). *J. Cell Biol.* **136**, 717–27 (1997).
98. Campbell, J. J. *et al.* Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science* **279**, 381–84 (1998).
99. Harburger, D. S. & Calderwood, D. A. Integrin signalling at a glance. *J. Cell Sci.* **122**, 159–63 (2009).
100. Shimaoka, M. *et al.* Reversibly locking a protein fold in an active conformation with a disulfide bond: integrin alphaL I domains with high affinity and antagonist activity in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 6009–14 (2001).
101. Shamri, R. *et al.* Lymphocyte arrest requires instantaneous induction of an extended LFA-1 conformation mediated by endothelium-bound chemokines. *Nat. Immunol.* **6**, 497–506 (2005).
102. Dustin, M. L. & Springer, T. A. T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. *Nature* **342**, 189–92 (1989).
103. Kim, M., Carman, C. V. & Springer, T. A. Bidirectional transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins. *Science* **301**, 1720–25 (2003).
104. Kim, M., Carman, C. V., Yang, W., Salas, A. & Springer, T. A. The primacy of affinity over clustering in regulation of adhesiveness of the integrin {alpha}L{beta}2. *J. Cell Biol.* **167**, 1241–53 (2004).
105. Springer, T. A. & Dustin, M. L. Integrin inside-out signaling and the immunological synapse. *Curr. Opin. Cell Biol.* **24**, 107–15 (2012).
106. Hogg, N., Patzak, I. & Willenbrock, F. The insider's guide to leukocyte integrin signalling and function. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 416–26 (2011).
107. Masopust, D. & Picker, L. J. Hidden Memories: Frontline memory T cells and early pathogen interception. *J. Immunol.* **188**, 5811–7 (2012).
108. Jameson, S. C. & Masopust, D. Diversity in T cell memory: an embarrassment of riches. *Immunity* **31**, 859–71 (2009).
109. Rops, A. L. *et al.* Heparan sulfate proteoglycans in glomerular inflammation. *Kidney Int.* **65**, 768–85 (2004).
110. Iozzo, R. V. Basement membrane proteoglycans: from cellar to ceiling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 646–56 (2005).
111. Spring, J., Paine-Saunders, S. E., Hynes, R. O. & Bernfield, M. Drosophila syndecan: conservation of a cell-surface heparan sulfate proteoglycan. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 3334–8 (1994).
112. Couchman, J. R. Transmembrane signaling proteoglycans. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **26**, 89–114 (2010).
113. Carey, D. J. Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors. *Biochem. J.* **327**, 1–16 (1997).
114. Pap, T. & Bertrand, J. Syndecans in cartilage breakdown and synovial inflammation. *Nat. Rev. Rheumatol.* **9**, 43–55 (2013).
115. Alexopoulou, A. N., Multhaupt, H. B. & Couchman, J. R. Syndecans in wound healing, inflammation and vascular biology. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**, 505–28 (2007).
116. Zhang, L., David, G. & Esko, J. D. Repetitive Ser-Gly sequences enhance heparan sulfate assembly in proteoglycans. *J. Biol. Chem.* **270**, 27127–35 (1995).
117. Tkachenko, E., Rhodes, J. M. & Simons, M. Syndecans: new kids on the signaling block. *Circ. Res.* **96**, 488–500 (2005).
118. Esko, J. D. & Selleck, S. B. Order out of chaos: assembly of ligand binding sites in heparan sulfate. *Annu. Rev. Biochem.* **71**, 435–71 (2002).
119. Fitzgerald, M. L., Wang, Z., Park, P. W., Murphy, G. & Bernfield, M. Shedding of syndecan-1 and -4 ectodomains is regulated by multiple signaling pathways and mediated by a TIMP-3-sensitive metalloproteinase. *J. Cell Biol.* **148**, 811–24 (2000).
120. Choi, S. *et al.* The matrix metalloproteinase-7 regulates the extracellular shedding of syndecan-2 from colon cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **417**, 1260–4 (2012).
121. Dews, I. C. & Mackenzie, K. R. Transmembrane domains of the syndecan family of growth factor coreceptors display a hierarchy of homotypic and heterotypic interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 20782–7 (2007).
122. Choi, S. *et al.* Transmembrane domain-induced oligomerization is crucial for the functions of syndecan-2 and syndecan-4. *J. Biol. Chem.* **280**, 42573–9 (2005).
123. Maday, S. *et al.* A PDZ-binding motif controls basolateral targeting of syndecan-1 along the biosynthetic pathway in polarized epithelial cells. *Traffic* **9**, 1915–24 (2008).
124. Rapraeger, A. C. & Ott, V. L. Molecular interactions of the syndecan core proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 620–8 (1998).
125. Granés, F., Urena, J. M., Rocamora, N. & Vilaró, S. Ezrin links syndecan-2 to the cytoskeleton. *J. Cell Sci.* **113**, 1267–76 (2000).
126. Granés, F. *et al.* Identification of a novel Ezrin-binding site in syndecan-2 cytoplasmic domain. *FEBS Lett.* **547**, 212–216 (2003).
127. Kinnunen, T. *et al.* Cortactin-Src kinase signaling pathway is involved in N-syndecan-dependent neurite outgrowth. *J. Biol. Chem.* **273**, 10702–8 (1998).
128. Kramer, K. L., Barnette, J. E. & Yost, H. J. PKCgamma regulates syndecan-2 inside-out signaling during xenopus left-right development. *Cell* **111**, 981–90 (2002).
129. Choi, Y. *et al.* Syndecan-2 regulates cell migration in colon cancer cells through Tiam1-mediated Rac activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **391**, 921–5 (2010).

130. Shepherd, T. R. *et al.* The Tiam1 PDZ domain couples to Syndecan1 and promotes cell-matrix adhesion. *J. Mol. Biol.* **398**, 730–46 (2010).
131. Ethell, I. M., Hagihara, K., Miura, Y., Irie, F. & Yamaguchi, Y. Synbindin, a novel syndecan-2-binding protein in neuronal dendritic spines. *J. Cell Biol.* **151**, 53–68 (2000).
132. Gao, Y., Li, M., Chen, W. & Simons, M. Synectin, syndecan-4 cytoplasmic domain binding PDZ protein, inhibits cell migration. *J. Cell. Physiol.* **184**, 373–9 (2000).
133. Grootjans, J. J. *et al.* Syntenin, a PDZ protein that binds syndecan cytoplasmic domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 13683–8 (1997).
134. Zimmermann, P. *et al.* PIP(2)-PDZ domain binding controls the association of syntenin with the plasma membrane. *Mol. Cell* **9**, 1215–25 (2002).
135. Zimmermann, P. *et al.* Syndecan recycling [corrected] is controlled by syntenin-PIP2 interaction and Arf6. *Dev. Cell* **9**, 377–88 (2005).
136. Morgan, M. R., Humphries, M. J. & Bass, M. D. Synergistic control of cell adhesion by integrins and syndecans. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 957–69 (2007).
137. Roper, J. A., Williamson, R. C. & Bass, M. D. Syndecan and integrin interactomes: large complexes in small spaces. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **22**, 583–90 (2012).
138. Hynes, R. O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines in their roles as major adhesion receptors. *Cell* **110**, 673–687 (2002).
139. Hayashida, K., Stahl, P. D. & Park, P. W. Syndecan-1 ectodomain shedding is regulated by the small GTPase Rab5. *J. Biol. Chem.* **283**, 35435–44 (2008).
140. Wang, H., Leavitt, L., Ramaswamy, R. & Rapraeger, A. C. Interaction of syndecan and alpha6beta4 integrin cytoplasmic domains: regulation of ErbB2-mediated integrin activation. *J. Biol. Chem.* **285**, 13569–79 (2010).
141. Beauvais, D. M., Ell, B. J., McWhorter, A. R. & Rapraeger, A. C. Syndecan-1 regulates alphavbeta3 and alphavbeta5 integrin activation during angiogenesis and is blocked by synstatin, a novel peptide inhibitor. *J. Exp. Med.* **206**, 691–705 (2009).
142. Raftopoulou, M. & Hall, A. Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev. Biol.* **265**, 23–32 (2004).
143. Granés, F. *et al.* Syndecan-2 induces filopodia by active cdc42Hs. *Exp. Cell Res.* **248**, 439–56 (1999).
144. Danen, E. H. J. *et al.* Integrins control motile strategy through a Rho-cofilin pathway. *J. Cell Biol.* **169**, 515–26 (2005).
145. Tkachenko, E., Lutgens, E., Stan, R.-V. & Simons, M. Fibroblast growth factor 2 endocytosis in endothelial cells proceed via syndecan-4-dependent activation of Rac1 and a Cdc42-dependent macropinocytic pathway. *J. Cell Sci.* **117**, 3189–99 (2004).
146. Bolomini-Vittori, M. *et al.* Regulation of conformer-specific activation of the integrin LFA-1 by a chemokine-triggered Rho signaling module. *Nat. Immunol.* **10**, 185–194 (2009).
147. Ridley, A. J. *et al.* Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* **302**, 1704–9 (2003).
148. Huveneers, S., Truong, H., Fässler, R., Sonnenberg, A. & Danen, E. H. J. Binding of soluble fibronectin to integrin alpha5 beta1 - link to focal adhesion redistribution and contractile shape. *J. Cell Sci.* **121**, 2452–62 (2008).
149. Bass, M. D. *et al.* Syndecan-4-dependent Rac1 regulation determines directional migration in response to the extracellular matrix. *J. Cell Biol.* **177**, 527–38 (2007).
150. Roca-Cusachs, P., Gauthier, N. C., Del Rio, A. & Sheetz, M. P. Clustering of alpha(5)beta(1) integrins determines adhesion strength whereas alpha(v)beta(3) and talin enable mechanotransduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 16245–50 (2009).
151. Morgan, M. R. *et al.* Syndecan-4 phosphorylation is a control point for integrin recycling. *Dev. Cell* **24**, 472–85 (2013).
152. Parish, C. R. The role of heparan sulphate in inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 633–43 (2006).
153. Götte, M. Syndecans in inflammation. *FASEB J.* **17**, 575–91 (2003).
154. Sanderson, R. D. & Børset, M. Syndecan-1 in B lymphoid malignancies. *Ann. Hematol.* **81**, 125–35 (2002).
155. Teixé, T. *et al.* Syndecan-2 and -4 expressed on activated primary human CD4+ lymphocytes can regulate T cell activation. *Mol. Immunol.* **45**, 2905–19 (2008).
156. Clasper, S. *et al.* Inducible expression of the cell surface heparan sulfate proteoglycan syndecan-2 (Fibroglycan) on human activated macrophages can regulate fibroblast growth factor action. *J. Biol. Chem.* **274**, 24113–23 (1999).
157. Saphire, A. C. S. *et al.* Syndecans serve as attachment receptors for human immunodeficiency virus type 1 on macrophages. *J. Virol.* **75**, 9187–200 (2001).
158. Koenig, A., Norgard-Sumnicht, K., Linhardt, R. & Varki, A. Differential interactions of heparin and heparan sulfate glycosaminoglycans with the selectins. Implications for the use of unfractionated and low molecular weight heparins as therapeutic agents. *J. Clin. Invest.* **101**, 877–89 (1998).
159. Wang, L., Fuster, M., Sriramaramo, P. & Esko, J. D. Endothelial heparan sulfate deficiency impairs L-selectin- and chemokine-mediated neutrophil trafficking during inflammatory responses. *Nat. Immunol.* **6**, 902–10 (2005).
160. Handel, T. M., Johnson, Z., Crown, S. E., Lau, E. K. & Proudfoot, A. E. Regulation of protein function by glycosaminoglycans as exemplified by chemokines. *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 385–410 (2005).
161. Sadir, R., Imberty, A., Baleux, F. & Lortat-Jacob, H. Heparan sulfate/heparin oligosaccharides protect stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)/CXCL12 against proteolysis induced by CD26/dipeptidyl peptidase IV. *J. Biol. Chem.* **279**, 43854–60 (2004).



162. Li, Q., Park, P. W., Wilson, C. L., Parks, W. C. & Louis, S. Matrilysin shedding of syndecan-1 regulates chemokine mobilization and transepithelial efflux of neutrophils in acute lung injury. *Cell* **111**, 635–46 (2002).
163. Middleton, J. *et al.* Transcytosis and surface presentation of IL-8 by venular endothelial cells. *Cell* **91**, 385–95 (1997).
164. Gingis-Velitski, S. *et al.* Heparanase uptake is mediated by cell membrane heparan sulfate proteoglycans. *J. Biol. Chem.* **279**, 44084–92 (2004).
165. Tsuboi, K. *et al.* Role of high endothelial venule-expressed heparan sulfate in chemokine presentation and lymphocyte homing. *J. Immunol.* **191**, 448–55 (2013).
166. Poon, I. K. H. *et al.* Mice deficient in heparanase exhibit impaired dendritic cell migration and reduced airway inflammation. *Eur. J. Immunol.* **44**, 1016–30 (2014).
167. Tanaka, Y. *et al.* Heparan sulfate proteoglycan on leukemic cells is primarily involved in integrin triggering and its mediated adhesion to endothelial cells. *J. Exp. Med.* **184**, 1987–97 (1996).
168. Ibrahim, J., Griffin, P., Coombe, D. R., Rider, C. C. & James, W. Cell-surface heparan sulfate facilitates human immunodeficiency virus Type 1 entry into some cell lines but not primary lymphocytes. *Virus Res.* **60**, 159–69 (1999).
169. Bobardt, M. D. *et al.* Syndecan captures, protects, and transmits HIV to T lymphocytes. *Immunity* **18**, 27–39 (2003).
170. Jones, K. S. *et al.* Heparan sulfate proteoglycans mediate attachment and entry of human T-cell leukemia virus type 1 virions into CD4 + T cells. *J. Virol.* **79**, 12692–702 (2005).
171. Pakula, R. *et al.* Syndecan-1/CD147 association is essential for cyclophilin B-induced activation of p44/42 mitogen-activated protein kinases and promotion of cell adhesion and chemotaxis. *Glycobiology* **17**, 492–503 (2007).
172. De Francesco, M. A., Baronio, M. & Poiesi, C. HIV-1 p17 matrix protein interacts with heparan sulfate side chain of CD44v3, syndecan-2, and syndecan-4 proteoglycans expressed on human activated CD4+ T cells affecting tumor necrosis factor alpha and interleukin 2 production. *J. Biol. Chem.* **286**, 19541–8 (2011).
173. Chung, J.-S., Dougherty, I., Cruz, P. D. & Ariizumi, K. Syndecan-4 mediates the coinhibitory function of DC-HIL on T cell activation. *J. Immunol.* **179**, 5778–84 (2007).
174. Chung, J.-S., Cruz, P. D. & Ariizumi, K. Inhibition of T-cell activation by syndecan-4 is mediated by CD148 through protein tyrosine phosphatase activity. *Eur. J. Immunol.* **41**, 1794–9 (2011).
175. Chung, J.-S. *et al.* Sézary syndrome cells overexpress syndecan-4 bearing distinct heparan sulfate moieties that suppress T-cell activation by binding DC-HIL and trapping TGF-beta on the cell surface. *Blood* **117**, 3382–90 (2011).
176. Chung, J.-S. *et al.* The DC-HIL ligand syndecan-4 is a negative regulator of T-cell allo-reactivity responsible for graft-versus-host disease. *Immunology* **138**, 173–82 (2013).
177. Chung, J.-S., Tamura, K., Akiyoshi, H., Cruz, P. D. & Ariizumi, K. The DC-HIL/syndecan-4 pathway regulates autoimmune responses through myeloid-derived suppressor cells. *J. Immunol.* **192**, 2576–84 (2014).
178. Abraham, R. T. & Weiss, A. Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signalling paradigm. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 301–8 (2004).
179. Essner, J. J., Chen, E. & Ekker, S. C. Syndecan-2. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **38**, 152–6 (2006).
180. Baietti, M. F. *et al.* Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nat. Cell Biol.* **14**, 677–85 (2012).
181. Chen, E., Hermanson, S. & Ekker, S. C. Syndecan-2 is essential for angiogenic sprouting during zebrafish development. *Blood* **103**, 1710–9 (2004).
182. David, G. *et al.* Spatial and temporal changes in the expression of fibroglycan (syndecan-2) during mouse embryonic development. *Development* **119**, 841–54 (1993).
183. Ethell, I. M. *et al.* EphB/syndecan-2 signaling in dendritic spine morphogenesis. *Neuron* **31**, 1001–13 (2001).
184. Chung, H., Lee, J., Jeong, D., Han, I.-O. & Oh, E.-S. Melanocortin 1 receptor regulates melanoma cell migration by controlling syndecan-2 expression. *J. Biol. Chem.* **287**, 19326–35 (2012).
185. Mytilinaiou, M. *et al.* Syndecan-2 is a key regulator of transforming growth factor beta 2/Smad2-mediated adhesion in fibrosarcoma cells. *IUBMB Life* **65**, 134–43 (2013).
186. Lim, H. C. & Couchman, J. R. Syndecan-2 regulation of morphology in breast carcinoma cells is dependent on RhoGTPases. *Biochim. Biophys. Acta* **1840**, 2482–90 (2014).
187. Sun, M. *et al.* RKIP and HMGA2 regulate breast tumor survival and metastasis through lysyl oxidase and syndecan-2. *Oncogene* **33**, 3528–37 (2014).
188. Kwon, M.-J. *et al.* The extracellular domain of syndecan-2 regulates the interaction of HCT116 human colon carcinoma cells with fibronectin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **431**, 415–20 (2013).
189. Oh, T. *et al.* Genome-wide identification and validation of a novel methylation biomarker, SDC2, for blood-based detection of colorectal cancer. *J. Mol. Diagn.* **15**, 498–507 (2013).
190. Vilaro, S., Reina, M., Ramirez, I. & Llobera, M. Intralipid administration induces a lipoprotein lipase-like activity in the livers of starved adult rats. **236**, 273–8 (1986).
191. Camps, L., Reina, M., Llobera, M., Vilaró, S. & Olivecrona, T. Lipoprotein lipase: cellular origin and functional distribution. *Am. J. Physiol.* **258**, 673–81 (1990).
192. Camps, L. *et al.* Lipoprotein lipase in lungs, spleen, and liver: synthesis and distribution. *J. Lipid Res.* **32**, 1877–88 (1991).

193. Busca, R. *et al.* Absence of N-glycosylation at asparagine-43 in human lipoprotein-lipase induces its accumulation in the rough endoplasmic-reticulum and alters this cellular compartment. *J. Lipid Res.* **36**, 939–51 (1995).
194. Buscà, R. *et al.* The mutant Asn291 → ser human lipoprotein lipase is associated with reduced catalytic activity and does not influence binding to heparin. *FEBS Lett.* **367**, 257–62 (1995).
195. Buscà, R. *et al.* The mutation gly142 → glu in human lipoprotein lipase produces a missorted protein that is diverted to lysosomes. *J. Biol. Chem.* **271**, 2139–46 (1996).
196. Fernandez-Borja, M. *et al.* Actin cytoskeleton of fibroblasts organizes surface proteoglycans that bind basic fibroblast growth factor and lipoprotein lipase. *Cell. Motil. Cytoskeleton* **30**, 89–107 (1995).
197. Martinho, R. G. *et al.* Ligand binding to heparan sulfate proteoglycans induces their aggregation and distribution along actin cytoskeleton. *Mol. Biol. Cell* **7**, 1771–88 (1996).
198. Villena, J., Berndt, C., Granes, F., Reina, M. & Vilaro, S. Syndecan-2 expression enhances adhesion and proliferation of stably transfected Swiss 3T3 cells. *Cell Biol. Int.* **27**, 1005–10 (2003).
199. Villena, J. *et al.* Syndecan-2 expression increases serum-withdrawal-induced apoptosis, mediated by re-distribution of Fas into lipid rafts, in stably transfected Swiss 3T3 cells. *Apoptosis* **11**, 2065–75 (2006).
200. Berndt, C., Casaroli-Marano, R. P., Vilaro, S. & Reina, M. Cloning and characterization of human syndecan-3. *J. Cell. Biochem.* **82**, 246–59 (2001).
201. Berndt, C. *et al.* Influence of cytoplasmic deletions on the filopodia-inducing effect of syndecan-3. *Cell Biol. Int.* **28**, 829–33 (2004).
202. Pagan, R. *et al.* Effects of growth and differentiation factors on the epithelial-mesenchymal transition in cultured neonatal rat hepatocytes. *J. Hepatol.* **31**, 895–904 (1999).
203. Casaroli-Marano, R. P., Pagan, R. & Vilaro, S. Epithelial-mesenchymal transition in proliferative vitreoretinopathy: intermediate filament protein expression in retinal pigment epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **40**, 2062–72 (1999).
204. Contreras, H. R. *et al.* Syndecan-2 expression in colorectal cancer-derived HT-29 M6 epithelial cells induces a migratory phenotype. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **286**, 742–51 (2001).
205. Castel, S. *et al.* Alpha v integrin antagonists induce the disassembly of focal contacts in melanoma cells. *Eur J Cell Biol* **79**, 502–12 (2000).
206. Montañez, E., Pagan, R., Reina, M. & Vilaró, S. Computerized analysis system for screening new angiogenic factors. *Microscope and analysis.* **92**, 11–12 (2002).
207. Noguer, O., Villena, J., Lorita, J., Vilaró, S. & Reina, M. Syndecan-2 downregulation impairs angiogenesis in human microvascular endothelial cells. *Exp. Cell Res.* **315**, 795–808 (2009).
208. Pribila, J. T., Quale, A. C., Mueller, K. L. & Shimizu, Y. Integrins and T cell-mediated immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **22**, 157–80 (2004).
209. Carey, D. J., Stahl, R. C., Cizmeci-Smith, G. & Asundi, V. K. Syndecan-1 expressed in Schwann cells causes morphological transformation and cytoskeletal reorganization and associates with actin during cell spreading. *J. Cell Biol.* **124**, 161–70 (1994).
210. Asundi, V. K., Erdman, R., Stahl, R. C. & Carey, D. J. Matrix metalloproteinase-dependent shedding of syndecan-3, a transmembrane heparan sulfate proteoglycan, in Schwann cells. *J. Neurosci. Res.* **73**, 593–602 (2003).
211. Lebakken, C. S. & Rapraeger, A. C. Syndecan-1 mediates cell spreading in transfected human lymphoblastoid (Raji) cells. *J. Cell Biol.* **132**, 1209–21 (1996).
212. Beauvais, D. M. & Rapraeger, A. C. Syndecan-1-mediated cell spreading requires signaling by  $\alpha v \beta 3$  integrins in human breast carcinoma cells. *Exp. Cell Res.* **286**, 219–32 (2003).
213. Majewska, E. *et al.* Role of tyrosine kinase enzymes in TNF-alpha and IL-1 induced expression of ICAM-1 and VCAM-1 on human umbilical vein endothelial cells. *Scand. J. Immunol.* **45**, 385–92 (1997).
214. Grakoui, A. *et al.* The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* **285**, 221–7 (1999).
215. Evans, R. *et al.* Integrins in immunity. *J. Cell Sci.* **122**, 215–25 (2009).
216. Lu, C., Shimaoka, M., Zang, Q., Takagi, J. & Springer, T. A. Locking in alternate conformations of the integrin  $\alpha L \beta 2$  I domain with disulfide bonds reveals functional relationships among integrin domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 2393–8 (2001).
217. Dransfield, I., Cabañas, C., Craig, A. & Hogg, N. Divalent cation regulation of the function of the leukocyte integrin LFA-1. *J. Cell Biol.* **116**, 219–26 (1992).
218. Zhang, Y. & Wang, H. Integrin signalling and function in immune cells. *Immunology* **135**, 268–75 (2012).
219. Cluzel, C. *et al.* The mechanisms and dynamics of  $(\alpha v) \beta 3$  integrin clustering in living cells. *J. Cell Biol.* **171**, 383–92 (2005).
220. Saltel, F. *et al.* New PI(4,5)P<sub>2</sub>- and membrane proximal integrin-binding motifs in the talin head control  $\beta 3$ -integrin clustering. *J. Cell Biol.* **187**, 715–31 (2009).
221. Simonson, W. T. N., Franco, S. J. & Huttenlocher, A. Talin1 regulates TCR-mediated LFA-1 function. *J. Immunol.* **177**, 7707–14 (2006).
222. Das, M., Subbayya Ithychanda, S., Qin, J. & Plow, E. F. Mechanisms of talin-dependent integrin signaling and crosstalk. *Biochim. Biophys. Acta* **1838**, 579–88 (2014).
223. Kwon, S. *et al.* Syndecan-4 promotes the retention of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in the plasma membrane. *FEBS Lett.* **583**, 2395–400 (2009).

224. Várnai, P. & Balla, T. Visualization of phosphoinositides that bind pleckstrin homology domains: calcium- and agonist-induced dynamic changes and relationship to myo-[3H]inositol-labeled phosphoinositide pools. *J. Cell Biol.* **143**, 501–10 (1998).
225. Balagopalan, L., Barr, V. A. & Samelson, L. E. Endocytic events in TCR signaling: focus on adapters in microclusters. *Immunol. Rev.* **232**, 84–98 (2009).
226. Batista, A., Millan, J., Mittelbrunn, M., Sanchez-Madrid, F. & Alonso, M. A. Recruitment of transferrin receptor to immunological synapse in response to TCR engagement. *J. Immunol.* **172**, 6709–14 (2004).
227. Santarlasci, V. *et al.* Rarity of human T helper 17 cells is due to retinoic acid orphan receptor-dependent mechanisms that limit their expansion. *Immunity* **36**, 201–14 (2012).
228. Friend, S. F., Deason-Towne, F., Peterson, L. K., Berger, A. J. & Dragone, L. L. Regulation of T cell receptor complex-mediated signaling by ubiquitin and ubiquitin-like modifications. *Am. J. Clin. Exp. Immunol.* **3**, 107–23 (2014).
229. Wang, H. *et al.* Tonic ubiquitylation controls T-cell receptor: CD3 complex expression during T-cell development. *EMBO J.* **29**, 1285–98 (2010).
230. Moran, A. E. *et al.* T cell receptor signal strength in Treg and iNKT cell development demonstrated by a novel fluorescent reporter mouse. *J. Exp. Med.* **208**, 1279–89 (2011).
231. Choi, S. *et al.* Syndecan-2 overexpression regulates adhesion and migration through cooperation with integrin alpha2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **384**, 231–5 (2009).
232. Whiteford, J. R., Xian, X., Chaussade, C., Vanhaesebroeck, B. & Ginsberg, M. H. Syndecan-2 is a novel ligand for the protein tyrosine phosphatase receptor CD148. *Mol. Biol. Cell* **22**, 3609–24 (2011).
233. Kwon, M.-J. *et al.* The extracellular domain of syndecan-2 regulates the interaction of HCT116 human colon carcinoma cells with fibronectin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **431**, 415–20 (2013).
234. Vicente, C. M., Ricci, R., Nader, H. B. & Toma, L. Syndecan-2 is upregulated in colorectal cancer cells through interactions with extracellular matrix produced by stromal fibroblasts. *BMC Cell Biol.* **14**, 25 (2013).
235. Götte, M. *et al.* Role of syndecan-1 in leukocyte-endothelial interactions in the ocular vasculature. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **43**, 1135–41 (2002).
236. Götte, M., Bernfield, M. & Jousseaume, A. M. Increased leukocyte-endothelial interactions in syndecan-1-deficient mice involve heparan sulfate-dependent and -independent steps. *Curr. Eye Res.* **30**, 417–22 (2005).
237. Dunzendorfer, S. Cell-surface heparan sulfate proteoglycan-mediated regulation of human neutrophil migration by the serpin antithrombin III. *Blood* **97**, 1079–85 (2001).
238. Kaneider, N. C. *et al.* Syndecan-4 mediates antithrombin-induced chemotaxis of human peripheral blood lymphocytes and monocytes. *J. Cell Sci.* **115**, 227–36 (2002).
239. Stewart, M. D. & Sanderson, R. D. Heparan Sulfate in the Nucleus and its Control of Cellular Functions. *Matrix Biol.* **35**, 56–9 (2014).
240. Zong, F. *et al.* Specific syndecan-1 domains regulate mesenchymal tumor cell adhesion, motility and migration. *PLoS One* **6**, e14816 (2011).
241. Stepp, M. A. Defects in keratinocyte activation during wound healing in the syndecan-1-deficient mouse. *J. Cell Sci.* **115**, 4517–31 (2002).
242. Bass, M. D. *et al.* A syndecan-4 hair trigger initiates wound healing through caveolin- and RhoG-regulated integrin endocytosis. *Dev. Cell* **21**, 681–93 (2011).
243. Semmrich, M. *et al.* Importance of integrin LFA-1 deactivation for the generation of immune responses. *J. Exp. Med.* **201**, 1987–98 (2005).
244. Cherry, L. K., Li, X., Schwab, P., Lim, B. & Klickstein, L. B. RhoH is required to maintain the integrin LFA-1 in a nonadhesive state on lymphocytes. *Nat. Immunol.* **5**, 961–7 (2004).
245. Choi, E. Y. *et al.* Regulation of LFA-1-dependent inflammatory cell recruitment by Cbl-b and 14-3-3 proteins regulation of LFA-1-dependent inflammatory cell recruitment by Cbl-b and 14-3-3 proteins. *Blood* **111**, 3607–14 (2008).
246. Kempf, T. *et al.* GDF-15 is an inhibitor of leukocyte integrin activation required for survival after myocardial infarction in mice. *Nat. Med.* **17**, 581–8 (2011).
247. Kharabi Masouleh, B. *et al.* Role of the heparan sulfate proteoglycan syndecan-1 (CD138) in delayed-type hypersensitivity. *J. Immunol.* **182**, 4985–93 (2009).
248. Dietrich, J. *et al.* Ligand-induced TCR down-regulation is not dependent on constitutive TCR cycling. *J. Immunol.* **168**, 5434–40 (2002).
249. Pitcher, C., Höning, S., Fingerhut, A., Bowers, K. & Marsh, M. Cluster of differentiation antigen 4 (CD4) endocytosis and adaptor complex binding require activation of the CD4 endocytosis signal by serine phosphorylation. *Mol. Biol. Cell* **10**, 677–91 (1999).
250. Mayor, S. & Pagano, R. E. Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 603–12 (2007).
251. Damke, H., Baba, T., Van Der Blik, A. M. & Schmid, S. L. Clathrin-independent pinocytosis is induced in cells overexpressing a temperature-sensitive mutant of dynamin. *J. Cell Biol.* **131**, 69–80 (1995).
252. Christianson, H. C. & Belting, M. Heparan sulfate proteoglycan as a cell-surface endocytosis receptor. *Matrix Biol.* **35**, 51–5 (2014).
253. Rovira-Clavé, X., Angulo-Ibáñez, M., Noguer, O., Espel, E. & Reina, M. Syndecan-2 can promote clearance of T-cell receptor/CD3 from the cell surface. *Immunology* **137**, 214–25 (2012).
254. Finetti, F. *et al.* Intraflagellar transport is required for polarized recycling of the TCR/CD3 complex to the immune synapse. *Nat. Cell Biol.* **11**, 1332–9 (2009).

255. Martín-Blanco, N. *et al.* CD3 $\epsilon$  recruits Numb to promote TCR degradation. *Int. Immunol.* **28**, 1237-37 (2015).
256. Fernández-Arenas, E. *et al.*  $\beta$ -arrestin-1 mediates the TCR-triggered re-routing of distal receptors to the immunological synapse by a PKC-mediated mechanism. *EMBO J.* **33**, 559-77 (2014).
257. Piotrowski, J. T., Gomez, T. S., Schoon, R. A., Mangalam, A. K. & Billadeau, D. D. WASH knockout T cells demonstrate defective receptor trafficking, proliferation, and effector function. *Mol. Cell. Biol.* **33**, 958-73 (2013).
258. Martínez-Martín, N. *et al.* T cell receptor internalization from the immunological synapse is mediated by TC21 and RhoG GTPase-dependent phagocytosis. *Immunity* **35**, 208-22 (2011).
259. Vardhana, S., Choudhuri, K., Varma, R. & Dustin, M. L. Essential role of ubiquitin and TSG101 protein in formation and function of the central supramolecular activation cluster. *Immunity* **32**, 531-40 (2010).
260. Chen, H.-Y. *et al.* Galectin-3 negatively regulates TCR-mediated CD4<sup>+</sup> T-cell activation at the immunological synapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 14496-501 (2009).
261. Le Bras, S. *et al.* Recruitment of the actin-binding protein HIP-55 to the immunological synapse regulates T cell receptor signaling and endocytosis. *J. Biol. Chem.* **279**, 15550-60 (2004).
262. Kirchgessner, H. *et al.* The transmembrane adaptor protein TRIM regulates T cell receptor (TCR) expression and TCR-mediated signaling via an association with the TCR zeta chain. *J. Exp. Med.* **193**, 1269-84 (2001).
263. Nishida, E., Chen, C., Morita, A. & Shimizu, J. Inhibition of T cell activation through down-regulation of TCR-CD3 expression mediated by an anti-CD90 Ab. *Immunol. Lett.* **136**, 163-70 (2011).
264. Ren, D., Darlucio, M. R. & Chou, J. H. Development of a multi-product leached protein A assay for bioprocess samples containing recombinant human monoclonal antibodies. *J. Immunol. Methods* **366**, 20-27 (2011).
265. Thompson, N. E., Foley, K. M., Stalder, E. S. & Burgess, R. R. Identification, Production, and Use of Polyol-Responsive Monoclonal Antibodies for Immunoaffinity Chromatography. *Methods Enzymol.* **463**, 475-94 (2009).
266. Teixé, T. *et al.* Syndecan-2 and -4 expressed on activated primary human CD4<sup>+</sup> lymphocytes can regulate T cell activation. *Mol. Immunol.* **45**, 2905-19 (2008).
267. Chung, J. S., Bonkobara, M., Tomihari, M., Cruz, P. D. & Ariizumi, K. The DC-HIL/syndecan-4 pathway inhibits human allogeneic T-cell responses. *Eur. J. Immunol.* **39**, 965-74 (2009).
268. Davis, S. J. & van der Merwe, P. A. The kinetic-segregation model: TCR triggering and beyond. *Nat. Immunol.* **7**, 803-9 (2006).
269. Álvarez-Fernández, S. *et al.* Potent antimyeloma activity of a novel ERK5/CDK inhibitor. *Clin. Cancer Res.* **19**, 2677-87 (2013).
270. Shukla, A. *et al.* Extracellular signal-regulated kinase 5: a potential therapeutic target for malignant mesotheliomas. *Clin. Cancer Res.* **19**, 2071-83 (2013).
271. Kawai, Y. *et al.* LAPTM5 promotes lysosomal degradation of intracellular CD3 $\zeta$  but not of cell surface CD3 $\zeta$ . *Immunol. Cell. Biol.* **92**, 527-34 (2014).
272. Ouchida, R. *et al.* A lysosomal protein negatively regulates surface T cell antigen receptor expression by promoting CD3 $\zeta$ -chain degradation. *Immunity* **29**, 33-43 (2008).
273. Wiedemann, A. *et al.* T-cell activation is accompanied by an ubiquitination process occurring at the immunological synapse. *Immunol. Lett.* **98**, 57-61 (2005).
274. Wang, S. *et al.* STUB1 is essential for T-cell activation by ubiquitinating CARMA1. *Eur. J. Immunol.* **43**, 1034-41 (2013).
275. Chen, Z. *et al.* The ubiquitin ligase stub1 negatively modulates regulatory T cell suppressive activity by promoting degradation of the transcription factor Foxp3. *Immunity* **39**, 272-85 (2013).
276. Zhao, Y., Guo, H., Qiao, G., Zucker, M. & Wallace, Y. E3 Ubiquitin ligase cbl-b regulates thymic-derived CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cell development by targeting Foxp3 for ubiquitination. *J Immunol* **194**, 1639-45 (2015).
277. Le, N. T. *et al.* P90RSK targets the ERK5-CHIP ubiquitin E3 ligase activity in diabetic hearts and promotes cardiac apoptosis and dysfunction. *Circ. Res.* **110**, 536-50 (2012).
278. Myers, M. D. *et al.* Src-like adaptor protein regulates TCR expression on thymocytes by linking the ubiquitin ligase c-Cbl to the TCR complex. *Nat. Immunol.* **7**, 57-66 (2006).
279. Yudushkin, I. A. & Vale, R. D. Imaging T-cell receptor activation reveals accumulation of tyrosine-phosphorylated CD3 $\zeta$  in the endosomal compartment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 22128-33 (2010).
280. Lio, C.-W. J. & Hsieh, C.-S. A two-step process for thymic regulatory T cell development. *Immunity* **28**, 100-11 (2008).
281. Burchill, M. a *et al.* Linked T cell receptor and cytokine signaling govern the development of the regulatory T cell repertoire. *Immunity* **28**, 112-21 (2008).
282. Peterson, L. K. *et al.* SLAP deficiency enhances number and function of regulatory T cells preventing chronic autoimmune arthritis in SKG mice. *J. Immunol.* **186**, 2273-81 (2011).
283. Oh, E. S., Couchman, J. R. & Woods, A. Serine phosphorylation of syndecan-2 proteoglycan cytoplasmic domain. *Arch. Biochem. Biophys.* **344**, 67-74 (1997).
284. Fagerholm, S., Morrice, N., Gahmberg, C. G. & Cohen, P. Phosphorylation of the cytoplasmic domain of the integrin CD18 chain by protein kinase C isoforms in leukocytes. *J. Biol. Chem.* **277**, 1728-38 (2002).



## ANNEX: ARTICLES PUBLICATS

---



Els següents articles s'han publicat fruit d'aquesta tesi:

- **Rovira-Clavé, X.\***, Angulo-Ibáñez, M.\*, Noguer, O., Espel, E., Reina, M. Syndecan-2 can promote clearance of T-cell receptor/CD3 from the cell surface. **2012**. *Immunology*. 137(3):214-25.  
\*La contribució dels dos autors és equivalent.
- **Rovira-Clavé, X.**, Angulo-Ibáñez, M., Reina, M., Espel, E. The PDZ-binding domain of syndecan-2 inhibits LFA-1 high-affinity conformation. **2014**. *Cellular Signalling*. 26(7):1489-1499.
- **Rovira-Clavé, X.**, Angulo-Ibáñez, M., Tournier, C., Reina, M., Espel, E. Dual role of ERK5 in the regulation of T cell receptor expression at the T cell surface. **2016**. *Journal of Leucocyte Biology*. 99(1):143-52.

En paral·lel, durant la meua formació pre-doctoral també he contribuït en els següents articles:

- Angulo-Ibáñez, M., **Rovira-Clavé, X.**, Granados-Jaén, A., Downs, B., Kim, YC., Wang, SM., Reina, M., Espel, E. ERK5 contributes to maintaining the balance of cellular nucleotide levels and erythropoiesis. **2015**. *Cell Cycle*. 14(24):3864-76.
- Granados-Jaén, A., Angulo-Ibáñez, M., **Rovira-Clavé, X.**, Soriano, F.X., Reina, M., Espel, E. Absence of ERK5 delays tumorigenesis in *Atm*<sup>-/-</sup> mice. (Manuscript *under review a Oncotarget*).
- Assaker, G.\*, **Rovira-Clavé, X.\***, Gerby, B., Keil, S., Hoang, T., Emery, G. Identification of novel regulators of the ligands Delta-Like 1 in physio-pathological Notch signalling by genome-wide screening. (Manuscript en preparació)  
\*La contribució dels dos autors és equivalent.





# Syndecan-2 can promote clearance of T-cell receptor/CD3 from the cell surface

Xavier Rovira-Clavé,<sup>1\*</sup> Maria Angulo-Ibáñez,<sup>1\*</sup> Oriol Noguer,<sup>1,3</sup> Enric Espel<sup>2</sup> and Manuel Reina<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departament de Biologia Cel·lular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona and <sup>2</sup>Departament de Fisiologia i Immunologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

doi:10.1111/j.1365-2567.2012.03626.x

Received 01 April 2012; revised 10 July 2012; accepted 13 July 2012.

<sup>3</sup>Present address: Rudbeck Laboratory, Department of Immunology, Genetics and Pathology, Uppsala University, Dag Hammarskjöldsvägen 20, Uppsala, Sweden

\*XRC and MAI contributed equally to this article.

Correspondence: Enric Espel, Departament de Fisiologia i Immunologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal 645, 08028 Barcelona Spain.  
Email: eespel@ub.edu  
Senior author: Manuel Reina,  
Email: mreina@ub.edu

## Introduction

The T-cell receptor (TCR)/CD3 complex is formed by a non-covalent association between the antigen-binding TCR- $\alpha\beta$  heterodimer and the CD3 $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  molecules and TCR- $\zeta$  chains, which together are referred to as the CD3 complex and are required for TCR expression, signal transduction and receptor transport.<sup>1</sup> The TCR/CD3 complex cycles continuously between the plasma membrane and the intracellular compartment. This balance keeps approximately 75–85% of the cycling TCR/CD3 pool located at the cell surface, with the rest located inside the cell.<sup>2–5</sup> Following ligation with antigen or antibody, the TCR/CD3 is internalized and degraded, leading to its decrease on the cell surface and the subsequent attenuation of TCR/CD3 signalling, which contributes to T-cell desensitization.<sup>5–8</sup> Indeed, when endocytosis of the TCR/CD3 complex is delayed by interference in the internalization process, this results in increased surface TCR/CD3 density and sustained signalling in both mature T cells<sup>9–12</sup> and double-positive thymocytes,<sup>10,13,14</sup> which

## Summary

T cells express the heparan sulphate proteoglycans syndecan-2 and syndecan-4. Syndecan-4 plays a T-cell inhibitory role; however, the function of syndecan-2 is unknown. In an attempt to examine this function, syndecan-2 was expressed constitutively in Jurkat T cells. Interestingly, the expression of syndecan-2 decreased the surface levels of T-cell receptor (TCR)/CD3 complex, concomitant with intracellular retention of CD3 $\epsilon$  and partial degradation of the TCR- $\zeta$  chain. Immunofluorescence microscopy revealed that intracellular CD3 $\epsilon$  co-located with Rab-4 endosomes. However, the intracellular pool of CD3 $\epsilon$  did not recycle to the cell surface. The lower TCR/CD3 surface levels caused by syndecan-2 led to reduced TCR/CD3 responsiveness. We show that the cytosolic PDZ-binding domain of syndecan-2 is not necessary to elicit TCR/CD3 down-regulation. These results identify a previously unrecognized means of controlling surface TCR/CD3 expression by syndecan-2.

**Keywords:** endocytosis; syndecan; T lymphocytes; T-cell receptor down-regulation; T-cell receptor  $\zeta$  chain.

may lead to autoreactivity.<sup>8,15</sup> Therefore, regulation of surface TCR/CD3 density is an important mechanism that determines the ability of the T cells to respond to stimuli.

Syndecan (SDC) family proteins are recycling endocytic receptors that can control cell surface dynamics.<sup>16–18</sup> Syndecans are also expressed in haematopoietic cells, and SDC2 and SDC4 are up-regulated during T-cell activation.<sup>19–21</sup> Recognition of SDC4 by its ligand DC-HIL in antigen-presenting cells impairs T-cell activation, by the action of the tyrosine phosphatase CD148.<sup>22</sup> However, the function of SDC2 in T cells is not yet known. This study identifies a new mechanism of regulation of the cell surface levels of the TCR/CD3 complex by SDC2.

## Materials and methods

### Materials and antibodies

MAR93 monoclonal antibody (mAb) was used to detect human cell surface CD25 (kindly donated by

Dr M. Lopez Botet; Universitat Pompeu Fabra). Anti-TCR- $\zeta$  clone 6B10.2 (sc-1239) and anti-SDC2 (sc-9492) were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Tebu-bio, Barcelona, Spain). Anti-CD3 $\epsilon$  clone 33-2A3 is a mouse IgG2a mAb (Immunostep, Salamanca, Spain). Anti-TCR- $\alpha\beta$  clone IP26 was from Biologend (Grupo Taper, Alcobendas, Madrid, Spain). Anti-transferrin receptor clone RVS10, anti-CD69 clone FN50, FITC-conjugated anti-CD95 clone LT95 and anti-MHC class I clone W6/32 were from Immunotools (Friesoythe, Germany). Allophycocyanin-conjugated anti-CD4 clone RPA-T4 was from Becton Dickinson (San Agustin de Guadalix, Madrid, Spain). Anti-CD28 is a mouse IgM mAb (clone CK248, kindly donated by Dr Pedro Romero; Ludwig Institute, Lausanne, Switzerland) and was used as a hybridoma supernatant for priming of CD4 T cells in combination with phytohaemagglutinin. Rabbit anti-Rab4 was from Abcam (Cambridge, UK) and rabbit anti-Lamp1 conjugated with Cy3 was from Sigma-Aldrich (Tres Cantos, Madrid, Spain). Anti-Erk1/2 (ref. 9102) and anti-phospho-Erk1/2 (ref. 9101) were from Cell Signalling (Izasa, Barcelona, Spain). The anti-syndecan-2 mAb 186C (mouse IgG1, clone sdc2.1.186.CL.C) was described elsewhere.<sup>21</sup> This mAb and anti-syndecan-2 mAb 51C (mouse IgG3, clone sdc2.1.51.CL.C), both to human SDC2, were made by immunizing mice with human *sdc2*-transfected 300.19 cells and showed specific binding by FACS to *sdc2*-transfected cell lines (300.19, Jurkat and COS) but not to untransfected cells. These anti-syndecan mAb were purified by ammonium sulphate precipitation from concentrated supernatants obtained from hybridoma cultures in Integra-CL-1000 flasks (Integra Biosciences, Cultek, Madrid, Spain).

### Western blot

A total cell extract was prepared from  $10^6$  cells dissolved in 150  $\mu$ l SDS-Loading Buffer. The cell extract was incubated at 95° during 30 min before loading on 10% or 12% SDS-polyacrylamide gel and transfer to a nitrocellulose membrane. Western blots were quantified on a Luminescent Image Analyzer LAS-3000 (Fujifilm, Barcelona, Spain) using GEL EVALUATION analysis software version 1.35 (FrogDance Software, Dundee, UK) or IMAGEJ software (Rasband, W.S., IMAGEJ; US National Institutes of Health, Bethesda, MD, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997–2009).

For TCR- $\zeta$  degradation experiments, cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 10% fetal calf serum (FCS) containing 50  $\mu$ g/ml cycloheximide (Sigma). At each time-point, cells were lysed in SDS loading buffer as described above. Lysates were analysed by immunoblot for anti-actin (AC-40) or TCR- $\zeta$  (6B10.2). Immunoblots and quantification were performed as described above.

### Plasmids

Human HA-Arf6 and HA-Arf6-T27N were plasmids #10834 and #10831, respectively, from Addgene (Cambridge, MA), deposited by Dr T. Roberts.<sup>23</sup> The DNA fragment corresponding to human wild-type *sdc2* cDNA was obtained by PCR amplification using the low-error Phusion™ High-Fidelity DNA polymerase (Finnzymes, Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain) and cloned in pcDNA3. Mutation of wild-type *sdc2* cDNA was carried out by PCR amplification using primers containing the desired mutations. The 5' ends of each pair of mutating primers (forward and reverse) overlapped approximately by 15 bp (with a  $T_m$  below 55° for the 15-bp overlap). After PCR amplification (15–20 cycles) the amplified DNA was *DpnI* digested and directly used to transform competent DH5 $\alpha$ . The authenticity of the constructs generated was confirmed by sequencing.

### Cell culture and transfections

Jurkat E6.1 human cells were obtained from the European Collection of Cell Cultures (ECACC) (Sigma-Aldrich). Jurkat 8B is a CD4-negative Jurkat cell line routinely used in our laboratory.<sup>21,24</sup> Both Jurkat cell lines (E6.1 and 8B) were used in all assays described in this study with analogous results. Jurkat cells were routinely cultured in DMEM, supplemented by 10% FCS, 2 mM l-glutamine and penicillin/streptomycin, and maintained at 37° in 5% CO<sub>2</sub>. The plasmid constructs were transfected into cells by electroporation (Multiporator; Eppendorf, Madrid, Spain). The transfected cells were cultured in complete medium for 24 hr before the selecting antibiotic was added. A total of five Jurkat cell clones over-expressing wild-type SDC2 were obtained and used in this study.

### Preparation of human T lymphocytes

The studies with human samples have been reviewed and approved by the University of Barcelona ethics committee. Primary human T cells were obtained from buffy coats from blood donors at the *Banc de Sang i Teixits* (Blood and Tissue Bank, Barcelona, Spain).

Peripheral blood mononuclear cells were isolated by a Ficoll 1-007 density gradient (Lymphoprep ref. 1114545; Axis-Shield, Reactiva, Barcelona, Spain). CD4 T cells were purified by negative selection, with affinity chromatography (Cedarlane, Tebu-bio, Barcelona, Spain), following the protocol supplied by the manufacturer. Purified CD4 T cells were cultured in DMEM–10% FCS, supplemented by 2 mM glutamine, 200 U/ml penicillin and 200  $\mu$ g/ml streptomycin.

To prepare primed CD4 T cells, these were activated at 37° using phytohaemagglutinin (10  $\mu$ g/ml), anti-CD28

mAb (CK248 supernatant) and interleukin-2 (20 U/ml). After 3–4 days, lymphocytes were washed and cultured in normal media (DMEM 10% FCS) for at least 1 day before use in experiments.

### Labelling of cycling pool and recycling

The measurement of the cycling pool was performed as described elsewhere.<sup>25</sup> To analyse the rate of CD3 $\epsilon$  recycling, cells were incubated at 37° for an hour in the presence of anti-CD3 $\epsilon$  antibody, then the surface antibody bound to CD3 was eliminated by acid wash by adding 1 volume of 0.5 M NaCl, 0.5 M acetic acid (pH 2.2). In this way 96% of cell surface staining was removed. Cells were immediately layered on top of an FCS cushion and pelleted by centrifugation. Cells were resuspended in cell culture media and incubated at 37° for the times indicated. At each time-point, recycling was stopped by layering cells on ice. Cells were labelled with an Alexa 488-conjugated F(ab')<sub>2</sub> rabbit anti-mouse IgG and analysed by flow cytometry. Recycled CD3 $\epsilon$  was calculated using the following formula: % Recycled = 100  $\times$  (MFI at time point - MFI after acid wash at t=0)/(MFI before acid wash at t=0 - MFI after acid wash at t=0).<sup>25</sup>

### Lymphocyte activation in coated plates

CD4 T cells ( $2 \times 10^5$  cells/well) were seeded in 24-well flat-bottom plates, which had been pre-coated with anti-CD3 or mouse IgG control antibodies. After culturing at 37°, cells were lysed and total RNA was purified.

### Flow cytometry

Cells were incubated with saturating amounts of primary antibody in PBS–1% FCS for 30 min at 4°, washed and incubated with Alexa 488-conjugated secondary antibody in PBS–1% FCS for 30 min at 4° in the dark. Non-specific fluorescence was assessed by incubating cells only with the same Alexa 488-conjugated anti-mouse immunoglobulin antibody (grey histograms).

For intracellular labelling, cells were fixed in 1% paraformaldehyde in PBS for 20 min at room temperature, washed and permeabilized with 0.2% saponin in PBS–1% FCS (permeabilization buffer) for 30 min in ice. Cells were centrifuged and resuspended in permeabilization buffer containing primary antibody for 1 hr at 4°. Then, cells were washed and treated with secondary antibody conjugated to Alexa 488 (Invitrogen, Barcelona, Spain) in permeabilization buffer for 45 min at 4°. Cells were washed with permeabilization buffer for 45 min at room temperature, resuspended in PBS–1% FCS and analysed by flow cytometry. Non-specific fluorescence was calculated by incubating cells with a non-specific IgG (clone NCG01 for mouse antibodies and clone DA1E for rabbit

antibodies) followed by staining with the same Alexa 488-conjugated antibody. Flow cytometry experiments used a Cytomics FC500 MPL or a Gallios flow cytometer (Beckman Coulter, Inc, Fullerton, CA). The sample was excited by a 488 nm air-cooled argon-ion laser (Cytomics, Beckman Coulter, Izasa, Barcelona, Spain) or 488 and 635 nm lasers (Gallios, Beckman Coulter, Izasa). Fluorescence was collected on the logarithmic scale. Optical alignment was checked with 10-nm fluorescent beads (Flow-Check fluorospheres; Beckman Coulter). Cell population was selected by gating in a forward scatter versus side scatter dot plot, excluding aggregates and cell debris. Fluorescence histograms were represented in single-parameter histograms (1024 channels) and dual-parameter histograms of green versus orange fluorescence, to distinguish auto-fluorescence from Alexa 488 fluorescence.

### Immunocytochemical staining and confocal microscopy

Cells were fixed and permeabilized with 0.2% saponin as indicated before. Cells were incubated with 100  $\mu$ l primary antibody mix (1  $\mu$ g/100  $\mu$ l) diluted in permeabilization buffer, for 1 hr at 4°. Rabbit anti-Rab4 and rabbit anti-Lamp1 conjugated with Cy3 were used to detect endosomal or lysosomal intracellular compartments, respectively. Cells were washed and incubated with anti-mouse-Alexa 488 or anti-rabbit-Alexa 546 (both from Invitrogen) antibody diluted in permeabilization buffer. Finally, cells were washed and resuspended in 7  $\mu$ l Fluoromont mounting medium, which was applied to microscope slides and covered with coverslips. Immunostained samples were viewed with a Leica TCS-SPE confocal microscope with an argon–krypton laser, in a 60  $\times$  (NA 0.7, oil) Leitz Plan-apochromatic objective, at room temperature. Pictures were acquired with the LEICA APPLICATION SUITE software (Leica microsistemas, Barcelona, Spain). IMAGEJ software was used to quantify the Pearson correlation coefficient for co-localization analysis in individual cells. The results given are the mean of at least five single cells. Final artwork was processed by ADOBE PHOTOSHOP (PRO CS5) software (Adobe Corp, San Jose, CA).

### Real-time quantitative PCR

Cells were lysed and their RNA was isolated. The RNA was reverse-transcribed (Super-Script III, ref. 11752-050; Invitrogen) and real-time PCR was carried out with Sybr-Green-based detection (ref. 11761-500; Invitrogen). Oligonucleotides were designed with the PRIMER 3 program on the www (Steve Rozen and Helen J. Skaletsky, <http://frodo.wi.mit.edu>). The oligonucleotides used for interleukin-2 were: 5'-AACTCACCAGGATGCTCACA-3' (sense) and 5'-GCACTTCCTCCAGAGGTTTG-3' (anti-sense). The

oligonucleotides used for TCR- $\zeta$  were: 5'-CAGCCTCTTCTGAGGGAAA-3' (sense) and 5'-TCTCAGGAA CAAGGCAGTGA-3' (anti-sense). The oligonucleotides to detect 18S rRNA were from TATAA (ref. RRN18S; TATAA Biocenter, Tebu-bio, Barcelona, Spain).

A dilution series ( $10^{-1}$ – $10^{-3}$ ) of the specific PCR product under study was prepared to determine the standard curve (relative quantification). The samples (in duplicate) were amplified according to the following general protocol: 10 min at 95°, 42 cycles: 15 seconds at 95°, 15 seconds at 60° and 20 seconds at 72°. To control the specificity of the reaction, melting-curve analysis was performed after amplification. Levels of endogenous 18S RNA were used as normalization controls and we calculated relative mRNA levels using the equation: Relative mRNA level =  $\frac{[E_{\text{gene of interest}}^{(C_t c - C_t s)}]}{[E_{18S \text{ RNA}}^{(C_t c - C_t s)}]}$  where  $E$  is the efficiency of the PCR,  $C_t$  is the threshold cycle,  $s$  is the stimulated sample and  $c$  is the unstimulated control.<sup>26</sup>

### Statistical analysis

All the data are presented as means  $\pm$  SD from three or more separate experiments. The unpaired  $t$ -test was performed for data involving two groups only and data involving more than two groups were analysed by one-way analysis of variance with Tukey's multiple comparison test. The relationship between cell surface expression of SDC2 and that of CD3 was determined by Spearman's rank correlation analysis. The GRAPHPAD INSTAT version 3.1a software for Macintosh was used (GraphPad, San Diego, CA). Differences were considered statistically significant when  $P$  values were  $< 0.05$ .

## Results

### Over-expression of SDC2 down-regulates TCR/CD3 and promotes degradation of TCR- $\zeta$ chain

Human T cells express SDC2 at the cell surface (see Supplementary material, Fig. S1).<sup>19,21</sup> To study the role played by SDC2 in T lymphocytes we stably over-expressed SDC2 in Jurkat T cells (Fig. 1a). Interestingly, *sdc2*-transfected cells (Jurkat-SDC2) showed a marked reduction in surface TCR- $\alpha\beta$  and CD3 $\epsilon$ , as analysed by flow cytometry (a representative clone of the five analysed is shown in Fig. 1b,c). However, other cell membrane proteins like Fas, CD69 or MHC class I were not down-regulated (see Supplementary material, Fig. S2a). During T cell–antigen-presenting cell interaction, the CD4 co-receptor is down-regulated coordinately with triggered TCR.<sup>27</sup> In Jurkat-SDC2 cells, down-regulation of CD4 was also observed, possibly accompanying the reduction of surface TCR/CD3 in these cells (Fig. S2a). Analysis of transferrin receptor (TfR) expression showed substantial heterogeneity between the different clones. The TfR was

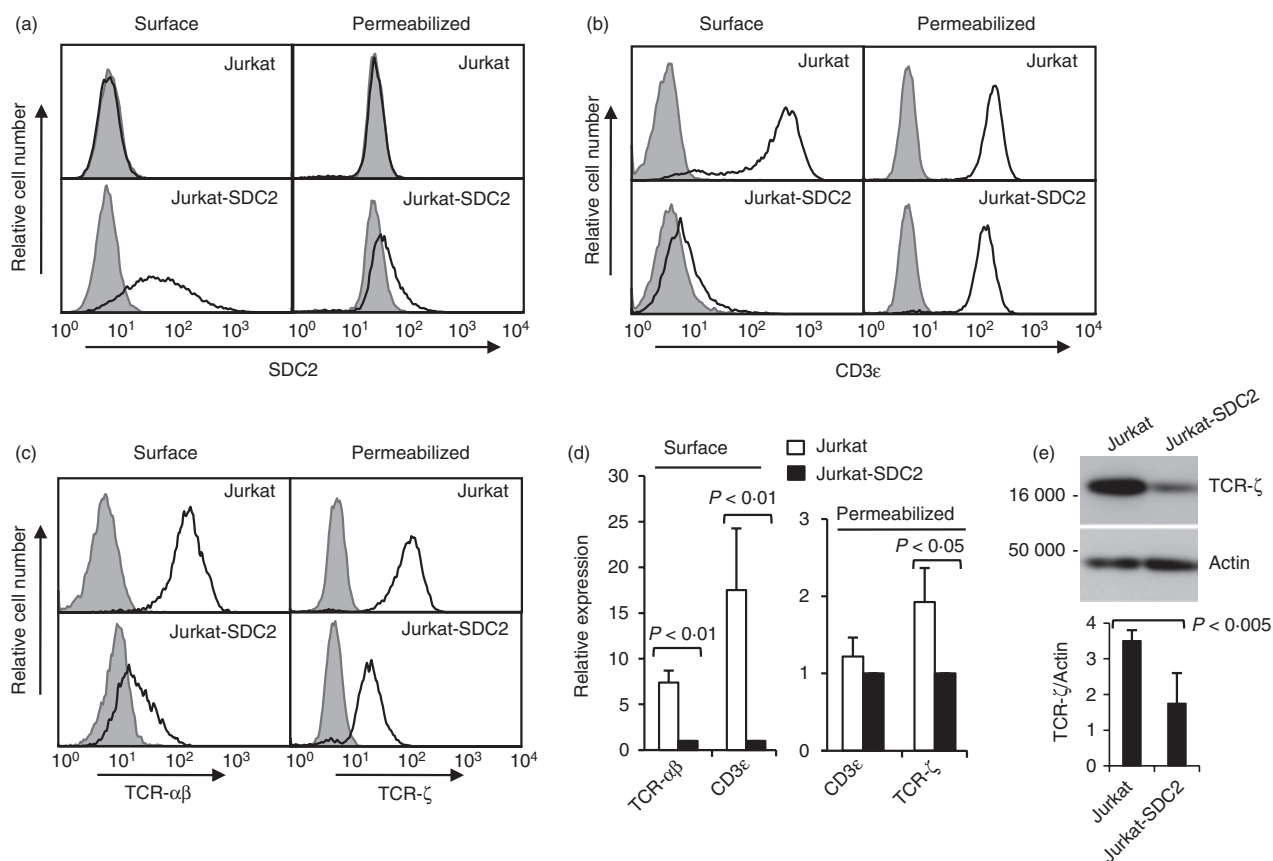
down-regulated in four clones but up-regulated in another (Fig. S2b).

To examine whether the decreased levels of surface TCR/CD3 were caused by its intracellular retention, *sdc2*-transfected cells were fixed, permeabilized and incubated with anti-CD3 $\epsilon$  or anti-TCR- $\zeta$  chain antibodies to analyse their total content. Interestingly, *sdc2*-transfected cells contained considerable intracellular amounts of CD3 $\epsilon$  (Fig. 1b), but a decreased TCR- $\zeta$  chain content (Fig. 1c). Although the surface levels of CD3 $\epsilon$  in five *sdc2*-expressing clones were on average 17-fold lower than on untransfected Jurkat cells, the total cellular levels of CD3 $\epsilon$  (surface plus intracellular) were not significantly different (Fig. 1d). As for the total cellular levels of TCR- $\zeta$  there was an approximately 50% decrease in Jurkat cells over-expressing SDC2 from the level in untransfected cells (Fig. 1c–e). Therefore, over-expression of SDC2 in Jurkat cells down-regulates TCR/CD3 and reduces TCR- $\zeta$  total levels.

To study the effect of SDC2 on TCR- $\zeta$  cellular levels in more detail, we analysed whether TCR- $\zeta$  was regulated at the transcriptional level. The reduced amount of cellular TCR- $\zeta$  in Jurkat-SDC2 was not a consequence of lower transcriptional expression, as the TCR- $\zeta$  mRNA steady-state levels in Jurkat and Jurkat-SDC2 cells were comparable (Fig. 2a). This suggests that the intracellular retention of CD3 $\delta\epsilon$  and CD3 $\gamma\epsilon$  dimers in Jurkat-SDC2 cells is accompanied by TCR- $\zeta$  degradation. To address this possibility, cells were treated with the protein synthesis inhibitor cycloheximide and total levels of TCR- $\zeta$  were evaluated by immunoblotting. Quantitative analysis of the Western blot showed a faster decrease in the TCR- $\zeta$  protein in Jurkat-SDC2 cells than in untransfected cells (Fig. 2b,c); its half-life was  $> 10$  hr in untransfected Jurkat cells, but approximately 5 hr when SDC2 was expressed (Fig. 2b,c). These data suggest that SDC2 controls the degradation of TCR- $\zeta$  chain.

### Jurkat-SDC2 cells are poorly activated by CD3 $\epsilon$ stimulation

In line with the low surface levels of the TCR/CD3 receptor on *sdc2*-transfected cells, these cells had a reduced capacity to respond to anti-CD3 $\epsilon$  stimulation. Indeed, the analysis of interleukin-2 mRNA and cell surface expression of CD25 and CD69 as read-outs of T-cell activation showed that Jurkat-SDC2 cells were virtually unresponsive to plate-bound anti-CD3 $\epsilon$  mAb (Fig. 3). However, the similar responsiveness of untransfected and *sdc2*-transfected Jurkat cells to activation with phorbol ester indicated that the differences in T-cell activation were not caused by alterations in signalling pathways downstream of the TCR (Fig. 3b–e). Analysis of Erk1/2 phosphorylation upon incubation of cells with phorbol ester confirmed that mitogen-activate protein kinase signalling was



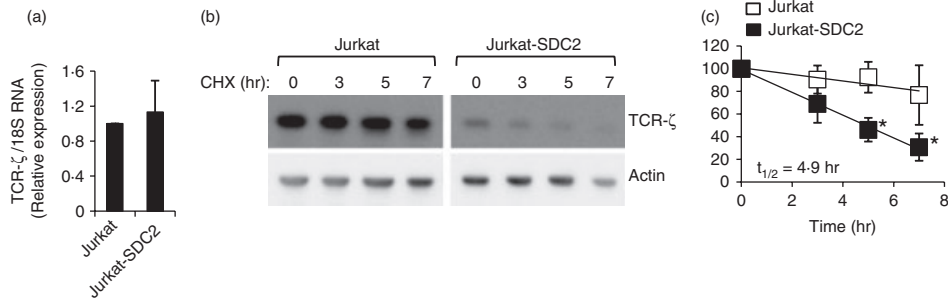
**Figure 1.** Over-expression of SDC2 down-regulates T-cell receptor (TCR)/CD3 in Jurkat T cells. (a) Expression of SDC2. Cells were incubated with anti-SDC2 monoclonal antibodies (mAb; 186C), followed by staining with F(ab')<sub>2</sub> of Alexa 488-conjugated rabbit anti-mouse Ig (open histograms). For staining of total SDC2 (extracellular and intracellular), cells were fixed and permeabilized before incubation with antibody. Grey histograms, control cells with secondary antibody only (surface labelling) or isotype-matched control primary antibody plus secondary antibody (permeabilized cells). The abscissa gives the fluorescence intensity on a logarithmic scale. (b) Expression of CD3ε. Jurkat-SDC2 and untransfected Jurkat cells were incubated with anti-CD3ε mAb 33-2A3, followed by staining with Alexa 488-conjugated anti-mouse antibody (open histograms). (c) Expression of TCR-αβ and TCR-ζ chain. Cells were incubated with anti-TCR-αβ mAb IP26 or permeabilized and incubated with anti-TCR-ζ chain rabbit antibody followed by staining with Alexa 488-conjugated secondary antibody (open histograms). (d) Quantification of FACS staining shown in (b) and (c). The relative expression ratio is calculated from the mean fluorescence intensity (MFI) values of untransfected Jurkat versus the Jurkat-SDC2 cells (TCR-αβ, *n* = 3, data from one Jurkat-SDC2 cell clone representative of three; CD3ε, the error bars representing SD among five different cell clones analysed in five independent experiments; TCR-ζ, the error bars represent variations among four different cell clones analysed in four independent experiments). (e) Western blot analysis of TCR-ζ. The blot was reprobated with anti-actin as an internal loading control of the samples and the intensity of the protein bands was quantified using quantitative luminescence. The analysis was repeated with five different Jurkat-SDC2 clones and the ratio TCRζ : actin ± SD is represented (bottom).

not impaired (Fig. 3d,e). Overall, these results indicate that low surface levels of TCR/CD3 receptor on *sdc2*-transfected cells, make them unresponsive to anti-CD3ε stimulation.

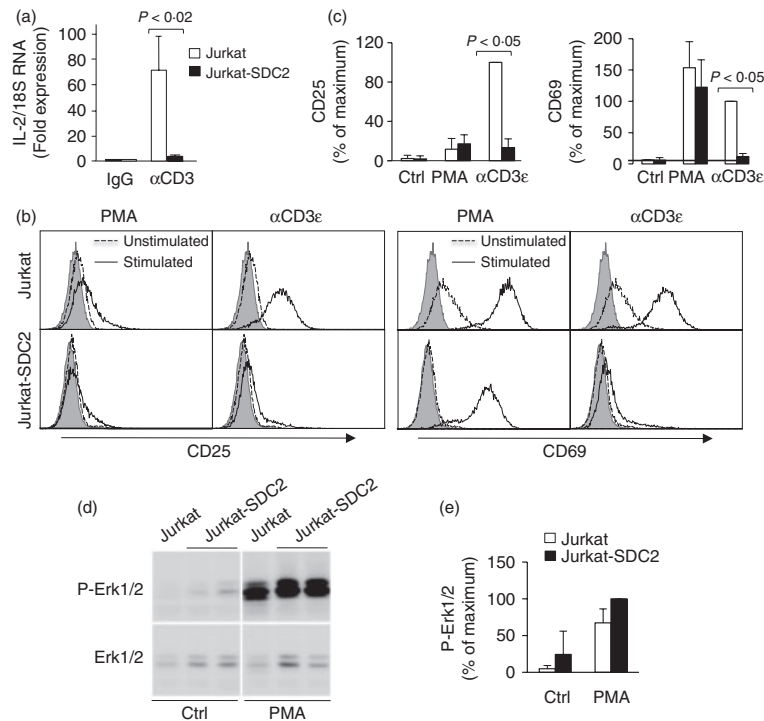
### CD3ε locates in endosomes in Jurkat-SDC2 cells

The above results showed that the total expression of CD3ε was unaffected by SDC2 over-expression. To determine the fate of CD3ε in Jurkat-SDC2 we analysed the presence of CD3ε in the endosomal and lysosomal compartments using confocal microscopy. CD3ε co-located with endosomal Rab4 in both *sdc2*-transfected and untransfected

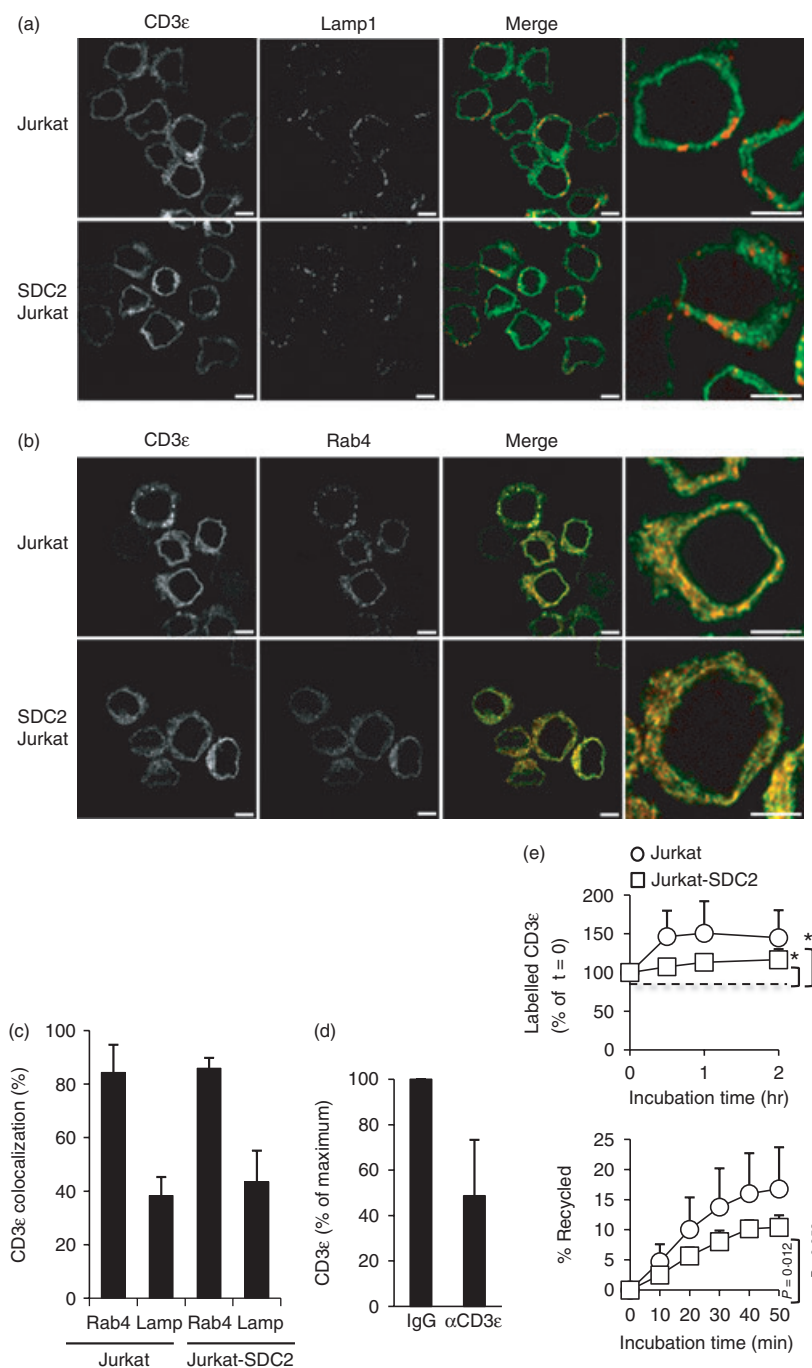
Jurkat cells. Moreover, very low co-location between CD3ε and lysosomal Lamp-1 was detected in *sdc2*-transfected cells (Fig. 4a-c). For comparison, we analysed the distribution of CD3ε in human CD4 T cells that had been stimulated with anti-CD3ε to trigger TCR/CD3 down-regulation and TCR-ζ degradation. The immunoblot analysis of cellular TCR-ζ chain showed its partial degradation in stimulated cells (see Supplementary material, Fig. S3). As for the distribution of CD3ε in CD3-stimulated primary T cells, it was similar to Jurkat-SDC2 cells, showing major co-location of CD3ε with Rab4-endosomes, but low co-location with Lamp1-lysosomes (see Supplementary material, Fig. S4). These data suggest that the



**Figure 2.** SDC2 induces degradation of T-cell receptor- $\zeta$  (TCR- $\zeta$ ). (a) Total RNA was extracted from aliquots of cells to analyse specifically the levels of TCR- $\zeta$  mRNA and 18S RNA by real-time PCR. The TCR- $\zeta$  : 18S RNA ratio was calculated and was given an arbitrary value of 1.0 for control Jurkat cells. The analysis was repeated with three different Jurkat-SDC2 clones and the average  $\pm$  SD is represented. (b) Western blot analysis of TCR- $\zeta$ . Jurkat and Jurkat-SDC2 cells were cultured in the presence of cycloheximide for different time intervals, the lysates were immunoblotted with anti-TCR- $\zeta$ , and the same membrane was reprobbed with anti-actin. (c) The intensity of TCR- $\zeta$  and actin bands of the experiment depicted in (b) and additional experiments were quantified and the ratio TCR- $\zeta$  : actin at time 0 was given an arbitrary value of 100. Data are the mean  $\pm$  SD of three experiments with three Jurkat-SDC2 clones (\* $P \leq 0.5$ ).



**Figure 3.** Jurkat-SDC2 cells do not respond to CD3 ligation. (a) Cells were starved overnight in DMEM-0.5% FCS and then stimulated with plate-bound anti-CD3 $\epsilon$  monoclonal antibody (mAb) or control IgG (4  $\mu$ g/ml) for 3 hr. The expression of interleukin-2 (IL-2) mRNA was analysed by quantitative PCR and normalized to 18S RNA content. Results are expressed as IL-2 : 18S ratio  $\pm$  SD, average of three experiments with one Jurkat-SDC2 cell clone, representative of two. (b,c) Relative levels of CD25 and CD69 on the surface of Jurkat-SDC2 cells stimulated with plate-bound anti-CD3 $\epsilon$  mAb or PMA were compared with control Jurkat cells by flow cytometry. (b) Representative histograms of CD25 and CD69 labelling show unlabelled control (grey shaded), control IgG-treated cells, and anti-CD3- and PMA-treated cells (open histograms). Although the Jurkat-SDC2 cells show the basal expression of CD69 diminished, this trait was not commonly associated with SDC2 expression in the other clones (see Supplementary material, Fig. S2). (c), The mean fluorescence intensity (MFI) of cells expressing surface CD25 and CD69 is represented as a percentage of the maximum value obtained in cells stimulated with anti-CD3. Data represent the mean + SD of three Jurkat-SDC2 clones analysed in eight experiments. (d) Western blot analysis of phosphorylated erk1/2. Jurkat and Jurkat-SDC2 cells (results from two different clones are shown) were stimulated with PMA for 5 min, the lysates were immunoblotted with anti-phospho-erk1/2, and the same samples were analysed with anti-erk1/2 in a separate immunoblot. (e) The intensities of phospho-erk1/2 and erk1/2 bands of the experiment depicted in (d) were quantified and the ratio (phospho-erk1/2) : (erk1/2) for PMA-stimulated Jurkat-SDC2 samples was given an arbitrary value of 100. Data represent the average of two experiments, each with three cell clones (the error bars represent variations among clones).



degradation of TCR-ζ chain observed in Jurkat-SDC2 cells is accompanied by intracellular storage of CD3γ/ε and CD3δ/ε dimers.

The increased intracellular content of CD3 in *sdc2*-transfected cells is possibly a direct consequence of the limiting amount of TCR-ζ chain. However, ligation of TCR/CD3 induces TCR down-regulation by increasing the internalization rate<sup>2</sup> and preventing recycling.<sup>5</sup> Therefore, we analysed the dynamics of TCR/CD3 internalization and recycling, to rule out that changes of

these mechanisms contribute to intracellular storage of CD3ε. After the constitutive TCR/CD3 down-regulation of *sdc2*-expressing cells, we wondered whether these cells could down-regulate the TCR/CD3 further by receptor ligation. Indeed, ligation with anti-CD3ε mAb triggered down-regulation in Jurkat-SDC2 cells (Fig. 4d). This endocytosis response of Jurkat-SDC2 cells suggests that SDC2 does not affect the internalization of TCR/CD3.

To test whether the over-expression of SDC2 regulates recycling of the TCR/CD3 complex we first determined



**Figure 4.** Intracellular location of CD3 $\epsilon$  in wild-type and *sdc2*-transfected Jurkat cells, and recycling of CD3 $\epsilon$ . Cells were fixed, permeabilized and stained with antibodies against CD3 $\epsilon$  (green) and either Lamp-1 (a) or Rab4 (red) (b). Co-location is clearly observed between CD3 $\epsilon$  and the early endosomal marker Rab4 (merged image, yellow). There is low co-location with Lamp-1. A magnification of a single cell is shown in the right-hand column. Scale bar: 5  $\mu$ m. One of three independent experiments is shown. A total of three Jurkat-SDC2 clones were analysed. (c) Quantification of the co-location of internalized CD3 and endosomal Rab4 or lysosomal Lamp1, by measurement of Pearson's correlation coefficient in individual cells ( $n \geq 5$ ), as described in the Materials and methods. (d) Down-regulation of CD3 $\epsilon$  in Jurkat-SDC2. Jurkat-SDC2 were stimulated for 2 hr with monoclonal antibodies (mAb) against CD3 $\epsilon$  (33-2A3, 0.3  $\mu$ g/ml) or mouse IgG and transferred to ice. The cells were then incubated with saturating amounts of the same anti-CD3 $\epsilon$  mAb, followed by staining with Alexa 488-conjugated goat anti-mouse IgG2a antibody and subjected to flow cytometry analysis. Data represent the average of mean fluorescence intensity (MFI) + SD (error bars) of two independent experiments carried out with two separate Jurkat-SDC2 clones. (e) Top panel. Surface CD3 $\epsilon$  and total recycling pool of CD3 $\epsilon$  in Jurkat-SDC2 and untransfected Jurkat cells. The surface and recycling pools were labelled by incubating cells with anti-CD3 $\epsilon$  mAb and an Alexa 488-conjugated rabbit anti-mouse F(ab')<sub>2</sub> antibody on ice to label only surface CD3 $\epsilon$  or at 37° for 120 min to label both surface CD3 $\epsilon$  and CD3 $\epsilon$  that recycled to the cell surface during the 120-min incubation.<sup>25</sup> The MFI of the cells were determined by flow cytometry and are represented as a percentage of the values of ice-incubated control cells. Mean + SD of five experiments conducted with the same Jurkat-SDC2 cell clone (\*significant increase of fluorescence for cells incubated at 37° as compared with control cells,  $P < 0.05$ , paired  $t$ -test). Note that the recycling pool is shown in relationship to the surface CD3 $\epsilon$  at time 0, which was lower for Jurkat-SDC2 cells. Similar data were obtained with two additional Jurkat-SDC2 clones. Bottom panel. Recycling of previously internalized anti-CD3 $\epsilon$  antibody. The percentage of recycling is shown in reference to the cell surface labelling at time 0 (see Materials and methods). Mean + SD of three experiments conducted with the same Jurkat-SDC2 clone (significant increase of recycling for Jurkat-SDC2 cells after incubating for 50 min as compared with time 0, paired  $t$ -test). The results are representative of two cell clones. In some Jurkat-SDC2 clones the low level of surface CD3 $\epsilon$  precluded the analysis of recycling.

the total CD3 $\epsilon$  cycling pool. The *sdc2*-transfected Jurkat cells were incubated with anti-CD3 $\epsilon$  mAb and an Alexa 488-conjugated rabbit anti-mouse F(ab')<sub>2</sub> antibody, either on ice to label only surface CD3 $\epsilon$  or at 37° for 120 min to label also the CD3 $\epsilon$  that recycled to the cell surface during the incubation.<sup>25</sup> An increase of fluorescence because of recycling of TCR/CD3 complexes was observed in both untransfected and *sdc2*-transfected cells, was proportional to the surface levels of CD3 $\epsilon$  (Fig. 4e) and independent of the large intracellular CD3 $\epsilon$  reservoir present in Jurkat-SDC2 cells. Therefore, in *sdc2*-transfected cells the intracellular pool of CD3 $\epsilon$  contributes marginally to recycling.

We also measured the rate of CD3 $\epsilon$  recycling in the two cell types. The results show that recycling of a previously internalized anti-CD3 $\epsilon$  antibody in Jurkat and Jurkat-SDC2 cells proceeds at a similar rate (Fig. 4e). It should be noted that as the Jurkat-SDC2 cells have reduced TCR/CD3 surface levels (Fig. 1), they internalize less receptor than control Jurkat cells (data not shown).

These results suggest that changes in the internalization and recycling of TCR/CD3 do not contribute substantially to the low surface levels of TCR/CD3 in Jurkat-SDC2 cells. This suggests that the SDC2-induced shortage of TCR- $\zeta$  chain limits the amount of completed TCR/CD3 complexes reaching the cell surface.

#### Location of SDC2 and TCR- $\zeta$ chain in Jurkat-SDC2 cells

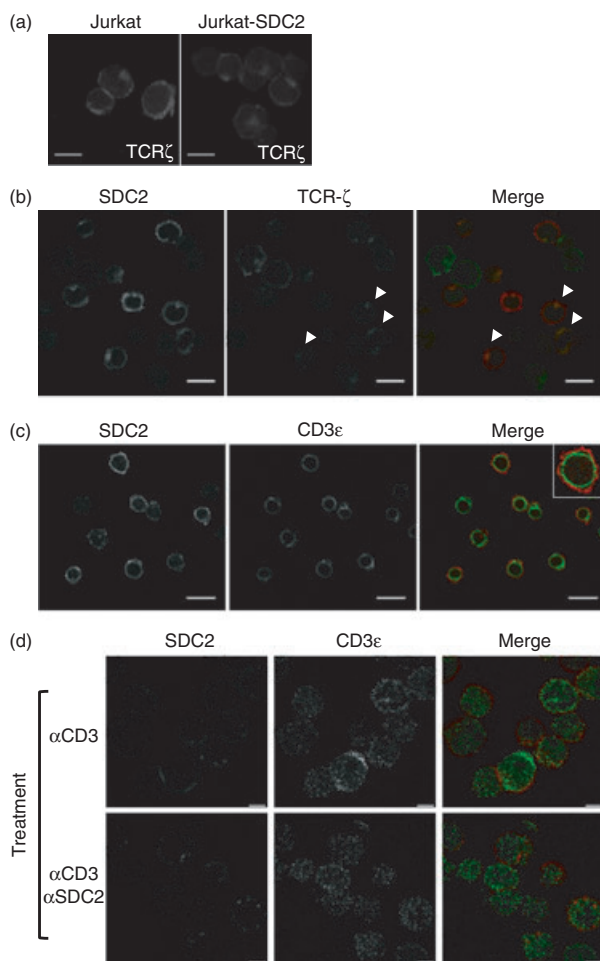
Recycling of syndecans is partially dependent on the small GTPase Arf6.<sup>18</sup> To test whether the Arf6-GTP/GDP

cycling activity was involved in SDC2-dependent TCR/CD3 internalization, we transfected Jurkat and Jurkat-SDC2 with wild-type *Arf6* or the dominant negative mutant *Arf6T27N*, a form of Arf6 that is unable to exchange GDP for GTP.<sup>28</sup> Flow cytometry analysis indicated that expression of wild-type Arf6 or Arf6T27N had no detectable effect on the surface levels of SDC2 and CD3 $\epsilon$  (see Supplementary material, Fig. S5). These results suggest that the activity of Arf6 is not required to keep CD3 $\epsilon$  down-regulated in Jurkat-SDC2 cells.

Transferrin receptor is a well-characterized recycling receptor that shares early endosomal trafficking with the TCR/CD3 during T-cell stimulation.<sup>29–31</sup> Examination of TfR expression on Jurkat-SDC2 cells, showed that four of the five clones had reduced surface TfR, suggesting that the effect of SDC2 expression is not restricted to TCR/CD3, but includes clathrin-dependent endocytosis (Fig. S2b). The fact that CD4, which internalizes by a clathrin-dependent pathway<sup>32</sup> was also down-regulated in Jurkat-SDC2, supports this idea (Fig. S2a).

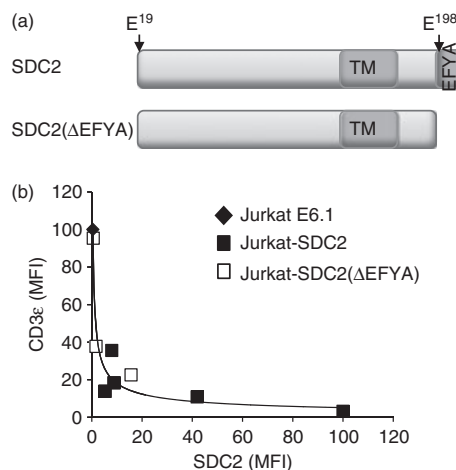
To rule out a close interaction between SDC2 and TCR/CD3 we analysed the subcellular location of TCR- $\zeta$  and SDC2 by confocal microscopy. The expression of TCR- $\zeta$  chain in *sdc2*-transfected Jurkat cells was low and therefore, its staining pattern by confocal microscopy was dimmer than in normal Jurkat (Fig. 5a). Despite this limitation, co-location of TCR- $\zeta$  chain and SDC2 was observed in a fraction of Jurkat-SDC2 cells (arrowheads in Fig. 5b).

In contrast, the distribution of CD3 $\epsilon$ , which accumulates in the cytoplasm of Jurkat-SDC2 cells, was clearly separated from SDC2 without evidence of co-location of the two proteins (Fig. 5c).



**Figure 5.** Location of SDC2, T-cell receptor- $\zeta$  (TCR- $\zeta$ ) and CD3 $\epsilon$ . (a) Staining with anti-TCR- $\zeta$  chain antibody of Jurkat and Jurkat-SDC2 cells. Cells were sedimented on poly-lysine-coated coverslips, fixed, permeabilized and stained with antibody. Scale bar: 9  $\mu$ m. One of the five clones examined is shown. (b) Location of TCR- $\zeta$  and SDC2 in *sdc2*-transfected Jurkat cells. Cells were prepared as in (a) and stained with antibodies against TCR- $\zeta$  chain (green) and SDC2 (red) (polyclonal antibody sc-9492). Some co-location of TCR- $\zeta$  with SDC2 was observed. Scale bar: 18  $\mu$ m. One of two independent experiments with four Jurkat-SDC2 clones is shown. (c) Location of CD3 $\epsilon$  and SDC2 in *sdc2*-transfected Jurkat cells. Cells were prepared as in (a) and stained with antibodies against CD3 $\epsilon$  (green) and SDC2 (red). Co-location of CD3 $\epsilon$  with SDC2 was not observed. Scale bar: 18  $\mu$ m. One of two independent experiments with two Jurkat-SDC2 clones is shown. (d) Location of CD3 $\epsilon$  and SDC2 in CD4 T cells. T lymphocytes were treated with anti-CD3 $\epsilon$  33-2A3 and mouse IgG (top) or with anti-CD3 $\epsilon$  and anti-SDC2 186C (bottom) for 10 min at 37°. Then, the cells were fixed and permeabilized. Immunocytochemical staining of CD3 $\epsilon$  (green) and SDC2 (red) is shown. Co-location of CD3 $\epsilon$  with SDC2 was not observed. Scale bar: 5  $\mu$ m. One of two independent experiments is shown.

A similar analysis of the subcellular location of CD3 $\epsilon$  and SDC2 was carried out in primary T cells. Activated T cells were incubated with anti-CD3 $\epsilon$  and anti-SDC2



**Figure 6.** The PDZ-binding domain of SDC2 is not necessary to induce T-cell receptor (TCR)/CD3 down-regulation. (a) A representation of the SDC2 wild-type molecule and the SDC2 with the C-terminal EFYA deletion [SDC2 ( $\Delta$ EFYA)]: TM, transmembrane region. (b) Correlation between the expression of CD3 $\epsilon$  and SDC2 in Jurkat (filled circle), five Jurkat-SDC2 clones (filled square) and three independent Jurkat-SDC2 ( $\Delta$ EFYA) clones (open squares). The solid line is the curve with the best fit to the data points (Spearman's rank correlation coefficient =  $-0.88$ ,  $P = 0.003$ ).

mAb to initiate down-regulation of both receptors,<sup>33</sup> and were then stained for analysis by confocal microscopy. CD3 $\epsilon$  fluorescence was punctate and distributed throughout cytoplasm, whereas SDC2 fluorescence was more diffuse (Fig. 5d). However, no co-location of CD3 $\epsilon$  and SDC2 was observed. These results suggest that the TCR- $\zeta$  and CD3 $\epsilon$  form different intracellular pools in Jurkat-SDC2 cells and that TCR- $\zeta$  and SDC2 may partially interact.

### The PDZ binding domain of SDC2 is not necessary to down-regulate TCR/CD3

SDC2 has one recognized interaction motif involved in membrane traffic, the PDZ-binding domain in the C-terminal region, which interacts with syntenin.<sup>18</sup> We therefore analysed whether the PDZ-binding domain of SDC2 played a role in TCR/CD3 down-regulation. To do this, we removed the four amino acids (EFYA) essential for binding to PDZ proteins. When the mutant *sdc2* ( $\Delta$ efya) was expressed in Jurkat, the down-regulation of CD3 $\epsilon$  was observed as in Jurkat-SDC2 cells (Fig. 6). The cell surface levels of CD3 $\epsilon$  in transfectants decreased in inverse correlation to the expression of surface SDC2 ( $\Delta$ EFYA), much like the cells transfected with wild-type *sdc2* (Fig. 6). These data indicate that the PDZ-binding domain is not essential to down-regulate the TCR/CD3, and suggest that traffic of SDC2 is not involved in TCR/CD3 down-regulation.<sup>18</sup>

## Discussion

This study provided genetic evidence that SDC2 can down-regulate the TCR/CD3. Over-expression of SDC2 in Jurkat cells resulted in partial TCR- $\zeta$  chain degradation, reduced surface TCR/CD3 density and reduced cell responsiveness to CD3 stimulation.

Confocal analysis of the subcellular location of CD3 and SDC2 suggests that the two receptors do not interact. Therefore, the down-regulatory effect of SDC2 on TCR/CD3 may be indirect, through control of the early endocytic pathway. The reduced cell surface levels in Jurkat-SDC2 cells of Tfr and CD4, which traffic in a similar way to the TCR/CD3 during T-cell stimulation,<sup>29–31,34</sup> support this idea. Moreover, when Jurkat cells were transfected with an SDC2 mutant lacking the PDZ-binding domain, the TCR/CD3 was down-regulated too, arguing against a direct involvement of SDC2 trafficking in TCR/CD3 down-regulation.

The results presented here suggest that SDC2 may play a functional role in TCR/CD3 down-regulation. To explore this possibility, we ligated SDC2 with specific antibody in antigen-stimulated or CD3-stimulated T cells in an attempt to increase TCR/CD3 down-regulation. However, no effect of SDC2-specific antibodies on TCR/CD3 down-regulation was observed (data not shown). This suggests that the anti-SDC2 antibodies used may not mimic the natural SDC2 ligand(s), which might increase TCR/CD3 down-regulation in a more physiological setting, this point merits further study.

Considerable attention has been paid to understanding the regulation of TCR/CD3 surface density because of its biological importance. The analysis of TCR/CD3 down-regulation constitutes a measurement of receptor engagement by the ligand.<sup>35,36</sup> By increasing the concentration of the TCR/CD3 ligand, a proportional increase in both the down-regulation of TCR/CD3 and the functional activation of the T cell was observed.<sup>35,37</sup> Conversely, when the internalization of TCR/CD3 complex is blocked<sup>9,10,13</sup> or when the trafficking of internalized TCR/CD3 to the lysosome and degradation are reduced,<sup>8,12,25</sup> TCR/CD3 surface density increases and signalling by TCR/CD3 is sustained, which may lead to autoreactivity.<sup>8</sup>

The TCR/CD3 down-regulation is dependent on its ubiquitination and on recognition of the ubiquitinated receptor by tumour suppressor gene (TSG) 101 at the immunological synapse.<sup>8,9</sup> The TCR/CD3 can be differently ubiquitinated, leading to different biological outcomes, such as internalization and degradation<sup>8,9,13</sup> or signalling attenuation.<sup>38</sup> Recognition of ubiquitinated TCR/CD3 by TSG101 leads to receptor translocation into multivesicular bodies and lysosomes, which causes receptor dephosphorylation and degradation.<sup>9</sup> The down-regulation of triggered TCR/CD3 and its subsequent

degradation are considered necessary events for limiting sustained TCR signalling, resulting in decreased sensitivity of the T-cell to the antigen.<sup>9,36,39–41</sup>

In addition to TSG101, other proteins mechanistically associated with the TCR/CD3 down-regulation process have been identified. Mature T cells, when they lack CD2-associated protein<sup>41</sup> or intra-flagellar transport proteins,<sup>42</sup> show an altered balance between surface and intracellular TCR/CD3. Over-expression of the adaptor proteins HIP-55 (haematopoietic progenitor kinase 1 interacting protein of 55 000 molecular weight) or TRIM (T-cell receptor interacting molecule) in Jurkat modify the TCR/CD3 surface levels.<sup>43,44</sup> Similarly, enforced expression of the lysosomal protein LAPTM5 (lysosomal-associated protein transmembrane 5) reduces surface TCR/CD3 levels by promoting TCR- $\zeta$  chain degradation without affecting other CD3 proteins.<sup>12</sup> More recently, the ligation of CD90 in mouse T cells has been shown to modulate TCR/CD3 down-regulation and T-cell activation.<sup>45</sup>

Ligation of TCR/CD3 induces TCR down-regulation by increasing the internalization rate<sup>2</sup> and preventing recycling.<sup>5</sup> Our data show that SDC2 down-regulated TCR/CD3 by increasing TCR- $\zeta$  chain degradation, limiting the amount of completed TCR/CD3 complexes reaching the cell surface, and leading to intracellular storage of excess CD3 $\delta\epsilon$  and CD3 $\gamma\epsilon$  dimers. It is tempting to speculate that SDC2 over-expression leads to increased ubiquitination of TCR- $\zeta$  chain and hence to increased transport to multivesicular bodies and lysosomes. The incomplete TCR/CD3 complexes lacking TCR- $\zeta$  may be retained in a non-recycling pool.

Like SDC2, SDC4 is also up-regulated in activated T cells.<sup>19–21</sup> We speculated that it might also down-regulate TCR/CD3, just as SDC2 does. Chung *et al.*<sup>46</sup> over-expressed SDC4 in Jurkat cells but reported no change in the expression of TCR/CD3, which suggests that SDC4 and SDC2 play different roles in T-cell biology.

The results of this study illustrate a unique mechanism for the regulation of surface TCR/CD3 expression by SDC2. This mechanism has the potential to contribute to modulate T-cell responses.

## Acknowledgements

We thank the technical staff of the FACS facility for their support. Our thanks also to Manel Bosch for his help with the confocal microscopy analyses and to Anna Pascual for her technical help in plasmid construction. This research was supported by the Spanish Ministry of Education and Science (SAF2004-05481).

## Disclosures

The authors declare no competing financial interests.

## References

- 1 Exley M, Terhorst C, Wileman T. Structure, assembly and intracellular transport of the T cell receptor for antigen. *Semin Immunol* 1991; **3**:283–97.
- 2 Krangel MS. Endocytosis and recycling of the T3-T cell receptor complex. The role of T3 phosphorylation. *J Exp Med* 1987; **165**:1141–59.
- 3 Minami Y, Samelson LE, Klausner RD. Internalization and cycling of the T cell antigen receptor. Role of protein kinase C. *J Biol Chem* 1987; **262**:13342–7.
- 4 Menné C, Møller Sørensen T, Siersma V, Essen von M, Ødum N, Geisler C. Endo- and exocytic rate constants for spontaneous and protein kinase C-activated T cell receptor cycling. *Eur J Immunol* 2002; **32**:616–26.
- 5 Liu H, Rhodes M, Wiest DL, Vignali DA. On the dynamics of TCR: CD3 complex cell surface expression and downmodulation. *Immunity* 2000; **13**:665–75.
- 6 Valitutti S, Müller S, Salio M, Lanzavecchia A. Degradation of T cell receptor (TCR)-CD3- $\zeta$  complexes after antigenic stimulation. *J Exp Med* 1997; **185**:1859–64.
- 7 Essen von M, Bonefeld CM, Siersma V, Rasmussen AB, Lauritsen JPH, Nielsen BL, Geisler C. Constitutive and ligand-induced TCR degradation. *J Immunol* 2004; **173**:384–93.
- 8 Naramura M, Jang I-K, Kole H, Huang F, Haines D, Gu H. c-Cbl and Cbl-b regulate T cell responsiveness by promoting ligand-induced TCR down-modulation. *Nat Immunol* 2002; **3**:1192–9.
- 9 Vardhana S, Choudhuri K, Varma R, Dustin ML. Essential Role of Ubiquitin and TSG101 Protein in Formation and Function of the Central Supramolecular Activation Cluster. *Immunity* 2010; **32**:531–40.
- 10 André P, Boretto J, Hueber AO, Régner-Vigouroux A, Gorvel JP, Ferrier P, Chavrier P. A dominant-negative mutant of the Rab5 GTPase enhances T cell signaling by interfering with TCR down-modulation in transgenic mice. *J Immunol* 1997; **159**:5253–63.
- 11 Bonefeld CM, Haks M, Nielsen B et al. TCR down-regulation controls virus-specific CD8<sup>+</sup> T cell responses. *J Immunol* 2008; **181**:7786–99.
- 12 Ouchida R, Yamasaki S, Hikida M et al. A Lysosomal Protein Negatively Regulates Surface T Cell Antigen Receptor Expression by Promoting CD3 $\zeta$ -Chain Degradation. *Immunity* 2008; **29**:33–43.
- 13 Wang H, Holst J, Woo S-R et al. Tonic ubiquitylation controls T-cell receptor: CD3 complex expression during T-cell development. *EMBO J* 2010; **29**:1285–98.
- 14 Thien CBF, Blystad FD, Zhan Y, Lew AM, Voigt V, Andoniou CE, Langdon WY. Loss of c-Cbl RING finger function results in high-intensity TCR signaling and thymic deletion. *EMBO J* 2005; **24**:3807–19.
- 15 Schönrich G, Kalinke U, Momburg F, Malissen M, Schmitt-Verhulst A-M, Malissen B, Hammerling GJ, Arnold B. Down-regulation of T cell receptors on self-reactive T cells as a novel mechanism for extrathymic tolerance induction. *Cell* 1991; **65**:293–304.
- 16 Fuki IV, Kuhn KM, Lomazov IR et al. The syndecan family of proteoglycans. Novel receptors mediating internalization of atherogenic lipoproteins *in vitro*. *J Clin Invest* 1997; **100**:1611–22.
- 17 Tkachenko E, Lutgens E, Stan R-V, Simons M. Fibroblast growth factor 2 endocytosis in endothelial cells proceed via syndecan-4-dependent activation of Rac1 and a Cdc42-dependent macropinoscytic pathway. *J Cell Sci* 2004; **117**:3189–99.
- 18 Zimmermann P, Zhang Z, Degeest G et al. Syndecan Recycling Is Controlled by Syntenin-PIP2 Interaction and Arf6. *Dev Cell* 2005; **9**:377–88.
- 19 Pakula R, Melchior A, Denys A, Vanpouille C, Mazurier J, Allain F. Syndecan-1/CD147 association is essential for cyclophilin B-induced activation of p44/42 mitogen-activated protein kinases and promotion of cell adhesion and chemotaxis. *Glycobiology* 2007; **17**:492–503.
- 20 Chung J-S, Dougherty I, Cruz PD, Ariizumi K. Syndecan-4 mediates the coinhibitory function of DC-HIL on T cell activation. *J Immunol* 2007; **179**:5778–84.
- 21 Teixe T, Nieto-Blanco P, Vilella R, Engel P, Reina M, Espel E. Syndecan-2 and -4 expressed on activated primary human CD4<sup>+</sup> lymphocytes can regulate T cell activation. *Mol Immunol* 2008; **45**:2905–19.
- 22 Chung J-S, Cruz PD, Ariizumi K. Inhibition of T-cell activation by syndecan-4 is mediated by CD148 through protein tyrosine phosphatase activity. *Eur J Immunol* 2011; **41**:1794–9.
- 23 Furman C, Short SM, Subramanian RR, Zetter BR, Roberts TM. DEF-1/ASAP1 is a GTPase-activating protein (GAP) for ARF1 that enhances cell motility through a GAP-dependent mechanism. *J Biol Chem* 2002; **277**:7962–9.
- 24 Buxadé M, Parra JL, Rousseau S et al. The Mnk5 are novel components in the control of TNF- $\alpha$  biosynthesis and phosphorylate and regulate hnRNP A1. *Immunity* 2005; **23**:177–89.
- 25 Myers MD, Dragone LL, Weiss A. Src-like adaptor protein down-regulates T cell receptor (TCR)-CD3 expression by targeting TCR $\zeta$  for degradation. *J Cell Biol* 2005; **170**:285–94.
- 26 Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001; **29**:e45.
- 27 Viola A, Salio M, Tuosto L, Linkert S, Acuto O, Lanzavecchia A. Quantitative contribution of CD4 and CD8 to T cell antigen receptor serial triggering. *J Exp Med* 1997; **186**:1775–9.
- 28 Radhakrishna H, Donaldson JG. ADP-ribosylation factor 6 regulates a novel plasma membrane recycling pathway. *J Cell Biol* 1997; **139**:49–61.
- 29 Das V, Nal B, Dujancourt A, Thoulouze M-I, Galli T, Roux P, Dautry-Varsat A, Alcover A. Activation-Induced Polarized Recycling Targets T Cell Antigen Receptors to the Immunological Synapse Involvement of SNARE Complexes. *Immunity* 2004; **20**:577–88.
- 30 Batista A, Millán J, Mittelbrunn M, Sánchez-Madrid F, Alonso MA. Recruitment of transferrin receptor to immunological synapse in response to TCR engagement. *J Immunol* 2004; **172**:6709–14.
- 31 Patino-Lopez G, Dong X, Ben-Aissa K et al. Rab35 and its GAP EPI64C in T cells regulate receptor recycling and immunological synapse formation. *J Biol Chem* 2008; **283**:18323–30.
- 32 Pitcher C, Hönig S, Fingerhut A, Bowers K, Marsh M. Cluster of differentiation antigen 4 (CD4) endocytosis and adaptor complex binding require activation of the CD4 endocytosis signal by serine phosphorylation. *Mol Biol Cell* 1999; **10**:677–91.
- 33 Fuki IV, Meyer ME, Williams KJ. Transmembrane and cytoplasmic domains of syndecan mediate a multi-step endocytic pathway involving detergent-insoluble membrane rafts. *Biochem J* 2000; **351**:607–12.
- 34 Acres RB, Conlon PJ, Mochizuki DY, Gallis B. Rapid phosphorylation and modulation of the T4 antigen on cloned helper T cells induced by phorbol myristate acetate or antigen. *J Biol Chem* 1986; **261**:16210–4.
- 35 Valitutti S, Müller S, Cella M, Padovan E, Lanzavecchia A. Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes. *Nature* 1995; **375**:148–51.
- 36 Valitutti S, Müller S, Dessing M, Lanzavecchia A. Signal extinction and T cell repolarization in T helper cell-antigen-presenting cell conjugates. *Eur J Immunol* 1996; **26**:2012–6.
- 37 Hemmer B, Stefanova I, Vergelli M, Germain RN, Martin R. Relationships among TCR ligand potency, thresholds for effector function elicitation, and the quality of early signaling events in human T cells. *J Immunol* 1998; **160**:5807–14.
- 38 Huang H, Jeon M-S, Liao L, Yang C, Elly C, Yates JR, Liu YC. K33-Linked Polyubiquitination of T Cell Receptor- $\zeta$  Regulates Proteolysis-Independent T Cell Signaling. *Immunity* 2010; **33**:60–70.
- 39 Kim DT, Rothbard JB, Bloom DD, Fathman CG. Quantitative analysis of T cell activation: role of TCR/ligand density and TCR affinity. *J Immunol* 1996; **156**:2737–42.
- 40 Martin S, Bevan MJ. Transient alteration of T cell fine specificity by a strong primary stimulus correlates with T cell receptor down-regulation. *Eur J Immunol* 1998; **28**:2991–3002.
- 41 Lee K-H, Dinner AR, Tu C et al. The immunological synapse balances T cell receptor signaling and degradation. *Science* 2003; **302**:1218–22.
- 42 Finetti F, Paccani SR, Riparbelli MG, Giacomello E, Perinetti G, Pazour GJ, Rosenbaum JL, Baldari CT. Intraflagellar transport is required for polarized recycling of the TCR/CD3 complex to the immune synapse. *Nat Cell Biol* 2009; **11**:1332–9.
- 43 Le Bras S, Foucault I, Foussat A, Brignone C, Acuto O, Deckert M. Recruitment of the actin-binding protein HIP-55 to the immunological synapse regulates T cell receptor signaling and endocytosis. *J Biol Chem* 2004; **279**:15550–60.
- 44 Kirchgessner H, Dietrich J, Scherer J et al. The transmembrane adaptor protein TRIM regulates T cell receptor (TCR) expression and TCR-mediated signaling via an association with the TCR  $\zeta$  chain. *J Exp Med* 2001; **193**:1269–84.
- 45 Nishida E, Chen C, Morita A, Shimizu J. Inhibition of T cell activation through down-regulation of TCR-CD3 expression mediated by an anti-CD90 Ab. *Immunol Lett* 2011; **136**:163–70.
- 46 Chung J-S, Bonkobara M, Tomihari M, Cruz PD, Ariizumi K. The DC-HIL/syndecan-4 pathway inhibits human allogeneic T-cell responses. *Eur J Immunol* 2009; **39**:965–74.

## Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

**Figure S1.** Expression of SDC2 in resting and activated primary CD4<sup>+</sup> T cells.

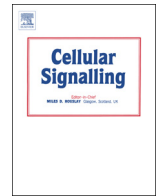
**Figure S2.** Expression of Fas, CD69, MHC class I, CD4 and transferrin receptor (TfR) in *sdc2*-transfected and control untransfected Jurkat cells as analysed by flow cytometry.

**Figure S3.** CD3-stimulation of CD4 T cells triggers T-cell receptor  $\zeta$  degradation.

**Figure S4.** Intracellular location of internalized CD3 $\epsilon$  in CD4 T lymphocytes.

**Figure S5.** SDC2-mediated T-cell receptor/CD3 down-regulation is independent of Arf6 activity.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.



# The PDZ-binding domain of syndecan-2 inhibits LFA-1 high-affinity conformation



Xavier Rovira-Clavé<sup>a</sup>, Maria Angulo-Ibáñez<sup>a</sup>, Manuel Reina<sup>a,1</sup>, Enric Espel<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Celltec-UB (Department of Cell Biology), Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain

<sup>b</sup> Department of Physiology and Immunology, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 27 January 2014

Accepted 16 March 2014

Available online 21 March 2014

### Keywords:

Proteoglycan

Integrin

Talin

Cell adhesion

## ABSTRACT

Syndecans are cell membrane proteoglycans that can modulate the activity and dynamics of some growth factor receptors and integrins. Here, we show the down-regulation of integrin lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) and inhibition of adhesion of Jurkat T cells transfected with syndecan-2. The PDZ-binding domain in the cytoplasmic region of syndecan-2 was necessary to block the LFA-1 high-affinity conformation, and to reduce cellular adhesion. A second cytoplasmic motif comprising tyrosines 179 and 191, and serines 187 and 188 contributed also to reduce LFA-1 function and cellular adhesion. Inhibition of the LFA-1 high-affinity conformation by syndecan-2 was independent of the expression of the talin head domain and RhoA, Rac1 and Cdc42 GTPases. These results demonstrate the importance of PDZ-binding domain of syndecan-2 for controlling LFA-1 affinity and cell adhesion.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

Successful leukocyte function depends on their ability to migrate into infected tissues through the endothelia and to establish appropriate cell–cell contacts [1]. In both cases, the capacity to adhere properly is a crucial point that is conditioned by integrins [2]. LFA-1 (CD11a, CD18) enables tight modulation of leukocyte adhesive capability [3]. During cell extravasation through the endothelia, LFA-1-mediated adhesion to the intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) is required for cell arrest [4,5]. Moreover, immunological synapse formation requires a close contact zone between the lymphocyte and antigen-presenting cell mediated by the LFA-1–ICAM-1 interaction [6,7]. LFA-1 adhesiveness is regulated by the modulation of affinity (conformation), avidity (clustering) and applied force [8–10]; however, the details of this regulation are not fully understood.

Syndecans (SDCs) are a family of heparan sulphate proteoglycans comprising four members (SDC1–4) with a common structure: an extracellular domain with heparan sulphate glycosaminoglycan chains

covalently attached, a single transmembrane domain and a short cytoplasmic domain [11]. The cytoplasmic tail is composed of one variable region that differs for each SDC (V region) flanked by two constant regions (C1 and C2). The C1 region contains one phosphorylatable tyrosine that, in the SDC4 case, is involved in the control of integrin recycling and cell movement [12]. Moreover, the C2 region is a PDZ-binding domain that controls also integrin recycling and cell adhesion and migration [13,14].

In the present work we studied the regulation of leukocyte integrins by SDC2 by analysing the adhesion properties of cells transfected with human SDC2.

## 2. Material and methods

### 2.1. Antibodies

The APC-conjugated anti-CD2 mAb (clone LT2), anti-CD11a monoclonal antibody (mAb; clone MEM-25), anti-CD18 mAb (clone MEM-48), FITC-conjugated anti-CD29 mAb (clone MEM-101A), FITC-conjugated anti-CD49d mAb (clone BU49), PE-conjugated anti-CD50 mAb (clone MEM-171), anti-CD54 mAb (clone 1H4) and PE-conjugated anti-CD58 mAb (clone MEM-63) were from Immunotools (Friesoythe, Germany). The high-affinity  $\beta_2$  integrin mAb24 was purchased from Novus Biologicals (Cambridge, UK). Alexa 488-labelled secondary antibodies were all from Invitrogen (Barcelona, Spain). The anti-SDC-2 mAb 186C (clone sdc2.1.186.CL.C) was described elsewhere [15]. IgG from mouse serum (ref. I5381) was from Sigma-Aldrich (Tres Cantos, Madrid, Spain).

**Abbreviations:** EGTA, ethylene glycol tetraacetic acid; HUVEC, human umbilical vein endothelial cell; ICAM-1, intercellular adhesion molecule 1; LFA-1, lymphocyte function-associated antigen 1; pLys, poly-D-lysine; PMA, phorbol-12-myristate-13-acetate; PtdIns [4,5]P<sub>2</sub>, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; SED, staphylococcal enterotoxin D; SDC, syndecan; VCAM-1, vascular cell adhesion molecule 1; VLA-4, very late antigen 4.

\* Corresponding author. Tel.: +34 93 402 1527.

E-mail addresses: [x.rovira.c@gmail.com](mailto:x.rovira.c@gmail.com) (X. Rovira-Clavé), [maria.angulib@gmail.com](mailto:maria.angulib@gmail.com) (M. Angulo-Ibáñez), [mreina@ub.edu](mailto:mreina@ub.edu) (M. Reina), [eespel@ub.edu](mailto:eespel@ub.edu) (E. Espel).

<sup>1</sup> Senior authors.

## 2.2. Cell culture

Primary human endothelial cells derived from umbilical veins (HUVEC) were provided by the Hospital Clinic (Universitat de Barcelona). HUVEC were cultured in Medium 199 (ref. BE12-119F, Lonza, Barcelona, Spain), supplemented with 20% FCS (ref. A15-101, GE Healthcare, Barcelona, Spain), 2 mM L-glutamine (ref. BE17-605E, Lonza), penicillin/streptomycin (ref. DE17-602E, Lonza), 20 mM HEPES (ref. BE17-737E, Lonza), 1 mM sodium pyruvate (ref. BE13-115E, Lonza), 100 µg/mL heparin (ref. H3149, Sigma-Aldrich) and 20 µg/mL Endothelial Cell Growth Supplement (ref. 02-102, Millipore, Madrid, Spain), and used between passages 3 and 6. Daudi B cells and Jurkat E6.1 human T cells were obtained from the European Collection of Cell Cultures (Sigma-Aldrich). Jurkat 8B is a CD4-negative Jurkat T cell line that is routinely used in our laboratory [15–17]. Both Jurkat cell lines (E6.1 and 8B) were used in all assays described in this study with analogous results, except in the static adhesion assay to HUVEC. Daudi cells and Jurkat cells were routinely grown in RPMI 1640 (ref. BE12-702F, Lonza) supplemented with 10% FCS, 2 mM L-glutamine and penicillin/streptomycin. The cells were maintained at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>.

## 2.3. Plasmids and transfections

Mutations of human wild-type *sdc2* cDNA were carried out by PCR amplification using mutated primers as described elsewhere [17]. In order to obtain stable cell lines, Jurkat cells were transfected by electroporation (Multiporator; Eppendorf, Madrid, Spain) and incubated in Geneticin (ref. 11811031, Gibco, Invitrogen, UK). A total of four Jurkat cell lines overexpressing wild-type SDC2, three Jurkat cell lines overexpressing SDC2(ΔEFYA) and one Jurkat cell line overexpressing SDC2(FAAF) were used in this study.

To study the role of RhoA, Rac1 and Cdc42, transient transfections were performed using the following plasmids: RhoA-T19N, RhoA-Q63L, Rac1-T17N, Rac1-Q61L, Cdc42-T17N and Cdc42-Q61L cloned into pcDNA3-EGFP expression vector. These plasmids were from Addgene (refs. 12967, 12968, 12982, 12981, 12976 and 12986 respectively, Cambridge, MA), deposited by Dr. G. Bokoch [18]. The plasmid coding for mouse EGFP-talin1-head was from Addgene (ref. 32856), deposited by Dr. A. Huttenlocher [19]. The plasmid coding for 2PH-PLCdelta-GFP was from Addgene (ref. 35142), deposited by Dr. S. Grinstein. Electroporation ( $6.25 \times 10^6$  cells/mL) was carried out with 10 µg of plasmids. Transfected cells were maintained in RPMI 1640–10% FCS without antibiotics for 24 h before use.

## 2.4. Flow cytometry

Jurkat T cells were incubated with saturating amounts of primary Ab in PBS–1% FCS for 30 min at 4 °C, washed and incubated with Alexa 488-conjugated secondary Ab in PBS–1% FCS for 30 min at 4 °C in the dark. Non-specific fluorescence was assessed by incubating cells only with the same Alexa 488-conjugated anti-mouse Ig Ab (grey histograms in all FACS figures).

For detection of high-affinity LFA-1, primary mAb24 was mixed with Alexa 488-conjugated secondary Ab in PBS for at least 30 min at RT in the dark, in the presence or absence of 1 mM Mg<sup>2+</sup> and 1 mM ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA) (ref. E4378, Sigma-Aldrich). Jurkat cells were activated or not with 10 ng/mL phorbol myristate acetate (PMA) (ref. P8139, Sigma-Aldrich) at 37 °C for 30 min. The cells were washed twice with PBS and stained for 20 min at 37 °C in the dark with the antibody mix. Non-specific fluorescence was determined by incubating cells with an antibody mix in which primary mAb24 was replaced by non-specific IgG.

For intracellular labelling, cells were fixed in 1% paraformaldehyde in PBS for 20 min at room temperature, then washed and permeabilized with 0.2% saponin in PBS–1% FCS (permeabilization buffer) for 30 min in ice. Cells were centrifuged and resuspended in permeabilization buffer

containing primary Ab for 1 h at 4 °C. Then, cells were washed and treated with secondary Ab conjugated to Alexa 488 in permeabilization buffer for 45 min at 4 °C. Cells were washed with permeabilization buffer for 45 min at room temperature, resuspended in PBS–1% FCS and analysed by flow cytometry. Non-specific fluorescence was calculated by incubating cells with a non-specific IgG (clone NCG01 for mouse Abs) followed by staining with the same Alexa 488-conjugated Ab.

Flow cytometry experiments used a Cytomics FC500 MPL or a Gallios flow cytometer (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA). The sample was excited by a 488 nm air-cooled argon-ion laser (Cytomics) or 488 nm and 635 nm lasers (Gallios). Fluorescence was collected on the logarithmic scale. Optical alignment was checked with 10 nm fluorescent beads (Flow-Check fluorospheres, Beckman Coulter). The cell population was selected by gating in a forward scatter vs. side scatter dot plot, excluding aggregates and cell debris. Fluorescence histograms were represented in single-parameter histograms (1024 channels) and dual-parameter histograms of green vs. orange fluorescence, in order to distinguish auto-fluorescence from Alexa 488 fluorescence.

## 2.5. Static adhesion assay

HUVECs were cultured in a 96-well plate at a density of  $0.5 \times 10^4$  cells/well, until they reached 90% confluence, and were then activated or not with 1 ng/mL TNF-α. After 18 h, the wells were washed twice with warm RPMI 1640. Jurkat T cells were washed, stained in 1 mL RPMI 1640 containing 2 µM Calcein-AM stock (ref. 56496, Invitrogen) and activated or not with 10 ng/mL PMA at 37 °C for 30 min. The labelled Jurkat T cells were washed and incubated with HUVECs for 1 h at 37 °C. Each condition was performed at least in quintuplicate. After incubation of the Jurkat T cells with confluent HUVEC monolayers, the “total fluorescence” was quantified using a fluorescence plate reader at 490 nm excitation and 520 nm emission. The medium containing non-attached Jurkat T cells was removed and the cells remaining in the wells were washed carefully with PBS. The remaining adherent cells were visualized by fluorescence microscopy and quantified using a fluorescence plate reader. The percentage of Jurkat T cell adhesion to HUVEC was calculated using the formula: Adhesion (%) = (“fluorescence of adherent cells” / “total fluorescence”) \* 100.

## 2.6. RNA isolation, cDNA synthesis, and real-time quantitative RT-PCR

Cells were lysed, their total RNA was reverse-transcribed (SuperScript III, ref. 11752-050; Invitrogen) and real-time PCR was performed with SYBR Green-based detection (ref. 11761-500; Invitrogen). The oligonucleotides used for SDC-2 were 5'-TCGGCGGAGTCCGAGCAGAG-3' (sense) and 5'-CAGAAGCGTAGTCATCGTCATCA-3' (antisense). The oligonucleotides used for CD11a were 5'-AAATGGAAGGACCCTGATGCTC-3' (sense) and 5'-TGTAGCGGATGATGTCTTTGGC-3' (antisense). The oligonucleotides used for CD18 were 5'-GTGCTGAAGCTGACCAACAA-3' (sense) and 5'-AAATGGAAGCCGTCATCAGT-3' (antisense). For all samples, the expression levels were normalized to 18S, and the oligonucleotides were from TATAA (ref. RRN18S; TATAA Biocenter, Tebu-bio, Barcelona, Spain). The relative quantification value was calculated as described elsewhere [17].

## 2.7. Conjugation assay

Daudi B cells were labelled with PKH67 (ref. PKH67-GL, Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions, incubated in the presence or absence of 1 µg/mL staphylococcal enterotoxin D (SED) (ref. DT303, Toxin Technology, Sarasota, FL) superantigen at 37 °C for 30 min, and then washed and resuspended at a density of  $10^6$  cells/mL in RPMI 1640. Jurkat cells were stained with Hoechst 33342 (ref. B2261, Sigma-Aldrich) at 37 °C for 30 min, and then washed and resuspended at a density of  $10^6$  cells/mL in RPMI 1640. For Jurkat–Daudi conjugation equal volumes of Jurkat cells and Daudi cells were thoroughly

mixed and centrifuged at 20 °C for 5 min. Cell mixtures were incubated at 37 °C for 30 min and then vigorously pipetted. The relative proportion of green, blue and green–blue populations was determined using a Gallios flow cytometer.

### 2.8. Cell spreading

Jurkat cells were labelled with PKH67 and stimulated or not with 10 ng/mL PMA at 37 °C for 30 min. Cells were then allowed to adhere to poly-D-lysine (pLys) (ref. 354210, Becton Dickinson, Madrid, Spain) glass coverslips for 4 h at 37 °C. Coverslips were prepared by coating them with 10 µg/mL pLys for 2 h at 37 °C. Cells were visualized with an Olympus BX61 epifluorescence microscope (Tokyo, Japan) using a ×50 objective and images were taken with an Olympus DP70 (Tokyo, Japan).

### 2.9. Immunofluorescence and confocal imaging

Jurkat cells were incubated in the presence or absence of 10 ng/mL PMA at 37 °C for 30 min, and then washed and labelled with primary Ab against CD11a or CD18 in PBS–1% FCS at 4 °C. After 30 min, the cells were washed and stained with Alexa 488-conjugated secondary Ab in PBS–1% FCS for 30 min at 4 °C in the dark. Finally, the cells were washed and resuspended in 7 µL of Fluoromont mounting medium, applied to microscope slides, and covered with coverslips. Immunostained samples were viewed under a Leica TCS-SPE confocal microscope with an Argon-Krypton laser and a 60× (NA 0.7, oil) Leitz Plan-apochromatic objective, at room temperature. Pictures were acquired using the Leica Application Suite software. Final images were processed by ImageJ software.

### 2.10. Statistical analysis

Statistical analysis was carried out by calculating the average and s.d. of independent experiments. The unpaired t-test was used to calculate p-values.  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

## 3. Results

### 3.1. Engagement of SDC2 increases cell polarization

To study the contribution of SDC2 to cell adhesion, we transfected Jurkat T cells with *sdc2*. Jurkat T cells exhibited undetectable levels of endogenous SDC2 at the cell surface as analysed by flow cytometry, although the mRNA was perceptible by RT-PCR (Suppl. Fig. 1B, C). Upon transfection of full-length human *sdc2* cDNA, stable cell lines were obtained that expressed abundant SDC2 mRNA but discrete cell surface densities of SDC2 (Suppl. Fig. 1C, D). All stably transfected cell lines described in this work, with the exception of one (A21, Suppl. Fig. 1D), showed a SDC2 expression level comparable to that of human T cells [15,17].

During cell adhesion, the SDCs modulate the activity of integrins [2]. We first evaluated the role of SDC2 in mediating cell adhesion independently of integrin contributions by using the non-biological substratum pLys, which is a high-affinity SDC ligand [20] (Suppl. Fig. 1E) that does not engage integrins. Previous reports described increased cellular spreading of SDC-1- and SDC-3-expressing cells on pLys [20,21], as well as on plates coated with anti-SDC Ab [22,23]. We seeded *sdc2*-transfected cells (Jurkat-SDC2) onto pLys, and these cells rapidly showed a spreading morphology with several cellular protrusions after a PMA treatment. Unlike wild-type Jurkat, which are usually spherical, after 4 h of incubation the majority of Jurkat-SDC2 showed a polarized morphology indicating contractile activity in their cytoskeleton (Fig. 1A). These results indicate that specific ligation of SDC2 can lead to cell spreading and polarization and suggest a possible role for this molecule in T cell adhesion.

### 3.2. SDC2 expression reduces adhesion of Jurkat T cells to endothelial cells

We next analysed whether SDC2 can modulate the adhesion of T cells to primary endothelial cells. To do this, we performed a static adhesion assay of Jurkat-SDC2 to HUVEC. Interestingly, ectopic expression of SDC2 led to a ~33% decrease in the adhesion of Jurkat T cells to HUVEC (Fig. 1B). The same response was observed with every cell line tested (Suppl. Fig. 2A), suggesting that SDC2 decreases the expression and/or inhibits the function of adhesion molecules.

As integrins play a major role in T cell adhesion to endothelia [4], we evaluated the nature of integrin involvement in the adhesion between Jurkat-SDC2 and endothelial cells. Jurkat-SDC2 cells were stimulated with PMA, which activates the integrins, and the adhesion of Jurkat to endothelial cells subsequently increased (Suppl. Fig. 2B). However, even after PMA stimulation, Jurkat-SDC2 cells adhered less well to endothelial cells than wild-type Jurkat (Fig. 1B, Suppl. Fig. 2A, B).

The inhibitory effect of SDC2 was also observed when examining the adhesion of Jurkat-SDC2 to inflamed endothelia. Indeed, although TNF stimulation of endothelial cells increased the adhesion of Jurkat and Jurkat-SDC2 (Suppl. Fig. 2B), the latter adhered significantly less well (Fig. 1B). TNF-stimulated endothelial cells show increased leukocyte adherence by means of increased expression of the integrin ligands ICAM-1 and VCAM-1 [24], and therefore the lower adhesion of Jurkat-SDC2 to endothelial cells under the different conditions assayed suggests that integrin function is impaired in Jurkat-SDC2.

### 3.3. SDC2 expression impairs T cell conjugation to B cells

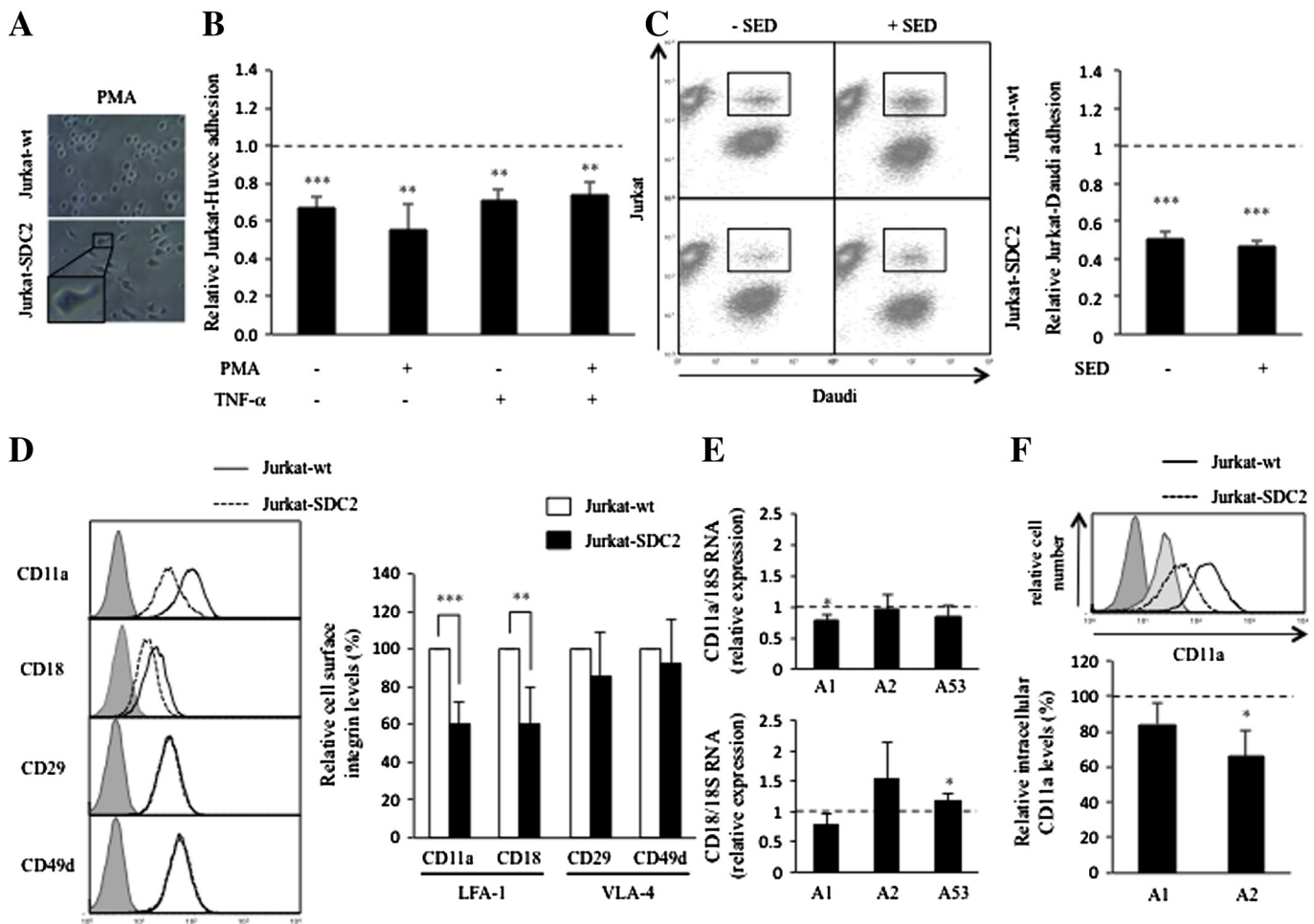
We then analysed the adhesion of SDC2-expressing T cells to a different cellular model. T–B-cell adhesion is the first step in the formation of the immune synapse [6], a context in which correctly activated LFA-1 is indispensable [7]. We therefore assessed whether the inhibitory effect of SDC2 on Jurkat adhesion to HUVEC is observed when Jurkat cells conjugate to Daudi B cells loaded with SED superantigen. Interestingly, quantitative analysis by FACS revealed that the conjugation of Jurkat-SDC2 cells to Daudi B cells was significantly reduced compared to that of wild-type Jurkat (Fig. 1C). Moreover, this phenomenon was observed regardless of whether B cells were superantigen-loaded or not. This finding correlates with the impaired adhesion of Jurkat to endothelial cells and suggests an inhibitory role for SDC2 during cell adhesion.

### 3.4. SDC2 expression decreases the LFA-1 surface density

Previous studies demonstrated that SDCs are required for the normal membrane expression of some growth factor receptors [13,17] and for the control of integrin trafficking [12]. Thus, we determined whether the inhibitory effect of SDC2 on Jurkat adhesion to HUVEC and B cells was a consequence of the down-regulation of integrin. The cell surface levels of the LFA-1 subunits  $\alpha_1$  (CD11a) and  $\beta_2$  (CD18) and the VLA-4 subunits  $\alpha_4$  (CD49d) and  $\beta_1$  (CD29) were determined by flow cytometry. Interestingly, in comparison to wild-type Jurkat, the cell surface levels of CD11a and CD18 in Jurkat-SDC2 cells were significantly diminished, whereas the amount of integrin VLA-4 was the same (Fig. 1D). Moreover, other cell membrane adhesion proteins like LFA-2, LFA-3, ICAM-1 and ICAM-3 were not down-regulated (Suppl. Fig. 3). The reduction of LFA-1 levels on the cell surface of Jurkat-SDC2 correlates with the observed reduction of adhesion to HUVEC and to B cells (Fig. 1B, C).

To determine the mechanism of LFA-1 down-regulation in Jurkat-SDC2 cells we analysed the steady-state levels of mRNA. The reduced amount of LFA-1 surface expression in Jurkat-SDC2 was not a consequence of lower transcriptional expression, since the CD11a and CD18 mRNA levels in Jurkat-SDC2 were similar to those of wild-type Jurkat cells (Fig. 1E). The down-regulation of surface CD11a in Jurkat-SDC2 cells showing unaltered CD11a mRNA levels suggests that CD11a could be retained intracellularly. Indeed, SDCs can control integrin recycling in a syntenin-Arf6-dependent manner [12,13]. However, the





**Fig. 1.** SDC2 impairs T cell adhesion and down-regulates LFA-1. (A) Jurkat T cell adhesion to pLys. Representative images of Jurkat-SDC2 and wild-type Jurkat cells (Jurkat-wt) stimulated for 30 min at 37 °C with PMA (10 ng/mL) and allowed to adhere to pLys-coated glass coverslips for 4 h. (B) Jurkat T cell adhesion to HUVEC. Jurkat cells were stained with Calcein-AM and activated or not with PMA (10 ng/mL). The stained cells were placed onto the HUVEC monolayer previously stimulated or not with TNF- $\alpha$  (1 ng/mL), and incubated for 1 h at 37 °C. The adhered cells were quantified using a fluorescence plate reader. Data are expressed as the mean of adhesion  $\pm$  SD of three Jurkat-SDC2 clones, each one analysed in at least two independent experiments performed in quintuplicate, and normalized to Jurkat-wt, which was given an arbitrary value of 1.0 (dotted line). (C) Jurkat T cell adhesion to Daudi B cell. (Left) A representative plot of T-B conjugate formation  $\pm$  SED superantigen. The boxed areas indicate double-positive events. (Right) Mean of conjugate formation  $\pm$  SD of three independent experiments with one Jurkat-SDC2 clone, normalized to Jurkat-wt, which was given an arbitrary value of 1.0 (dotted line). (D) Expression of LFA-1 (CD11a and CD18) and VLA-4 (CD29 and CD49d) at the cell surface as analysed by flow cytometry. (Left) Representative histograms of cell surface staining. (Right) Quantification of FACS staining. The mean fluorescence intensity (MFI) is represented as a percentage of the value obtained with Jurkat-wt. Mean  $\pm$  SD of four Jurkat-SDC2 clones, each one analysed in at least three independent experiments. (E) LFA-1 mRNA expression as analysed by reverse transcription and real-time PCR. CD11a: 18S and CD18: 18S values were calculated and normalized to Jurkat-wt, which was given an arbitrary value of 1.0 (dotted line). The analysis was repeated with three different Jurkat-SDC2 clones and the average  $\pm$  SD of three independent experiments is presented. (F) Expression of total CD11a (extracellular and intracellular). (Top) Representative histograms. Cells were fixed, permeabilized and incubated with anti-CD11a or isotype-matched control primary antibody plus Alexa 488-conjugated F(ab')<sub>2</sub> anti-mouse antibody. (Bottom) Quantification of FACS staining. The MFI is represented as a percentage of the value obtained with Jurkat-wt. The analysis was repeated with two different Jurkat-SDC2 clones and the average  $\pm$  SD of three independent experiments is presented. \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001.

lower surface amount of CD11a in Jurkat-SDC2 was not caused by its intracellular retention (Fig. 1F). Taken together, these results suggest that CD11a down-regulation in Jurkat-SDC2 cells could be caused by a decline in the translation of CD11a mRNA or by reduced CD11a protein stability.

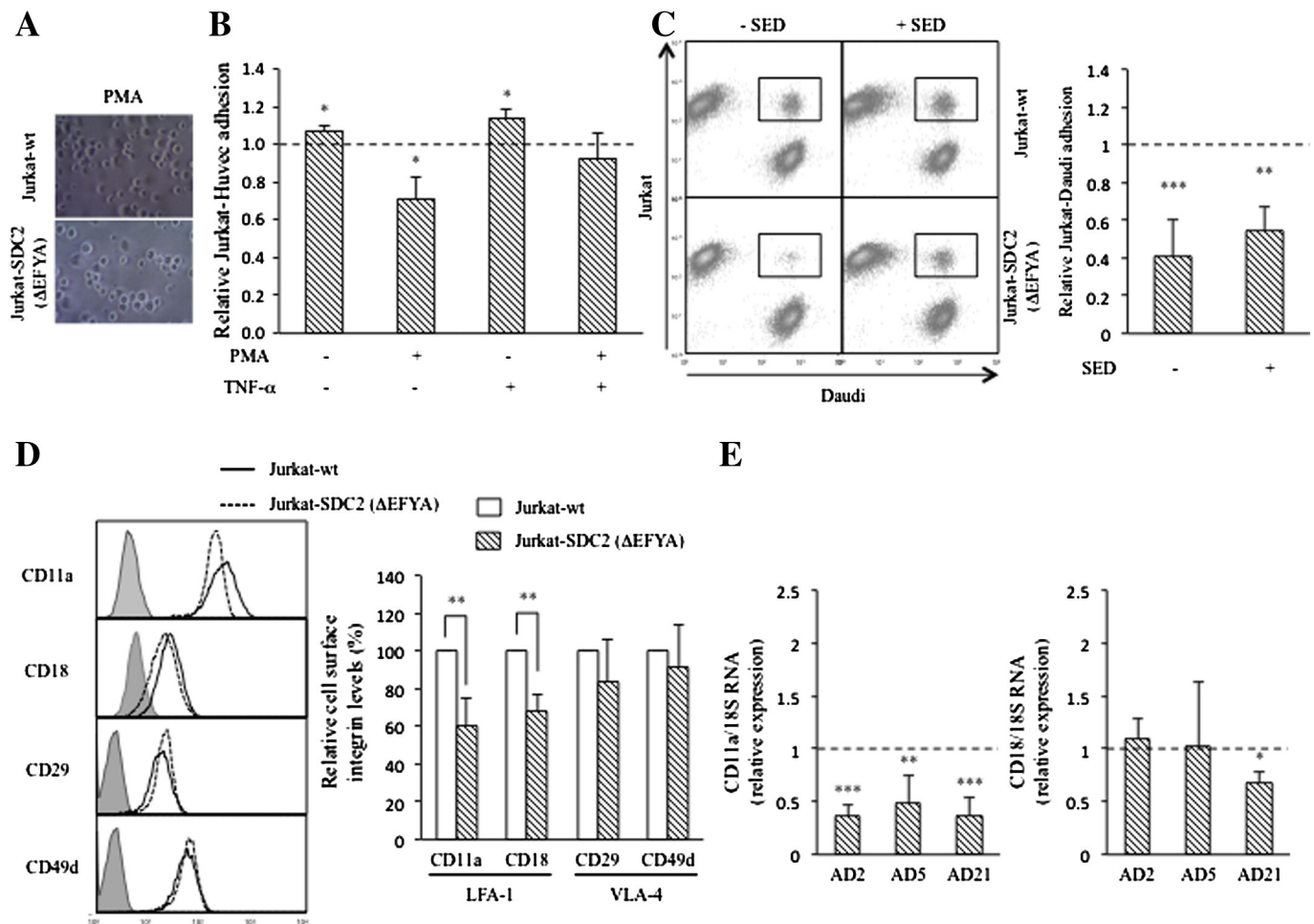
### 3.5. Role of PDZ-binding domain of SDC2 in cell adhesion

Syntenin binding to the PDZ-binding domain of SDCs participates in the control of integrin recycling, adhesion and cell migration [3,4]. To test the role of the PDZ-binding domain in the inhibitory effect of SDC2 on adhesion, cells were transfected with a mutant *sdc2* without the EFYA domain (*sdc2*( $\Delta$ EFYA)) (Suppl. Fig. 1).

Jurkat-SDC2( $\Delta$ EFYA) cells activated with PMA and seeded onto pLys did not show a polarized morphology (Fig. 2A), indicating an altered pattern of intracellular signalling in Jurkat-SDC2( $\Delta$ EFYA) compared to Jurkat-SDC2. Moreover, adhesion of SDC2( $\Delta$ EFYA)-expressing cells to

resting and to TNF-stimulated HUVEC increased in comparison to Jurkat-SDC2, eliminating the negative effect of wild-type SDC2 and recovering the adhesion levels observed in wild-type Jurkat (Fig. 2B, Suppl. Fig. 2C, D). This indicates that the PDZ-binding domain of SDC2 participates in the inhibition of cell adhesion. However, Jurkat-SDC2( $\Delta$ EFYA) cells stimulated with PMA adhered weakly to endothelial cells (Fig. 2B), suggesting that additional regulatory elements present in the SDC2( $\Delta$ EFYA) cytoplasmic domain were uncovered by PMA stimulation. These results indicate that SDC2 inhibits the adhesion of Jurkat to endothelial cells through the PDZ-binding domain and suggest the presence of additional regulatory cytoplasmic motifs.

To determine whether the deletion of the PDZ-binding domain would improve the adhesion of Jurkat-SDC2 to Daudi B cells, we performed a conjugation assay. A lower percentage of T-B conjugation was observed between Jurkat-SDC2( $\Delta$ EFYA) and Daudi B cells compared to wild-type Jurkat (Fig. 2C), in both SED-loaded and -unloaded Daudi B cells. This result is consistent with the observed inhibition of



**Fig. 2.** PDZ-binding domain of SDC2 regulates T cell adhesion. (A) Jurkat T cell adhesion to pLys. Representative images of Jurkat cells treated as in Fig. 1A and allowed to adhere to pLys-coated glass coverslips. (B) Jurkat T cell adhesion to HUVEC. Jurkat cells were stained with Calcein-AM and treated as in Fig. 1B. Data are expressed as the mean of adhesion  $\pm$  SD of three Jurkat-SDC2( $\Delta$ EFYA) clones, each one analysed in at least three independent experiments performed in quintuplicate, normalized to Jurkat-wt, which was given an arbitrary value of 1.0 (dotted line). (C) Jurkat T cell adhesion to Daudi B cell. (Left) A representative plot of T-B conjugate formation  $\pm$  SED superantigen. The boxed areas indicate double-positive events. (Right) Mean of conjugate formation  $\pm$  SD of three independent experiments with one Jurkat-SDC2( $\Delta$ EFYA) clone, normalized to Jurkat-wt, which was given an arbitrary value of 1.0 (dotted line). (D) Expression of LFA-1 (CD11a and CD18) and VLA-4 (CD29 and CD49d) at the cell surface as analysed by flow cytometry. (Left) Representative histograms of cell surface staining. (Right) Quantification of FACS staining. The MFI is represented as a percentage of the value obtained with Jurkat-wt. Mean  $\pm$  SD of three Jurkat-SDC2( $\Delta$ EFYA) clones, each one analysed in at least three independent experiments. (E) LFA-1 mRNA expression as analysed by reverse transcription and real-time PCR. CD11a: 18S and CD18: 18S values were calculated and normalized to Jurkat-wt, which was given an arbitrary value of 1.0 (dotted line). The analysis was repeated with three different Jurkat-SDC2( $\Delta$ EFYA) clones and the average  $\pm$  SD of three independent experiments is presented. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

adhesion to endothelial cells when SDC2( $\Delta$ EFYA)-transfected Jurkat cells were stimulated with PMA, further confirming that in addition to the EFYA sequence other SDC2 cytoplasmic motifs are inhibitory.

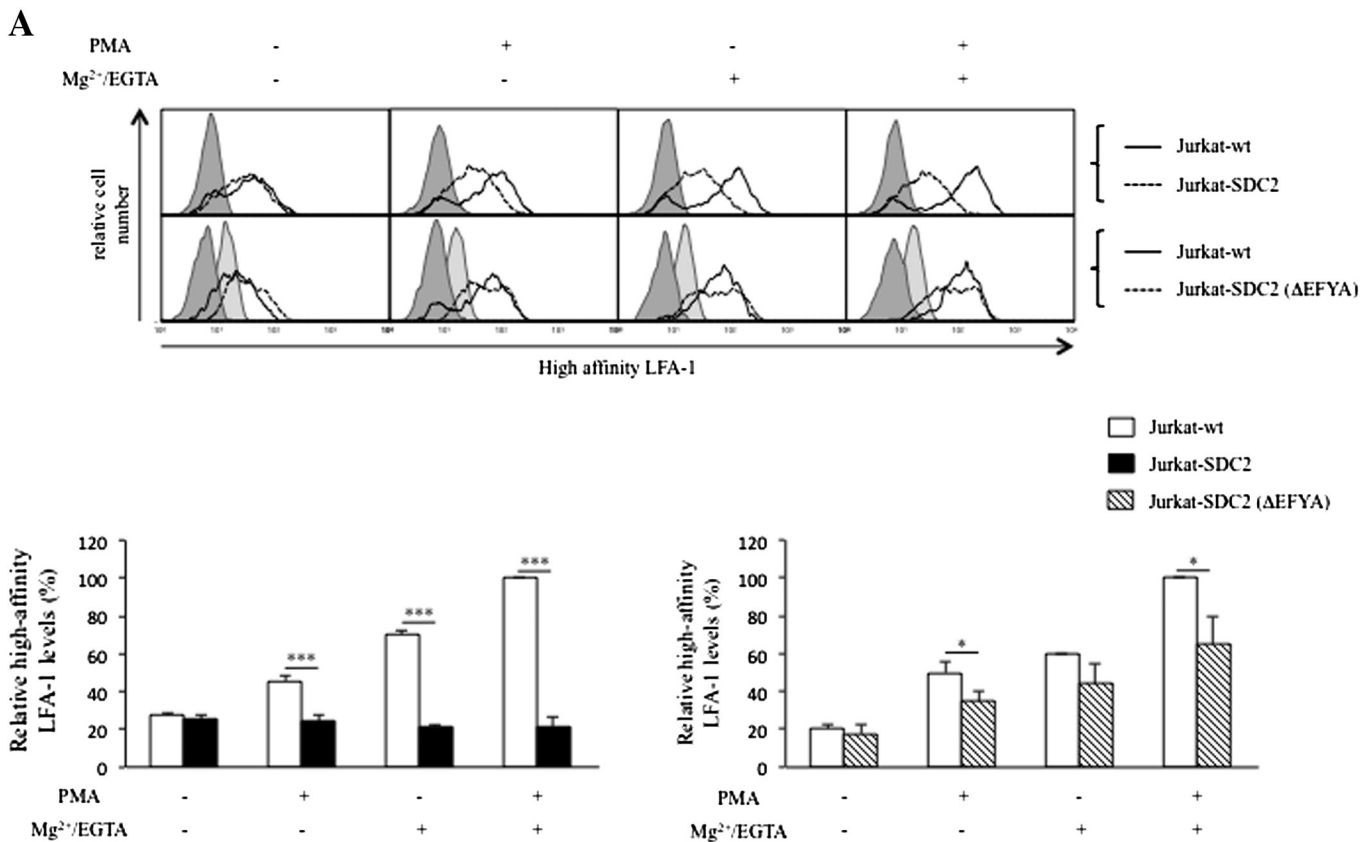
The recovered adhesion of Jurkat-SDC2( $\Delta$ EFYA) cells to endothelia suggested the parallel reconstitution of surface LFA-1 levels. Intriguingly, the surface expression of LFA-1 in Jurkat-SDC2( $\Delta$ EFYA) cells was as low as in Jurkat-SDC2 (Fig. 2D), suggesting that the potential negative effect of lower LFA-1 levels in Jurkat-SDC2( $\Delta$ EFYA) cells on adhesion is neutralized by a compensatory mechanism such as the activation status of LFA-1 or its level of clustering (see below). Moreover, in contrast to Jurkat-SDC2 cells, the steady-state levels of CD11a mRNA in Jurkat-SDC2( $\Delta$ EFYA) cells were significantly diminished (Fig. 2E); however, CD18 mRNA levels were unaltered. Whether the signals generated by SDC2( $\Delta$ EFYA) led to enhanced CD11a mRNA degradation or to reduced transcription of *cd11a* remains to be determined.

### 3.6. SDC2 impairs LFA-1 high-affinity conversion by PMA and $Mg^{2+}$ , but not LFA-1 clustering, through the PDZ-binding domain

The above results show that Jurkat-SDC2( $\Delta$ EFYA) cells adhere better to endothelial cells than Jurkat-SDC2 (Figs. 1B, 2B), despite

expressing comparable LFA-1 surface densities (Figs. 1D, 2D). LFA-1 adhesiveness is regulated by the modulation of affinity (conformation) and avidity (clustering) [9]. Therefore, we hypothesized that changes in LFA-1 affinity or avidity accounted for the observed difference in adhesion between Jurkat-SDC2 and Jurkat-SDC2( $\Delta$ EFYA) cells. When T cells come into contact with chemokines present on the endothelial cell surface glycocalyx [4], this leads to inside-out activation of LFA-1 affinity or clustering, and the presence of SDC2 could act as a modulator of the clustering or conformational state of LFA-1.

To test this notion, we quantified the activation state of LFA-1 using the activation state-specific mAb24 antibody [25] that binds to activated  $\beta_2$  I domains [26]. We observed that unstimulated Jurkat-SDC2( $\Delta$ EFYA), Jurkat-SDC2 and wild-type Jurkat contained similar basal levels of high-affinity LFA-1 (Fig. 3A). We then stimulated inside-out signalling by PMA treatment and used the integrin activator  $Mg^{2+}$  [25]. Both treatments alone or in combination increased the affinity of LFA-1 in wild-type Jurkat and, to a lesser extent, also in Jurkat-SDC2( $\Delta$ EFYA) (Fig. 3A and Suppl. Fig. 4). In contrast, the affinity of LFA-1 in Jurkat-SDC2 could not be improved by any of these treatments (Fig. 3A and Suppl. Fig. 4).



**Fig. 3.** SDC2 expression on Jurkat T cells regulates LFA-1 affinity, but not LFA-1 clustering, through the PDZ-binding domain. (A) Detection of LFA-1 high-affinity conformation. (Top) Jurkat cells were stimulated or not for 30 min with PMA (10 ng/mL) at 37 °C, incubated with the LFA-1 high-affinity epitope reporter (mAb24) and stained with Alexa 488-conjugated F(ab')<sub>2</sub> anti-mouse antibody in the presence or absence of 1 mM Mg<sup>2+</sup> and 1 mM EGTA, followed by flow cytometry analysis. (Bottom) Quantification of FACS staining. The MFI is represented as a percentage of the value obtained in Jurkat-wt stimulated with PMA and Mg<sup>2+</sup>-EGTA. The results are the mean ± SD of three independent experiments with one Jurkat-SDC2 clone and one Jurkat-SDC2(ΔEFYA) clone. The p-values from the t-tests between experiments represented by bars of the same colour are shown in [Supplementary Fig. 4](#). (B) Distribution of surface CD11a and CD18. Jurkat cells were stimulated or not with PMA (10 ng/mL) at 37 °C for 30 min, stained with anti-CD11a or anti-CD18 antibodies and analysed as indicated in the methods. Scale bar: 10 μm. \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001.

Moreover, although the affinity of LFA-1 in Jurkat-SDC2(ΔEFYA) cells increased following PMA treatment (Fig. 3A and Suppl. Fig. 4), it did not reach the activation levels of wild-type Jurkat cells, correlating with the adhesion differences observed between PMA-stimulated wild-type Jurkat and Jurkat-SDC2(ΔEFYA) cells (Fig. 2B), and suggesting that additional inhibitory elements are present in the SDC2 cytoplasmic domain, with their effect being potentiated by phorbol ester stimulation.

We also analysed the degree of LFA-1 clustering in cells. PMA, which is known to regulate integrin clustering on the cell surface, was used to activate cells. However, no differences in the level of LFA-1 clustering among the different cell types were observed (Fig. 3B). Overall, these results indicate that LFA-1 in Jurkat-SDC2 is locked in a low-affinity closed conformation and that the SDC2 PDZ-binding motif plays a major role in maintaining this low-affinity conformation.

### 3.7. Talin1 head domain does not rescue LFA-1 affinity in Jurkat-SDC2 cells

The activation of integrin affinity by inside-out signalling is mediated by talin [27]. The talin head domain regulates integrin clustering and affinity [28,29], and is necessary for LFA-1 activation via inside-out signalling [19]. To identify a potential role of talin1 in the inhibition of the LFA-1 high-affinity conformation by SDC2, we transfected a cDNA coding for talin1 head fused to EGFP to wild-type Jurkat and Jurkat-SDC2 (Suppl. Fig. 5A). Cells were then stimulated with PMA and Mg<sup>2+</sup> to activate the high-affinity conformation of LFA-1 and were stained with the affinity reporter mAb24. Surprisingly, overexpression of the talin head

domain did not increase the levels of high-affinity LFA-1 in Jurkat-SDC2 cells (Fig. 4A), indicating that LFA-1 is locked in a bent conformation.

Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PtdIns[4,5]P<sub>2</sub>) can promote talin binding to the integrin β chain [30] and SDCs modulate PtdIns [4,5]P<sub>2</sub> intracellular traffic [31]. Therefore we hypothesized that in Jurkat-SDC2 cells the distribution of PtdIns[4,5]P<sub>2</sub> could be altered by the presence of SDC2 and be inaccessible to talin1 and LFA-1. To test this hypothesis, we visualized the PtdIns[4,5]P<sub>2</sub> pools by cellular expression of the pleckstrin homology domain of phospholipase C fused to GFP [32]. The distribution of PtdIns[4,5]P<sub>2</sub> in Jurkat-SDC2 and wild-type Jurkat cells was similar, with major localization at the plasma membrane (Fig. 4B). This indicates that the lack of effect of overexpressing talin head in Jurkat-SDC2 cells is not due to major differences in the cellular distribution of PtdIns[4,5]P<sub>2</sub>. Therefore, the lack of activation of high-affinity LFA-1 in Jurkat-SDC2 cells expressing a constitutively active talin head domain suggests that LFA-1 pools are not accessible to the expressed talin head domain.

### 3.8. Expression of Rac1, RhoA and Cdc42 does not rescue LFA-1 affinity in Jurkat-SDC2 cells

We next focused on three small GTPases known to participate in the control of integrin function [33], to investigate whether they might be involved in the deregulated LFA-1 activity in Jurkat-SDC2 cells. SDC-4 mediates the activation of RhoA and Rac1 and regulates directional migration in response to extracellular matrix [34]. Furthermore, the engagement of RhoA and Rac1 activity has been linked to

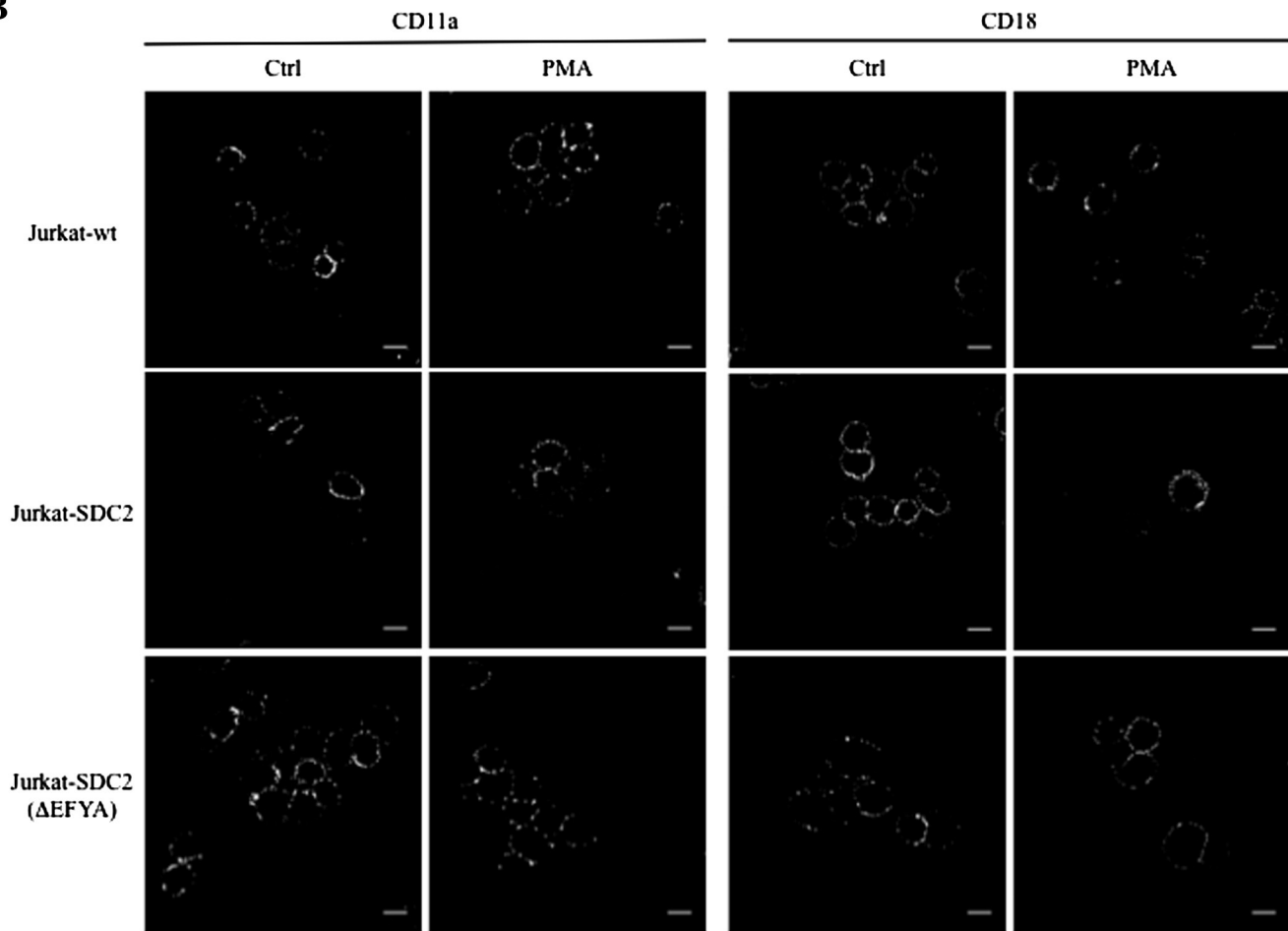
**B**

Fig. 3 (continued).

the process of adhesion and modulation of integrin activity [33]. Thus, we overexpressed constitutively active *rhoA-Q63L* and *rac1-Q61L* or dominant-negative *rhoA-T19N* and *rac1-T17N* cDNA mutants fused to *EGFP* to determine whether the inhibition of LFA-1 by SDC2 could be prevented (Suppl. Fig. 5B). Neither expression of inhibitory nor activating RhoA or Rac1 had any effect on the inhibition of high-affinity LFA-1 by SDC2 (Fig. 4C).

Previous studies have reported that Cdc42, a Rac1-related small GTPase, is a negative regulator of LFA-1 affinity [33]. Moreover, SDC2 overexpression in COS-1 cells correlates with the activation of Cdc42 [35], which is required for the induction of filopodia. To test whether the LFA-1 low-affinity conformation in Jurkat-SDC2 is due to activation of Cdc42, we overexpressed dominant-negative *cdc42-T17N* fused to *EGFP* (Suppl. Fig. 5B). Compared to untransfected cells, *cdc42-T17N*-transfected Jurkat-SDC2 did not show any change in the closed conformation of LFA-1 (Fig. 4C). Furthermore, overexpression of a constitutively active-mutant *cdc42-Q61L* (Suppl. Fig. 5B) did not change the basal affinity of LFA-1 in Jurkat-SDC2 cells (Fig. 4C). These data collectively suggest that the small GTP binding proteins, RhoA, Rac1 and Cdc42, do not play a role in the capacity of SDC2 to inhibit the LFA-1 high-affinity conformation.

### 3.9. Role of SDC2 cytoplasmic tyrosines and serines in cell adhesion

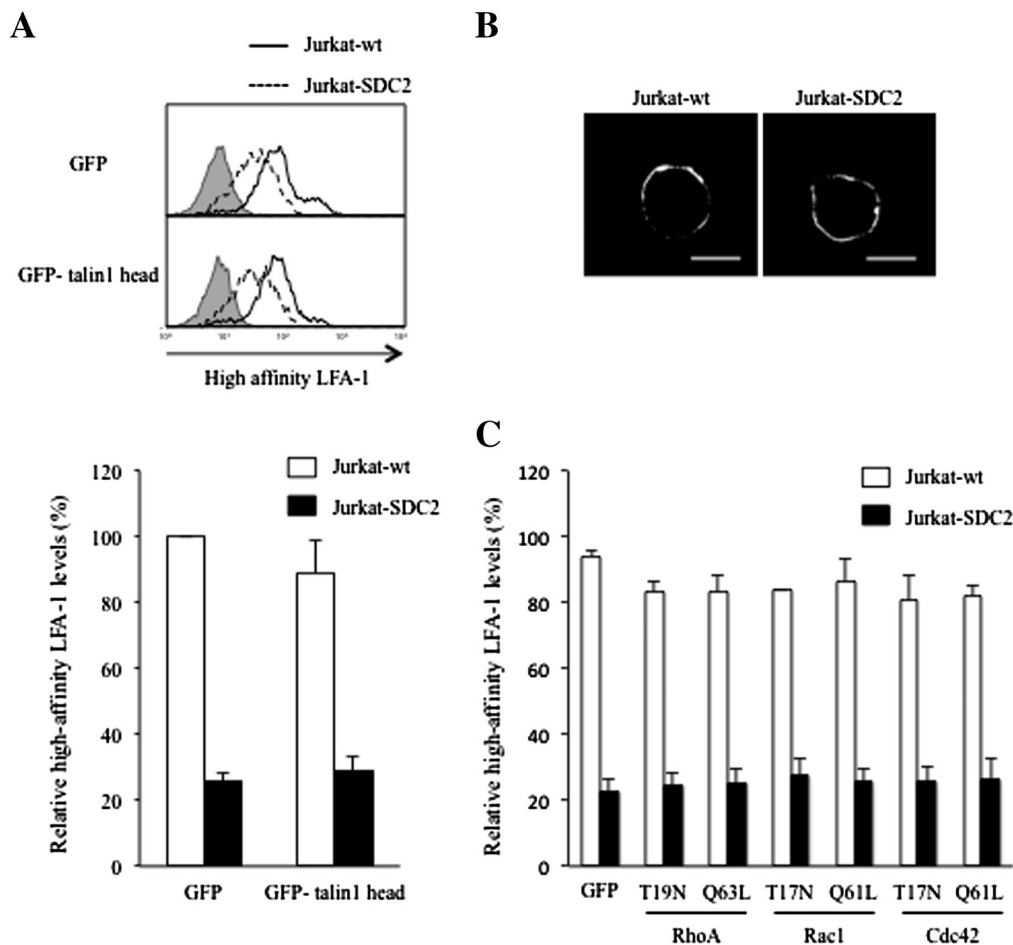
The incomplete recovery of adhesion of PMA-stimulated Jurkat-SDC2(ΔEFYA) cells to HUVEC (Fig. 2B) suggested that signalling motifs other than the PDZ-binding domain in the SDC2 cytoplasmic domain play a role in adhesion. Indeed, published data indicate that the

phosphorylation of tyrosine 180 (a tyrosine that is conserved in all four SDCs) in the cytoplasmic region of SDC4 determines integrin recycling and cell movement [12]. Moreover, phosphorylation of SDC2 by EphB2 receptor tyrosine kinase is required for SDC2 clustering and spine formation [36]. To determine the role played by the SDC2-conserved tyrosines 179, 191 and the specific serines 187 and 188, they were mutated to Phe and Ala, respectively. The mutant *sdc2(FAAF)* was stably transfected into Jurkat (Jurkat-SDC2(FAAF)) and adhesion to endothelial cells and Daudi B cells was determined. The pattern of adhesion of Jurkat-SDC2(FAAF) cells was related to that of Jurkat-SDC2, showing a decreasing trend in the four experimental conditions assayed, though the differences in adhesion reach significance only when Jurkat and HUVEC were stimulated (Fig. 5A). Curiously, although the adhesion of Jurkat-SDC2(FAAF) to unstimulated Daudi B cells was impaired, upon SED stimulation, Jurkat-SDC2(FAAF) cells adhered to Daudi B cells almost as well as wild-type Jurkat cells (Fig. 5B). Jurkat-SDC2(FAAF) cells also showed CD11a down-regulation (Fig. 5C), but this was not due to mRNA inhibition (Fig. 5D).

Furthermore, as observed in Jurkat-SDC2(EFYA) cells, expression of *sdc2(FAAF)* did not lock LFA-1 into a low-affinity conformation (Fig. 5E and Suppl. Fig. 4). When cells were treated with PMA and/or  $Mg^{2+}$ , the affinity of LFA-1 increased, but not as much as in wild-type Jurkat cells.

## 4. Discussion

To examine the role of SDC2 in cell adhesion we chose two cellular models: adhesion to endothelia and adhesion to B cells. Although SDC2 has been reported to have an enhancing role in adhesion



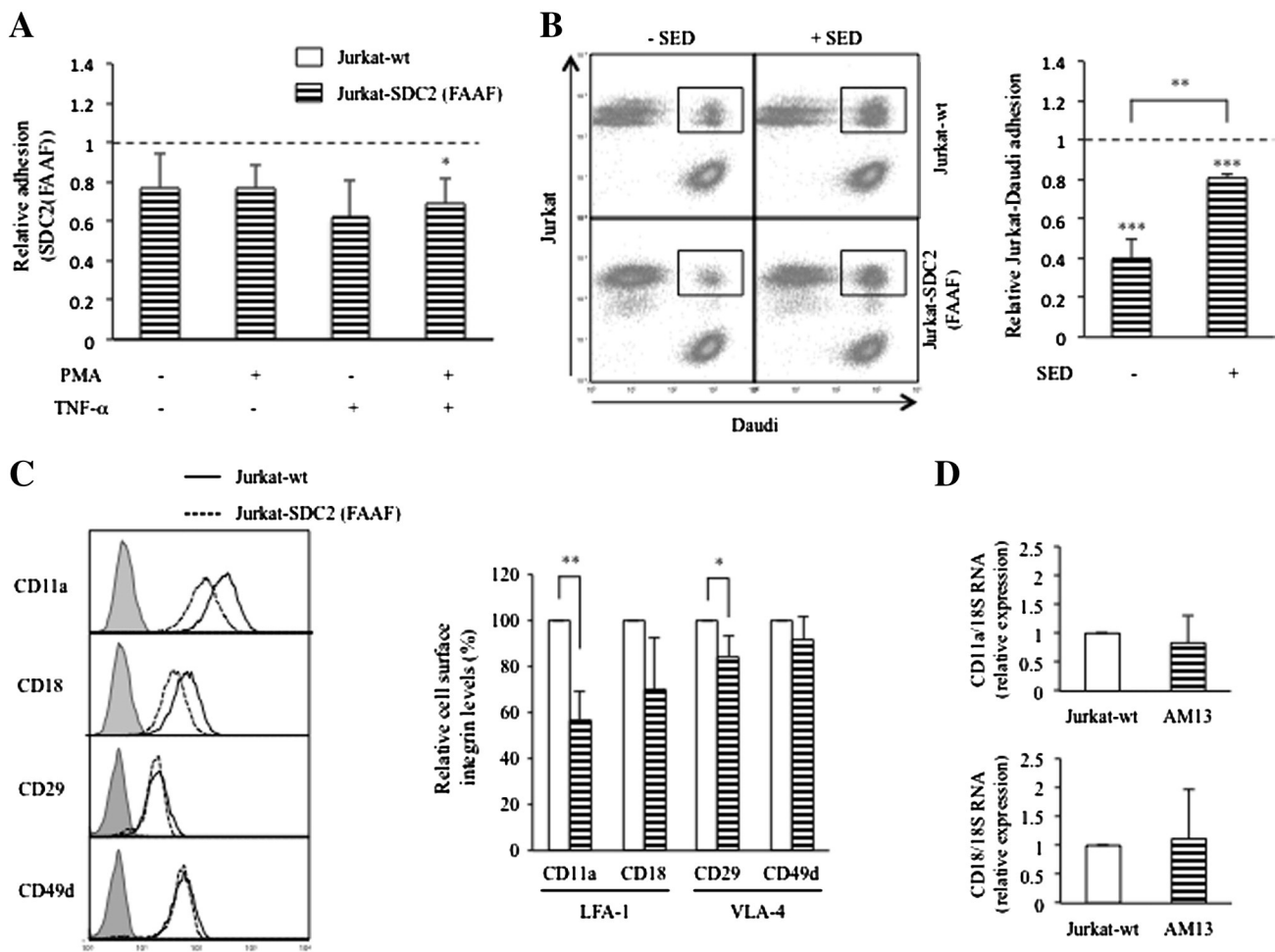
**Fig. 4.** Blockade of LFA-1 activation by SDC2 cannot be reverted by the expression of talin head or Rho GTPases. (A) Talin1 head domain does not rescue LFA-1 affinity. (Top) Jurkat cells were transfected with *EGFP-talin1 head* or *GFP* cDNAs. After 24 h, cells were stimulated for 30 min with PMA (10 ng/mL) at 37 °C and stained with the LFA-1 high-affinity epitope reporter (mAb24) and Alexa 633-conjugated F(ab')<sub>2</sub> anti-mouse antibody in the presence of 1 mM Mg<sup>2+</sup> and 1 mM EGTA, followed by flow cytometry analysis. (Bottom) Quantification of high-affinity LFA-1 in GFP-positive cells. The MFI is represented as a percentage of the maximum value obtained in GFP-Jurkat-wt. Data represent the mean  $\pm$  SD of three independent experiments with one Jurkat-SDC2 clone. (B) PtdIns[4,5]P<sub>2</sub> location. Jurkat cells were transfected with *2PH-PLCdelta-GFP* cDNA. After 24 h, cells were fixed and visualized by confocal microscopy. Representative fluorescence microscopy images of one of the two clones analysed. Scale bar: 10  $\mu$ m. (C) Small Rho GTPases do not rescue LFA-1 affinity. Jurkat cells were transfected with *EGFP-RhoA-T19N (DN)*, *-Q63L(CA)*, *EGFP-Rac1-T17N (DN)*, *-Q61L(CA)*, *EGFP-Cdc42-T17N(DN)*, *-Q61L(CA)* or *GFP* cDNAs. After 24 h, cells were stimulated for 30 min with PMA (10 ng/mL) at 37 °C and stained with the LFA-1 high-affinity epitope reporter (mAb24) and Alexa 633-conjugated F(ab')<sub>2</sub> anti-mouse antibody in the presence of 1 mM Mg<sup>2+</sup> and 1 mM EGTA, followed by flow cytometry analysis. The MFI of Alexa 633-labelled cells in GFP-positive cells is represented as a percentage of the maximum value obtained in Jurkat-wt. Mean  $\pm$  SD of three independent experiments with one Jurkat-SDC2 clone.

[37–41], we found impaired adhesion of Jurkat expressing SDC2 in both models. Consistent with this finding, polymorphonuclear cells from mutant mice lacking SDC1 showed increased adhesion to unstimulated and TNF- $\alpha$ -stimulated HUVEC [42,43]. Furthermore, inhibition of chemokine-induced migration of neutrophils, monocytes and lymphocytes by antithrombin is mediated by SDC4 [44,45]. These data are consistent with the results presented herein, suggesting an inhibitory role for the SDC family in the adhesion of leucocytes to endothelia.

The ability of a T cell to adhere to other cells is regulated by the levels of integrins on the cell surface [4]. All three transfected SDC2 cDNAs (*sdc2*, *sdc2( $\Delta$ EFYA)* and *sdc2(FAAF)*) led to down-regulation of LFA-1 at the cell surface. However, distinct signalling pathways caused the levels of LFA-1 to decrease in each case. Thus, in Jurkat-SDC2 and Jurkat-SDC2(FAAF) cells LFA-1 was regulated post-transcriptionally, whereas in Jurkat-SDC2( $\Delta$ EFYA) cells the reduction in LFA-1 was caused by a decrease in CD11a mRNA steady-state levels, possibly due to transcriptional inhibition (Fig. 2E). These results suggest that the PDZ-binding domain may control the activity of the *CD11a* gene, whereas residues Y179, Y191, S187 and S188 may control the CD11a half-life or its translation rate. Consistent with an inhibitory role for SDCs in integrin expression, elimination of the SDC1 function in mice results

in increased transcription of the integrin subunits  $\alpha$ 3 and  $\alpha$ 9 [46]. Furthermore, the engagement of SDC4 has been reported to induce integrin endocytosis, reducing cell avidity for fibronectin [47].

We found that deletion of the PDZ-binding domain of SDC2, a domain conserved by all SDCs, led to increased adhesion of Jurkat-SDC2( $\Delta$ EFYA) to endothelia, but not to B cells. Likewise, mutation of residues Y179, Y191, S187 and S188 increased the adhesion of Jurkat-SDC2 to antigen-stimulated B cells. Interestingly, this was not due to the recovery of cell surface LFA-1 levels, because Jurkat-SDC2( $\Delta$ EFYA), Jurkat-SDC2(FAAF) and Jurkat-SDC2 cells showed similar amounts of cell surface LFA-1. Although changes in LFA-1 density at the cell surface certainly affect the adhesion capacity of the cell, our data show that an alternative mechanism is critical in determining the lower adhesion of Jurkat-SDC2 to endothelia and antigen-presenting cells. Thus, in Jurkat-SDC2 cells LFA-1 was locked in a low-affinity conformation, as it was not recognized by the activation reporter antibody mAb24 (Fig. 3A). This was apparent when Jurkat-SDC2 cells were treated with PMA, which activates integrins while bypassing TCR signalling, and when cells were incubated with Mg<sup>2+</sup>/EGTA, which artificially triggers the activation state of LFA-1 (Fig. 3A). The blockade of LFA-1 in a closed conformation could not be reverted by overexpression of talin head domain (Fig. 4A).



**Fig. 5.** Role of SDC2 cytoplasmic tyrosines and serines in cell adhesion. (A) Jurkat T cell adhesion to HUVEC. Jurkat cells were stained with Calcein-AM and treated as in Fig. 1B. Data are expressed as the mean of adhesion  $\pm$  SD of one Jurkat-SDC2(FAAF) clone analysed in three independent experiments performed in quintuplicate, normalized to Jurkat-wt, which was given an arbitrary value of 1.0 (dotted line). (B) Jurkat T cell adhesion to Daudi B cell. (Left) A representative plot of T-B conjugate formation  $\pm$  SED superantigen. The boxed areas indicate double-positive events. (Right) Mean of conjugate formation  $\pm$  SD of three independent experiments with one Jurkat-SDC2(FAAF) clone, normalized to Jurkat-wt, which was given an arbitrary value of 1.0 (dotted line). (C) Expression of LFA-1 (CD11a and CD18) and VLA-4 (CD29 and CD49d) at the cell surface as analysed by flow cytometry. (Left) Representative histograms of cell surface staining. (Right) Quantification of FACS staining. The MFI is represented as a percentage of the value obtained with Jurkat-wt. Mean  $\pm$  SD of one Jurkat-SDC2(FAAF) clone analysed in at least three independent experiments. (D) LFA-1 mRNA expression as analysed by reverse transcription and real-time PCR. CD11a: 18S and CD18: 18S values were calculated and normalized to Jurkat-wt, which was given an arbitrary value of 1.0 (dotted line). Mean  $\pm$  SD of one Jurkat-SDC2(FAAF) clone analysed in three independent experiments. (E) Detection of LFA-1 high-affinity conformation. Jurkat cells were treated as in Fig. 3A. (Top) Representative histograms of cell surface staining. (Bottom) Quantification of FACS staining. The MFI is represented as a percentage of the value obtained in Jurkat-wt stimulated with PMA and  $Mg^{2+}$ -EGTA. Mean  $\pm$  SD of one Jurkat-SDC2(FAAF) clone analysed in three independent experiments. The p-values from the t-tests between experiments represented by bars of the same colour are shown in Supplementary Fig. 4. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

It seems likely, therefore, that the differences in adhesion to endothelia between Jurkat-SDC2 and Jurkat-SDC2( $\Delta$ EFYA) cells are mediated by SDC2 control of inside-out signalling on LFA-1, through the PDZ-binding domain. The diminished adhesion of Jurkat-SDC2 to Daudi B cells was reverted by the mutation of tyrosines 179, 191 and serines 187 and 188, but not by deletion of the PDZ-binding domain. Thus, a hierarchy of functional strength seems to exist between these two motifs, being uncovered by the interaction with Daudi B cells, but not with HUVEC. The results are consistent with the view that the cytoplasmic tyrosines 179, 191 and serines 187 and 188 are part of an inhibitory motif that together with the PDZ-binding domain exert a potent inhibitory effect on LFA-1 affinity. It is tempting to speculate that a conserved mechanism in the SDC family could regulate LFA-1 affinity through the PDZ-binding domain and conserved tyrosine Y179, and this will be worthy of further consideration. In line with an inhibitory effect of SDCs on the activity of LFA-1, it has been reported that SDC1-deficient polymorphonuclear cells show increased adhesion to ICAM-1, which can be blocked by Abs directed against CD18 [48]. However, the fact that SDCs have also been implicated in the activation of integrin receptors, and have been

shown to synergize with integrins during adhesion to extracellular matrix and focal adhesion formation [49], suggests that integrin-SDC crosstalk may depend on the specific pairs functionally interacting and the particular cellular context [50].

## 5. Conclusions

In summary, our results suggest that SDC2 may impair cellular adhesion by acting on LFA-1 function at multiple steps, by reducing LFA-1 levels at the cell surface and by locking LFA-1 in a low-affinity closed conformation, via signalling starting in two domains of the SDC2 cytoplasmic region.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.03.012>.

## Authorship

X.R. conceived, designed and performed most experiments. X.R. and M.A. designed the T-B conjugation experiments.

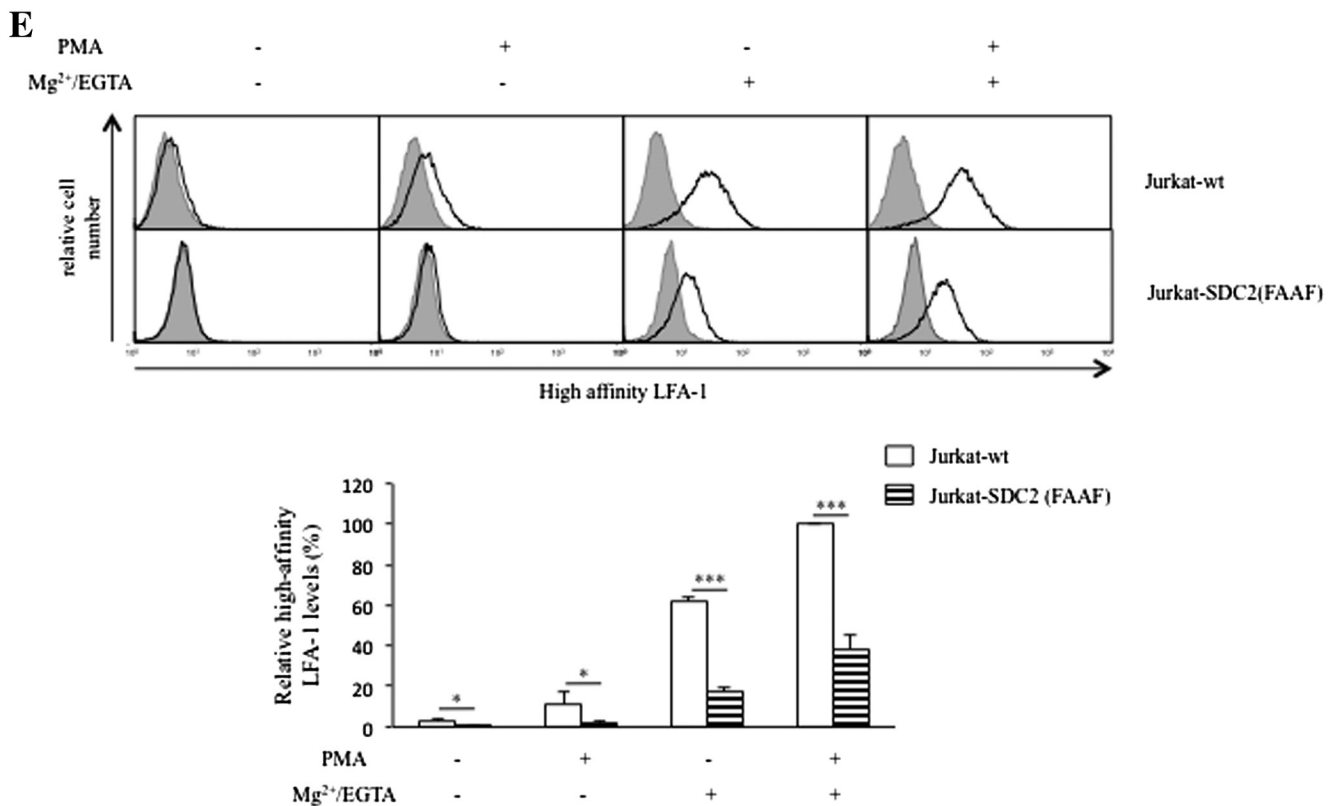


Fig. 5 (continued).

M.A. performed the confocal microscopy experiments.  
X.R., M.A., M.R. and E.E. analysed the data.  
X.R., M.R. and E.E. wrote the manuscript.

## Disclosure

The authors declare no competing financial interests.

## Acknowledgements

We thank the technical staff of the FACS facility for their support. This research was supported by grant FBG300412 from Fundació Bosch i Gimpera to MR, Universitat de Barcelona. X.R. and M.A. are supported by a predoctoral fellowship from Fundació Bosch i Gimpera (FBG300412).

## References

- J.G. Cyster, *Annu. Rev. Immunol.* 23 (2005) 127–159.
- J.T. Pribila, A.C. Quale, K.L. Mueller, Y. Shimizu, *Annu. Rev. Immunol.* 22 (2004) 157–180.
- R. Evans, I. Patzak, L. Svensson, K. De Filippo, K. Jones, A. McDowall, N. Hogg, *J. Cell Sci.* 122 (2009) 215–225.
- K. Ley, C. Laudanna, M.I. Cybulsky, S. Nourshargh, *Nat. Rev. Immunol.* 7 (2007) 678–689.
- R. Alon, S.W. Feigelson, *Curr. Opin. Cell Biol.* 24 (2012) 670–676.
- S.K. Bromley, W.R. Burack, G. Kenneth, K. Somersalo, T.N. Sims, C. Sumen, M.M. Davis, A.S. Shaw, P.M. Allen, M.L. Dustin, *Annu. Rev. Immunol.* 19 (2001) 375–396.
- T.A. Springer, M.L. Dustin, *Curr. Opin. Cell Biol.* 24 (2012) 107–115.
- M. Kim, C.V. Carman, W. Yang, A. Salas, T.A. Springer, *J. Cell Biol.* 167 (2004) 1241–1253.
- T. Schürpf, T.A. Springer, *EMBO J.* 30 (2011) 4712–4727.
- W. Chen, C. Zhu, *Immunol. Rev.* 256 (2013) 160–176.
- J.R. Couchman, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 26 (2010) 89–114.
- M.R. Morgan, H. Hamidi, M.D. Bass, S. Warwood, C. Ballestrem, M.J. Humphries, *Dev. Cell* 24 (2013) 472–485.
- P. Zimmermann, Z. Zhang, G. Degeest, E. Mortier, I. Leenaerts, C. Coomans, J. Schulz, F. N'Kuli, P.J. Courtoy, G. David, *Dev. Cell* 9 (2005) 377–388.
- E. Tkachenko, A. Elfenbein, D. Tirziu, M. Simons, *Circ. Res.* 98 (2006) 1398–1404.
- T. Teixé, P. Nieto-Blanco, R. Vilella, P. Engel, M. Reina, E. Espel, *Mol. Immunol.* 45 (2008) 2905–2919.
- M. Buxadé, J.L. Parra, S. Rousseau, N. Shpiro, R. Marquez, N. Morrice, J. Bain, E. Espel, C.G. Proud, *Immunology* 23 (2005) 177–189.
- X. Rovira-Clavé, M. Angulo-Ibáñez, O. Noguera, E. Espel, M. Reina, *Immunology* 137 (2012) 214–225.
- M.C. Subauste, M. Von Herrath, V. Benard, C.E. Chamberlain, T.H. Chuang, K. Chu, G. M. Bokoch, K.M. Hahn, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 9725–9733.
- W.T.N. Simonson, S.J. Franco, A. Huttenlocher, *J. Immunol.* 177 (2006) 7707–7714.
- D.J. Carey, R.C. Stahl, G. Cizmeci-Smith, V.K. Asundi, *J. Cell Biol.* 124 (1994) 161–170.
- V.K. Asundi, R. Erdman, R.C. Stahl, D.J. Carey, *J. Neurosci. Res.* 73 (2003) 593–602.
- C.S. Lebakken, A.C. Rapraeger, *J. Cell Biol.* 132 (1996) 1209–1221.
- D.M. Beauvais, A.C. Rapraeger, *Exp. Cell Res.* 286 (2003) 219–232.
- E. Majewska, E. Paleolog, Z. Baj, U. Kralisz, M. Feldmann, H. Tóthzrewski, *Scand. J. Immunol.* 45 (1997) 385–392.
- I. Dransfield, C. Cabañas, A. Craig, N. Hogg, *J. Cell Biol.* 116 (1992) 219–226.
- C. Lu, M. Shimaoka, Q. Zang, J. Takagi, T.A. Springer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 2393–2398.
- J.H. Wang, *Cell Res.* 22 (2012) 1512–1514.
- C. Cluzel, F. Saltel, J. Lussi, F. Paulhe, B.A. Imhof, B. Wehrle-Haller, *J. Cell Biol.* 171 (2005) 383–392.
- F. Saltel, E. Mortier, V.P. Hytönen, M.-C. Jacquier, P. Zimmermann, V. Vogel, W. Liu, B. Wehrle-Haller, *J. Cell Biol.* 187 (2009) 715–731.
- M. Das, S. Subbaya Ithychanda, J. Qin, E.F. Plow, *Biochim. Biophys. Acta* 1838 (2014) 579–588.
- S. Kwon, H. Son, Y. Choi, J.H. Lee, S. Choi, Y. Lim, I.O. Han, E.S. Oh, *FEBS Lett.* 583 (2009) 2395–2400.
- P. Várnai, T. Balla, *J. Cell Biol.* 143 (1998) 501–510.
- M. Bolomini-Vittori, A. Montesor, C. Giagulli, D. Staunton, B. Rossi, M. Martinello, G. Constantin, C. Laudanna, *Nat. Immunol.* 10 (2009) 185–194.
- M.D. Bass, K. a Roach, M.R. Morgan, Z. Mostafavi-Pour, T. Schoen, T. Muramatsu, U. Mayer, C. Ballestrem, J.P. Spatz, M.J. Humphries, *J. Cell Biol.* 177 (2007) 527–538.
- F. Granés, R. García, R.P. Casaroli-Marano, S. Castel, N. Rocamora, M. Reina, J.M. Ureña, S. Vilaró, *Exp. Cell Res.* 248 (1999) 439–456.
- I.M. Ethell, F. Irie, M.S. Kalo, J.R. Couchman, E.B. Pasquale, *Neuron* 31 (2001) 1001–1013.
- S. Choi, Y. Kim, H. Park, I.O. Han, E. Chung, S.Y. Lee, Y.B. Kim, J.W. Lee, E.S. Oh, J.Y. Yi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 384 (2009) 231–235.
- J.R. Whiteford, X. Xian, C. Chaussade, B. Vanhaesebroeck, S. Nourshargh, J.R. Couchman, *Mol. Biol. Cell* 22 (2011) 3609–3624.
- M. Mytilinaiou, A. Bano, D. Nikitovic, A. Berdiaki, K. Voudouri, A. Kalogeraki, N.K. Karamanos, G.N. Tzanakakis, *IUBMB Life* 65 (2013) 134–143.

- [40] M.J. Kwon, Y. Kim, Y. Choi, S.H. Kim, S. Park, I. Han, D.H. Kang, E.S. Oh, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 431 (2013) 415–420.
- [41] C.M. Vicente, R. Ricci, H.B. Nader, L. Toma, *BMC Cell Biol.* vol. 14 (2013) 25.
- [42] M. Götte, A.M. Jousen, C. Klein, P. Andre, D.D. Wagner, M.T. Hinkes, B. Kirchhof, A.P. Adamis, M. Bernfield, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43 (2002) 1135–1141.
- [43] M. Götte, M. Bernfield, A.M. Jousen, *Curr. Eye Res.* 30 (2005) 417–422.
- [44] S. Dünzendorfer, N. Kaneider, A. Rabensteiner, C. Meierhofer, C. Reinisch, J. Römisch, C.J. Wiedermann, *Blood* 97 (2001) 1079–1085.
- [45] N.C. Kaneider, C.M. Reinisch, S. Dünzendorfer, J. Römisch, C.J. Wiedermann, C.J. Wiedermann, *J. Cell Sci.* 115 (2002) 227–236.
- [46] M.A. Stepp, H.E. Gibson, P.H. Gala, D.D. Iglesia, A. Pajoohesh-Ganji, S. Pal-Ghosh, M. Brown, C. Aquino, A.M. Schwartz, O. Goldberger, M.T. Hinkes, M. Bernfield, *J. Cell Sci.* 115 (2002) 4517–4531.
- [47] M.D. Bass, R.C. Williamson, R.D. Nunan, J.D. Humphries, A. Byron, M.R. Morgan, P. Martin, M.J. Humphries, *Dev. Cell* 21 (2011) 681–693.
- [48] B. Kharabi Masouleh, G.B. Ten Dam, M.K. Wild, R. Seelige, J. van der Vlag, A.L. Rops, F. G. Echtermeyer, D. Vestweber, T.H. van Kuppevelt, L. Kiesel, M. Götte, *J. Immunol.* 182 (2009) 4985–4993.
- [49] M.R. Morgan, M.J. Humphries, M.D. Bass, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8 (2007) 957–969.
- [50] J.A. Roper, R.C. Williamson, M.D. Bass, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 22 (2012) 583–590.





# Dual role of ERK5 in the regulation of T cell receptor expression at the T cell surface

Xavier Rovira-Clavé,\* Maria Angulo-Ibáñez,\* Cathy Tournier,<sup>†</sup> Manuel Reina,\*<sup>1</sup> and Enric Espel<sup>†,1</sup>

\*Celltec-UB, Department of Cell Biology, and <sup>†</sup>Department of Physiology and Immunology, Faculty of Biology, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain; and <sup>1</sup>University of Manchester, Faculty of Life Sciences, Manchester, United Kingdom

RECEIVED JANUARY 28, 2015; REVISED JULY 8, 2015; ACCEPTED AUGUST 5, 2015. DOI: 10.1189/jlb.2A0115-034R

## ABSTRACT

Regulation of the levels of the TCR/CD3 complex at the cell surface is critical to proper T cell development and mature T cell activation. We provide evidence that the MAPK ERK5 regulates the surface expression of the TCR/CD3 complex by controlling the degradation of the CD3 $\zeta$  chain and the recovery of the complex after anti-CD3 $\epsilon$  stimulation. ERK5 knockdown led to TCR/CD3 up-regulation at the cell surface and increased amounts of the CD3 $\zeta$  chain. Inhibition of the MEK5-dependent phosphorylation status of the kinase domain of ERK5 in human T CD4<sup>+</sup> cells reduced CD3 $\zeta$  ubiquitination and degradation, limiting TCR/CD3 down-regulation in anti-CD3-stimulated cells. Moreover, TCR/CD3 recovery at the cell surface, after anti-CD3 $\epsilon$  treatment, is impaired by ERK5 knockdown or pharmacological inhibition of autophosphorylation in the ERK5 C-terminal region. ERK5 loss in thymocytes augmented cellular CD3 $\zeta$  and increased cell surface levels of TCR/CD3 on CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> thymocytes. This correlated with enhanced generation of CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup> thymocytes. Our findings define ERK5 as a novel kinase that modulates the levels of TCR/CD3 at the cell surface by promoting CD3 $\zeta$  degradation and TCR/CD3 recovery after TCR stimulation. *J. Leukoc. Biol.* **99**: 143–152; 2016.

## Introduction

T cell activation depends on the TCR/CD3 complex recognizing specific peptides on the MHC. The TCR/CD3 complex is a multimeric receptor composed of 4 noncovalently attached dimers: the antigen-binding TCR- $\alpha\beta$ , as well as CD3 $\epsilon\gamma$ , CD3 $\epsilon\delta$ , and CD3 $\zeta\zeta$  chains. Regulation of TCR/CD3 complex levels on the cell surface is a dynamic phenomenon that is coordinated through multiple pathways to ensure correct signal transmission.

Abbreviations: AICD = activation-induced cell death, APC = allophycocyanin, DP = double-positive, EGFP = enhanced GFP, Foxp3 = forkhead box p3, Lamp-1 = lysosomal-associated membrane protein 1, LAPTM5 = lysosomal protein transmembrane 5, loxP = locus of crossover of P1, MFI = mean fluorescence intensity, MHC-I = MHC class I, sh = short hairpin, shS = scrambled sh sequence, SLAP = Src-like adaptor protein, SP = single-positive, TEY domain = threonine-glutamic acid-tyrosine activation domain, T<sub>reg</sub> = regulatory T cell, tT<sub>reg</sub> = thymus-derived regulatory T cell

The online version of this paper, found at [www.jleukbio.org](http://www.jleukbio.org), includes supplemental information.

The cell-surface levels of the TCR/CD3 complex present a balance among internalization, recycling, and degradation of existing complexes and the expression of new ones that must be fully assembled before reaching the cell surface [1]. Expression of the TCR/CD3 complex in mature T cells is stable and shows a cycling behavior, with ~30% of the complexes found within endosomal compartments [2]. However, stimulation by TCR/CD3 triggers its rapid down-regulation by enhancing internalization and degradation and reducing recycling [3], thereby avoiding T cell hyperactivation and autoimmunity [4]. In the thymus, thymocytes at the DP stage express 10-fold less TCR/CD3 on the cell surface than SP cells, which is a hypothetical control mechanism for negative and positive selection [5].

ERK5, also known as MAPK7 or big MAPK1, is a member of the MAPK family. The better studied ERK1/2, p38, and JNK kinases play key roles during thymocyte development and in mature T cells after TCR/CD3 stimulation [6]. ERK5 consists of an N-terminal region with a TEY domain, similarly to ERK1/2, and a large C-terminal region with transcriptional activity after autophosphorylation [7]. ERK5 activation occurs by dual phosphorylation of its TEY domain that is mediated by MEK5 [8]. The MEK5/ERK5 pathway is essential for proper blood vessel and cardiac development; thus, ERK5-deficient mice typically die at d 10 or 11 of gestation [9]. In addition, ERK5 is strongly implicated in tumorigenesis, and targeted use as an anti-cancer therapy has been investigated [10, 11]. During T cell development, TCR/CD3 stimulation by strong or weak agonists activates the MEK5-ERK5 pathway and helps to regulate negative selection [12]. It is also known that ERK5 is phosphorylated in peripheral T cells upon TCR/CD3 stimulation [12–15] and that silencing ERK5 in DO11.10 hybridoma cells and primary murine T cells enhances their activation [15]. However, studies that use conditional deletion of *Erk5* in CD4<sup>+</sup> cells show unaltered T cell development and peripheral T cell maintenance [14, 16]. Therefore, the contribution of ERK5 to T cell biology is not fully understood.

In this study, we use genetic and pharmacological approaches in human and mouse T cells to demonstrate that ERK5 promotes CD3 $\zeta$  degradation and TCR/CD3 recovery after anti-CD3 $\epsilon$

1. Correspondence: Faculty of Biology, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain. E-mail: [eespel@ub.edu](mailto:eespel@ub.edu) (E.E.); [mreina@ub.edu](mailto:mreina@ub.edu) (M.R.)

stimulation. Consequently, we show that ERK5 contributes to the control of TCR/CD3 complex expression on the cell surface.

## MATERIALS AND METHODS

### Antibodies and reagents

The mAb anti-human-CD11a (clone MEM-25), anti-human-CD18 (clone MEM-48), and anti-human-MHC-I (clone W6/32) and Annexin V-FITC conjugated were from ImmunoTools (Friesoythe, Germany). The mAb anti-human-TCR- $\alpha/\beta$  (clone IP26), anti-mouse-CD4-APC (clone RM4-5), anti-mouse-CD8-FITC (clone 53-6.3), anti-mouse-CD3 $\epsilon$ -APC (clone 145-2C11) was from BD Biosciences (San Jose, CA, USA). The anti-human-CD3 $\epsilon$  mAb (IgG2a; clone 33-2A3) was from Immunostep (Salamanca, Spain). The anti-TCR $\zeta$  (clone 6B10.2) and anti-ubiquitin (clone P4D1) were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). The polyclonal anti-ERK5 was from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). Rabbit anti-Lamp-1-Cy3 and anti- $\beta$ -actin (clone AC-40) were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Alexa 488-labeled secondary antibodies were all from Life Technologies (Grand Island, NY, USA). The ERK5 inhibitor BIX02188 was from Selleckchem.com (Houston, TX, USA), and XMD8-92 was from Tocris Bioscience (Bristol, United Kingdom). The cycloheximide was from Sigma-Aldrich.

### Mice

ERK5<sup>loxP/loxP</sup> mice on a C57BL/6 background were described previously in ref. [14]. ERK5<sup>loxP/loxP</sup> mice were bred to Vav-Cre mice (kindly provided by Thomas Graf, Centre for Genomic Regulation, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain) [17] and Foxp3<sup>EGFP</sup> reporter mice (kindly provided by Thomas Stratmann, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain). All mice were treated in accordance with institutional guidelines and national laws and policies. Experiments were conducted on 4-wk-old mice.

### Isolation of murine splenocytes and cell cultures

The spleens were extracted freshly by dissection and disaggregated mechanically to obtain a single-cell suspension. The splenocytes were treated with RBC lysis buffer for 15 min at room temperature before being pelleted by centrifugation and then cultured to 10<sup>7</sup> cells/ml. Murine splenocytes, primary human T cells, Jurkat, shS cells, and shERK5 cells were cultured in RPMI, supplemented with 10% FCS, 2 mM L-glutamine, and penicillin/streptomycin and maintained at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>.

### Murine DP thymocyte purification

Thymuses were extracted freshly by dissection and disaggregated mechanically to obtain a single-cell suspension. DP thymocytes were purified by sorting on a FACSAria (BD Biosciences), by gating on the CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> population (purities up to 95% were obtained). The cells were lysed and analyzed by Western blotting or real-time PCR.

### Generation of stable cell lines

Jurkat E6.1 human T cells were obtained from the European Collection of Cell Cultures (Sigma-Aldrich). One million Jurkat T cells were stably transfected by electroporation (Multiporator; Eppendorf, Hamburg, Germany) with a scrambled shRNA expression vector or ERK5-specific shRNA expression vector directed to a conserved *Erk5* sequence in exon 2 (ref. TRCN000001354; Sigma-Aldrich) and cultured in 10 wells of 24-well plates with medium containing 1  $\mu$ g/ml puromycin. A total of 9 shS and 10 shERK5 cell lines was obtained and used in this study.

### Isolation of human T cells

All of the studies involving human samples were approved by the Ethics Committee of the Universitat de Barcelona. Primary human T cells of healthy

blood donors were obtained from buffy coats at Banc de Sang i Teixits (Blood and Tissue Bank, Barcelona, Spain). PBMCs were isolated by a Ficoll 1.007 density gradient (Lymphoprep, ref. 1114545; Axis-Shield, Dundee, Scotland), and resting T CD4<sup>+</sup> cells were purified by negative selection by use of affinity chromatography (Cedarlane, Ontario, Canada), as described in the manufacturer's protocol (typical purity = 90%). To prepare activated human T CD4<sup>+</sup> cells, resting T CD4<sup>+</sup> cells were activated with PHA (10  $\mu$ g/ml), anti-CD28 (hybridoma CK248 supernatant), and IL-2 (20 U/ml). After 3 d at 37°C, T cells were washed twice and cultured for 1 d in RPMI (ref. BE12-702F; Lonza, Basel, Switzerland) and 10% FCS before their use in experiments.

### Real-time quantitative PCR

Cells were lysed, their total RNA was reverse transcribed (SuperScript III, ref. 11752-050; Life Technologies), and real-time PCR was performed in the StepOne Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Life Technologies) by use of GoTaq qPCR Master Mix (ref. A6001; Promega, Madison, WI, USA). The oligonucleotides used for human ERK5 were 5'-GCCTATGGAGTGGTGCTCTC-3' (sense) and 5'-GGTCGCTTTCCATCAGGTC-3' (antisense). The oligonucleotides used for human CD3 $\zeta$  were 5'-CAGCCTCTTCTGAGGAAA-3' (sense) and 5'-TCTCAGGAACAAGGCAGTGA-3' (antisense). The oligonucleotides used for mouse CD3 $\zeta$  were 5'-AGCCCTGTACCTGAGAGCAA-3' (sense) and 5'-CTGTTTGCCTCCCATCTCTG-3' (antisense). For all samples, the expression levels were normalized to 18S RNA with oligonucleotides from TATAA Biocenter (Göteborg, Sweden; ref. RRN18S). The relative quantification value was calculated as described elsewhere [18].

### Western blot

A total cell extract was prepared from 10<sup>6</sup> cells dissolved in 100  $\mu$ l of an SDS loading buffer. The cell extract was incubated at 95°C for 30 min before loading on 8, 10, or 12% SDS polyacrylamide gel and then transferred to a nitrocellulose membrane. Western blots were quantitated by chemiluminescent detection by use of a Kodak X-Omat film or a Luminescent Image Analyzer LAS-3000 (Fujifilm, Tokyo, Japan). Densitometric analysis of proteins was performed by use of Fiji software. All analysis involved normalizing to actin as a loading control.

### Flow cytometry

Flow cytometric analyses were performed as described previously [19]. Samples were analyzed on a Gallios flow cytometer (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Apoptosis was determined by incubating the thymocytes in binding buffer (10 mM Hepes pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>) with Annexin V-FITC and propidium iodide.

### Confocal microscopy

Cells were fixed, permeabilized, and stained as in intracellular flow cytometry with mouse antibodies against CD3 $\epsilon$  or CD3 $\zeta$  and rabbit antibody against LAMP-1 conjugated with Cy3. Then, cells were washed and incubated with anti-mouse Alexa 488 (Invitrogen). Finally, the cells were washed and resuspended in 7  $\mu$ l Fluoromount mounting medium, applied to microscope slides, and covered with coverslips. Immunostained samples were viewed under a Leica TCS-SPE confocal microscope at Leitz Plan apochromatic 60 $\times$  (NA, 0.7, oil) objective at room temperature. Pictures were acquired by use of the Leica Application Suite software. Final images were processed by Fiji software.

### CD3 $\zeta$ ubiquitination analysis

For the immunoprecipitation experiments, 50  $\times$  10<sup>6</sup> PBMCs were treated with DMSO or BIX02188 (10  $\mu$ M). After 1 h at 37°C, the cells were stimulated with anti-CD3 $\epsilon$  (clone 33-2A3; 0.3  $\mu$ g/ml) for 6 h, washed twice, and lysed in a 1 ml lysis buffer (10 mM Tris HCl, pH 7.5, 10 mM NaCl, 1% Triton X-100, 2.5 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, and inhibitors of proteases and phosphatases). The lysates were precleared overnight at 4°C with agarose beads, immunoprecipitated with CD3 $\zeta$  antibody, and separated by SDS-PAGE

before Western blotting. The membrane was probed with ubiquitin antibody or CD3 $\zeta$  antibody.

### TUNEL assay

The thymuses were fixed immediately after killing with 10% neutral formalin and embedded in paraffin. Thin tissue sections were cut at 10  $\mu$ m and deparaffinized before TUNEL staining was performed by use of an In Situ Cell Death Detection Kit (ref. 12156792910; Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA), according to the manufacturer's protocol. The thymus sections were visualized with an Olympus BX61 epifluorescence microscope by use of a  $\times 20$  objective, and images were taken with an Olympus DP70 camera. The final images were processed by Fiji software.

### Statistics

Data are expressed as the means  $\pm$  SD from 3 or more independent experiments. Differences between groups were compared by use of Student *t* tests for 2 groups; 2-way ANOVA with Bonferroni post hoc correction was used for groups with 2 independent variables. Statistical analysis was carried out by use of GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Significance levels are indicated in the figure legends.

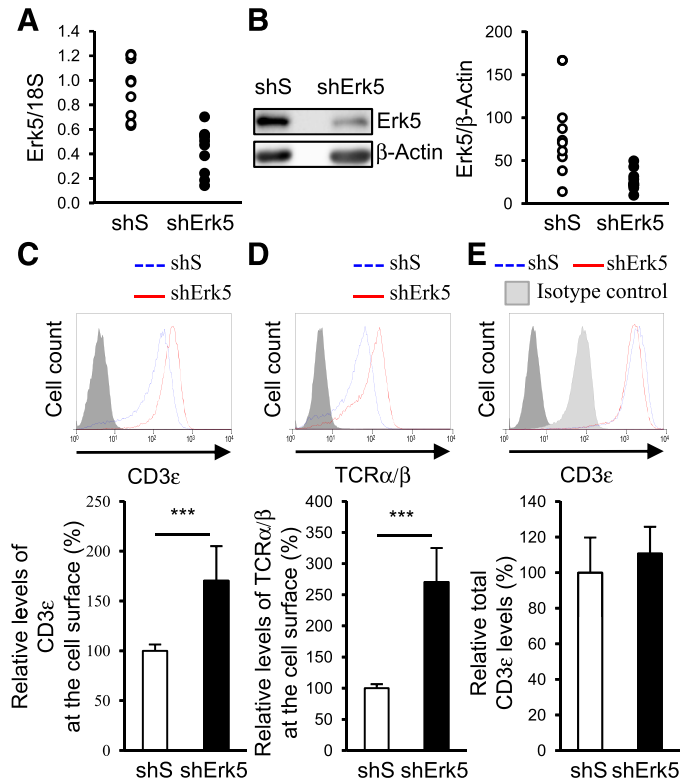
## RESULTS

### ERK5 knockdown in Jurkat T cells led to higher cell-surface levels of TCR/CD3

To define the role of ERK5 in T cells, we initially targeted ERK5 in Jurkat leukemic T CD4<sup>+</sup> cells by use of shRNA-mediated knockdown directed to a conserved *Erk5* sequence in exon 2 (shERK5; Fig. 1A and B). Interestingly, ERK5 reduction led to higher levels of CD3 $\epsilon$  (Fig. 1C) and TCR- $\alpha/\beta$  (Fig. 1D) at the cell surface compared with control cell lines transfected with shS. Up-regulation of CD3 $\epsilon$  and TCR- $\alpha/\beta$  by ERK5 knockdown was specific, as the expression of other abundant cell membrane proteins, such as MHC-I (Supplemental Fig. 1A) or LFA-1 (CD11a/CD18; Supplemental Fig. 1B and C), was not altered. Moreover, CD3 $\epsilon$  up-regulation was not a result of augmented total amounts of this protein in shERK5 cell lines (Fig. 1E). Importantly, TCR/CD3 up-regulation in shERK5 cell lines correlates with an enhanced AICD (Supplemental Fig. 1D). These results suggest a possible role for ERK5 in the regulation of TCR/CD3 expression at the cell surface in Jurkat T cells.

### ERK5 knockdown in Jurkat T cells led to higher CD3 $\zeta$ protein levels and reduced TCR/CD3 recovery at the cell surface after anti-CD3 $\epsilon$ stimulation

Given that the control of CD3 $\zeta$  levels is a key regulatory mechanism for TCR/CD3 complex expression at the cell surface [20], we analyzed the total amount of CD3 $\zeta$  in shERK5 cell lines and observed a significant increase in the expression of CD3 $\zeta$  compared with shS cell lines (Fig. 2A). In contrast, CD3 $\zeta$  mRNA levels were similar in shERK5 and shS cell lines (Fig. 2B), suggesting that CD3 $\zeta$  chain degradation was reduced in shERK5 cell lines. To test this hypothesis, we measured CD3 $\zeta$  half-life by incubating the cells with cycloheximide, an inhibitor of protein synthesis, for up to 6 h (Fig. 2C). CD3 $\zeta$  showed a trend toward an increased half-life in shERK5 cells at 3 h ( $P = 0.061$ ). This difference could account for the incremented CD3 $\zeta$  levels observed in long-term cultured cells. These results show that

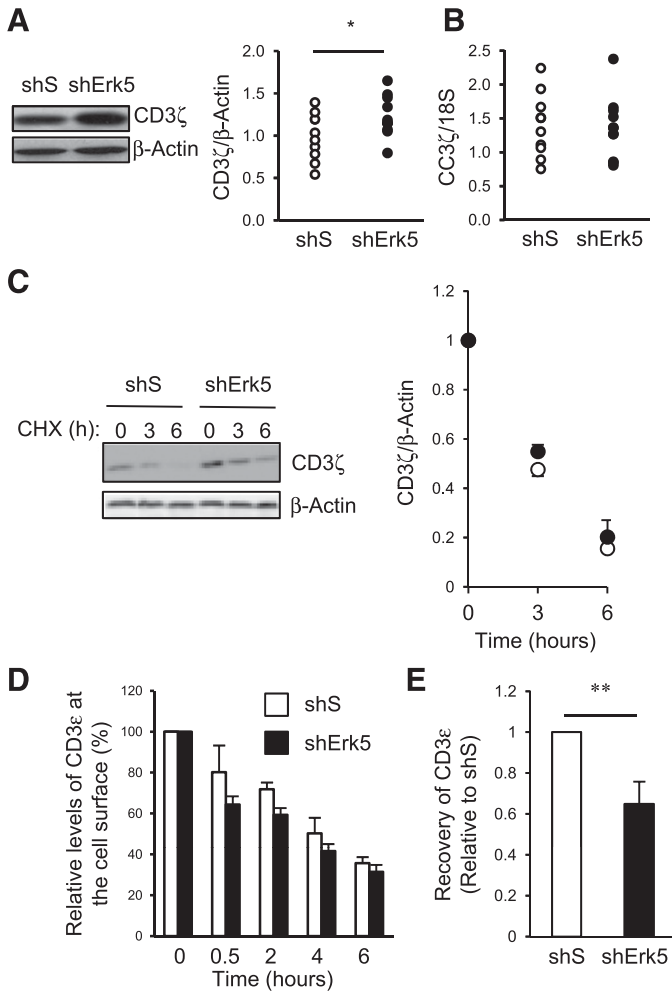


**Figure 1. ERK5-knockdown in Jurkat T cells increased cell-surface levels of TCR/CD3.** (A) ERK5 mRNA levels in shERK5 Jurkat cell lines. ERK5:18S values are normalized to 1 shS cell line, given an arbitrary value of 1.0. (B) ERK5 protein levels in shERK5 Jurkat cell lines. Representative Western blot with anti-ERK5 (left); ERK5:β-actin ratio (right). (C and D) Cell-surface expression of CD3 $\epsilon$  (C) and TCR- $\alpha/\beta$  (D). Cells were incubated with anti-CD3 $\epsilon$  or anti-TCR- $\alpha/\beta$ , followed by staining with Alexa 488-conjugated F(ab')<sub>2</sub> anti-mouse antibody and analysis by flow cytometry. Representative histograms (upper); quantification of FACS staining (lower). The MFI is represented as a percentage of the value obtained with the shS cell line. (E) Expression of total CD3 $\epsilon$  (extracellular and intracellular). Representative histogram (upper); quantification of FACS staining (lower). (A and B) Nine and 10 different cell lines were analyzed for shS and shERK5 cell lines, respectively. (C–E) The analyses were repeated with 2 different shS cell lines and 2 different shERK5 cell lines, and the average  $\pm$  SD of 3 independent experiments is presented. \*\*\* $P < 0.001$ .

increased CD3 $\zeta$  expression led to increased TCR/CD3 at the surface of shERK5 Jurkat T cells and suggest a role for ERK5 in the regulation of CD3 $\zeta$  protein levels.

Antigen-stimulated T cells are known to down-regulate TCR/CD3 from the cell surface, a process that rapidly desensitizes the cell [4, 21]. To gain insight in the ERK5 function in the regulation of TCR/CD3 at the cell surface, we promoted TCR/CD3 down-regulation in shS and shERK5 cell lines by stimulation with soluble anti-CD3 $\epsilon$  antibody. Analysis of TCR/CD3 down-regulation by quantitation of cell-surface CD3 $\epsilon$  expression at different time points, showed a similar down-regulation pattern for both shERK5 and control shS cells (Fig. 2D).

The down-regulation of TCR/CD3 in stimulated T cells is reversed after removal of the stimulus [1]. To establish whether



**Figure 2. ERK5 knockdown in Jurkat T cells led to reduced CD3 $\zeta$  degradation and reduced TCR/CD3 recovery on the cell surface after anti-CD3 $\epsilon$  stimulation.** (A) CD3 $\zeta$  protein levels in shERK5 Jurkat cell lines. Representative Western blot with anti-CD3 $\zeta$  (left) and CD3 $\zeta$ : $\beta$ -actin ratio in 9 different cell lines (right) is presented. (B) CD3 $\zeta$  mRNA levels in shERK5 cell lines. CD3 $\zeta$ :18S values in 10 different cell lines were normalized to 1 shS cell line given an arbitrary value of 1.0. (C) CD3 $\zeta$  protein levels in shERK5 Jurkat cell lines. shS and shERK5 cells were cultured in the presence of cycloheximide (CHX; 25  $\mu$ g/ml) for different time points. Representative Western blot with anti-CD3 $\zeta$  (left) and CD3 $\zeta$ : $\beta$ -actin ratio (right) are presented. (D) Kinetics of CD3 $\epsilon$  down-regulation in shERK5 Jurkat cell lines. shS and shERK5 cells were stimulated with anti-CD3 $\epsilon$  (0.3  $\mu$ g/ml) for different time points at 37°C. The cells were then incubated with saturating amounts of the same anti-CD3 $\epsilon$ , followed by staining with Alexa 488-conjugated F(ab')<sub>2</sub> anti-mouse antibody and analyzed by flow cytometry. The MFI is represented as a percentage of the value obtained at time 0. (E) TCR/CD3 recovery after anti-CD3 $\epsilon$  treatment in shERK5 Jurkat cell lines. shS and shERK5 cells were treated during 6 h as in D and then washed twice to remove the antibody before culturing them in normal medium during 18 h. Then, the cells were stained as in D. TCR/CD3 recovery was normalized to the shS cell line given an arbitrary value of 1.0. (C–E) The analyses were repeated with 1 shS cell line and 1 shERK5 cell line, and the average  $\pm$  sd of 3 independent experiments is presented. \* $P$  < 0.05; \*\* $P$  < 0.01.

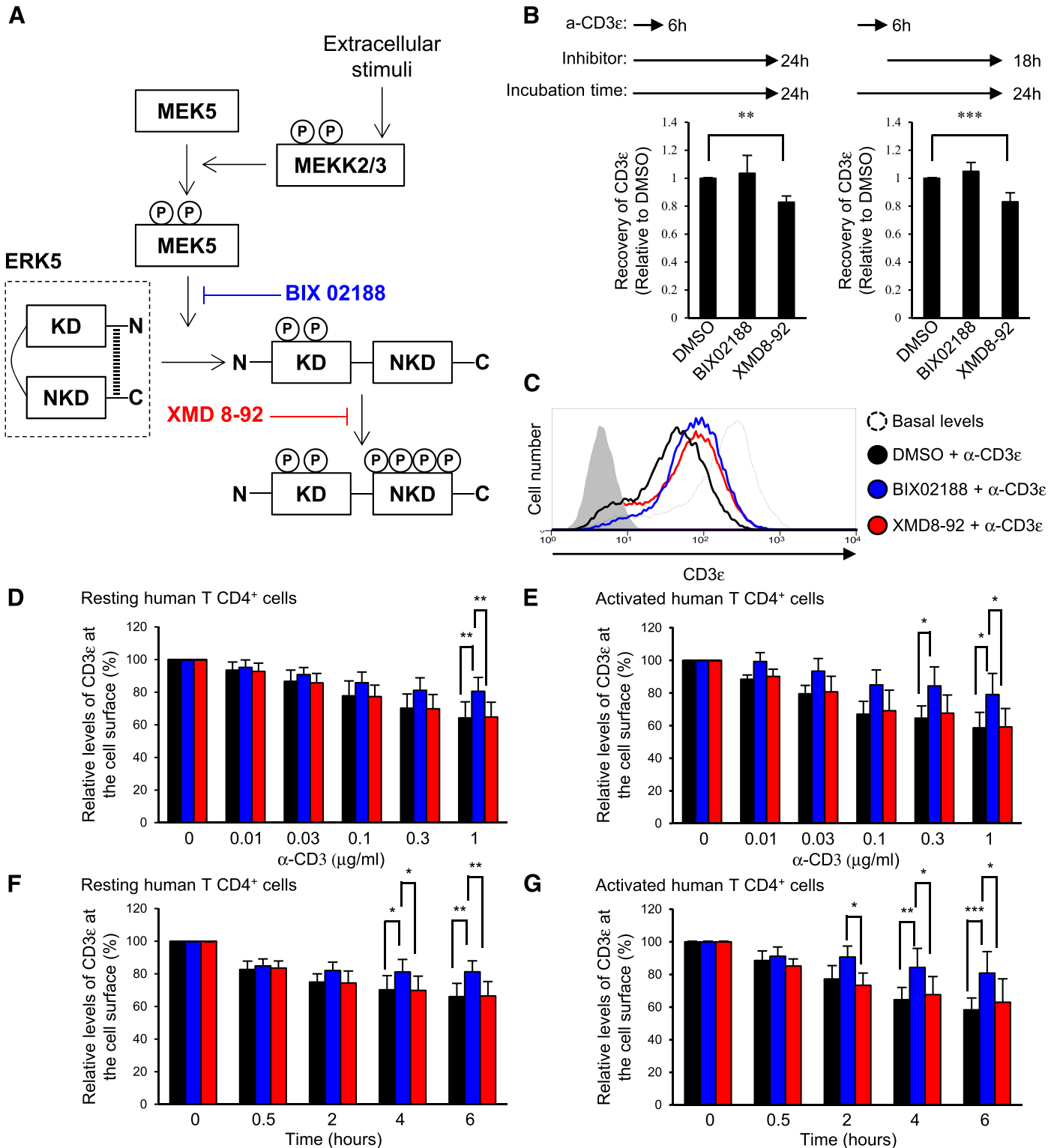
ERK5 controlled the recovery of TCR/CD3 at the cell surface, we treated shERK5 cells with anti-CD3 $\epsilon$  over 6 h, washed the cells to remove the antibody, and cultured them in normal medium for

18 h. Unexpectedly, the surface CD3 $\epsilon$  levels in shERK5 cells showed a 40% reduction compared with shS cells (Fig. 2E), suggesting that ERK5 may play a positive role in the TCR/CD3 recovery at the cell surface after anti-CD3 $\epsilon$  treatment. Taken together, these data support that ERK5 could alter cell-surface expression of TCR/CD3 by acting in 2 different pathways: CD3 $\zeta$  degradation and TCR/CD3 recovery at cell surface after anti-CD3 $\epsilon$  treatment.

**Pharmacological inhibition of ERK5 impaired TCR/CD3 down-regulation and reduced its recovery in anti-CD3 $\epsilon$ -stimulated T CD4<sup>+</sup> cells**

We next evaluated whether pharmacological inhibition of the MEK5/ERK5 signaling pathway affects TCR/CD3 recovery after anti-CD3 $\epsilon$  treatment. The inhibitor BIX02188 suppresses MEK5 catalytic activity and ERK5 phosphorylation in the kinase domain, whereas the inhibitor XMD8-92 blocks ERK5 autophosphorylation at the C-terminal region (Fig. 3A) [7]. At the concentrations used in this study, neither one is known to affect other related MAPKs [10, 11]. Whereas inhibition of the MEK5-dependent phosphorylation status of the ERK5 kinase domain by BIX02188 in TCR<sup>+</sup> PBMCs from healthy donors during TCR/CD3 recovery did not show differences compared with control cells, ERK5 inhibition with XMD8-92 resulted in an impaired capacity to recover normal levels of TCR/CD3 at the cell surface (Fig. 3B). These data suggest that ERK5 regulates TCR/CD3 recovery at the cell surface after anti-CD3 $\epsilon$  treatment through autophosphorylation of its C-terminal region and independently of the MEK5-dependent phosphorylation status of its kinase domain.

We also used these pharmacological inhibitors to analyze the effect of ERK5 during TCR/CD3 down-regulation. Interestingly, when Jurkat cells were CD3 stimulated in the presence of BIX02188 or XMD8-92, the down-regulation of TCR/CD3 was impaired (Fig. 3C and Supplemental Fig. 2A and B), suggesting a role for ERK5 in the control of TCR/CD3 down-regulation. To confirm our results in primary human T CD4<sup>+</sup> cells, these were stimulated with soluble anti-CD3 $\epsilon$  to induce TCR/CD3 down-regulation in the presence or absence of BIX02188 and XMD8-92. Stimulation of resting (Fig. 3D) or activated (Fig. 3E) T CD4<sup>+</sup> cells with different concentrations of anti-CD3 $\epsilon$  led to TCR/CD3 down-regulation, but interestingly, this was significantly impaired in cells treated with BIX02188. This confirmed a role for the MEK5/ERK5 signaling pathway in the regulation of cell-surface levels of TCR/CD3. Treatment with XMD8-92 did not modify TCR/CD3 down-regulation in resting (Fig. 3D) or activated (Fig. 3E) cells, suggesting that autophosphorylation of the C-terminal region of ERK5 was not involved in the regulation of TCR/CD3 down-regulation during anti-CD3 $\epsilon$  treatment. The inhibition of the MEK5/ERK5 signaling pathway by BIX02188 did not affect TCR/CD3 down-regulation in the 1st 30 min, but after this time, down-regulation was arrested in BIX02188-treated resting (Fig. 3F) or activated (Fig. 3G) T CD4<sup>+</sup> cells. Of note, stimulation of Jurkat cells with anti-CD3 $\epsilon$  led to TCR/CD3 down-regulation of >50% (Fig. 3C and Supplemental Fig. 2A and B), an extent that we did not observe in primary human T CD4<sup>+</sup> cells. This suggested a role for the phosphorylation of the C-terminal domain of ERK5 in the control of TCR/CD3 down-regulation during strong signaling.



**Figure 3.** TCR/CD3 down-regulation by anti-CD3 $\epsilon$  treatment is impaired by pharmacological inhibition of ERK5. (A) Mechanism of action of ERK5 pathway inhibitors. P, phosphorylation; MEKK, MEK kinase; KD, kinase domain; NKD, nonkinase domain; N, N terminus; C, C terminus. (B) TCR/CD3 recovery after anti-CD3 $\epsilon$  treatment in TCR<sup>+</sup> PBMCs, which were stimulated with anti-CD3 $\epsilon$  (0.3  $\mu$ g/ml) for 6 h at 37°C in the presence (left) or absence (right) of DMSO, BIX02188 (10  $\mu$ M), or XMD8-92 (10  $\mu$ M). Then, cells were washed twice to remove the antibody before culturing them during 18 h in medium with inhibitors and stained as in Fig. 2D. TCR/CD3 recovery was normalized to the shS cell line, given an arbitrary value of 1.0;  $n = 3$ . (C) Jurkat T cells treated with DMSO, BIX02188 (10  $\mu$ M), or XMD8-92 (10  $\mu$ M). After 1 h at 37°C, cells were stimulated with anti-CD3 $\epsilon$  (clone 33-2A3; 0.3  $\mu$ g/ml) for 4 h at 37°C. The cells were then incubated with saturating amounts of the same anti-CD3 $\epsilon$ , followed by staining with Alexa 488-conjugated F(ab')<sub>2</sub> (continued on next page)

**ERK5 controlled CD3ζ ubiquitination and degradation during TCR/CD3 down-regulation**

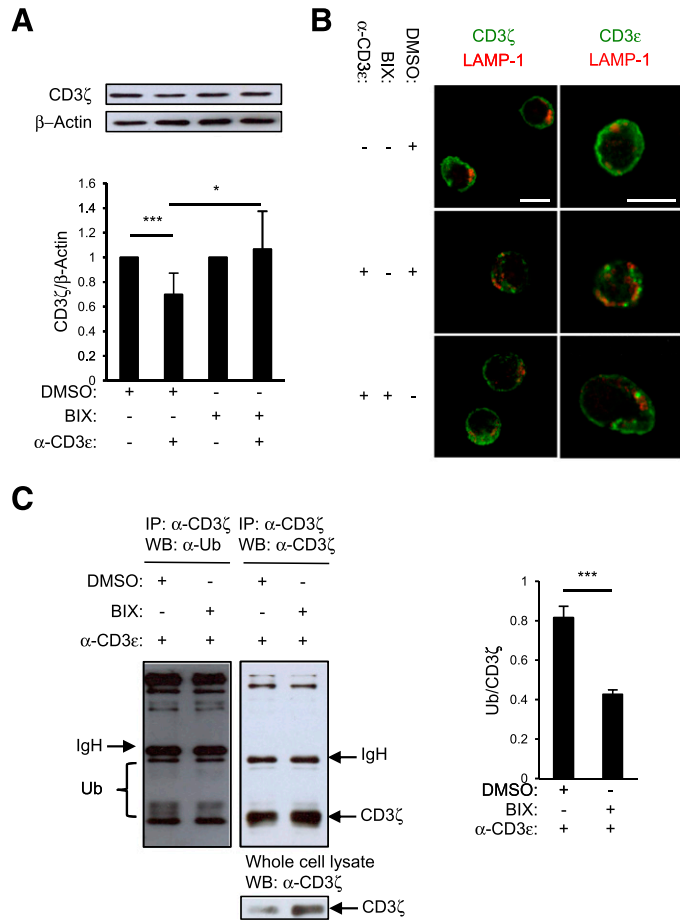
Results from shERK5 cell lines suggested a role for ERK5 in CD3ζ degradation. To prove it, we treated activated T CD4<sup>+</sup> cells with soluble anti-CD3ε over 6 h to induce CD3ζ degradation in the presence or absence of BIX02188. Whereas cellular levels of CD3ζ decreased with CD3 stimulation, treatment with BIX02188 blocked CD3ζ degradation (Fig. 4A). Importantly, in unstimulated cells, the inhibitor alone does not affect the CD3ζ steady state (Supplemental Fig. 2C), indicating that the kinase domain of ERK5 promotes CD3ζ degradation after CD3 stimulation. Confocal microscopy was then performed to visualize the effect of BIX02188 on CD3ε and CD3ζ distribution in T CD4<sup>+</sup> cells. As expected from flow cytometry and Western blot analysis, CD3 stimulation caused internalization of CD3ε and CD3ζ and reduction of CD3ζ (Fig. 4B), with both phenomena spared by BIX02188 treatment.

After TCR triggering, CD3ζ is known to be targeted by ubiquitination before its degradation [22], so next, we tested whether the pattern of CD3ζ ubiquitination was altered by ERK5 activity. PBMCs were stimulated with soluble anti-CD3ε to induce CD3ζ degradation, in the presence or absence of BIX02188, before cell lysates were prepared, and CD3ζ was immunoprecipitated. As previously seen for T CD4<sup>+</sup> cells (Fig. 4A), treatment of PBMCs with BIX02188 impaired the degradation of CD3ζ produced by CD3 stimulation (whole-cell lysate; Fig. 4C and Supplemental Fig. 2D). However, CD3ζ was less ubiquitinated in cells treated with BIX02188 (Fig. 4C and Supplemental Fig. 2D), suggesting that the kinase domain of ERK5 promoted CD3ζ ubiquitination. Taken together, these results indicate that the kinase domain of ERK5 promoted TCR/CD3 down-regulation by promoting ubiquitination and posterior degradation of CD3ζ.

**Splenic T cells from Erk5<sup>-/-</sup> mice did not show attenuated TCR/CD3 down-regulation**

To obtain insight into the physiologic significance of ERK5 in T cell function, we bred ERK5-floxed mice to Vav-Cre mice to generate ERK5-specific deficiency in the hematopoietic system (called ERK5<sup>-/-</sup>; Supplemental Fig. 3A–C). Neither the T cell cellularity (Supplemental Fig. 3D–E) nor the percentages of T CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells (Supplemental Fig. 3F and G) in the thymus and spleen were altered by the absence of ERK5, which was consistent with previous reports [14, 16] and confirmed that ERK5 was not needed for T cell development and peripheral T cell maintenance.

Our results suggest a role for ERK5 in the regulation of CD3ζ stability and TCR/CD3 traffic; however, steady-state, splenic T cells from ERK5<sup>-/-</sup> and ERK5<sup>+/+</sup> mice had similar amounts of CD3ε at the cell surface (Fig. 5A). Moreover, stimulation of splenocytes with anti-CD3ε at different time points revealed that TCR/CD3 down-regulation was not diminished in the ERK5<sup>-/-</sup> mice



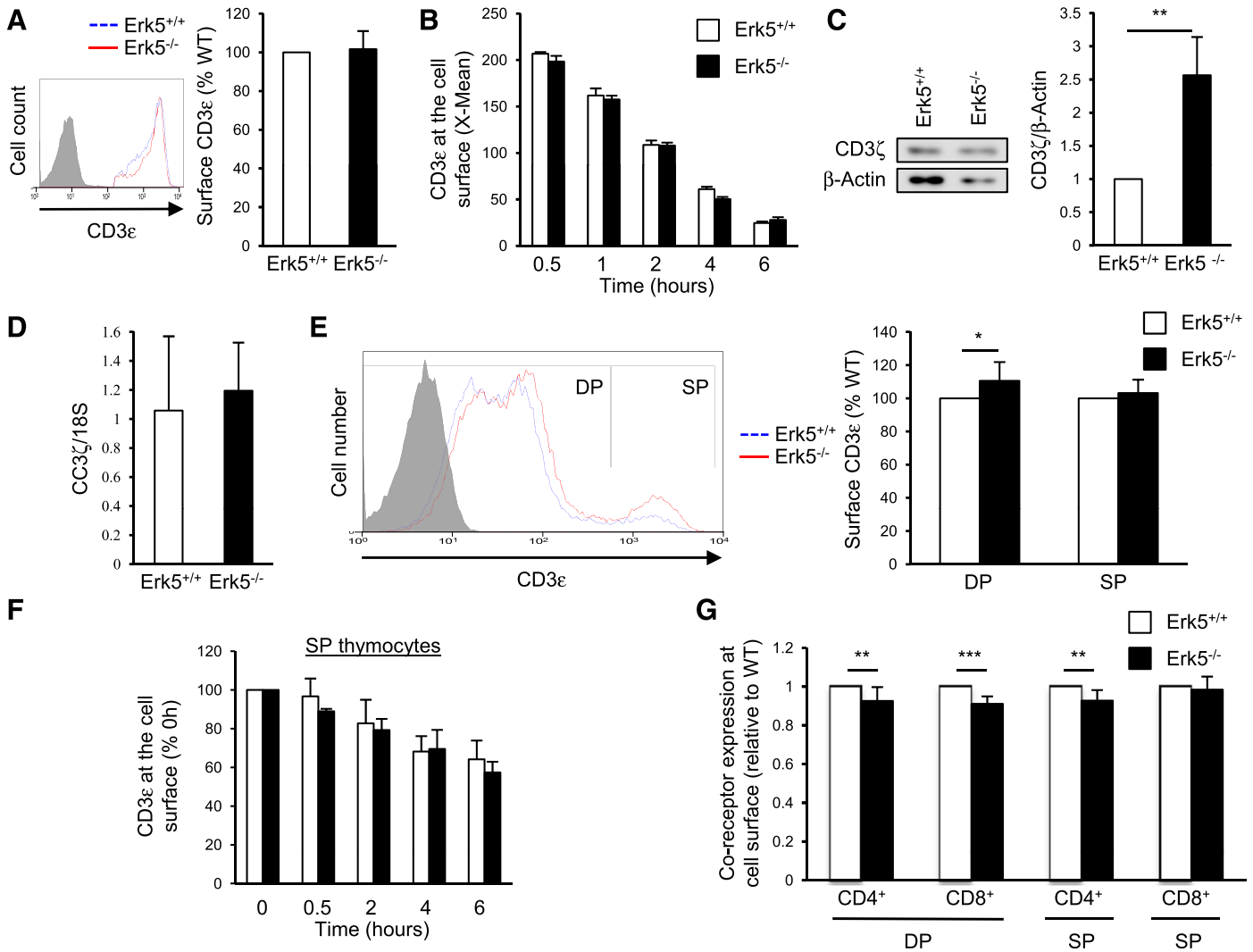
**Figure 4. Inhibition of ERK5 in anti-CD3ε-stimulated primary human T cells impairs CD3ζ ubiquitination and degradation.** (A) CD3ζ degradation after anti-CD3ε treatment. Activated T CD4<sup>+</sup> cells were treated as in Fig. 3F for 6 h. The cell lysates were immunoblotted with anti-CD3ζ. Representative Western blot (upper) and the CD3ζ:β-actin ratio (lower) are presented; n = 7. (B) Intracellular location of CD3ζ (left) and CD3ε (right). Activated human T CD4<sup>+</sup> cells were treated as in A, permeabilized, and stained with antibodies against CD3ζ (green) or CD3ε (green) and LAMP-1 (red). The samples were visualized by confocal microscopy, and representative images are presented. Original scale bars, 10 μm; n = 2. (C) CD3ζ ubiquitination (Ub). PBMCs were treated as in A, and CD3ζ was immunoprecipitated (IP) from PBMCs. Representative immunoblots [left; Western blot (WB)] and ubiquitination:CD3ζ ratio (right) are presented; n = 3. BIX, BIX02188. \*P < 0.05; \*\*\*P < 0.001.

compared with ERK5<sup>+/+</sup> mice (Fig. 5B), suggesting that ERK5 does not control TCR/CD3 down-regulation in murine splenocytes.

**ERK5<sup>-/-</sup> mice showed reduced degradation of CD3ζ in DP thymocytes**

Immature CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> DP thymocytes in the thymus express 10-fold less TCR/CD3 at the cell surface than mature CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> SP thymocytes because of a constitutive ubiquitination of CD3ζ

anti-mouse antibody and analyzed by flow cytometry. Representative histogram of cell-surface staining is shown. (D and E) Dose-response and (F and G) kinetics of CD3ε down-regulation. Resting (D and F) and activated (E and G) primary human T CD4<sup>+</sup> cells treated with DMSO, BIX02188 (10 μM), or XMD8-92 (10 μM) for 1 h at 37°C. Then, cells were treated with different anti-CD3ε concentrations or incubation times and stained as in Fig. 2D. The MFI is represented as a percentage of the value obtained at time 0; n = 4. \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001.



**Figure 5. ERK5<sup>-/-</sup> mice show reduced degradation of CD3ζ in DP thymocytes.** (A) Cell-surface expression of CD3ε on mice splenocytes. Cells were incubated with anti-CD3ε (clone 145-2C11), followed by staining with Alexa 488-conjugated F(ab')<sub>2</sub> anti-hamster antibody and analyzed by flow cytometry. A representative histogram (left) and the MFI (right; as the percentage of the value obtained in ERK5<sup>+/+</sup> mice) are presented. The average ± SD of ERK5<sup>+/+</sup> and ERK5<sup>-/-</sup> mice (*n* = 6) is presented. (B) Kinetics of CD3ε down-regulation. Splenocytes were stimulated with anti-CD3ε (clone 145-2C11; 1 μg/ml) at 37°C for the times indicated. The cells were then incubated with saturating amounts of the same anti-CD3ε and stained with Alexa 488-conjugated F(ab')<sub>2</sub> anti-hamster antibody before analysis by flow cytometry. The average ± SD of ERK5<sup>+/+</sup> (*n* = 3) and ERK5<sup>-/-</sup> (*n* = 4) mice is presented. (C) CD3ζ protein levels in DP thymocytes, which were sorted as described in Materials and Methods. The cell lysates were immunoblotted with anti-CD3ζ. Representative Western blot (left) and the CD3ζ:β-actin ratio (right) are presented. Average ± SD of 3 pairs of ERK5<sup>+/+</sup> and ERK5<sup>-/-</sup> mice is shown. (D) CD3ζ mRNA levels in DP thymocytes. CD3ζ:18S was normalized to ERK5<sup>+/+</sup> mice and given an arbitrary value of 1.0. Average ± SD of 5 pairs of ERK5<sup>+/+</sup> and ERK5<sup>-/-</sup> mice is shown. (E) Cell-surface expression of CD3ε on mice thymocytes. Cells were incubated and stained as in A. Representative histograms showing 2 different cell populations based on CD3ε expression (left). The MFI is represented as a percentage of the value obtained in the DP or SP population in ERK5<sup>+/+</sup> mice (right). Average ± SD of 8 pairs of ERK5<sup>+/+</sup> and ERK5<sup>-/-</sup> mice is shown. (F) Kinetics of CD3ε down-regulation. Thymocytes were stimulated with anti-CD3ε (clone 145-2C11; 1 μg/ml) at 37°C for the times indicated. The cells were then incubated with saturating amounts of the same anti-CD3ε and stained with Alexa 488-conjugated F(ab')<sub>2</sub> anti-hamster antibody before analysis by flow cytometry by gating in the CD3<sup>high</sup> thymocytes. The average ± SD of ERK5<sup>+/+</sup> (*n* = 3) and ERK5<sup>-/-</sup> (*n* = 4) mice is presented. (G) Cell-surface expression of CD4 and CD8 on mice thymocytes, which were stained with anti-CD4-APC and anti-CD8-FITC and analyzed by flow cytometry. The MFI is represented for each marker as a percentage of the value obtained in the DP or SP population in ERK5<sup>+/+</sup> mice. Average ± SD of 9 pairs of ERK5<sup>+/+</sup> and ERK5<sup>-/-</sup> mice is shown. WT, Wild-type. \**P* < 0.05; \*\**P* < 0.01; \*\*\**P* < 0.001.

[22]. Given that ERK5 promotes CD3ζ ubiquitination on peripheral T CD4<sup>+</sup> cells after anti-CD3ε stimulation (Fig. 4C), we surmised that ERK5 could play a role in controlling CD3ζ steady state in DP thymocytes. Therefore, we analyzed the total amount of CD3ζ on the immature DP thymocytes of ERK5<sup>-/-</sup> mice and

detected a 2.5-fold increase compared with ERK5<sup>+/+</sup> mice (Fig. 5C). Interestingly, CD3ζ mRNA levels were similar in the DP thymocytes of ERK5<sup>-/-</sup> and ERK5<sup>+/+</sup> mice (Fig. 5D), suggesting that ERK5 promoted CD3ζ degradation. In addition, as CD3ζ degradation regulates TCR/CD3 expression on DP thymocytes



[22], we analyzed CD3 $\epsilon$  expression at the cell surface by flow cytometry. As DP thymocytes express 10-fold less TCR/CD3 at the cell surface than SP cells [5], we separated DP and SP thymocytes by CD3 $\epsilon$  staining intensity (Fig. 5E, histogram). As expected from the analysis of TCR/CD3 expression in splenic T cells (Fig. 5A and B), SP thymocytes from ERK5 $^{-/-}$  and ERK5 $^{+/+}$  mice showed the same levels of cell-surface CD3 $\epsilon$  (Fig. 5E) and the same TCR/CD3 down-regulation profile after anti-CD3 $\epsilon$  treatment (Fig. 5F). However, in DP thymocytes of ERK5 $^{-/-}$  mice, CD3 $\epsilon$  expression on the cell membrane was slightly increased (Fig. 5E), consistent with the increased CD3 $\zeta$  levels in these cells. Thus, ERK5 controlled TCR/CD3 levels at the cell surface of immature DP thymocytes by promoting CD3 $\zeta$  degradation.

Interestingly, cell-surface CD4 and CD8 levels of DP thymocytes and CD4 levels of CD4 $^{+}$  SP thymocytes were slightly down-regulated in ERK5 $^{-/-}$  mice (Fig. 5G). We do not know at this point whether the decrease of CD4 and CD8 in DP thymocytes was an indirect consequence of higher TCR expression or a direct effect of the absence of ERK5. However, changes in the relative abundance of TCR/CD3 receptors or CD4 and CD8 coreceptors could affect the selection process through minimum and maximum signaling thresholds that determine the fate of DP thymocytes, which in turn, could lead to death by neglect and negative selection with weak and strong signals, respectively [5]. ERK5 deficiency in Jurkat T cells promotes AICD after anti-CD3 $\epsilon$  stimulation (Supplemental Fig. 1D), and it has been proposed that the MEK5/ERK5 pathway plays a role in negative selection [12]. However, TUNEL staining to determine if ERK5 influences thymocyte apoptosis showed a similar number of TUNEL $^{+}$  apoptotic thymocytes in ERK5 $^{-/-}$  and ERK5 $^{+/+}$  mice (Fig. 6A and Supplemental Fig. 4A). Moreover, FACS quantification by Annexin V and propidium iodide staining showed the same amount of apoptotic thymocytes in ERK5 $^{-/-}$  compared with ERK5 $^{+/+}$  mice (Fig. 6B). These results indicate that the higher amount of TCR/CD3 at the cell surface of DP thymocytes from ERK5 $^{-/-}$  mice does not promote apoptosis. However, the existence of a potential compensatory phenomenon cannot be excluded at this point.

### ERK5 $^{-/-}$ mice showed an increased percentage of CD4 $^{+}$ CD8 $^{-}$ CD25 $^{+}$ thymocytes and reduced percentage of T $_{reg}$ in the spleen

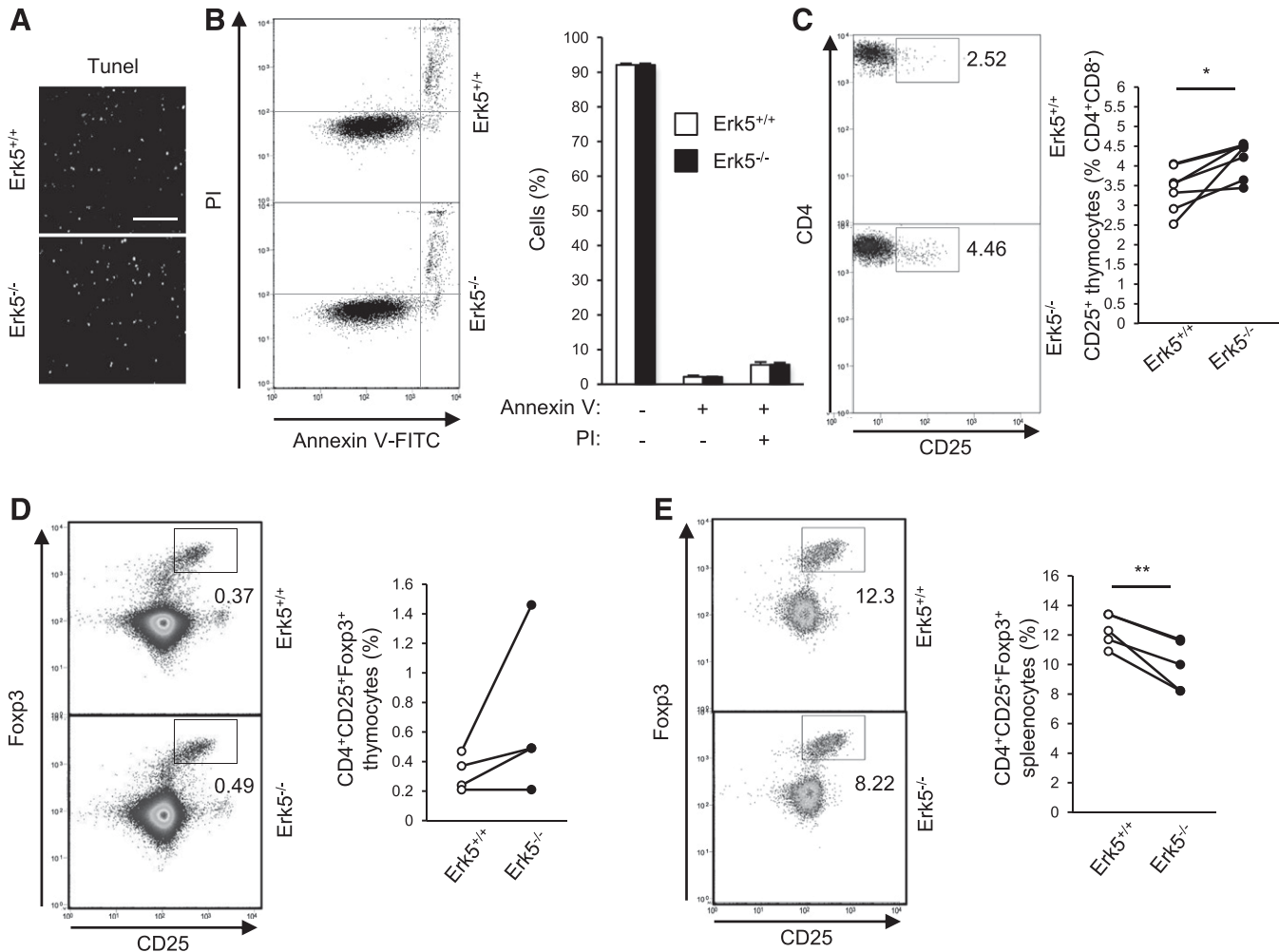
Up-regulated TCR/CD3 on the cell surface is known to influence the strength of the TCR/CD3 signal by altering TCR avidity for peptide and MHC [1]. During development, CD4 $^{+}$ CD8 $^{-}$ CD25 $^{+}$ Foxp3 $^{+}$  tT $_{reg}$ s experience stronger TCR/CD3 signals than conventional T cells, and a population enriched in tT $_{reg}$  progenitors (CD4 $^{+}$ CD8 $^{-}$ CD25 $^{+}$ Foxp3 $^{-}$ ) receives even stronger TCR/CD3 signals [23]; therefore, we hypothesized that up-regulation of TCR/CD3 at the cell surface of DP thymocytes could increase the presence of CD4 $^{+}$ CD8 $^{-}$ CD25 $^{+}$  thymocytes in ERK5 $^{-/-}$  mice. To examine the effect of ERK5 deficiency in the development of this thymocyte subpopulation, we analyzed the percentage of CD4 $^{+}$ CD8 $^{-}$ CD25 $^{+}$  cells in the thymus by flow cytometry. Compared with ERK5 $^{+/+}$  mice, the absence of ERK5 increased the CD4 $^{+}$ CD8 $^{-}$ CD25 $^{+}$  population in the thymus (Fig. 6C), suggesting that ERK5 limited the generation of CD4 $^{+}$ CD8 $^{-}$ CD25 $^{+}$  thymocytes by down-regulating TCR/CD3 at the cell surface of

DP thymocytes via degradation of CD3 $\zeta$ . To examine further the effect of ERK5 on T $_{reg}$  development, we bred Vav-Cre/ERK5 $^{loxP/loxP}$  mice to Foxp3 $^{EGFP}$  reporter mice to generate ERK5 $^{-/-}$  mice with fluorescently labeled T $_{regs}$ . ERK5 $^{-/-}$  mice present a similar percentage of CD4 $^{+}$ CD8 $^{-}$ CD25 $^{+}$ Foxp3 $^{+}$  tT $_{regs}$  compared with ERK5 $^{+/+}$  mice (Fig. 6D), suggesting a proper tT $_{reg}$  development, despite the enrichment in the population of tT $_{reg}$  progenitors. Remarkably, ERK5 deletion results in a reduced percentage of T $_{regs}$  in the spleen (Fig. 6E). In summary, ERK5 $^{-/-}$  mice show an augmented presence of tT $_{reg}$  progenitors and a reduced percentage of T $_{regs}$  in the spleen, with both phenomena apparently unrelated, considering the normal development of the tT $_{reg}$  population.

## DISCUSSION

In the present study, we used different models to demonstrate that ERK5 has a dual role with antagonistic effects in the modulation of TCR/CD3 complex levels at the cell surface. On 1 hand, ERK5 knockdown or inhibition of ERK5 autophosphorylation leads to reduced amounts of the TCR/CD3 complex at the cell surface after anti-CD3 $\epsilon$  stimulation. On the other hand, we show several evidences suggesting that ERK5 promotes CD3 $\zeta$  degradation during anti-CD3 $\epsilon$  stimulation, leading to diminished TCR/CD3 levels at the cell surface. First, knockdown of ERK5 in Jurkat cells resulted in increased amounts of CD3 $\zeta$  without affecting CD3 $\epsilon$ , which led to higher cell-surface levels of TCR/CD3 (Figs. 1 and 2). Second, inhibition of MEK5-dependent phosphorylation of ERK5 in Jurkat and human T CD4 $^{+}$  cells impaired TCR/CD3 down-regulation after anti-CD3 $\epsilon$  stimulation (Fig. 3). Although ERK5 inhibitors are a proposed therapeutic approach for different cancers [24, 25], our results suggest that such treatment could produce undesired effects on T cell development. Third, DP thymocytes from ERK5 $^{-/-}$  mice showed increased CD3 $\zeta$  (Fig. 5C), probably as a consequence of altered tonic CD3 $\zeta$  ubiquitination, which is used by DP thymocytes to regulate the levels of TCR/CD3 on the cell surface [22]. Despite the small up-regulation of TCR/CD3, it could account for a shifted signaling threshold and altered selection process. Intriguingly, neither resting nor anti-CD3 $\epsilon$ -stimulated, splenic T cells from the ERK5 $^{-/-}$  mice showed altered levels of TCR/CD3 (Fig. 5B). However, we cannot discount the existence of a compensatory phenomenon or the possibility that different TCR/CD3 ligands or longer incubation times could lead to effects similar to those observed in the LAPTM5 $^{-/-}$  mice, which shows impaired TCR down-regulation in splenic T cells by promoting lysosomal degradation of CD3 $\zeta$  after anti-CD3 $\epsilon$  stimulation [26]. This point merits further study.

It was recently proposed that 2 different pathways were able to degrade CD3 $\zeta$  [27]. These included a LAPTM5-dependent pathway, which promotes degradation of intracellular CD3 $\zeta$  before assembly in the Golgi apparatus with the TCR- $\alpha\beta$ CD3 $\gamma\epsilon$ CD3 $\delta\epsilon$  complex [21], and a SLAP/c-Cbl pathway [28], which promotes degradation of recently internalized CD3 $\zeta$  from the cell surface [4, 29]. We show that ERK5-deficient DP thymocytes display a similar phenotype to LAPTM5-deficient DP thymocytes [26] but that this is less intense than in the SLAP- or



**Figure 6.** ERK5<sup>-/-</sup> mice show increased percentage of CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup> thymocytes and reduced percentage of T<sub>reg</sub> in the spleen. (A) In situ TUNEL staining on thymus sections. Representative images of 1 of the 3 pairs of ERK5<sup>+/+</sup> and ERK5<sup>-/-</sup> mice analyzed. Original scale bar, 100  $\mu$ m. Contrast and brightness have been adjusted to the entire figure to facilitate its visualization. (B) Apoptosis on thymocytes, which were stained in binding buffer with Annexin V-FITC (1:40 dilution) and propidium iodide (PI; 0.4  $\mu$ g/ml) and analyzed by flow cytometry. Representative flow cytometric profiles (left). The percentages of Annexin V-positive or propidium iodide-positive cells in ERK5<sup>+/+</sup> ( $n = 2$ ) and ERK5<sup>-/-</sup> ( $n = 2$ ) mice are shown (right). (C) Percentages of CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup> thymocytes, which were stained with anti-CD4-APC, anti-CD8-FITC, and anti-CD25-PE and analyzed by flow cytometry. Representative flow cytometric profiles of cell-surface staining/gating in CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> population (left). The percentages of 7 pairs of ERK5<sup>+/+</sup> and ERK5<sup>-/-</sup> mice are shown (right). Differences were compared by use of paired Student's *t* test. (D and E) Flow cytometry analysis of tT<sub>reg</sub> (D) and spleen (E) from ERK5<sup>-/-</sup>-Foxp3<sup>EGFP</sup> and ERK5<sup>+/+</sup>-Foxp3<sup>EGFP</sup> mice. Cells were stained with anti-CD4-APC and anti-CD25-PE and analyzed by flow cytometry. Representative flow cytometric profiles of cell-surface staining/gating in CD4<sup>+</sup> populations (left). The percentages of ERK5<sup>+/+</sup> ( $n = 4$ ) and ERK5<sup>-/-</sup> ( $n = 4$ ) mice are shown (right). Differences were compared by use of paired Student's *t* test. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ .

c-Cbl-deficient DP thymocytes. Conversely, ERK5 inhibition in T CD4<sup>+</sup> cells showed that ERK5 was involved in the ubiquitination and degradation of recently internalized CD3 $\zeta$  (Fig. 4), suggesting that ERK5 could be involved in the regulation of both pathways. Additional studies will be needed to elucidate the relationship among ERK5, SLAP/c-Cbl, and LAPTM5 signaling pathways in the control of CD3 $\zeta$  traffic and degradation.

The development of tT<sub>regs</sub> comprises 2 stages [30, 31]: in the 1st stage, SP CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> thymocytes have up-regulated cell-surface CD25, a subunit of the high-affinity IL-2R; in the 2nd stage (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>), *Foxp3* is induced. The former is TCR/CD3 dependent, and the latter is TCR/CD3 independent and IL-2 dependent [30, 31]. We propose that the up-regulation

of TCR/CD3 on DP thymocytes in ERK5<sup>-/-</sup> mice could account for the shift toward a CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> phenotype. In addition, SLAP deficiency in mice increases the number of tT<sub>regs</sub> [32], suggesting a role for the pathways that controls CD3 $\zeta$  degradation.

In conclusion, our study identifies ERK5 as a novel kinase that modulates TCR/CD3 expression in mouse and human T cells through the control of CD3 $\zeta$  degradation and TCR/CD3 recovery after anti-CD3 $\epsilon$  treatment. Further studies will be necessary to elucidate the downstream pathways activated by ERK5 that mediate CD3 $\zeta$ -chain degradation, as well as the implications of this phenomenon in T cell activation and T<sub>reg</sub> development and function.

## AUTHORSHIP

X.R.-C. conceived of, designed, and performed most of the experiments. M.A.-I. and E.E. designed and performed experiments. C.T. provided Erk5<sup>loxP/loxP</sup> mice. X.R.-C., M.A.-I., M.R., and E.E. analyzed the data. X.R.-C., M.R., and E.E. wrote the manuscript.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Grant FBG300412 from Fundació Bosch i Gimpera (to M.R.). X.R.-C. and M.A.-I. are supported by a predoctoral fellowship from Fundació Bosch i Gimpera (FBG300412). The authors thank the technical staff of the FACS Facility, the staff of the Animal Facility for maintaining the mice, and members of the M.R. laboratory for comments and suggestions.

## DISCLOSURES

The authors declare no competing financial interests.

## REFERENCES

- Schrum, A. G., Turka, L. A., Palmer, E. (2003) Surface T-cell antigen receptor expression and availability for long-term antigenic signaling. *Immunol. Rev.* **196**, 7–24.
- Von Essen, M., Bonefeld, C. M., Siersma, V., Rasmussen, A. B., Lauritsen, J. P. H., Nielsen, B. L., Geisler, C. (2004) Constitutive and ligand-induced TCR degradation. *J. Immunol.* **173**, 384–393.
- Liu, H., Rhodes, M., Wiest, D. L., Vignali, D. A. (2000) On the dynamics of TCR:CD3 complex cell surface expression and downmodulation. *Immunity* **13**, 665–675.
- Naramura, M., Jang, I.-K., Kole, H., Huang, F., Haines, D., Gu, H. (2002) c-Cbl and Cbl-b regulate T cell responsiveness by promoting ligand-induced TCR down-modulation. *Nat. Immunol.* **3**, 1192–1199.
- Starr, T. K., Jameson, S. C., Hogquist, K. A. (2003) Positive and negative selection of T cells. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 139–176.
- Kortum, R. L., Rouquette-Jazdanian, A. K., Samelson, L. E. (2013) Ras and extracellular signal-regulated kinase signaling in thymocytes and T cells. *Trends Immunol.* **34**, 259–268.
- Nithianandarajah-Jones, G. N., Wilm, B., Goldring, C. E. P., Müller, J., Cross, M. J. (2012) ERK5: structure, regulation and function. *Cell. Signal.* **24**, 2187–2196.
- Kato, Y., Kravchenko, V. V., Tapping, R. I., Han, J., Ulevitch, R. J., Lee, J. D. (1997) BMK1/ERK5 regulates serum-induced early gene expression through transcription factor MEF2C. *EMBO J.* **16**, 7054–7066.
- Regan, C. P., Li, W., Boucher, D. M., Spatz, S., Su, M. S., Kuida, K. (2002) Erk5 null mice display multiple extraembryonic vascular and embryonic cardiovascular defects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 9248–9253.
- Tatake, R. J., O'Neill, M. M., Kennedy, C. A., Wayne, A. L., Jakes, S., Wu, D., Kugler, S. Z., Jr., Kashem, M. A., Kaplita, P., Snow, R. J. (2008) Identification of pharmacological inhibitors of the MEK5/ERK5 pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **377**, 120–125.
- Yang, Q., Deng, X., Lu, B., Cameron, M., Fearn, C., Patricelli, M. P., Yates III, J. R., Gray, N. S., Lee, J.-D. (2010) Pharmacological inhibition of BMK1 suppresses tumor growth through promyelocytic leukemia protein. *Cancer Cell* **18**, 258–267.
- Sohn, S. J., Lewis, G. M., Winoto, A. (2008) Non-redundant function of the MEK5-ERK5 pathway in thymocyte apoptosis. *EMBO J.* **27**, 1896–1906.
- Garaude, J., Kaminski, S., Cherni, S., Hipkind, R. A., Villalba, M. (2005) The role of ERK5 in T-cell signalling. *Scand. J. Immunol.* **62**, 515–520.
- Ananieva, O., Macdonald, A., Wang, X., McCoy, C. E., McIlrath, J., Tournier, C., Arthur, J. S. C. (2008) ERK5 regulation in naïve T-cell activation and survival. *Eur. J. Immunol.* **38**, 2534–2547.
- Sohn, S. J., Li, D., Lee, L. K., Winoto, A. (2005) Transcriptional regulation of tissue-specific genes by the ERK5 mitogen-activated protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 8553–8566.
- Weinreich, M. A., Jameson, S. C., Hogquist, K. A. (2011) Postselection thymocyte maturation and emigration are independent of IL-7 and ERK5. *J. Immunol.* **186**, 1343–1347.
- Stadtfeld, M., Graf, T. (2005) Assessing the role of hematopoietic plasticity for endothelial and hepatocyte development by non-invasive lineage tracing. *Development* **132**, 203–213.
- Rovira-Clavé, X., Angulo-Ibáñez, M., Noguer, O., Espel, E., Reina, M. (2012) Syndecan-2 can promote clearance of T-cell receptor/CD3 from the cell surface. *Immunology* **137**, 214–225.
- Rovira-Clavé, X., Angulo-Ibáñez, M., Reina, M., Espel, E. (2014) The PDZ-binding domain of syndecan-2 inhibits LFA-1 high-affinity conformation. *Cell. Signal.* **26**, 1489–1499.
- D'Oro, U., Munitic, I., Chacko, G., Karpova, T., McNally, J., Ashwell, J. D. (2002) Regulation of constitutive TCR internalization by the ζ-chain. *J. Immunol.* **169**, 6269–6278.
- Yudushkin, I. A., Vale, R. D. (2010) Imaging T-cell receptor activation reveals accumulation of tyrosine-phosphorylated CD3ζ in the endosomal compartment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 22128–22133.
- Wang, H., Holst, J., Woo, S. R., Guy, C., Bettini, M., Wang, Y., Shafer, A., Naramura, M., Mingueneau, M., Dragone, L. L., Hayes, S. M., Malissen, B., Band, H., Vignali, D. A. (2010) Tonic ubiquitylation controls T-cell receptor:CD3 complex expression during T-cell development. *EMBO J.* **29**, 1285–1298.
- Moran, A. E., Holzapfel, K. L., Xing, Y., Cunningham, N. R., Maltzman, J. S., Punt, J., Hogquist, K. A. (2011) T cell receptor signal strength in Treg and iNKT cell development demonstrated by a novel fluorescent reporter mouse. *J. Exp. Med.* **208**, 1279–1289.
- Álvarez-Fernández, S., Ortíz-Ruiz, M. J., Parrott, T., Zaknoen, S., Ocio, E. M., San Miguel, J., Burrows, F. J., Esparis-Ogando, A., Pandiella, A. (2013) Potent antimyeloma activity of a novel ERK5/CDK inhibitor. *Clin. Cancer Res.* **19**, 2677–2687.
- Shukla, A., Miller, J. M., Cason, C., Sayan, M., MacPherson, M. B., Beuschel, S. L., Hillegass, J., Vacek, P. M., Pass, H. I., Mossman, B. T. (2013) Extracellular signal-regulated kinase 5: a potential therapeutic target for malignant mesotheliomas. *Clin. Cancer Res.* **19**, 2071–2083.
- Ouchida, R., Yamasaki, S., Hikida, M., Masuda, K., Kawamura, K., Wada, A., Mochizuki, S., Tagawa, M., Sakamoto, A., Hatano, M., Tokuhisa, T., Koseki, H., Saito, T., Kurosaki, T., Wang, J.-Y. (2008) A lysosomal protein negatively regulates surface T cell antigen receptor expression by promoting CD3zeta-chain degradation. *Immunity* **29**, 33–43.
- Kawai, Y., Ouchida, R., Yamasaki, S., Dragone, L., Tsubata, T., Wang, J. Y. (2014) LAPTM5 promotes lysosomal degradation of intracellular CD3ζ but not of cell surface CD3ζ. *Immunol. Cell Biol.* **92**, 527–534.
- Myers, M. D., Sosinowski, T., Dragone, L. L., White, C., Band, H., Gu, H., Weiss, A. (2006) Src-like adaptor protein regulates TCR expression on thymocytes by linking the ubiquitin ligase c-Cbl to the TCR complex. *Nat. Immunol.* **7**, 57–66.
- Myers, M. D., Dragone, L. L., Weiss, A. (2005) Src-like adaptor protein down-regulates T cell receptor (TCR)-CD3 expression by targeting TCRzeta for degradation. *J. Cell Biol.* **170**, 285–294.
- Lio, C.-W. J., Hsieh, C.-S. (2008) A two-step process for thymic regulatory T cell development. *Immunity* **28**, 100–111.
- Burchill, M. A., Yang, J., Vang, K. B., Moon, J.-J., Chu, H. H., Lio, C.-W. J., Vegoe, A. L., Hsieh, C.-S., Jenkins, M. K., Farrar, M. A. (2008) Linked T cell receptor and cytokine signaling govern the development of the regulatory T cell repertoire. *Immunity* **28**, 112–121.
- Peterson, L. K., Shaw, L. A., Joetham, A., Sakaguchi, S., Gelfand, E. W., Dragone, L. L. (2011) SLAP deficiency enhances number and function of regulatory T cells preventing chronic autoimmune arthritis in SKG mice. *J. Immunol.* **186**, 2273–2281.

## KEY WORDS:

MAPK · TCR down-regulation · ubiquitination · regulatory T cell