

~~T prov 27/100~~

T 10/26

**TESIS DOCTORAL**

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha ..2-10-97.....
ENTRADA NUM. 3011.....

**ESTUDIO E IDENTIFICACION DE MOLECULAS QUE SE ASOCIAN A LA SUBUNIDAD CD3-ε DEL RECEPTOR PARA EL ANTIGENO DE LOS LINFOCITOS T.**

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
Nº Documento 615153848
Nº Copia 16344224

**Presentada por la licenciada Isabel Elena de Aós Scherpenseel para optar al grado de Doctor en Biología.**

**Director: Dr. Jaime Sancho López**  
**Instituto de Parasitología y Biomedicina,**  
**CSIC, Granada.**

**Granada, Noviembre de 1997**

UNIVERSIDAD DE GRANADA
22 SET. 1997
COMISION DE DOCTORADO

**INDICE**

<b>Abreviaturas</b> .....	1
<b>I. Introducción</b> .....	3
I.1. El receptor para el antígeno de los linfocitos T. ....	4
I.1.1. Estructura del complejo receptor para el antígeno de los linfocitos T/CD3. ....	4
I.1.1.1. Las cadenas polipeptídicas TCR $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ y $\delta$ . ....	4
I.1.1.2. Las cadenas polipeptídicas CD3 $\gamma$ , $\delta$ y $\epsilon$ . ....	5
I.1.1.3. Las cadenas polipeptídicas $\zeta$ , $\eta$ y Fc $\epsilon$ R1 $\gamma$ . ....	6
I.1.2. Modelo estructural del TCR/CD3 . ....	8
I.1.3. Activación del linfocito T. ....	10
I.2. Co-receptores. ....	14
I.2.1. Estructura de CD4 y CD8. ....	14
I.2.2. El papel de CD4 y CD8 en la activación de los linfocitos T. ....	15
I.2.3. CD28 y CTLA-4. ....	17
I.2.4. La fosfotirosina fosfatasa CD45. ....	18
I.3. Moléculas implicadas en la transducción de señales a través del TCR/CD3. ....	21
I.3.1. Las tirosina quinasas de la familia <i>Src</i> . ....	21
I.3.1.1. Asociación de p56 <i>lck</i> a CD4 y CD8. ....	24
I.3.1.2. Asociación de CD3 $\zeta$ y p59 <i>fyn</i> . ....	25
I.3.1.3. Otras asociaciones de las PTKs de la familia <i>src</i> . ....	25
I.3.2. La familia de tirosina quinasas Syk/ZAP-70. ....	25
I.3.2.1. La asociación de ZAP-70 con las cadenas CD3. ....	26
I.3.3. La fosfatidilinositol 3 quinasa. ....	29
I.3.3.1. Las proteínas que se asocian a PI 3-quinasa. ....	30
I.3.4. La proteína adaptadora Shc. ....	32
I.3.5. La proteína adaptadora Grb2. ....	34
I.3.6. La proteína c-cbl. ....	35
I.3.7. Proteínas pequeñas que unen GTP: La superfamilia Ras ..... 37	
I.4. Transducción de señales mediada por el TCR/CD3. ....	39
I.4.1. El papel de CD3 $\epsilon$ en la transducción de señales. ....	42
<b>II. Objetivos</b> .....	44

---

<b>III. Material y métodos</b> .....	46
III.1. Material general. ....	47
III.2. Cultivos celulares. ....	47
III.2.1. Líneas celulares. ....	47
III.2.2. Mantenimiento. ....	48
III.3. Determinación de la viabilidad celular. ....	48
III.4. Generación de las quimeras. ....	48
III.5. Preparación de las matrices de afinidad. ....	49
III.5.1. Material. ....	49
III.5.2. Soluciones. ....	49
III.5.3. Asociación de los péptidos a las matrices de afinidad. ....	50
III.5.4. Marcaje mediante quinasa de músculo de corazón. ....	50
III.5.4.1. Material. ....	50
III.5.4.2. Soluciones. ....	50
III.5.4.3. Marcaje de los péptidos mediante la quinasa de músculo de corazón. ....	50
III.6. Análisis e identificación de proteínas mediante Western-Blot. ....	51
III.6.1. Material. ....	51
III.6.2. Soluciones. ....	51
III.6.3. Electroforesis de proteínas. ....	52
III.6.4. Inmunotransferencia y Western-Blot. ....	52
III.6.5. Estudio de proteínas fosforiladas en tirosina. ....	52
III.6.6. Reincubación de las membranas. ....	53
III.6.7. Tinción de geles de acrilamida con azul brillante de Coomasie.....	53
III.7. Estimulación celular. ....	53
III.7.1. Material. ....	53
III.7.2. Soluciones. ....	53
III.7.3. Activación celular. ....	53
III.7.4. Pretratamiento con herbimicina-A. ....	54
III.7.5. Tratamiento con pervanadato. ....	54
III.7.6. Obtención de material insoluble en NP-40. ....	54
III.8. Inmunoprecipitación. ....	55
III.8.1. Material. ....	55
III.8.2. Soluciones. ....	55
III.8.3. Preparación de las muestras. ....	55

---

---

III.9. Determinación <i>in vitro</i> de la actividad PI 3-quinasa. ....	56
III.9.1. Material. ....	56
III.9.2. Soluciones. ....	56
III.9.3. Ensayo de actividad PI 3-quinasa. ....	56
III.9.4. Extracción de fosfolípidos y análisis de los productos. ....	57
III.10. Ensayo de unión a GTP. ....	58
III.10.1. Material. ....	58
III.10.2. Soluciones. ....	58
III.10.3. Ensayo de unión a GTP. ....	58
III.10.4. Western-Bolt después del ensayo de unión a GTP. ....	58
III.11. Purificación y aislamiento de ADN plasmídico. ....	58
III.11.1. Material. ....	58
III.11.2. Soluciones. ....	59
III.11.3. Protocolo de purificación de ADN plasmídico. ....	59
III.11.4. Análisis del ADN plasmídico. ....	60
III.11.5. Digestión mediante enzimas de restricción. ....	60
III.12. Transformación de bacterias. ....	61
III.12.1. Soluciones. ....	61
III.12.2. Protocolo para hacer competentes las bacterias. ....	61
III.12.3. Transformación de las bacterias. ....	61
III.13. Transfección en células de mamífero. ....	61
III.13.1. Material. ....	61
III.13.2. Soluciones. ....	61
III.13.3. Transfección en células de mamífero. ....	62
III.14. Detección de antígenos mediante citometría de flujo. ....	62
III.14.1. Material. ....	62
III.14.2. Soluciones. ....	62
III.14.3. Análisis de la expresión de antígenos en superficie. ....	62
III.15. Estudios de señal de transducción en linfocitos T periféricos de ratón CD3- $\zeta/\eta^{\text{null}}$ y wild type. ....	63
III.15.1. Ratones. ....	63
III.15.2. Anticuerpos. ....	63
III.15.3. Material. ....	63
III.15.4. Aislamiento y purificación celular. ....	63
<b>IV. Resultados. ....</b>	<b>65</b>
IV.1. Estudio de la interacción entre la subunidad p85 de la PI 3-quinasa y la cadena CD3- $\epsilon$ del receptor TCR/CD3 en células Jurkat y Jurkat CD8- $\epsilon$ ...	66

---

IV.1.1. En células Jurkat la estimulación del TCR/CD3 induce la asociación de la subunidad p85 $\alpha$ de la PI 3-quinasa a CD3- $\epsilon$ fosforilada. ....	66
IV.1.2. En células Jurkat CD8- $\epsilon$ la estimulación del TCR/CD3 o de CD8- $\epsilon$ induce la asociación de la subunidad p85 $\alpha$ de la PI 3-quinasa a CD3- $\epsilon$ y CD8- $\epsilon$ fosforilados. ....	69
IV.1.3. En células Jurkat CD8- $\epsilon$ se detecta actividad PI 3-quinasa asociada a CD3- $\epsilon$ y CD8- $\epsilon$ en respuesta a la activación del receptor. ....	74
IV.1.4. El tratamiento de las células Jurkat con herbimicina A reduce la asociación de la subunidad p85 $\alpha$ a la cadena CD3- $\epsilon$ . ....	76
IV.1.5. Estudio de la interacción entre la subunidad p85 $\alpha$ de la PI 3-quinasa y la cadena CD3- $\epsilon$ en ausencia de Lck. ....	79
IV.1.6. Estudio de la relación de la cadena polipeptídica CD3- $\epsilon$ con proteínas del citoesqueleto. ....	81
IV.2. Estudio de la interacción entre la subunidad p85 $\alpha$ de la PI 3-quinasa y la región citoplasmática de la cadena CD3- $\epsilon$ del receptor TCR/CD3 en células COS. ....	85
IV.2.1. La co-transfección de Fyn y la quimera CD8- $\epsilon$ puede reconstituir la fosforilación en tirosina de CD8- $\epsilon$ en una línea celular no hematopoyética. ....	85
IV.2.2. En células COS-7 transfectadas la subunidad p85 $\alpha$ de la PI3-quinasa se une preferentemente a la quimera CD8- $\epsilon$ fosforilada en tirosina. ....	85
IV.3. Estudio de la interacción entre la subunidad p85 $\alpha$ de la PI 3-quinasa y la región citoplasmática de la cadena CD3- $\epsilon$ del receptor TCR/CD3 <i>in vitro</i> mediante péptidos sintéticos. ....	89
IV.3.1. La subunidad p85 $\alpha$ de la PI 3-quinasa se une <i>in vitro</i> al ITAM de CD3- $\epsilon$ fosforilado en tirosina. ....	89
IV.3.2. Requerimientos de la unión de la subunidad p85 $\alpha$ de la PI 3-quinasa con los péptidos CD3- $\epsilon$ -ITAM. ....	92
IV.3.3. Comparación de la unión de p85 $\alpha$ , ZAP-70, Shc, Lck, Cbl y Grb-2 al ITAM de CD3- $\epsilon$ no fosforilado y doblemente fosforilado. ....	95
IV.4. Estudio de la interacción entre la subunidad p85 $\alpha$ de la PI 3-quinasa y la cadena CD3- $\epsilon$ del receptor TCR/CD3 <i>in vivo</i> en ratones deficientes en la cadena CD3- $\zeta$ . ....	97
IV.5. Estudio de la interacción de la cadena CD3- $\epsilon$ con proteínas pequeñas de unión a GTP. ....	102

---

<b>V. Discusión.</b> .....	105
V.1. La asociación de la subunidad p85 $\alpha$ de la PI 3-quinasa y la cadena CD3- $\epsilon$ del complejo TCR/CD3. ....	106
V.1.1.El papel de la PI 3-quinasa en la activación de los linfocitos T. ....	106
V.1.2. Asociación de la subunidad p85 $\alpha$ de la PI 3-quinasa y la cadena CD3- $\epsilon$ en células Jurkat. ....	107
V.1.3. La asociación de la subunidad p85 $\alpha$ de la PI 3-quinasa y la región citoplasmática de la cadena CD3- $\epsilon$ no depende de la presencia de otros componentes del complejo TCR/CD3. ....	108
V.1.4. En linfocitos T periféricos de ratones salvajes y $\zeta^{-/-}$ la subunidad p85 $\alpha$ de la PI 3-quinasa y la cadena CD3- $\epsilon$ se asocian tras la estimulación del receptor TCR/CD3. ....	109
V.1.5. La asociación de la subunidad p85 $\alpha$ de la PI 3-quinasa y la la cadena CD3- $\epsilon$ depende de la actividad tirosina quinasa. ....	110
V.1.6. La asociación de la subunidad p85 $\alpha$ de la PI 3-quinasa a la la cadena CD3- $\epsilon$ del TCR/CD3 se produce a través del ITAM de Cd3- $\epsilon$ . ....	112
V.1.7. Posibles mecanismos de asociación entre la cadena polipeptídica CD3- $\epsilon$ y la subunidad p85 de la PI 3-quinasa. ....	113
V.2. Interacción del ITAM de la cadena CD3- $\epsilon$ del TCR/CD3 con proteínas pequeñas que unen GTP. ....	118
V.3. La cadena CD3- $\epsilon$ del receptor TCR/CD3 no se asocia con el citoesqueleto. ....	119
<b>VI. Conclusiones.</b> .....	121
<b>VII. Bibliografía.</b> .....	123

---

---

## **ABREVIATURAS**

ADN	Acido desoxirribonucleico
Ala	Alanina
Arg	Arginina
ARNm	Acido ribonucleico mensajero
Asp	Acido aspártico
ATP	Adenosin trifosfato
BCR	Receptor de las células B
BSA	Albumina de suero bobino
Ca <sup>2+</sup>	Calcio
C-terminal	Carboxi terminal
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
EGFR	Receptor del factor de crecimiento
EGTA	Acido etilenglicol-(β-aminoetiléter)-N,N'-tetraacético
ERK	Quinasa regulada por señales extracelulares
FBS	Suero bovino fetal
FcεR1γ	Cadena gamma 1 del receptor de la fracción constante de la Ig E
GAP	Proteína de activación de proteínas de unión a GTP
GDP	Guanosin difosfato
Glu	Acido glutámico
GM-CSF	Factor estimulador de colonias granulocitos-macrófagos
Grb-2	Segunda proteína de unión al receptor de factores de crecimiento
GTP	Guanosin trifosfato
HRP	Peroxidasa de rábano
Ig	Inmunoglobulina
IEL	Linfocito de epitelio intestinal
IFN-γ	Interferon gamma
IL-2	Interleuquina-2
IL-3	Interleuquina-3
IL-4	Interleuquina-4
Ile	Isoleucina
ITAM	Motivo de activación de inmunoreceptores basado en tirosina
kb	Kilobases
kDa	KiloDaltons

---

Leu	Leucina
MAP	Proteína activada por mitógeno
MAPK	Serina quinasa moduladora de MAP
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
N-terminal	Amino terminal
pAb	Anticuerpo policlonal
pb	Pares de bases
PDGFR	Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas
PHA	Fitohemaglutinina A
PI	Fosfatidilinositol
PI 3-quinasa	Fosfatidilinositol 3 quinasa
PKC	Proteína quinasa C
PLC	Fosfolipasa C
PMSF	Fluoruro de fenilmetanosulfonilo
PTB	Dominio de unión a tirosina con homología a la pleckstrina
PTK	Proteína tirosina quinasa
Rac	Proteína relacionada con PKA y PKC
RE	Reticulo endoplásmico
RNAsa A	Ribonucleasa A
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de acrilamida con SDS
Ser	Serina
SH1	Dominio con homología a <i>src</i> 1
SH2	Dominio con homología a <i>src</i> 2
SH3	Dominio con homología a <i>src</i> 3
Syk	Tirosina quinasa de bazo
TCR/CD3	Complejo receptor para el antígeno de los linfocitos T/CD3
Temed	N,N,N',N'-tetrametilendiamina
TNF	Factor de necrosis tumoral
Tyr	Tirosina
Val	Valina
ZAP-70	Proteína asociada a $\zeta$



**I. INTRODUCCION**

## **I.1. El receptor para el antígeno de los linfocitos T.**

### **I.1.1. Estructura del complejo receptor para el antígeno de los linfocitos T/CD3.**

Los linfocitos T reconocen los péptidos antigénicos en el contexto de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase I y MHC clase II a través del complejo receptor para el antígeno (TCR). Tras la unión del antígeno-MHC al TCR se inicia una respuesta celular. El programa de respuesta temprana incluye una rápida inducción de la fosforilación en tirosina de ciertas proteínas seguida de la activación de la fosfolipasa C (PLC) específica de fosfatidilinositol, elevación del  $Ca^{2+}$  citoplasmático libre, acumulación de Ras-GTP y activación de serina/treonina quinasas [Weiss and Littman (1994)]. La activación celular culmina en la división celular y funciones efectoras como la secreción de interleuquina-2 (IL-2) o actividad citolítica.

El complejo receptor para el antígeno de los linfocitos T/CD3 (TCR/CD3) es un complejo protéico de membrana, multimérico que incluye las cadenas polipeptídicas clonotípicamente variables TCR  $\alpha\beta$  o  $\gamma\delta$  y las invariantes CD3- $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  y  $\zeta$  [Clevers et al. (1988); Weiss (1991)]. En el complejo TCR/CD3 existe una división de las funciones: TCR  $\alpha\beta$  o  $\gamma\delta$  reconocen al antígeno y CD3- $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  y  $\zeta$  controlan el ensamblaje del complejo y la transducción de la señal.

#### **I.1.1.1. Las cadenas polipeptídicas TCR $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ y $\delta$**

Las cadenas polipeptídicas TCR  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  son glicoproteínas de membrana cada una consistente en un dominio N-terminal extracelular, un dominio transmembrana y una pequeña cola citoplasmática [Clevers et al. (1988)]. Las proteínas TCR  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Las proteínas pertenecientes a esta superfamilia se caracterizan por tener unidades estructurales que se pliegan formando dominios discretos. Generalmente las regiones N-terminales son variables en secuencia (dominios V), que a su vez contienen regiones hipervariables. También presentan regiones de secuencia constante (dominios C). Las regiones constantes del dominio extracelular de las cadenas TCR están ancladas a la membrana plasmática. En la región variable se encuentra la variación clonotípica que va a permitir el reconocimiento de más de  $10^8$  antígenos diferentes. La mayoría de los heterodímeros TCR  $\alpha\beta$  están unidos covalentemente mediante puentes disulfuro, mientras que los TCR  $\gamma\delta$  se asocian entre si no covalentemente. La asociación entre las cadenas TCR  $\alpha$  y TCR  $\beta$  ocurre a nivel extracelular mediante aminoácidos de cisteína cercanos a la región transmembrana [Manolios et al. (1994); Manolios et al. (1997)].

Las células con receptores  $\gamma\delta$  son menos abundantes que los linfocitos T  $\alpha\beta$ , comprendiendo en humanos entre un 1-10% de los linfocitos T de la circulación sistémica, bazo, y nódulos linfáticos [Brenner et al. (1986); Itohara et al. (1989)]. Parece que los linfocitos T  $\gamma\delta$  serían esenciales en neonatos antes de que el repertorio  $\alpha\beta$  estuviera completamente desarrollado.

Mientras que los genes de TCR  $\alpha$  y  $\delta$  están localizados cerca uno del otro en el cromosoma humano 14q11.2, los genes TCR  $\beta$  y  $\gamma$  están en los extremos opuestos del mismo cromosoma (TCR  $\beta$  7q32-35, TCR  $\gamma$  7p15-14).

Tres grupos distintos y mediante diferentes enfoques han abordado el problema de la estructura del receptor TCR y más concretamente la estructura mediante rayos X de los fragmentos extracelulares completos de las cadenas TCR  $\alpha\beta$  glicosiladas [Garboczi et al. (1996); Garcia et al. (1996); Gregoire et al. (1997)]. El receptor clonotípico utilizado por cada grupo es distinto así como el péptido específicamente reconocido. En el caso de García et al y Garboczi et al, el sitio de unión del TCR al complejo MHC-péptido es relativamente plano, menos una cavidad hidrofóbica comprendida entre las asas hipervariables  $\beta 3$  y  $\alpha 3$  del TCR (CDR3s) que aloja a un aminoácido del péptido, quedando el resto prácticamente enterrado en la molécula de MHC. En el caso de Gregoire et al la superficie de interacción TCR/péptido-MHC no es plana sino que el asa hipervariable  $\beta 3$  del TCR se encuentra dispuesta hacia el exterior. El tamaño del asa  $\beta 3$  depende del número de aminoácidos que lo conformen. Si se tratara de un asa de gran tamaño se postula un movimiento de retirada que permitiría al aminoácido del péptido entrar en la cavidad comprendida entre las asas  $\beta 3$  y  $\alpha 3$ .

#### **I.1.1.2. Las cadenas polipeptídicas CD3 $\gamma$ , $\delta$ , y $\epsilon$ .**

Las cadenas CD3  $\gamma$  y  $\delta$  son glicoproteínas que se encuentran generalmente en copia única en los complejos TCR/CD3 maduros. Sin embargo, suele haber dos copias de la molécula no glicosilada CD3  $\epsilon$  formando parte del complejo TCR/CD3 [Blumberg et al. (1990)]. Las cadenas CD3  $\epsilon$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  presentan una región extracelular con dominios variables, ya que pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Las regiones transmembrana de CD3  $\epsilon$ ,  $\delta$  y  $\gamma$  contienen Asp y Glu que juegan un papel importante en los contactos con las cadenas TCR  $\alpha\beta$ . La asociación de la cadena TCR  $\alpha$  con las cadenas CD3  $\delta$  y CD3  $\epsilon$  se ha localizado en un motivo de 8 aminoácidos en la región transmembrana de TCR  $\alpha$ . Por contra, los complejos binarios TCR  $\beta$  y CD3  $\epsilon$  interaccionan a través de sus dominios extracelulares, mientras que la asociación TCR  $\beta$  y CD3  $\delta$  se produce a nivel transmembrana [Manolios et al. (1994)].

Se ha observado que mutantes de linfocitos T que carecen de alguna cadena TCR o CD3 son incapaces de transportar las cadenas restantes a la superficie celular.

En células T carentes de TCR  $\alpha$  o TCR  $\beta$  o mediante transfecciones en células COS se ha demostrado que inicialmente se forma un núcleo entre las cadenas CD3  $\epsilon$ ,  $\delta$  y  $\gamma$  a las que posteriormente se le unen las cadenas TCR  $\alpha$  y  $\beta$ , y por último CD3  $\zeta$  [Alarcon et al. (1988); Sancho et al. (1989); Blumberg et al. (1990); Hall et al. (1991)]. Este proceso tiene lugar en el retículo endoplásmico (RE) y el ensamblaje del TCR/CD3 completo es un requisito imprescindible para la exportación del complejo fuera del RE [Clevers et al. (1988)].

Aparte del papel en el ensamblaje en el RE del complejo TCR/CD3, CD3  $\epsilon$ ,  $\delta$  y  $\gamma$  juegan un papel en la transducción de las señales iniciada por la interacción entre las regiones variables de las cadenas  $\alpha\beta$  del TCR y el antígeno-MHC. La transducción de la señal a través del complejo CD3 ha sido localizada en unos pequeños motivos de secuencias en la región intracitoplasmática. Originalmente definidos por M. Reth [Reth (1989)], este motivo denominado ITAM (Immunoreceptor tyrosine-based activation motif) contiene una secuencia consenso con dos residuos de tirosinas separados entre sí por 10-11 aminoácidos (YXXL (X)<sub>7-8</sub> YXXL/I) [Reth (1989); Cambier (1995)]. Dentro del ITAM también son importantes los residuos localizados en la posición +3 C-terminal respecto a las tirosinas. En el caso de las cadenas CD3 estos aminoácidos son leucina o isoleucina. Los ITAMs contienen la información estructural necesaria para la transducción de las señales inducida por la estimulación del TCR. Los residuos de tirosina presentes en este motivo pueden ser fosforilados en respuesta a la activación del TCR [Baniyash et al. (1988); Letourneur and Klausner (1992); Qian et al. (1993); Sancho et al. (1993); Clark et al. (1994)]. Cada una de las cadenas CD3  $\epsilon$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  posee un ITAM. (Ver Tabla 2.)

Las cadenas CD3  $\epsilon$ ,  $\delta$  y  $\gamma$  están codificadas por tres genes miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas y se encuentran en el cromosoma 11q23. Dado que la secuencia nucleotídica de los genes de CD3  $\gamma$  y  $\delta$  es bastante similar y están localizados a solo 1.4 kb entre si, parece probable que provengan de una duplicación génica [Saito et al. (1987)]. La posible duplicación génica tuvo que tener lugar tras la divergencia entre las especies mamíferas y las aves puesto que el único gen CD3 en el pollo es homólogo a CD3  $\gamma$  y  $\delta$  [Bernot and Auffray (1991)].

#### **I.1.1.3. Las cadenas polipeptídicas CD3 $\zeta$ , $\eta$ y Fc $\epsilon$ R1 $\gamma$ .**

El gen de CD3  $\zeta$  se encuentra separado de los otros genes del TCR y CD3, concretamente en el cromosoma humano 1q22-q25 [Baniyash et al. (1989)]. Algunos linfocitos T de ratón generan una cadena CD3  $\eta$  mediante "corte y empalme" alternativo del ARNm de CD3  $\zeta$  [Jin et al. (1990)]. Así que en algunos receptores TCR/CD3 de ratón podemos encontrar, a parte de los dímeros  $\zeta\zeta$ , cadenas  $\zeta\eta$  o  $\eta\eta$ .

Sin embargo hasta la fecha no se conoce una cadena CD3  $\eta$  o un equivalente en humanos o ratas [Orloff et al. (1990); Clayton et al. (1992)].

La cadena CD3  $\zeta$  posee un dominio extracelular muy corto de exclusivamente 9 aminoácidos, mientras que la cola citoplasmática es de 112 aminoácidos. CD3  $\zeta$  no pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas [Weissman et al. (1988)]. Algunos autores favorecen la denominación TCR  $\zeta$ , sobre la de CD3  $\zeta$ , sin embargo nosotros nos referiremos a  $\zeta$  como CD3  $\zeta$  a lo largo de este trabajo.

La cadena CD3  $\zeta$  posee tres ITAMs en su región citoplasmática, denominados  $\zeta_A$ ,  $\zeta_B$  y  $\zeta_C$  y cuyas tirosinas pueden ser fosforiladas tras la activación del receptor por el antígeno [Irving and Weiss (1991); Sancho et al. (1992); Wange et al. (1993); Weiss (1993); Exley et al. (1994)]. Actualmente se piensa que los distintos elementos transductores de CD3  $\zeta$  ( $\zeta_A$ ,  $\zeta_B$ ,  $\zeta_C$ ) y de CD3  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$  podrían jugar papeles distintos durante la diferenciación tímica temprana [Kappes et al. (1995)], pero que la cooperación entre los distintos elementos se requiere durante la activación del linfocito T mediada por el antígeno [Wegener et al. (1992)]. Otras teorías postulan que los diferentes componentes del CD3 emiten señales cualitativamente similares, con lo cual los ITAMs serían considerados redundantes y tendrían una función aditiva [Shinkai et al. (1995)]. La habilidad de las cadenas CD3 fosforiladas de transducir señales mitogénicas está basada en el reclutamiento de moléculas señalizadoras o efectoras. La distinta selectividad de los motivos ITAM para unir efectores podría indicar que cada uno de ellos conduce a distintas respuestas biológicas [Cambier and Johnson (1995.)].

Subunidad	Tamaño (kDa)	Estructura primaria			Glicosilación	Fosforilación	Localización cromosómica.
		Ex.	TM.	Cit.			
<b>TCR</b>							
$\alpha$	45-60 (32)	227	27	4	+	-	14q11.2
$\beta$	40-50 (32)	220	23	3	+	-	7q35
$\gamma$	45-60 (30)	218	25	4	+	-	7p15-14
$\delta$	40-60 (37)	223	27	5	+	-	14q11.2
<b>CD</b>							
$\gamma$	25-28 (16)	89	27	44	+	P-Ser/P-Tyr	11q23
$\delta$	20 (14)	79	27	44	+	P-Tyr	11q23
$\epsilon$	20 (14)	105	26	55	-	P-Tyr	11q23
$\zeta$	16	9	21	112	-	P-Ser/P-Tyr	1q22-q25
$\omega$	28	?	?	?	-	?	
Fc $\epsilon$ R1 $\gamma$	9	6	20	42	-	P-Tyr	1q23

Tabla 1. Componentes del receptor TCR/CD3 humano.

El grado de flexibilidad que presenta la señalización en linfocitos T queda patente en el uso de moléculas señalizadoras alternativas diferentes a los miembros del complejo TCR/CD3. En una población de células T  $\alpha\beta$  y  $\gamma\delta$ , denominados linfocitos del epitelio intestinal mucoso (IEL) la cadena Fc $\epsilon$ R1 $\gamma$  puede reemplazar a CD3  $\zeta$ . El gen de Fc $\epsilon$ R1 $\gamma$  se encuentra localizado en el cromosoma 1q23. El segmento transmembrana de CD3  $\zeta$  es homólogo al de Fc $\epsilon$ R1 $\gamma$  lo que permite su expresión en el complejo TCR/CD3 [Blank et al. (1989)]. La cadena Fc $\epsilon$ R $\gamma$  posee también un ITAM que le permite funcionar como molécula transductora de señales.

CONSENSO:	D	X	X	X	-	X	X	X	X	D	X	X	Y	X	X	L	X	X	X	X	-	X	X	X	Y	X	X	L
	E									E						I												I
hCD3 $\gamma$	D	-	K	Q	T	L	L	P	N	D	Q	L	Y	Q	P	L	K	D	R	E	D	D	Q	-	Y	S	H	L
hCD3 $\delta$	D	-	T	Q	A	L	L	R	N	D	Q	V	Y	Q	P	L	R	D	R	D	D	A	Q	-	Y	S	H	L
hCD3 $\epsilon$	E	R	P	P	P	-	-	V	P	N	P	D	Y	E	P	I	R	K	G	Q	R	D	L	-	Y	S	G	L
hCD3 $\zeta$ A	E	P	P	A	Y	Q	Q	C	Q	N	Q	L	Y	N	E	L	N	L	R	-	R	E	E	-	Y	D	V	L
hCD3 $\zeta$ B	G	K	P	R	R	K	N	P	Q	E	G	L	Y	N	E	L	Q	K	D	K	M	A	E	A	Y	S	E	I
hCD3 $\zeta$ C	E	R	-	R	P	G	K	G	H	D	G	L	Y	Q	C	L	S	T	A	T	-	K	D	T	Y	D	A	L
hFc $\epsilon$ R $\gamma$ 1	A	A	I	T	S	Y	E	K	S	D	G	V	Y	T	G	L	S	T	R	N	-	Q	E	T	Y	E	T	L

**Tabla 2. Distribución y secuencia de los ITAMs en las cadenas polipeptídicas CD3.** Secuencia de las cadenas polipeptídicas CD3 humanas alineadas. Las cajas indican los aminoácidos que constituyen el motivo ITAM.

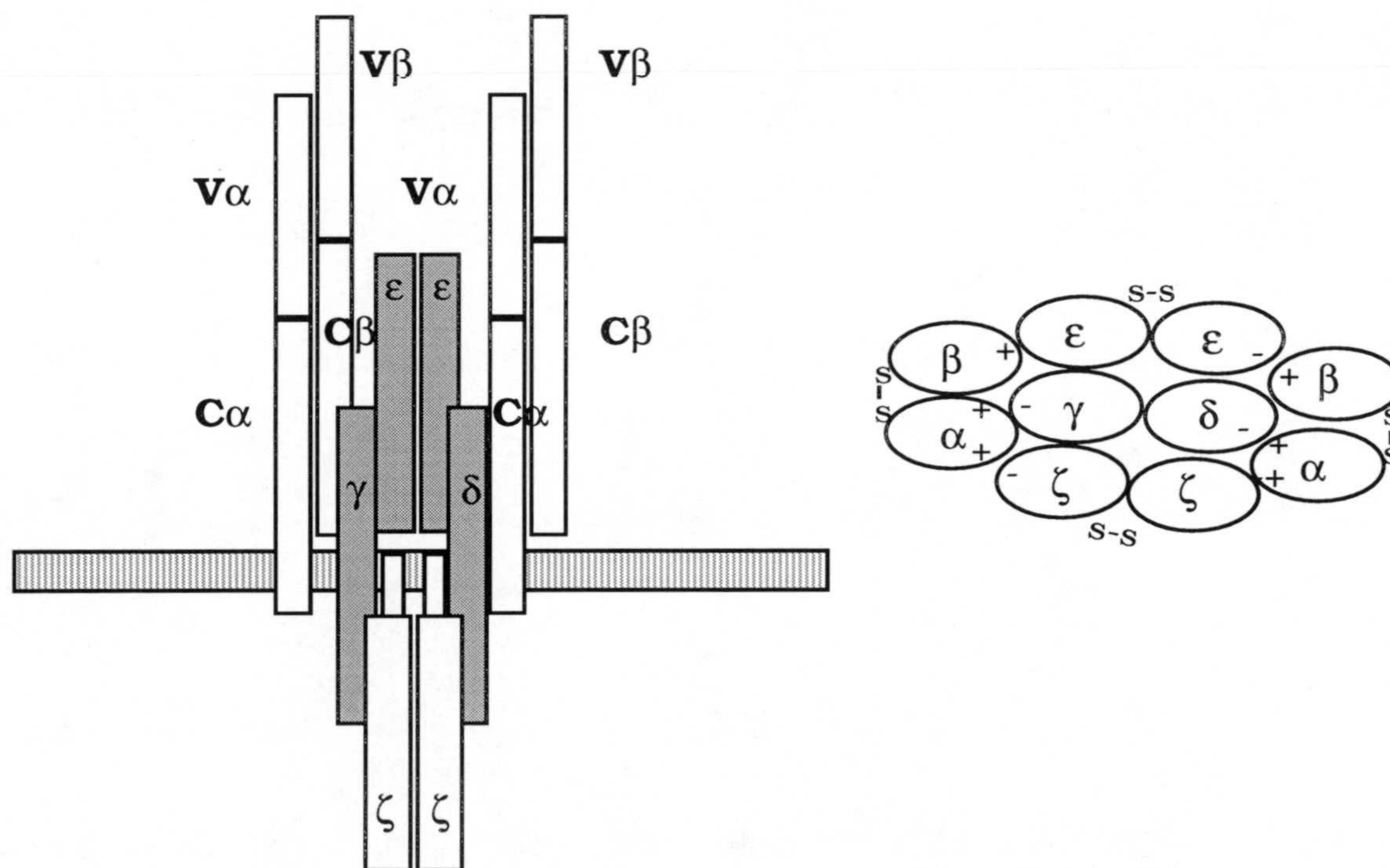
**I.1.2 Modelo estructural del TCR/CD3.**

La estequiometría real de los componentes del complejo TCR/CD3 y su valencia funcional no han sido determinadas con exactitud. Un acercamiento al estudio de la estructura del receptor se ha realizado mediante dos técnicas distintas; co-modulación por anticuerpos y análisis de sedimentación [Exley et al. (1991); Exley et al. (1995)]. Estos estudios favorecen un modelo de complejo TCR/CD3 divalente. En un hibridoma T-T anticuerpos monoclonales específicos frente a un TCR  $\alpha\beta$  podían co-modular el otro tipo de TCR  $\alpha\beta$  [Exley et al. (1995)]. Los análisis en gradientes de sacarosa identifican un complejo TCR/CD3 de aproximadamente 300 kDa, unos 100 kDa mayor de lo que se esperaría si la estructura del receptor fuera un complejo de ocho subunidades ( $\alpha\beta\gamma\delta\epsilon_2\zeta_2$ ).

Este modelo es coherente con resultados y observaciones anteriores. Estudios de los complejos formados tras transfección en células COS y CHO [Wileman et al. (1993)] así como en células T [Brenner and Strominger (1985)] demostraban la

formación de pares de cadenas CD3  $\epsilon$  que se reducían en número para formar parejas de CD3  $\epsilon$  y  $\gamma$  o CD3  $\epsilon$  y  $\delta$  cuando las cadenas CD3  $\delta$  o CD3  $\gamma$  eran co-expresadas. El modelo divalente permite comprender observaciones realizadas hace tiempo, como los homodímeros CD3  $\epsilon$  encontrados en los receptores de la superficie celular [Sancho et al. (1989); Blumberg et al. (1990); Hall et al. (1991)] o los llamados "medios-receptores" ( $\alpha\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$  y  $\alpha\beta$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ) que se han identificado como intermediarios en la formación de los complejos TCR/CD3 [Ley et al. (1989); Alarcon et al. (1991); Kappes and Tonegawa (1991)].

De este modo el modelo divalente comprende dos heterodímeros  $\alpha\beta$  rodeando un centro de CD3  $\gamma\epsilon\epsilon\delta$ . De este modo permite la neutralización de los residuos transmembranales cargados de las cadenas  $\alpha\beta$  y CD3 que son importantes en el ensamblaje del complejo TCR/CD3. En la figura 1. podemos ver una representación del modelo divalente de complejo TCR/CD3. Mientras que los puentes disulfuro entre las cadenas CD3  $\zeta$  siempre están presentes, sólo un 10-20% de los CD3  $\epsilon$  están unidos por puentes disulfuro [Blumberg et al. (1990); Jin et al. (1990); Exley et al. (1995)].



**Figura 1. Modelo divalente de la estructura del complejo TCR/CD3.** Tomado de Terhorst et al, 1995, *T cell receptors*, Cap. 17, Ed. Bell. J., Owen, M. & Simpson, E. Oxford University Press.

Sin embargo, otros grupos favorecen un modelo formado por un complejo mínimo de 8 subunidades, el heterodímero  $\alpha\beta$ , un dímero CD3  $\epsilon\gamma$  y otro CD3  $\epsilon\delta$  y el

dímero CD3  $\zeta\zeta$ . Este modelo afirma que hay una interacción preferencial de TCR  $\beta$  con el dímero CD3  $\epsilon\gamma$  y de TCR  $\alpha$  con el dímero CD3  $\epsilon\delta$ . Otra opción dentro del modelo de 8 subunidades es que cada uno de los dímeros interaccione con ambas cadenas TCR  $\alpha\beta$ . El modelo fue propuesto tras realizarse experimentos de co-transfección en células COS. CD3  $\zeta$  sólo se asociaba al complejo TCR/CD3 cuando todas las cadenas eran co-transfectadas [Hall et al. (1991)]. No todas las cadenas formaban heterodímeros estables, dependiendo la falta de asociación de los residuos cargados negativamente en sus dominios transmembrana [Manolios et al. (1991)].

### **I.1.3. Activación del linfocito T.**

El termino "activación del linfocito T" generalmente hace referencia a la activación de linfocitos T maduros de sangre periférica, basos linfáticos y tejidos. El estímulo fisiológico que activa a los linfocitos T es el péptido no propio asociado a la molécula del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), presentado al linfocito T por la célula presentadora del antígeno. Otros receptores en la superficie del linfocito T median la interacción entre ambas células. La especificidad de la respuesta frente al antígeno viene determinada por el TCR. Sin embargo, otros receptores juegan un papel accesorio crucial y amplifican la señal que contribuye a la activación del linfocito T. La lista de moléculas con el potencial de participar en el proceso de activación es larga y la contribución relativa de todas ellas no se conoce en todos los casos. Está bien establecido que la activación del linfocito T no ocurre en respuesta a la interacción del TCR sólomente, sino que requiere las interacciones cooperativas entre el TCR y moléculas señalizadoras accesorias como CD2, CD4, CD8, CD5 o CD28 (las cuales se revisan en el capítulo siguiente). La activación del TCR sólo, en ausencia de otras señales, conduce a un estado de anergia o "no-respuesta" [Schwartz (1996)].

Las células anérgicas generadas por la estimulación del TCR en ausencia de co-estimulación no proliferan cuando son re-estimuladas. El estado de anergia se define como un estado celular en el que el linfocito está vivo pero no produce una respuesta funcional cuando es estimulado a través del TCR y los co-receptores necesarios para una respuesta completa. Generalmente esta falta de respuesta funcional se traduce en un bloqueo de la producción de IL-2. Sin embargo, IL-2 no es la única interleuquina cuya producción está disminuida en linfocitos T anérgicos. Sucede lo mismo con IL-3/GM-CSF. Sin embargo, la producción de interferón-  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) o IL-4 no se ven apenas afectados. Es decir, la anergia bloquea la habilidad de la célula de producir y/o responder a señales proliferativas.

La necesidad de las moléculas co-estimuladoras para evitar la anergia se explica mediante la teoría de que la co-estimulación bloquea la producción de los inhibidores moleculares que causan la anergia. Otra hipótesis es que la gran cantidad de IL-2



producida tras la co-estimulación evita la expresión del inhibidor mediante una señal de transducción a través del receptor de IL-2.

Sustituciones en un aminoácido en péptidos antigénicos pueden generar ligandos antagonistas o parcialmente agonistas que conducen a un estado de anergia. La estimulación del TCR con estas moléculas bloquea la producción de IL-2 incluso en presencia de co-estimulación, como si el TCR tuviera poca afección por el complejo MHC-péptido alterado.

Coestimulación	Tipo de péptido	Respuesta
NO	Agonista	Anergia
SI	Agonista parcial	Anergia
SI	Antagonista	No respuesta
SI	Agonista	Respuesta

*Tabla 3. Respuesta celular en función del péptido y la co-estimulación.*

El TCR/CD3 es importante en las siguientes respuestas: selección positiva y negativa de timocitos, regulación de la actividad citotóxica de los linfocitos T mediante el control de la secreción de mediadores citotóxicos como la perforina, muerte por apoptosis y la regulación de la adhesión de linfocitos T mediante integrinas. El control de la expresión de genes de citoquinas es uno de los mecanismos que permiten al TCR controlar las respuestas inmunes [Cantrell (1996)].

Hay ciertas proteínas que parecen jugar un papel importante en procesos de señalización. Entre ellas se incluyen PLC  $\gamma$ 1, p21Ras, ERK y Vav. La estimulación de la PLC  $\gamma$ 1 fue la primera señal que se encontró relacionada con la activación a través del TCR. La fosforilación en tirosina de PLC  $\gamma$ 1 aumenta su actividad catalítica lo que provoca la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5 bifosfato en inositol 1,4,5 trifosfato y diacilglicerol. Estos segundos mensajeros inducen la movilización de  $Ca^{2+}$  citoplasmático y la activación de la proteína quinasa C (PKC) respectivamente [Cantrell (1996)]. La liberación de  $Ca^{2+}$  de reservas intracelulares provoca una entrada de  $Ca^{2+}$  extracelular a través de una bomba de  $Ca^{2+}$ , por el llamado mecanismo capacitativo. El  $Ca^{2+}$  modula la actividad de la calcineurina, una serina fosfatasa dependiente de calcio-calmodulina [Berridge and Irvine (1989)].

La transmisión de señales de p21Ras hasta el núcleo implica la activación de las quinasas denominadas MAP o ERK. La fosforilación y activación de ERK induce la

fosforilación de un número de factores de transcripción que son importantes para la inducción de la transcripción génica. El protooncogen Vav se expresa exclusivamente en células hematopoyéticas y se ha sugerido que funciona como una proteína de intercambio de nucleótidos de guanina para la familia de pequeñas GTPasas Rho/Rac/CDC24 [Collins et al. (1997); Crespo et al. (1997)]. Vav juega un papel crítico en la activación y el desarrollo linfocitario ya que el número linfocitos T y B se reduce enormemente en ausencia de Vav y las pocas células que se desarrollan presentan un defecto en las señales de transducción mediadas a través del TCR o del BCR [Fisher et al. (1995)]. Sin embargo el mecanismo molecular por el cual Vav actúa en linfocitos no se conoce. Recientemente se ha descrito la fosforilación en tirosina de Vav por parte de ZAP-70. Una vez fosforilada se asocia a ZAP-70. Una sola mutación en la tirosina 315 de ZAP-70 impide esta asociación y reduce la fosforilación en tirosina de ZAP-70, Vav, Shc y SLP-76 tras la estimulación del receptor, lo que pone de manifiesto la importancia de la asociación Vav-ZAP-70 en las vías de transducción de la señal tras la estimulación del TCR/CD3 [Wu et al. (1997)].

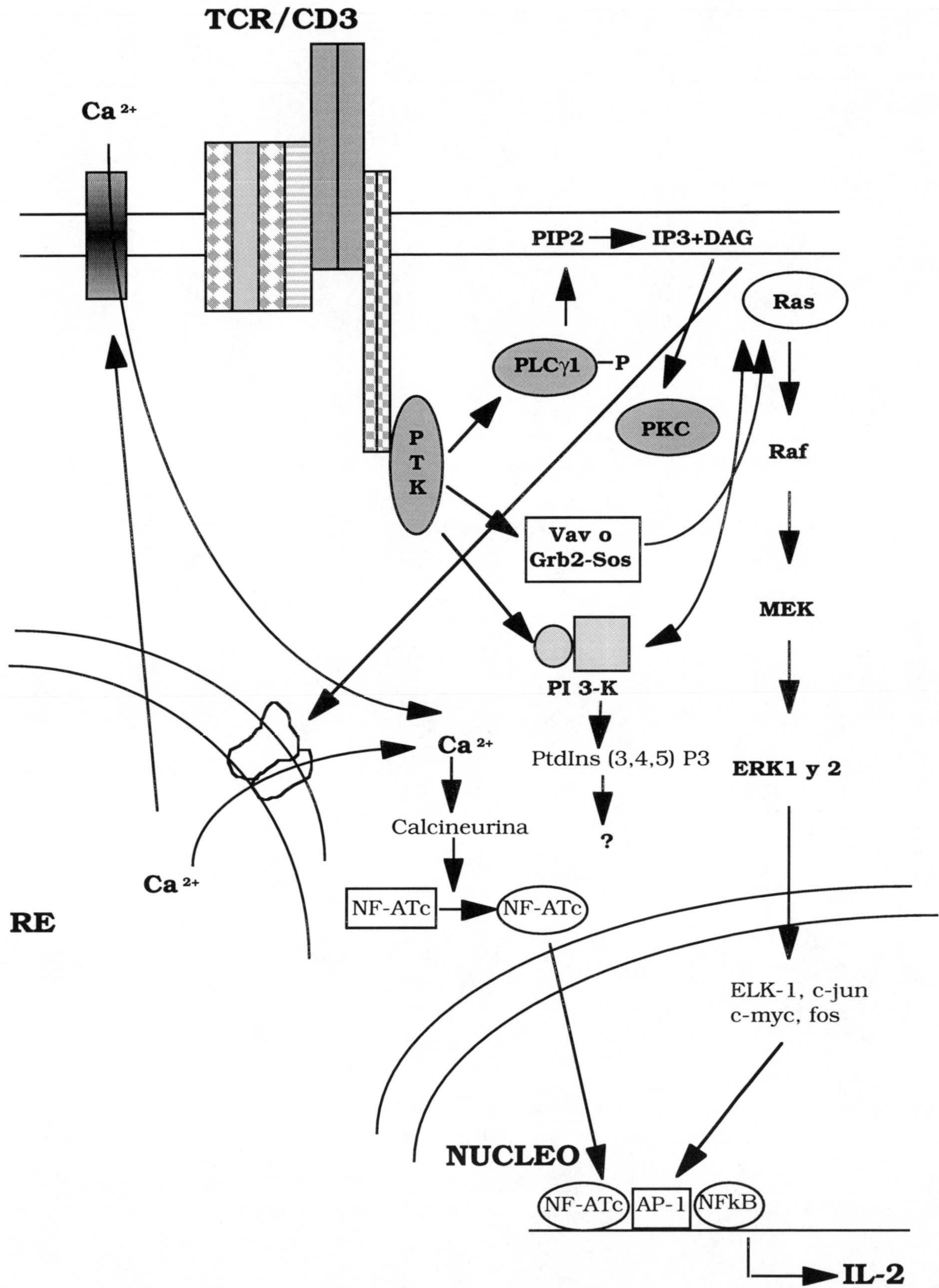


Figura 2. Esquema de las vías de activación relacionadas con la estimulación del linfocito T a través del TCR/CD3.

## I.2. Co-receptores.

La activación del TCR/CD3 está estrechamente controlada. Se requiere la presencia coordinada y la unión regulada de otros receptores o moléculas co-estimuladoras tanto en el linfocito T como en la célula presentadora del antígeno. Algunas moléculas co-estimuladoras están expresadas constitutivamente mientras que otras se expresan durante la activación. La co-estimulación del linfocito T incluye una variedad de diferentes moléculas entre las que se encuentran miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas, de la superfamilia del receptor TNF e integrinas y selectinas. También existen moléculas cuya actividad puede afectar en algunos casos negativamente a la activación de la célula T.

El reconocimiento del antígeno por el linfocito T pasa por una fase no específica de adhesión seguida de la interacción específica entre el TCR/CD3 y el antígeno-MHC. Las primeras moléculas de adhesión en el linfocito T que contribuyen a la avidéz de la unión son CD2 y CD11a/CD18. Sus ligandos CD58 y CD54 o ICAM-1 se expresan en todas las células presentadoras de antígenos. Los ligandos naturales de CD4 y CD8 son las mismas moléculas de MHC clase II y clase I.

En este capítulo nos referiremos a CD4, CD8, CD28, CTLA-4 y CD45. En la Tabla 3. se citan otras moléculas co-estimuladoras en humanos.

### I.2.1. Estructura de CD4 y CD8.

CD4 y CD8 son co-receptores que interaccionan respectivamente con las moléculas de MHC clase II y clase I de las células presentadoras de antígenos [Janeway (1992); Miceli and Parnes (1993)]. Las estructuras externas de CD4 y CD8 son totalmente distintas aunque ambos pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas. CD4 es un monómero de 55 kDa con cuatro dominios externos de tipo Ig (D1-D4), una región transmembrana y una cola citoplasmática. Los dominios extracelulares interaccionan en parejas D1 con D2 y D3 con D4 para formar dos estructuras en forma de copa con una conexión flexible [Wang et al. (1990)]. El sitio de unión de CD4 con la molécula MHC de clase II ha sido localizado en ambos lados de la concavidad formada por D1 y D2 [Clayton et al. (1989)].

CD8 puede ser expresado en dos formas, como un homodímero de dos polipéptidos CD8  $\alpha$  unidos por puentes disulfuro o como un heterodímero de los polipéptidos CD8  $\alpha$  y  $\beta$  unidos por puentes disulfuro. Aunque los genes que codifican para CD8  $\alpha$  y  $\beta$  están relacionados y se predice una estructura secundaria parecida para ambos, existe muy poca homología de secuencia entre ellos. Ambos polipéptidos tienen un sólo dominio externo de tipo Ig seguidos de un péptido altamente glicosilado de conexión con los dominios transmembrana y citoplasmático. Las células CD8<sup>+</sup> TCR

$\alpha\beta$  expresan el heterodímero CD8  $\alpha\beta$ , pero la mayoría de las CD8<sup>+</sup> TCR  $\gamma\delta$ , algunas células NK y las células CD8<sup>+</sup> TCR  $\alpha\beta$  del epitelio intestinal presentan el CD8  $\alpha\alpha$ . En el homodímero CD8  $\alpha\alpha$  el sitio de unión a la molécula MHC clase I se ha mapeado en unos bucles tipo CDR. Estos bucles están cargados positivamente lo que sugiere la importancia de las interacciones electrostáticas en la unión. La estructura cristalina del complejo CD8  $\alpha\alpha$ /HLA-A2 demuestra que CD8 interacciona con los dominios  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  de HLA-A2 y con la  $\beta_2$ -microglobulina [Gao et al. (1997)].

Antígeno	kDa	Fosforilación	Función/Ligando.
<b>CD</b>			
CD2 (LFA-2)	50(38)	Tyr	Receptor de CD58 (LFA-3).
CD4	55(51)	Ser/Treo	Receptor de MHC clase II.
CD5	67	Tyr	Receptor de CD72.
CD6	130	Tyr	?
CD7	38	Tyr	?
CD8 $\alpha$	34(24)	Ser/Treo	Receptor de MHC clase I.
$\alpha'$			
$\beta$			
CD27	55	Tyr?	Receptor de CD70.
CD28	44(23)	Tyr (Ser/Treo?)	Receptor de CD80 B7-1. Receptor de B7-2, B70.
CTLA-4	45	Tyr, Ser/Treo?	Receptor de B7coestimulac.
gp39	39	Tyr?	Receptor de CD40 y
CD40L			coestimulación.
CD45	170-240	Tyr	Tir fosfatasa.
CD11a(LFA-1 $\alpha$ )	180(130)		Receptor de ICAM-1
CD18	95(82)		
CD54(ICAM-1)	90		Receptor de CD11a/CD18
CD95 (Fas-Apo1)	35		Receptor de Ligando de Fas.

*Tabla 4. Principales moléculas co-estimuladoras.*

### **I.2.2. El papel de CD4 y CD8 en la activación de las células T.**

La idea de que CD4 y CD8  $\alpha$  juegan un papel en señal de transducción se derivó del descubrimiento de que ambas se asocian con la tirosina quinasa citoplasmática p56Lck, ya que las tirosina quinasas están implicadas en el control del crecimiento

celular y la diferenciación [Veillette et al. (1988); Pingel and Thomas (1989); Veillette et al. (1989); Rudd (1990); Campbell et al. (1995)]. El punto de unión de CD4-CD8 a p56Lck está localizado en 32 aminoácidos en el extremo amino-terminal [Turner et al. (1990)], especialmente dos residuos de cisteína. Esta región está altamente conservada entre especies y constituye la única homología entre CD4 y CD8 [Hoeveler and Malissen (1993)].

Estudios realizados con anticuerpos monoclonales anti-CD4 y anti-CD8 mostraban que éstos bloquean la función de los linfocitos T que expresan estos antígenos. Estos experimentos, llevados a cabo en células T CD4<sup>+</sup> y linfocitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup>, muestran que dichos anticuerpos tienen un efecto en la interacción entre la célula T y la célula diana. Este efecto no sólo es debido a la interferencia entre la unión de CD4/8-MHC sino que afecta a las señales de transducción mediadas a través del TCR [Blanchard et al. (1987); Blanchard et al. (1988); O'Rourke and Mescher (1993); Anel et al. (1997)].

La capacidad de producir movilización de Ca<sup>2+</sup> y fosforilación de sustratos en tirosina tras la activación del receptor TCR/CD3 está modulada por CD4 y CD8. La co-estimulación de CD3 y CD4 produce un efecto sinérgico en la movilización de calcio así como en la fosforilación en tirosina [Sancho et al. (1992)]. La respuesta es débil si sólo se estimula el TCR/CD3. Lck, la PTK asociada a CD4 podría incrementar la actividad de la PLC- $\gamma$  mediada por la estimulación del TCR/CD3 [Ledbetter et al. (1993)].

Hibridomas de linfocitos T citotóxicos CD8  $\alpha\beta^-$  en los que se transfecta la cadena CD8  $\alpha$  solo o CD8  $\alpha$  y CD8  $\beta$  demuestran que aunque los tres tipos de hibridomas producen IL-2 tras la activación las células CD8  $\alpha\beta$  lo hacen más eficientemente que las CD8  $\alpha\alpha$  y que las CD8  $-/-$ . Las células CD8  $\alpha\beta$  son capaces de reconocer una variante derivativa de un péptido debilmente agonista. La unión del ligando al TCR es entre 5 y 20 veces más ávida en las células CD8  $\alpha\beta$  [Luescher et al. (1995); Renard et al. (1996)]. La vida media de la unión TCR/MHC-péptido en ausencia de CD8 es menor que en presencia de CD8, por lo que contribuiría a la estabilización del sistema y a la eficiencia del reconocimiento. La avidéz e intensidad del reconocimiento del TCR por MHC-péptido es directamente proporcional a la dependencia del TCR por CD8.

Experimentos llevados a cabo en células T transfectadas con un CD8 $\alpha$  carente de región citoplasmática demuestran que p56Lck es imprescindible para el correcto funcionamiento de CD8. Experimentos con formas de CD4 en las que las dos cisteínas han sido sustituidas por alaninas hacen extensible esta afirmación para CD4 [Glaichenhaus et al. (1991)]. También se ha descrito que CD4 podría inhibir la respuesta celular T en ausencia de una interacción entre el TCR y las moléculas MHC, indicando quizás que CD4 podría transmitir una "señal negativa" [Bank and Chess

(1985); Haughn et al. (1992); Davis and Littman (1995)]. Para explicar estas observaciones se ha propuesto que las moléculas CD4 que no participan en la activación mediada por TCR, podrían inhibir esta activación debido al secuestro de Lck [Ledbetter et al. (1993)].

### **I.2.3. CD28 y CTLA-4.**

CD28 es un homodímero unido por puentes disulfuro de dos cadenas glicoprotéicas de 44 kDa [Greene et al. (1996)]. El dominio extracelular comprende 202 aminoácidos, el intracelular tiene 41 aminoácidos y parece estar implicado en transducción de señales [Aruffo and Seed (1987)]. CD28 es altamente homólogo a otro antígeno de células T, CTLA-4. Ambas son miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas, concretamente de una subfamilia de moléculas con un único dominio V [Linsley and Ledbetter (1993)]. Los genes de CD28 y CTLA-4 están muy asociados ya que se localizan en las mismas regiones del cromosoma 1 de ratón y del cromosoma 2 en humanos. A diferencia de CD28 los transcritos de CTLA-4 solo son detectables en linfocitos T activados. CD28 se expresa predominantemente pero no exclusivamente en células del linaje T. La expresión de CD28 no está restringida a linfocitos TCR  $\alpha\beta$  ya que también está presente en el 50% de las células CD4<sup>-</sup>, CD8<sup>-</sup>, TCR  $\gamma\delta$  y en todas las CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>-</sup>, TCR  $\gamma\delta$ .

Los ligandos de CD28 son B7-1 (CD80) y B7-2/B70 (CD86) que se expresan tanto en células presentadoras de antígenos como células activadas B, células dendríticas y monocitos. La unión de CD28 a sus ligandos determina decisivamente el destino de la respuesta del linfocito T. La estimulación de TCR sin co-estimulación de CD28 puede derivar en una inactivación funcional, o anergia de las células T helper 1 (Th1) [Boussiotis et al. (1996); Schwartz (1996)]. La estimulación de CD28 produce un incremento en la transcripción y estabilidad de los mARNs de las linfoquinas, especialmente de IL-2 [Fraser and Weiss (1992); Stein et al. (1994)]. CD28 regula la expresión de Bcl-XL [Sperling et al. (1996)], y otros antígenos de membrana como CTLA-4, el receptor de alta afinidad de IL-2 y el ligando de CD40, los cuales se necesitan para la correcta progresión de la respuesta inmune [Hutchcroft et al. (1995); Rudd (1996)]. El papel de CD28 podría ser también el de mantener la respuesta proliferativa y aumentar el tiempo de supervivencia de la célula.

CD28 posee en su cola citoplasmática un motivo de Tyr-Met-Asn-Met (YMNM) que es fosforilado en tirosina tras la activación, seguido del reclutamiento de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI 3-quinasa) [Truitt et al. (1994); Crooks et al. (1995)], Grb2 (Growth factor receptor-bound protein-2) y la proteína ITK [Raab et al. (1995); Gibson et al. (1996)]. Las respuestas mas tardias incluyen activación de la MAPK (serine kinase modules for mitogen activated kinase), SAPK/JNK (stress activated

protein kinase/c-jun N-terminal protein kinase) y la proteína de activación mitogénica p38 (p38/HOG1), lo que lleva a la fosforilación de c-jun y al inicio de la transcripción de IL-2

Dado que CD28 puede asociarse a dos ligandos B7-1 y B7-2, se han realizado estudios comparativos sobre las consecuencias de la interacción de CD28 con sus ligandos en linfocitos T humanos en reposo. La interacción de CD28 con B7-1 o B7-2 induce por igual la asociación de PI 3-quinasa a CD28 sin necesidad de preactivación del linfocito T [Ghiotto-Ragueneau et al. (1996)].

CTLA-4 tiene como ligandos igualmente a B7-1 y B7-2, a los que se une con alta avidéz, mientras que CD28 se une con baja avidéz. CD28 y CTLA-4 tienen diferentes funciones durante la activación de la célula T. La activación de CD28 regula positivamente y con fuerza la producción de citoquinas por parte del linfocito T y la activación celular. La estimulación de CTLA-4 con anticuerpos monoclonales no produce el mismo efecto [Krummel and Allison (1995)] y regula negativamente los efectos mediados por CD28. CTLA-4 se asocia específicamente con la tirosina fosfatasa SYP, una interacción que está mediada por el dominio SH2 de SYP y la secuencia fosforilada en tirosina Tyr-Val-Lys-Met de la región citoplasmática de CTLA-4 [Marengere et al. (1996)]. La ausencia de CTLA-4 produce la activación constitutiva de la vía de Ras, por lo que la habilidad de SYP para interaccionar con CTLA-4 podría regular negativamente la señal a través de Ras. SYP defosforila CD3  $\zeta$  y Shc, una proteína que se asocia a Grb2 y Sos que inician la cascada de activación de Ras. La secuencia YVKM, al igual que la existente en CD28 es la secuencia consenso de unión al dominio SH2 de la subunidad reguladora, p85, de la PI 3-quinasa. Aunque parece que ambas se asociarían con la PI 3-quinasa, CTLA-4 lo haría con una afinidad extremadamente baja y la PI 3-quinasa asociada a CTLA-4 tendría baja actividad [Waterhaouse et al. (1996)]. Existen algunos resultados contradictorios realizados en ratones Motheaten, que presentan muy bajos niveles de SYP. En ellos CTLA-4 sigue cumpliendo su papel inhibitorio, llevando a pensar que SYP no es requerida para su función, aunque en este estudio no se contempla que en ausencia de SYP otras fosfatasas de la familia puedan asociarse a CTLA-4 y complementar la carencia de SYP, permitiendo la funcionalidad de CTLA-4 [Chambers and Allison (1996)].

#### **I.2.4. La fosfotirosina fosfatasa CD45.**

La familia de antígenos leucocitarios CD45 comprende un grupo de glicoproteínas de membrana que se expresa en células de origen mieloide y linfoide. CD45 se puede expresar en diferentes isoformas que se generan por "corte y empalme" alternativo de los exones que codifican el dominio extracelular. La expresión diferencial de las formas conocidas como CD45RO y CD45RA en humanos se utiliza



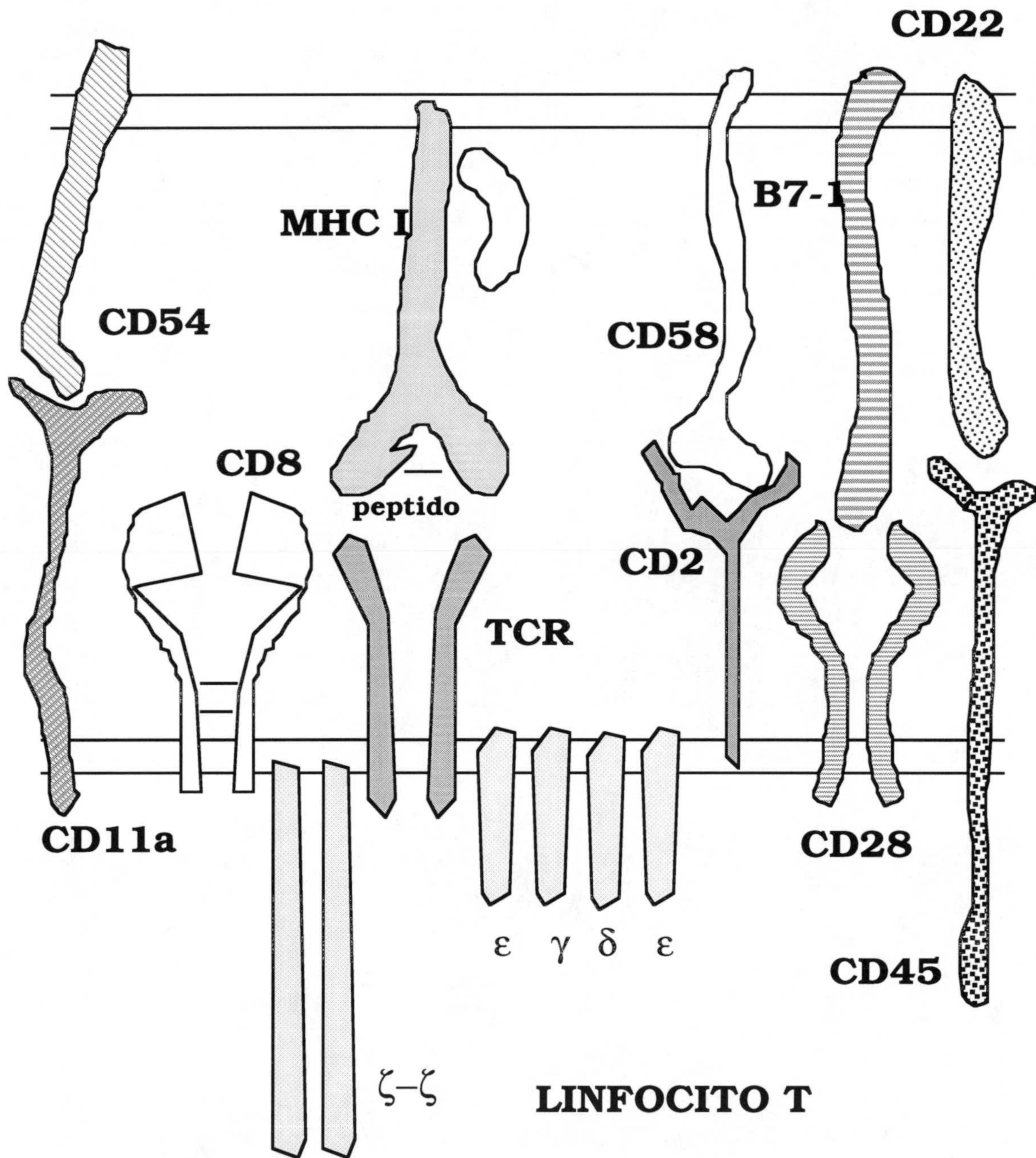
para distinguir a las células memoria de las que nunca han estado expuestas a la interacción péptido-MHC. El posible ligando de CD45 es una molécula presente en la membrana de las células B, CD22.

Todas las moléculas CD45 tienen en común un gran dominio intracelular, que contiene dos subdominios que tienen actividad fosfotirosina fosfatasa. Esta fosfatasa se cree que actúa como un regulador positivo de la familia de las Src quinasas mediante la desfosforilación de la tirosina de regulación negativa, permitiendo así a la quinasa que esté activada [Weiss and Littman (1994)]. CD45 puede desfosforilar específicamente *in vitro* la tirosina C-terminal reguladora negativa tanto de p59Fyn como de p56Lck [Mustelin et al. (1992)]. *In vivo*, en líneas celulares que carecen de CD45, estas tirosinas de Lck y Fyn están hiperfosforiladas [Sieh et al. (1993)].

Como regulador positivo de las quinasas de la familia Src, CD45 es un componente crítico en la señalización en células T. En la mayoría de las líneas celulares carentes de CD45, la estimulación del TCR no produce una transducción de la señal [Ostergaard et al. (1989); Hurley et al. (1993); Biffen et al. (1994); Desai et al. (1994)]. Otros autores sugieren una actuación de la CD45 sobre otros sustratos como ZAP-70 [Mustelin et al. (1995)] o PLC  $\gamma$ , sobre las cuales una vez activadas, la respuesta sería suprimida por la acción de CD45. Estos autores postulan que CD45 puede desfosforilar múltiples moléculas efectoras, y que la concentración local de CD45 en los complejos receptores determina el balance positivo-negativo tras la interacción [Ledbetter et al. (1993)].

Se han realizado estudios de mutagénesis dirigida para definir las regiones de importancia en la región citoplasmática de CD45 [Chan et al. (1994)]. Mutaciones en el residuo de cisteína, que se encuentra en todos los dominios fosfatasa, reveló que sólo el dominio fosfatasa proximal de CD45 tiene actividad fosfatasa. Aunque el dominio distal no parece tener actividad catalítica se requiere para el correcto funcionamiento del dominio proximal [Streuli et al. (1990)]. Otros estudios afirman que ambos dominios tienen actividad fosfatasa y si en los estudios anteriores no se observaba se debe a una incorrecta conformación de la proteína expresada *in vitro* sin los dominios extracitoplasmático y transmembrana [Wang and Pallen (1991)].

**CELULA PRESENTADORA DE ANTIGENO**



*Figura 3. Esquema de las interacciones entre el linfocito T y la célula presentadora del antígeno.*

### **I.3. Moléculas implicadas en la transducción de señales a través del TCR/CD3.**

La estimulación del TCR/CD3 y de las moléculas co-estimuladoras inicia una cascada de procesos intracelulares. Para que se produzca la transducción de señales es necesario inicialmente un incremento en la fosforilación en tirosina de ciertas proteínas intracelulares [Mustelin and Burn (1993)]. La importancia de la fosforilación en tirosina temprana se ha demostrado mediante el uso de inhibidores de tirosina quinasas, que bloquean las señales de transducción así como muchos de los pasos tempranos y tardíos de la activación celular, como el recambio de fosfatidilinositol, el incremento de  $Ca^{2+}$  intracelular, la expresión del receptor de la IL-2, la citotoxicidad y la síntesis de ADN. Estudios llevados a cabo en líneas celulares linfocitarias carentes de alguna PTK o en cepas de ratón en las que se ha anulado o sobreexpresado el gen correspondiente a alguna de ellas refuerzan las teorías sobre la importancia de la fosforilación en tirosina en la transducción de señales a través del TCR/CD3 [Glaichenhaus et al. (1991); Chan et al. (1991).; Straus and Weiss (1992); Karnitz et al. (1994)]. En este capítulo se presentan las principales moléculas implicadas en las señales de transducción temprana.

#### **I.3.1. Las tirosina quinasas de la familia Src.**

La familia Src de tirosina quinasas (PTK) está formada por un grupo de ocho proteínas con una estructura característica. Dentro de este grupo se encuentran pp60Src, p56Lck, p59Fyn, p53/56Lyn, p55Blk y p60Yes. Fyn se asocia con el TCR, Lyn, Fyn, Blk y Lck se asocian con el receptor de IgM de linfocitos B y Lyn y Yes se asocian al receptor de IgE de alta afinidad [Kolanus et al. (1993)]. Cada una de estas Src quinasas posee un dominio tirosina quinasa altamente conservado (*src* homology 1 domain (SH1)) de unos 300 aminoácidos. En el extremo N-terminal tienen un motivo consenso para la unión de ácido mirístico. En esta región se localiza la zona de unión a otras moléculas o receptores. Le siguen un dominio *src* homology 2 y 3 (SH2 y SH3) y una región C-terminal reguladora. La figura 4 ilustra la organización de una Src quinasa [Rudd et al. (1994)]. La región N-terminal está unida a un ácido mirístico, una modificación que se requiere para la asociación y localización en la membrana de estas quinasas. Está seguida de una región de unos 70-80 aminoácidos que dependiendo de la quinasa incluye puntos para la asociación con los receptores CD4 o CD8, la asociación con las cadenas CD3 o para la fosforilación en serina por la proteína quinasa C (PKC). Los dominios conservados SH2 y SH3 se encuentran también en otras proteínas, incluidas proteínas sin actividad enzimática (adaptadoras) o en enzimas [Pawson and Gish (1992)].

Los dominios SH2 tienen aproximadamente 100 aminoácidos y se encuentran en muchas moléculas intracelulares implicadas en transducción de señales como PLC  $\gamma$ , rasGAP, la subunidad reguladora p85 de la fosfatidilinositol 3 quinasa (PI 3-quinasa), etc. Los dominios SH2 en moléculas adaptadoras sirven de puente de unión entre proteínas señalizadoras fosforiladas en tirosina y receptores que carecen de dominios SH2. Aunque todos los dominios SH2 comparten la propiedad común de unir residuos de fosfotirosina, una especificidad biológica adicional reside en el contexto de secuencia que rodea al residuo de fosfotirosina, especialmente la posición +3 a la tirosina fosforilada. Cantley, L. y colaboradores han definido las secuencias óptimas de unión para diferentes dominios SH2, demostrando la importancia de los residuos adyacentes en la definición de la especificidad de la unión [Songyang et al. (1993)]. Los dominios SH2 de los miembros de la familia Src seleccionan péptidos fosforilados con Glu en las posiciones +1 y +2 e Ile en la posición +3 C-terminal a la pTyr.

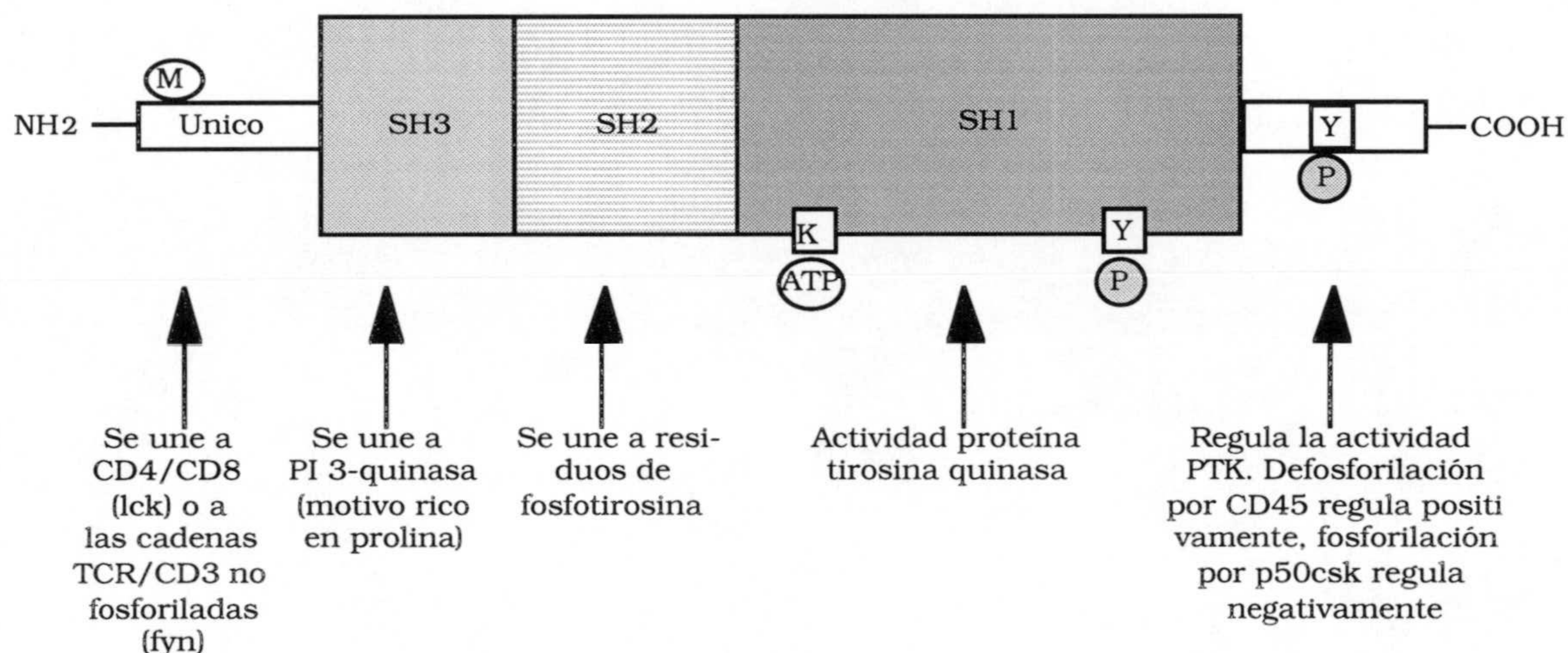


Figura 4. Estructura generalizada de la Lck de la familia Src. Modificado de Rudd et al, 1994.

La estructura cristalina del dominio SH2 de Src se determinó por difracción de rayos X. El dominio SH2 se asemeja a un enchufe con dos agujeros. Los dos agujeros o bolsillos corresponden a lugares de interacción altamente específicos. Un sitio une la fosfotirosina mediante uniones de hidrógeno e interacciones aminoaromáticas e hidrofóbicas. El segundo sitio es principalmente hidrofóbico [Waksman et al. (1993)]. El dominio SH2 es necesario para la transformación oncogénica por una proteína p56Lck constitutivamente activa [Veillette et al. (1992)]. Los dominios SH2 de las tirosina quinasa de la familia Src tendrían una doble función: mediar las interacciones con proteínas fosforiladas en tirosina creando así complejos

señalizadores y unirse al extremo C-terminal de la Src quinasa fosforilado en tirosina jugando un papel en la regulación de la actividad de la proteína [Amrein et al. (1993)]. El dominio SH2 de las Src quinasas es esencial para el inicio de los procesos señalizadores tras la estimulación del TCR [Straus et al. (1996)].

El dominio SH3 es un pequeño dominio de aproximadamente unos 50 aminoácidos. Los dominios SH3 parecen funcionar como unidades independientes, encontrándose a veces en tandem con dominios SH2. Estos dominios reconocen proteínas mediante interacciones con secuencias peptídicas cortas ricas en residuos de prolina. También podemos encontrarlos en varias proteínas como PLC $\gamma$ , la subunidad reguladora p85 de PI 3-quinasa, Abl, etc. Al igual que en el caso de SH2, los distintos dominios SH3 presentan distintas especificidades de unión. Mientras los dominios SH3 de Src, Fyn, Lyn y PI 3-quinasa reconocen un motivo RPLPPLP, el dominio SH3 de Abl prefiere la secuencia PPPYPPPP(I/V)P [Weng et al. (1995)]. Recientemente también se ha sugerido que el dominio SH3 de la tirosina quinasa de la familia Src, Hck podría estar implicado en la regulación de la actividad enzimática de la misma [Moarefi et al. (1997)].

Hacia el extremo C-terminal está un dominio catalítico altamente conservado de unos 300 aminoácidos, el SH1, que presenta aproximadamente un 80% de homología entre los miembros de las Src quinasas. La región tiene una zona rica en glicina con un residuo de lisina clave que une ATP. Incluye un sitio de autofosforilación. Lck se activa por autofosforilación de su tirosina 394. Un residuo de tirosina en la región C-terminal está implicado en la regulación de la actividad quinasa. Tyr-527 de pp60Src, o Tyr-505 en p56Lck sirven como reguladores de la actividad *in vivo*. La fosforilación de este residuo inhibe su actividad catalítica, mientras que la desfosforilación del mismo estimula la actividad quinasa. La fosforilación está mediada por la tirosina quinasa citosólica p50Csk, mientras que la desfosforilación está mediada por tirosina fosfatasas como CD45. Cuando este residuo es fosforilado interacciona con el propio dominio SH2 de la Src quinasa [Amrein et al. (1993); Cooper and Howell (1993); Yamaguchi and Hendrickson (1996)].

Recientemente se ha descrito la estructura tridimensional completa de dos miembros de la familia Src: Src y Hck [Pawson (1997); Sicheri et al. (1997); Xu et al. (1997)]. Presentan 4 dominios estructurales: los dominios SH2 y SH3 se encuentran respectivamente a los lados de los lóbulos grande y pequeño, del dominio tirosina quinasa.

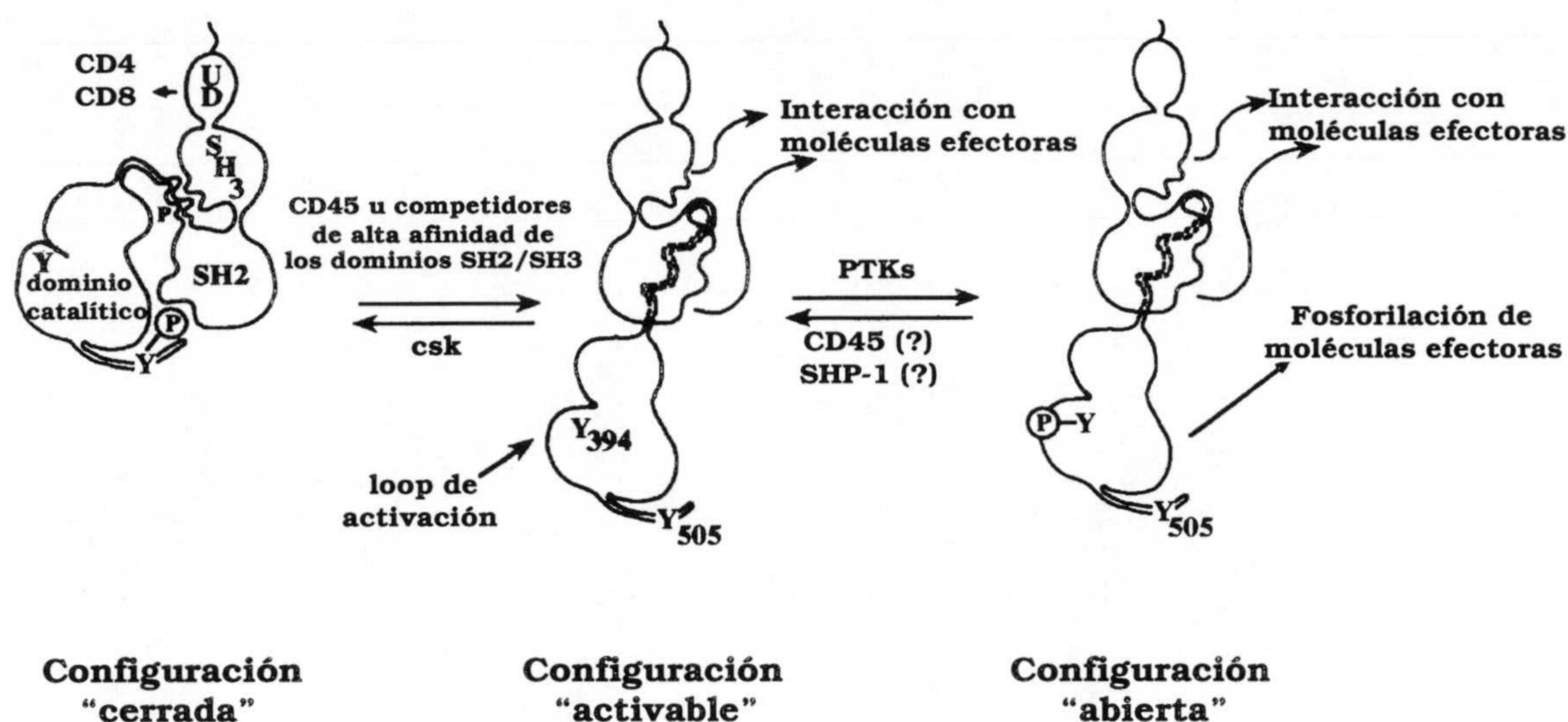


Figura 5. Estructura tridimensional y regulación de la actividad de p56Lck. Esquema cedido por B. Malissen, Centre d'Inmunologie Marseille-Luminy, Francia.

#### I.3.1.1. Asociación de p56Lck a CD4 y CD8.

Las Src quinasas carecen de regiones transmembrana y extracelulares. Su papel en señal de transducción parecía claro debido a su capacidad de asociarse a receptores de la superficie celular, como Lck que interacciona con los receptores celulares CD4 y CD8 [Veillette et al. (1988; Barber et al. (1989)]. Aproximadamente entre un 30 a un 90% de Lck está asociado a CD4 o CD8 dependiendo de la línea celular estudiada. Las regiones citoplasmáticas de CD4 y CD8 presentan un motivo de 13 residuos de homología entre ambos. Esta región se encuentra en la mitad de la región citoplasmática de CD4 (aminoácidos 419-431) y en las proximidades de la bicapa lipídica en CD8  $\alpha$  (aminoácidos 190-203). En esta secuencia hay un motivo conservado CXCP así como 5 aminoácidos básicos que alternan con secuencias hidrofóbicas [Turner et al. (1990)]. Las cisteínas son esenciales para la interacción con Lck.

Los aminoácidos 10 a 32 en p56Lck se unen a CD4 y CD8. Esta región de Lck difiere de los otros miembros de la familia Src. Especialmente las cisteínas en las posiciones 20 y 23 son imprescindibles para la interacción.

Análisis de mutantes de la línea celular Jurkat defectivos en Lck demuestran que Lck es necesaria para la transducción normal de la señal a través del TCR/CD3 [Straus and Weiss (1992)]. Lck regula positivamente la vía de las PTKs asociadas al TCR/CD3 mediante la fosforilación de las tirosinas de los ITAMs del complejo TCR/CD3 [Chu and Littman (1994)], así como otras proteínas implicadas en señalización como ZAP-70.

### **I.3.1.2. Asociación de CD3 $\zeta$ y p59Fyn.**

p59Fyn existe en dos isoformas: p59Fyn(B) está altamente expresada en cerebro y otros tipos celulares, mientras que p59Fyn(T) se expresa en células T. Estas dos isoformas son fruto de un "corte y empalme" alternativo. Fyn co-inmunoprecipita con el complejo TCR/CD3. Aproximadamente un 20% de Fyn puede ser detectado en asociación con el receptor dependiendo del detergente utilizado para el aislamiento [Samelson et al. (1990); Da Silva et al. (1992); Gassmann et al. (1994)].

Los primeros 10 aminoácidos de la región N-terminal de Fyn median la unión al receptor, más concretamente a la cadena CD3  $\zeta$ . La secuencia de unión tiene dos cisteínas. Fyn se asocia a las cadenas CD3  $\epsilon$ ,  $\delta$  y  $\gamma$ , así como a la cadena CD3  $\zeta$  [Timson-Gauen et al. (1992)].

### **I.3.1.3. Otras asociaciones de las PTKs de la familia Src.**

CD2 es una glicoproteína no-polimórfica que se expresa en todos los timocitos humanos y en linfocitos T periféricos. El ligando fisiológico de CD2 es LFA-3/CD58 una glicoproteína de membrana. Algunos anticuerpos anti-CD2 inducen una proliferación de la célula T no dependiente de IL-2. En la activación del CD2 uno de los primeros sucesos es la fosforilación de proteínas en tirosina. CD2 es capaz de inducir un incremento en la actividad quinasa de p56Lck [Danielian et al. (1992)]. Esta asociación requiere de una región rica en prolina de la cadena citoplasmática de CD2 y el dominio SH3 de Lck [Bell et al. (1996)].

CD5 es un antígeno específico de linfocitos T que se une al antígeno de células B CD72 y actúa como co-receptor en la estimulación del crecimiento del linfocito T. CD5 se asocia con la cadena TCR  $\zeta$  y se fosforila rápidamente en residuos de tirosina como efecto de la estimulación del TCR/CD3. CD5 está asociado a Lck y es además sustrato de Lck. La unión de Lck a CD5 induce un incremento de la actividad catalítica de Lck [Raab et al. (1994)].

Se ha descrito la interacción de Lck y Fyn con la cadena  $\beta$  del receptor de IL-2. La región ácida de la cadena  $\beta$  es esencial para esta interacción. Dentro de esta región dos tirosinas serían además potenciales sustratos de la quinasa. Parte de la región N-terminal de Lck y Fyn se requiere para la asociación con IL-2R  $\beta$ . Sin embargo, existe una gran controversia en el papel de estas quinasas en la señalización a través del receptor de IL-2.

### **I.3.2. La familia de tirosina quinasas Syk/ZAP-70.**

Aproximadamente en 1991 Chan y col. y Wange y col. describían una proteína fosforilada en tirosina de 70 kDa que se asociaba con la cola citoplasmática de TCR  $\zeta$  y que denominaron ZAP-70 ( $\zeta$  chain-associated protein). Esta proteína tiene actividad

fosfotirosina quinasa [Chan et al. (1991); Wange et al. (1992); Chan et al. (1992); Chu and Littman (1994)]. De este modo se iniciaba el estudio de la ZAP-70 y las proteínas de la familia Syk como elementos activos en la transducción de las señales mediadas por el TCR/CD3. Las PTKs de la familia Syk se diferencian de las PTKs de la familia Src. La secuencia de ZAP-70 contiene dos dominios SH2 y un dominio tirosina quinasa C-terminal. A diferencia de las PTKs de la familia Src, ZAP-70 carece de un residuo de tirosina C-terminal con función de regulación negativa, no contiene un dominio SH3 y le falta el sitio de miristilación en el aminoácido 2, lo que implica que no se localiza de manera constitutiva en la membrana. ZAP-70 es homólogo a Syk (spleen tyrosine kinase). Syk tiene 72 kDa y se encuentra predominantemente en células B, células mieloides y timocitos. [Weiss (1993); Weiss and Littman (1994)]

#### **1.3.2.1. La asociación de ZAP-70 con las cadenas CD3.**

A diferencia de Lck y Fyn, ZAP-70 se asocia a la cadena CD3  $\zeta$  y CD3  $\epsilon$  sólo tras la activación del receptor [Straus and Weiss (1993)]. Experimentos de expresión en células COS demuestran que esta asociación requiere la co-expresión de Lck o Fyn. La asociación de ZAP-70 a las cadenas CD3  $\zeta$  y CD3  $\epsilon$  requiere los dos dominios SH2 en tandem de la molécula ZAP-70 para dicha unión. Los dominios SH2 N-terminal o C-terminal por separado no se unen a estas subunidades del TCR [Wange et al. (1993)]. La afinidad de los distintos ITAMs comprendidos dentro de CD3  $\zeta$  y CD3  $\epsilon$  presentan una jerarquía  $\zeta_A > \zeta_B > \epsilon > \zeta_C$ . La unión de ZAP-70 a los ITAMs fosforilados se incrementa notablemente por el alto nivel de cooperatividad entre sus dos dominios SH2, que individualmente demuestran baja afinidad de interacción por su ligando [Timson-Gauen et al. (1994); Isakov et al. (1995)]. En estudios llevados a cabo con resonancia para estudiar la asociación de los ITAMs tanto a ZAP-70 como a Syk sugieren que las especificidades de unión de los dominios SH2 de las kinasas de las familias Src y Syk son similares. Las PTKs de la familia Src se asocian al receptor en linfocitos T en reposo y parecen tener una baja afinidad de unión por los ITAMs de TCR/CD3 no fosforilados, pero esta interacción aumenta en afinidad con la fosforilación del ITAM. La unión del ITAM fosforilado al dominio SH2 de Src incrementa la actividad catalítica de la Src quinasa. Esto promueve la fosforilación de la segunda tirosina del ITAM. La fosforilación de ambas tirosinas del ITAM favorece la unión de las PTKs de la familia Syk ya que la afinidad de ZAP-70/Syk mediante los dos dominios SH2 es mayor que la de un solo dominio SH2 de Fyn o Lck [Bu et al. (1995)].

Dos tirosinas, Tyr492 y Tyr493, de ZAP-70 se han identificado como sitios de fosforilación *in vivo* en respuesta a la activación del TCR/CD3. Para determinar el papel de la fosforilación en tirosina en la regulación de la actividad de ZAP-70 se mutaron dichas tirosinas por fenilalaninas. La mutante Y493F presenta una actividad



quinasa basal normal, pero no puede ser activada por fosforilación en tirosina. La mutacion Y492F produce un incremento en la actividad quinasa basal de 4 veces. Estos estudios demuestran que estas tirosinas no son responsables de la asociación p56Lck y ZAP-70 a traves de dominios SH2. Mas bien parece indicar que el reclutamiento de ZAP-70 al TCR/CD3 permite la autofosforilación de ZAP-70 y la unión a p56Lck que fosforila a la Tyr493. Esto provoca la regulación positiva de la actividad quinasa de ZAP-70 que comienza a fosforilar a sus substratos [Wange et al. (1995); Mege et al. (1996)]. La autofosforilación de ZAP-70 genera nuevos puntos de unión para proteínas con dominios SH2 [Neumeinster et al. (1995)].

Una de estas proteínas es SHP-1 (también conocida como PTP1C, SH-PTP1 o SHP). SHP-1 es una tirosina fosfatasa. A través de su dominio SH2, SHP-1 se asocia a ZAP-70. La interacción entre SHP-1 y ZAP-70 incrementa la actividad fosfatasa de SHP-1 y provoca una disminución de la actividad quinasa de ZAP-70, lo que sugiere un método de control mediante un lazo autoregulatorio. La activación de ZAP-70 resulta en el reclutamiento de SHP-1 que funciona inactivando la quinasa y regulando negativamente las señales de transducción a través del TCR/CD3. De este modo ZAP-70 es responsable de su propia regulación negativa [Plas et al. (1996)]. En la figura 6 se presenta un esquema de la regulación positiva de ZAP-70.

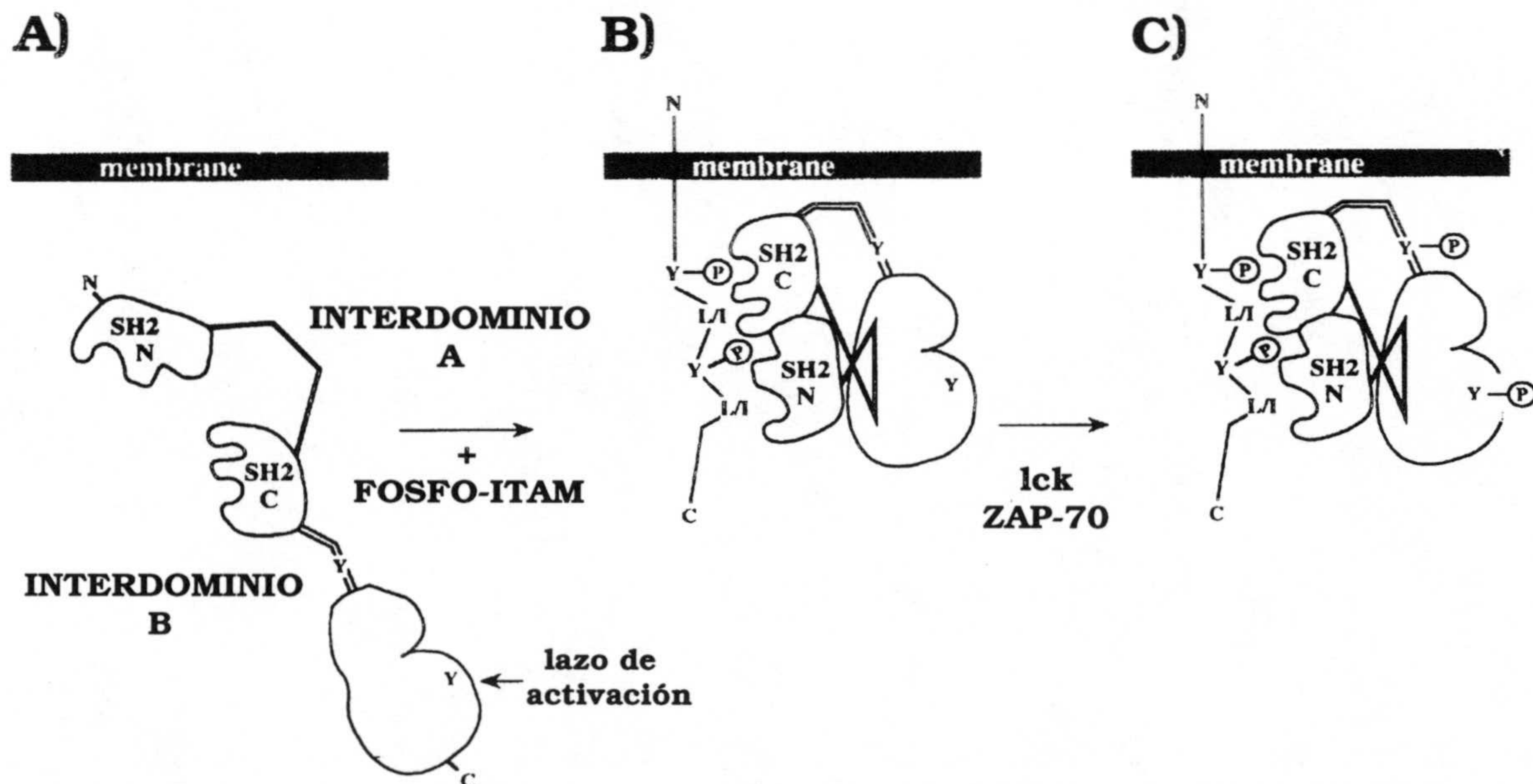


Figura 6. Representación de la regulación positiva de ZAP-70 tras la activación del receptor y posterior fosforilación de las cadenas CD3. Esquema cedido por Bernard Malissen, Centre d'Immunologie, Marseille-Luminy. Francia.

También se ha descrito que los linfocitos T de nódulos linfáticos y timocitos de ratón expresan CD3  $\zeta$  constitutivamente fosforilada en tirosina en estado basal [van Oers et al. (1994)]. En estas circunstancias hay una fracción de moléculas ZAP-70 que están constitutivamente asociadas a CD3  $\zeta$ . La activación del TCR/CD3 conlleva un incremento de la fosforilación en tirosina de las cadenas CD3 y ZAP-70. Esta observación ha llevado a sugerir una función protectora de ZAP-70. La fracción de moléculas de ZAP-70 que estaría unida a CD3  $\zeta$  protegería a los ITAMs de estas cadenas de la desfosforilación por fosfotirosina fosfatasas.

Uno de los sustratos de ZAP-70 es una proteína de 120 kDa que se fosforila en tirosina tras la activación de los linfocitos T. Esta proteína resultó ser el producto del gen c-Cbl [Fournel et al. (1996)]. Dado que c-Cbl no posee dominios SH2 las posibilidades de interacción serían que los dominios SH2 de ZAP-70 se unieran a residuos fosforilados en tirosina de c-Cbl o bien que c-Cbl se uniera a residuos de fosfotirosina de ZAP-70 mediante alguna proteína adaptadora. ZAP-70 parece requerir la presencia de Lck y/o Fyn para fosforilar c-Cbl.

Otra de las proteínas a las que se asocia ZAP-70 es Vav. La asociación parece tener lugar a través del dominio SH2 de Vav y requiere la inducción de la fosforilación en tirosina ya que el pretratamiento con herbimicina A, un inhibidor de la actividad tirosina quinasa, evita la asociación Vav-ZAP-70 [Katzan et al. (1994)]. Otros autores han encontrado que esta asociación puede ser dependiente de tubulina, lo que permitiría establecer una conexión entre las moléculas señalizadoras y el citoesqueleto [Huby et al. (1995)].

Las interacciones físicas y funcionales entre ZAP-70 y p59Fyn también han sido descritas. Estas no parecen depender de la presencia de las cadenas del CD3 y requieren los dominios SH2 y SH3 de Fyn sugiriendo que son múltiples los sitios en ZAP-70 y en Fyn implicados en la asociación que conduce a la fosforilación de ZAP-70 [Fusaki et al. (1996)]. Trabajos llevados a cabo con Lck secundan la idea de que no es una zona exclusivamente en la Src quinasa la necesaria para la asociación a ZAP-70 sino que ambos dominios SH2 y SH3 son imprescindibles [Yamasaki et al. (1996)].

Ya hemos mencionado como pequeños cambios en los péptidos antigénicos presentados por las moléculas de MHC pueden convertir complejos agonistas en parcialmente agonistas e incluso en inhibidores. Estudios realizados con péptidos debilmente agonistas y antagonistas demostraban que la señal de transducción es distinta a la producida por un péptido agonista. El patrón de fosforilación de CD3  $\zeta$  es distinto y no se produce la fosforilación de ZAP-70, lo que lleva a la anergia del linfocito T. Esto demuestra que el complejo TCR/CD3 puede activar vías de señalización selectivamente dependiendo de la naturaleza del ligando reconocido y así

según el patrón de proteínas fosforiladas en tirosina relacionadas con el TCR/CD3 conducir a diferentes fenotipos [Sloan-Lancaster et al. (1994); Madrenas et al. (1995)].

Se han descrito tanto en ratones como en humanos inmunodeficiencias severas asociadas a mutaciones del gen de ZAP-70, demostrando la función esencial de esta molécula en el funcionamiento de los linfocitos T [Chan et al. (1994); Elder et al. (1994)].

### **I.3.3. La fosfatidilinositol 3 quinasa.**

La fosfatidilinositol 3-quinasa (PI 3-quinasa) fosforila la posición D3 del anillo de inositol del fosfatidilinositol (PI) y sus derivados fosforilados para producir PI 3-fosfato, PI 3,4-bifosfato y PI 3,4,5-trifosfato. Estos lípidos no parecen ser sustratos de ninguna de las isoformas conocidas de PLC y probablemente tengan un papel como segundos mensajeros directos. La PI 3-quinasa es un heterodímero con una subunidad de 85 kDa y otra de 110 kDa. Se han descrito 3 isoformas de p85 denominadas, p85 $\alpha$ , p85 $\beta$  y p85 $\gamma$  y todas carecen de actividad PI 3-quinasa. La homología entre todas las isoformas es de un 62%. p85 presenta dos dominios SH2 y uno SH3. También presenta una región con homología de secuencia al producto del gen BCR. La proteína BCR tiene actividad GAP por Rac, con lo que se postula que esta región podría interaccionar con pequeñas proteínas de unión a GTP [Panayotou and Waterfield (1992)]. La presencia de distintos dominios funcionales sugiere que la proteína p85 puede tener papeles de regulación e interacciones múltiples [Dhand et al. (1994); Ward et al. (1996)].

La única forma de p110 clonada hasta la fecha tiene homología con Vps34p, una PI 3-quinasa de levadura. p110 presenta un dominio catalítico en la región C-terminal de la proteína. La región N-terminal no presenta homología con ninguna otra proteína y se cree que juega un papel regulatorio. En esta región aproximadamente unos 88 aminoácidos están implicados en la unión a p85. La región comprendida entre los dominios SH2 en p85 se requiere para la unión a p110, concretamente los residuos 451-555. La interacción entre las dos subunidades no depende de la presencia de fosfotirosina y tampoco de motivos ricos en prolina.

Dado que p85 se puede asociar a receptores mediante sus dominios SH2, la regulación de la actividad enzimática podría producirse como resultado de la translocación a la membrana de la quinasa haciéndola accesible a sus sustratos [Susa et al. (1992)] o por interacciones de p85 con otras proteínas y entre las subunidades p85/p110. Estas interacciones se deben a cambios inducidos en la p85 tras la unión a PTKs que se transmiten a la p110 y producen su activación. Concretamente la fosforilación en tirosina de p85 se correlaciona con un incremento en la actividad específica de la PI 3-quinasa [Hayashi et al. (1992); Dhand et al. (1994)]. La subunidad

p110 de la PI 3-quinasa presenta a su vez una actividad como proteína serina quinasa. El sustrato de esta actividad es la misma subunidad p85 y esta fosforilación en serina parece regular negativamente la actividad PI 3-quinasa. La actividad serina quinasa intrínseca mantiene a la actividad PI 3-quinasa en un nivel basal bajo mediante la fosforilación en la Ser608 de p85 [Dhand et al. (1994)].

El dominio SH3 de Fyn se une a una región rica en prolina (residuos del 84-99) de la p85. Esta unión conduce a un incremento de 5 a 7 veces en la actividad PI 3-quinasa [Karnitz et al. (1994); Pleiman et al. (1994.)]. También se ha observado en una línea celular Jurkat con una Lck defectuosa que tanto la fosforilación en tirosina como la activación de PI 3-quinasa no se producen. p56Lck activa directamente a la PI 3-quinasa purificada. Todo parece sugerir que Lck se requiere para la activación de la PI 3-quinasa y puede activarla fosforilando uno a varios puntos reguladores [von Willebrand et al. (1994)].

Respecto a la regulación de la actividad de la PI 3-quinasa por tirosina quinasa existe cierta controversia ya que Cantrell y col. afirman que el complejo TCR/CD3 no regula la actividad PI 3-quinasa mediante mecanismos que impliquen la fosforilación en tirosina de la p85 [Ward et al. (1992)]. Este mismo grupo propone una regulación diferencial para las isoformas  $\alpha$  y  $\beta$  de p85. Mientras que tras la activación del linfocito T, p110 resulta fosforilado en serina, p85  $\alpha$  no modifica su nivel basal de fosforilación en serina. Sin embargo, la estimulación de TCR/CD3 produciría un rápido aumento de la fosforilación en treonina de p85  $\beta$ . Según el grupo la fosforilación diferencial de p85  $\alpha$  y  $\beta$  revela la potencial regulación y función divergente de las dos isoformas tras la activación del linfocito T [Reif et al. (1993)].

Un examen de la secuencia N-terminal de p85 revela la existencia de dos zonas ricas en prolina. La capacidad de estas secuencias para asociarse a dominios SH3 las hace potenciales zonas de regulación. Incluso se postula que el dominio SH3 de la p85 podría autoasociarse a los motivos ricos en prolina de la misma subunidad como parte de un mecanismo regulador [Kapeller et al. (1994)].

#### **1.3.3.1. Las proteínas que se asocian a PI 3-quinasa.**

Ya he mencionado las asociaciones de PTKs del tipo Fyn y Lck y su posible papel regulador de la actividad PI 3-quinasa. Sin embargo y dado el papel crucial de PI 3-quinasa en la transducción de señales el número de interacciones no termina aquí, sino que, al contrario, cada vez son más el número de proteínas implicadas en asociación con la PI 3-quinasa.

En 1994, Exley y col. publicaron un trabajo sobre la asociación de la PI 3-quinasa con una secuencia específica de CD3  $\zeta$ , dependiendo de la activación del linfocito T [Exley et al. (1994)] y que ha sido la base de partida de la tesis que aquí se

presenta. La PI 3-quinasa se asocia preferentemente al ITAM  $\zeta_A$ , dicha asociación ocurre tras la activación del TCR/CD3 y la fosforilación en tirosina del ITAM. La asociación a los ITAMs de CD3  $\zeta$  puede ser catalogada como  $\zeta_A \gg \zeta_C > \zeta_B$ . Tras la activación se produce un incremento en la actividad PI 3-quinasa asociada a  $\zeta_A$ . La asociación diferencial a uno de los ITAMs de CD3  $\zeta$  frente a los otros favorece la teoría de que los distintos ITAMs del complejo TCR/CD3 reclutan diferentes moléculas implicadas en señales de transducción.

Evidencias de la dependencia que la transducción de señales a través del TCR/CD3 tiene de PI 3-quinasa también se han observado mediante el uso del inhibidor específico de la PI 3-quinasa; wortmanina [Exley and Varticovski. (1997)]. En concentraciones nanomolares la wortmanina inhibe la PI 3-quinasa interaccionando con la subunidad catalítica p110. Concretamente el punto de interacción es la zona de unión a ATP de la p110, especialmente la Lys802 [Wymann et al. (1996)]. La wortmanina inhibe la activación de los linfocitos T periféricos de sangre humana activados con anti-CD3 o anti-CD28, pero no inhibe la producción de IL-2 de linfocitos CD4+ de bazo de ratón estimulados con anti-CD3. Algunos autores afirman que esto no es una prueba de que PI 3-quinasa juega un papel esencial en la respuesta al antígeno, ya que además de esta contradicción, la wortmanina podría tener efectos adicionales no descritos sobre otras vías aparte de la PI 3-quinasa [Shi et al. (1997)]. Efectivamente la wortmanina a niveles micromolares bloquea la PI 4-quinasa [Nakanishi et al. (1995)] y a rangos nanomolares inhibe la activación de la fosfolipasa A2, pero esta no juega un papel en la activación vía TCR [Cross et al. (1995)].

La proteína Ras funciona con transductora de señales gracias a su habilidad de cambiar de una forma activa a inactiva dependiendo de la unión de GTP. GTP activa Ras, ésta tiene actividad intrínseca GTPasa y la hidrólisis de GTP a GDP revierte la proteína a su estado inactivo. Ras regula la actividad de las MAP quinasas [Cantrell et al. (1993)]. Mediante la expresión de una PI 3-quinasa constitutivamente activa se ha observado una elevación de los niveles de GTP unido a Ras demostrando que PI 3-quinasa puede activar la vía de Ras [Hu et al. (1995)]. La interacción de PI 3-quinasa con Ras se produce a través de la subunidad catalítica p110 y concretamente a través de sus residuos 133 y 134. De estos mismos estudios se deriva la posibilidad de una influencia de esta zona de contacto con Ras en la actividad de la PI 3-quinasa, ya que la interacción con Ras-GTP produce un aumento en la actividad enzimática de la PI 3-quinasa [Rodriguez-Viciano et al. (1996)].

Dado el papel ubicuo de la PI 3-quinasa en la señalización a través de diferentes receptores muchas de las asociaciones de ciertas proteínas con la PI 3-quinasa han sido comprobadas en líneas celulares distintas a las de linfocitos T, e incluso con referencia a otros receptores como el receptor de la IL-2, PDGFR, EGFR, CD28... En

este sentido se ha descrito que la proteína c-Cbl es la proteína responsable de la asociación de la subunidad p85 de la PI 3-quinasa con el receptor de EGF. Tanto los dominios SH2 como el SH3 de p85 parecen estar implicados en la asociación a c-Cbl [Soltoff and Cantley (1996)]. En líneas celulares B se han observado resultados similares, c-Cbl está constitutivamente asociada a p85 a través de residuos ricos en prolina en c-Cbl y el dominio SH3 de p85. Tras la estimulación de las células la fosforilación en tirosina de c-Cbl promueve la asociación de p85 mediante sus dominios SH2 [Jain et al. (1997)]. La interacción de p85 con otra molécula adaptadora Shc también ha sido descrita en líneas celulares B. Shc fosforilada en tirosina se une específicamente al dominio SH2 C-terminal de p85. El dominio SH3 también interacciona con Shc [Harrison-Findik et al. (1995)].

Como he mencionado anteriormente la PI 3-quinasa no sólo juega un papel activo en la transducción de señales a través del TCR/CD3 sino que otros receptores dependen de PI 3-quinasa para transducir señales de activación. Uno de estos receptores es CD28, molécula co-receptora y de vital importancia para que se produzca una activación y respuesta total a través del complejo TCR/CD3. El dominio SH2 de p85 reconoce preferencialmente la secuencia pY-M/V-X-M siendo X cualquier aminoácido. Esta secuencia se encuentra en la región citoplasmática de CD28. En líneas celulares T, Jurkat, la estimulación de CD28 provoca la fosforilación en tirosina de CD28 y la asociación de PI 3-quinasa [August and Dupont (1994)].

PI 3-quinasa probablemente actúa como un primer interruptor en distintos sistemas señalizadores, conduciendo a la activación de los distintos procesos dependiendo del tipo celular [Panayotou and Waterfield (1992)].

#### **I.3.4. La proteína adaptadora Shc.**

La serie de proteínas conocidas como Shc (66, 52 y 46 kDa), han sido denominadas así por Src homology 2/ $\alpha$ -collagen related. El clonaje de los cADNs de esta familia de proteínas demuestra que las especies de 46 y 52 kDa surgen del uso de lugares alternativos de iniciación de la translación en el mismo transcrito. La forma de 66 kDa parece surgir de un "corte y empalme" alternativo ya que sólo hay un gen de Shc [Okada et al. (1995)]. Estas isoformas comparten un dominio SH2 C-terminal, y un dominio central con homología por los dominios de colágeno (CH1), rico en residuos de prolina y glicina. También presentan un dominio N-terminal de unión a fosfotirosina diferente al dominio SH2 (PTB) [Kavanaugh and Williams (1994; Bonfini et al. (1996)]. La forma de 66 kDa contiene un dominio CH2 adicional. Curiosamente se ha observado que la sobreexpresión de la forma de 66 kDa no conduce a la transformación de las células, como si ocurre con las formas de 46 y 52 kDa.

Las proteínas Shc tras activación celular se fosforilan en un sólo residuo de tirosina (Tyr317) que sirve como zona de anclaje a la proteína Grb2. Al igual que otras proteínas anteriormente citadas, Shc no sólo juega un papel en la transducción de la señal mediada por el TCR/CD3, sino también en las señales iniciadas a través de otros receptores. Muchas de las interacciones de Shc han sido descritas en otros modelos de receptores, pero nos indican que en el caso del TCR/CD3 podrían jugar un papel similar. Así, Shc se une al receptor de EGF fosforilado en tirosina [Blaikie et al. (1994)], al receptor de la insulina [Okada et al. (1995)], al receptor de la IL-2 [Ravichandran and Burakoff (1994.)], al receptor de inmunoglobulinas [Kumar et al. (1995)] ... La interacción Shc-Grb2-Sos y la importancia funcional de este complejo en la activación de Ras ha sido descrita en varios modelos. La unión de Grb2 a receptores de factores de crecimiento a través de Shc, recluta Sos a la zona de la membrana, donde cambia GDP por GTP en Ras, conduciéndola a su activación. Ras activada inicia una cascada que transmite la señal de la superficie celular al núcleo.

El dominio PTB reconoce una secuencia de tirosina fosforilada diferente a la reconocida por SH2. En concreto reconoce una secuencia NPXpY siendo N asparragina, P prolina, X cualquier aminoácido y pY la tirosina fosforilada. Esta interacción es rara en los dominios SH2 que generalmente selecciona la especificidad basado en los aminoácidos C-terminal a la fosfotirosina. Los estudios llevados a cabo con estos dominios revelan que las interacciones mediadas por los dominios PTB son de las de mayor afinidad observadas y con una gran dependencia por secuencias concretas de unión [Mandiyan et al. (1996)]. También se ha descrito la estructura tridimensional de este dominio unido a un péptido de fosfotirosina. Los resultados revelaban gran similitud con los dominios conocidos como pleckstrin homology domains (PH) con un sandwich  $\beta$  rodeado de una  $\alpha$ -hélice y se une a fosfolípidos ácidos [Zhou et al. (1995)].

La relación o posible asociación de Shc con moléculas pertenecientes al complejo TCR/CD3 es motivo de controversia. Burakoff y col. estudiaron el papel de Shc en linfocitos T y vieron que tras la activación del TCR/CD3, Shc se fosforila en tirosina e interacciona con Grb2 y Sos. El dominio SH2 de Shc interacciona directamente con la cadena CD3  $\zeta$  fosforilada en tirosina [Ravichandran et al. (1993)]. Péptidos sintéticos que corresponden a las cadenas  $\zeta$ ,  $\zeta$  fosforilada,  $\epsilon$  y  $\epsilon$  fosforilada fueron utilizados en este estudio y sólo se observaba asociación de Shc a CD3  $\zeta$  fosforilada en tirosina. Estudios similares mediante péptidos sintéticos llevados a cabo por Cantrell y col. afirman que dicha interacción no se produce en absoluto y que la interacción de CD3  $\zeta$  con el complejo Grb2-Sos no requiere la presencia de Shc [Osman et al. (1995)].

### **I.3.5. La proteína adaptadora Grb2.**

La proteína Grb2 (growth factor receptor bound protein 2) está formada por un dominio SH2 flanqueado por dos dominios SH3. Grb2 se une a Sos (son of sevenless guanine nucleotide exchange protein) a través de su dominio SH3 [Li et al. (1993)]. Sos facilita el paso de p21 Ras a su estado activo intercambiando GDP por GTP. De este modo este complejo está implicado en la regulación de Ras y de dianas posteriores como Raf-1, ERK y Jun. El complejo básico Grb2-Sos ha aumentado en número de integrantes según los experimentos realizados. De este modo existen ya una variedad de complejos propuestos que partiendo del duplex Grb2-Sos han sido observados dependiendo del receptor y línea celular estudiados.

El dominio SH2 de Grb2 se une fuertemente a residuos de fosfotirosina en receptores con actividad intrínseca tirosina quinasa [Li et al. (1994)] o a Shc. Shc reconoce a los receptores fosforilados en tirosina por PTKs asociándose a través de su dominio SH2. Tras la activación del receptor de inmunoglobulina M, se ha comprobado la asociación Shc-Grb2 [Kumar et al. (1995)]. La unión de Grb2 a Shc requiere que Shc esté fosforilado. Mediante uno de sus dominios SH3 Grb2 recluta a Sos a la membrana celular. Sin embargo cada vez hay más evidencias de que Grb2 no sólo se une a Shc y que su implicación en la transducción de señales de activación no sólo se debería a su asociación con Shc [Nel et al. (1995)].

También se ha descrito en linfocitos T la asociación del dominio SH2 de Grb2 al motivo YMNM de CD28. Esta asociación se produce tras la activación del receptor y depende de la fosforilación en tirosina del motivo. Esta fosforilación requiere de PTKs de la familia Src como Fyn o Lck [Raab et al. (1995)].

Otra de las proteínas intracelulares a las que se asocia Grb2 es c-Cbl. En la línea celular T, Jurkat, y tras la activación a través del TCR/CD3, c-Cbl co-inmunoprecipita con Grb2. La unión de c-Cbl a Grb2 requiere del dominio SH3 de Grb2, pero tras la activación del receptor c-Cbl se asocia del mismo modo a los dominios SH2 de Grb2 [Meisner et al. (1995)]. El complejo observado también incluye a la subunidad p85 de la PI 3-quinasa, y tras la activación aumenta la cantidad de p85 asociada al complejo, así como los niveles de fosforilación de c-Cbl. Los autores de este trabajo proponen un complejo diferente al Grb2-Sos que estaría formado por la asociación constitutiva de c-Cbl a Grb2 y reclutaría a la PI 3-quinasa en respuesta a la activación del TCR. Esta misma asociación constitutiva Grb2-c-Cbl ha sido descrita igualmente en células Jurkat [Buday et al. (1996)] y en células hematopoyéticas [Oda et al. (1995)].



### I.3.6. La proteína c-Cbl.

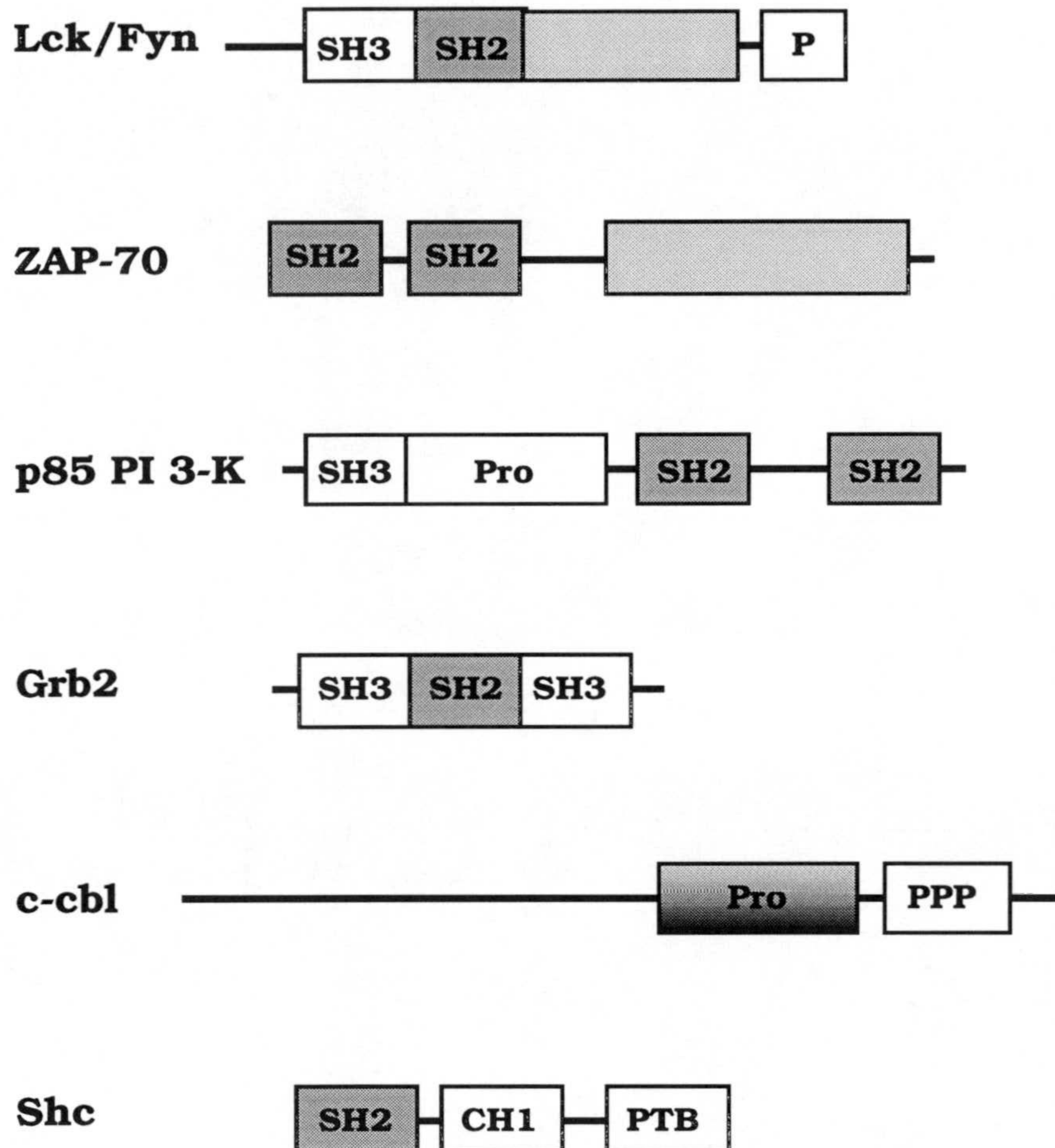
El gén *cbl* fue descubierto como un oncogen causante de transformación del retrovirus Cas NS-1. La proteína viral v-Cbl está muy truncada comparada con su homóloga celular, ya que comprende el 38% N-terminal de la proteína c-Cbl. La forma oncogénica viral se localiza en el núcleo mientras que la celular tiene localización citoplasmática y su sobreexpresión no está asociada a tumorigénesis. Esta proteína de 120 kDa tiene una serie de regiones características que sugieren posibles dominios funcionales. Posee una región N-terminal fuertemente básica, un motivo dedo RING y una región rica en prolina de unos 200 aminoácidos [Bowtell and Langdon (1995)].

Tras la activación del TCR c-Cbl es fosforilada en tirosina de una manera rápida y reversible [Tanaka et al. (1995)]. C-Cbl fosforilada en tirosina se asocia a los dominios SH2 de Fyn y Lck, GAP y PLC  $\gamma$ . La proteína c-Cbl se asocia en su estado no fosforilado y en el fosforilado al dominio SH3 N-terminal de Grb2 [Da Silva et al. (1993); Donovan et al. (1994)]. De este modo se demuestra que c-Cbl es un importante sustrato de las PTKs en linfocitos T y es capaz de asociarse a moléculas adaptadoras como Grb2, tanto en células activadas como inactivadas. También en células no activadas se ha comprobado la asociación de c-Cbl a Fyn y Lck mediante sus dominios SH3 [Reedquist et al. (1994)]. C-Cbl puede servir como un nexo entre moléculas con dominios SH2 y SH3. Una asociación similar entre c-Cbl y tirosina quinasa se ha observado en el caso del receptor de linfocitos B demostrando así que c-Cbl participa en funciones de señalización en general una vez activados receptores de superficie de células inmunes [Cory et al. (1995); Panchamoorthy et al. (1996)]. Igualmente se ha demostrado la asociación a receptores de factores de crecimiento con actividad tirosina quinasa intrínseca como el EGFR [Bowtell and Langdon (1995); Galisteo et al. (1995)].

En I.3.5. se describen los resultados en la línea celular T, Jurkat, en los que tras la activación a través del TCR/CD3 c-Cbl inmunoprecipita con Grb2 [Meisner et al. (1995)]. Una consecuencia de la activación del TCR es la unión de p85 PI 3-quinasa a c-Cbl y el correspondiente aumento de la actividad PI 3-quinasa. La secuencia Y<sup>739</sup>EAM de c-Cbl es un posible lugar de reconocimiento para el dominio SH2 de p85, aunque Shc también puede unirse a este motivo. Esta misma asociación entre c-Cbl-p85 ha sido observada en linfocitos B tras la activación del receptor de linfocitos B (BCR) [Kim et al. (1995)]. Experimentos llevados a cabo tanto en líneas B como T vuelven a demostrar la interacción, pero para ellos parece ser la isoforma de  $\beta$  de p85 la que se une específicamente a c-Cbl [Hartley et al. (1995)].

También se ha descrito la asociación de c-Cbl a ZAP-70 tras la activación del receptor. Esta interacción parece realizarse mediante una proteína adaptadora. ZAP-70 no puede fosforilar c-Cbl en células COS en ausencia de Fyn o Lck. Los autores

sugerían que c-Cbl funcionaría como una gran proteína de atraque que uniría ZAP-70 a otros fenómenos bioquímicos como la activación de Ras o el metabolismo lipídico [Fournel et al. (1996)].



*Figura 7. Proteínas señalizadoras en linfocitos T. SH2; src homology domain 2. SH3; src homology domain 3. PTB; protein tyrosine binding domain. Pro; sitios ricos en prolina. P; sitios de fosforilación en tirosina. CH1; collagen homology domain.*

Crk es una proteína adaptadora que contiene un dominio SH2 y un dominio SH3, que ha sido implicada en transducción de señales. Hay tres formas celulares de Crk (CrkI, CrkII y CrkL). No se conoce demasiado sobre ella, excepto que se asocia con C3G (guanine nucleotide-releasing factor for a small G-protein Rap1) por lo que podría tener un papel mediando interacciones con proteínas intercambiadoras de guanina en proteínas pequeñas de unión a GTP.

Cada vez es mayor el número de trabajos que coinciden en demostrar en líneas celulares y receptores diferentes la asociación de Crk a c-Cbl tras la activación de dichos receptores, incluido TCR/CD3 [de Jong et al. (1995); Sawasdikosol et al.

(1995); Buday et al. (1996); Reedquist et al. (1996); Sawasdikosol et al. (1996)]. La interacción requiere de la fosforilación en tirosina de c-Cbl que permite la unión al dominio SH2 de Crk.

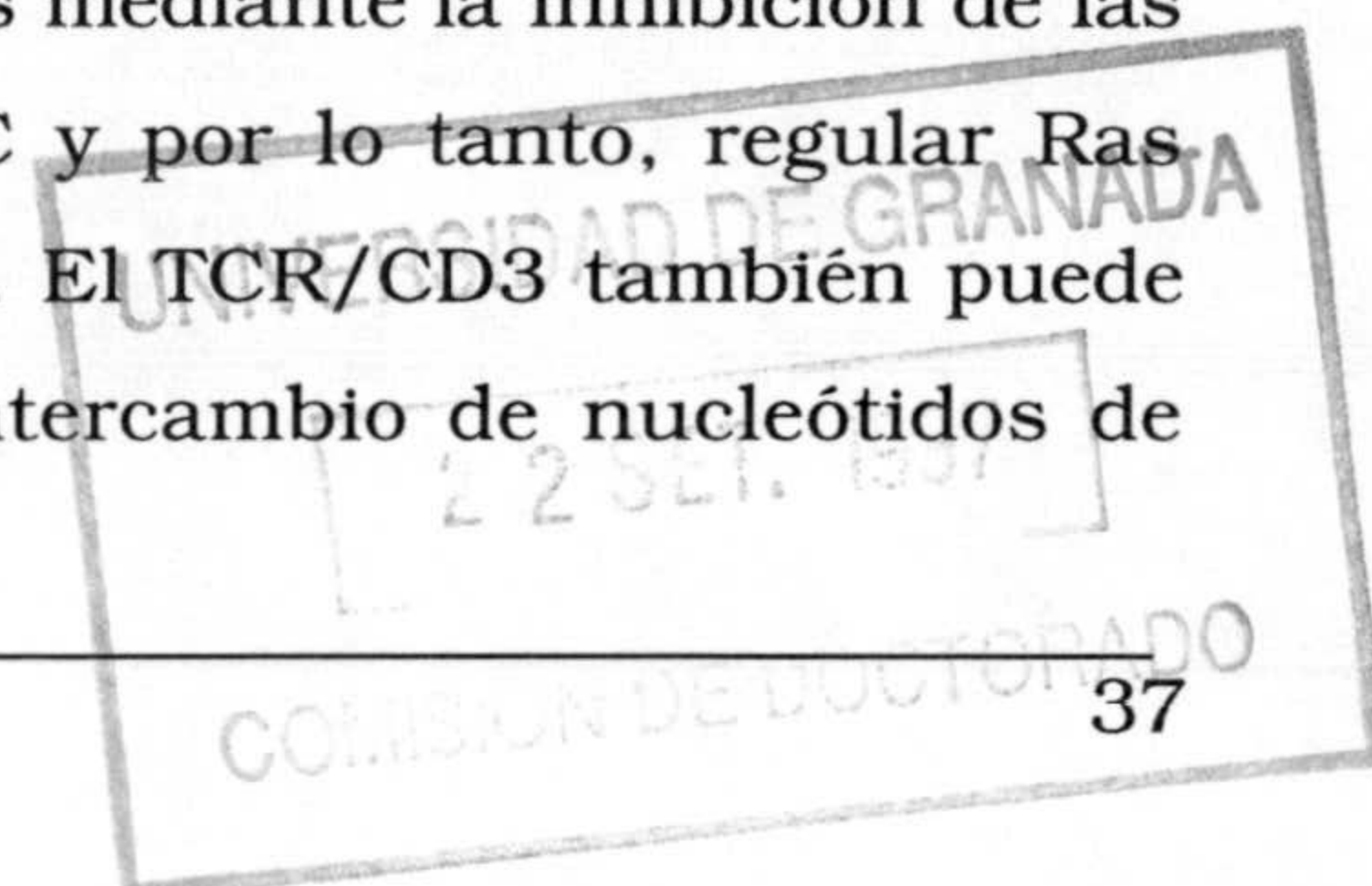
### **I.3.7. Proteínas pequeñas que unen GTP: La superfamilia Ras.**

Existen múltiples aspectos de las funciones celulares que son controlados por proteínas de unión a GTP (proteínas G). Existen proteínas G de gran tamaño y heterotriméricas. Proteínas de esta familia interaccionan con tirosina quinasas en linfocitos T tras la activación del receptor TCR/CD3 [Stanners et al. (1995)]. Se produce un intercambio de GTP en la proteína G $\alpha$ q así como una asociación física de G $\alpha$ q con moléculas CD3.

Sin embargo también existen proteínas G de pequeño peso molecular y monoméricas que pertenecen a la superfamilia Ras. Los miembros de esta familia comparten entre si homologías de secuencia y estructurales que tienen como objetivo el desarrollo de su función bioquímica básica, la unión e hidrólisis de GTP. Estas proteínas están en la célula en uno de los dos estados conformacionales interconvertibles, una forma activa cuando está unida a GTP y otra inactiva cuando está unida a GDP [Chavrier et al. (1993)]. El ciclo GTP/GDP está regulado por dos clases de proteínas: las proteínas activadoras de GTPasa (GAP) que estimulan la actividad GTPasa intrínseca de las proteínas G de la familia Ras, inactivándolas. Y los factores de intercambio como los estimuladores de la disociación de GDP (GDS) que promueven el intercambio de GDP por GTP volviendo a la proteína G a su estado activo o los inhibidores de la disociación de GDP (GDI) que evitan el intercambio.

La superfamilia se subdivide en tres grupos: las subfamilias Ras, Rho y Rab. Las proteínas Ras son reguladores clave en la proliferación celular. Ras ejerce su acción a través de interacciones dependientes de GTP con numerosas dianas celulares o efectores. La más conocida es la serina/treonina proteína quinasa de la familia Raf. Ras interacciona con la región reguladora de Raf traslocándola a la membrana plasmática donde posteriormente se activa. Raf activada fosforila MEK que activa la cascada de quinasas MAP mediante la cual se activan numerosos factores de transcripción.

En linfocitos T la activación del TCR/CD3 provoca una estimulación rápida y prolongada de Ras. Parece que hay dos vías de activación de Ras que co-existen en linfocitos T. Una, estaría mediada por PKC, puesto que hay activadores de la PKC como ésteres de forbol o diacilglicerol que estimulan Ras mediante la inhibición de las Ras-GAP. El receptor TCR/CD3 puede estimular PKC y por lo tanto, regular Ras mediante esta quinasa [Izquierdo and Cantrell (1992)]. El TCR/CD3 también puede regular a Ras mediante el control de proteínas de intercambio de nucleótidos de



guanina, especialmente Sos. Sos se asocia a Grb-2 a través de los dominios SH3 de Grb-2. El dominio SH2 de Grb-2 puede asociarse a moléculas fosforiladas en tirosina. La activación del TCR provoca la fosforilación en tirosina de una proteína de 36 kDa que se asocia al complejo Grb-2/Sos [Cantrell. (1996)]. Se ha demostrado la regulación de la actividad PI 3-quinasa mediante la acción de Ras que actúa sinérgicamente con las PTKs [Rodríguez-Viciano et al. (1996)], aunque otros estudios afirman que la interacción entre ambas proteínas induce la actividad de Ras [Hu et al. (1995)].

La subfamilia Rho tiene al menos 4 genes Rho además de Rac1, Rac2 y CDC42Hs. Las proteínas Rho están relacionadas con el control del citoesqueleto. Los cambios en la organización del citoesqueleto y la forma de la célula tras la estimulación de la célula parecen necesitar una cascada de pequeñas proteínas G entre las que están Ras, Rac1 y Rho [Chavrier et al. (1993)]. Las proteínas Rab están relacionadas con el control del tráfico intracelular.

---

#### I.4. Transducción de señales mediada por el TCR/CD3.

La activación de los linfocitos T periféricos maduros a través del TCR/CD3 inicia múltiples señales intracelulares que pueden conducir a la proliferación celular y funciones efectoras. Los mecanismos bioquímicos que relacionan la activación del receptor con estos sucesos intracelulares son complejos y están siendo estudiados. Algunos como la activación de la fosforilación en tirosina, la elevación de  $Ca^{2+}$  intracelular, la activación de Ras y su cascada de quinasas son bien conocidos [Izquierdo and Cantrell (1992)]. También se conocen los fenómenos relacionados con la inducción de la transcripción de las linfoquinas. Sin embargo hay "lapsus" de conocimiento todavía, especialmente en lo que se refiere a como la fosforilación en tirosina temprana desemboca en los procesos finales. Parece que el papel más importante que juega la fosforilación en tirosina es el de provocar el ensamblaje de complejos señalizadores multimoleculares que incluyan al TCR/CD3 o se situen cerca del mismo [Wange and Samelson (1996)].

En el capítulo I.3. se presentan las principales moléculas implicadas en la transducción de señales mediada por la activación del TCR/CD3. En él se describen las principales interacciones de las moléculas entre si. En el presente capítulo trataré de esquematizar las interacciones moleculares que median en la transducción y dibujar una visión de lo que hasta la fecha se considera probado.

Inmediatamente después de la activación del TCR/CD3 se activan las PTKs asociadas al TCR [Cantrell (1996)]. Dos familias de PTKs juegan un papel primordial en la señalización tras la activación del TCR: Las PTKs de la familia Src, a la que pertenecen Lck y Fyn y las proteínas de la familia ZAP-70/Syk [Weiss (1993)]. El dominio N-terminal de Lck se une a las moléculas co-receptoras CD4 o CD8, mientras que la misma región en Fyn se une a las cadenas polipeptídicas CD3. La principal función de las quinasas de la familia Src es fosforilar residuos de tirosina claves en los ITAMs de las cadenas del CD3 [Timson-Gauen et al. (1992)]. Los dominios SH2 y SH3 de las PTKs de la familia Src forman una asociación intramolecular con su región C-terminal fosforilada en tirosina, inhibiendo su propia actividad quinasa. La desfosforilación del residuo por CD45 deja a los dominios SH2 y SH3 disponibles para interactuar con otras proteínas y regula positivamente su actividad quinasa. Otra función adicional de las Src quinasas es la de fosforilar y por lo tanto activar ZAP-70. Existe una interacción física entre Fyn y Lck con ZAP-70. Esta interacción está mediada por los dominios SH2 y SH3 de Fyn y Lck. Uno de los papeles funcionales de Fyn y Lck es la fosforilación en tirosina de ZAP-70 para activar de ese modo su actividad quinasa [Fusaki et al. (1996); Yamasaki et al. (1996)].

Gracias a sus dos dominios SH2 ZAP-70 puede unirse a los ITAMs de las cadenas CD3. El reclutamiento de ZAP-70 a los ITAMs de TCR/CD3 es necesario para la activación de su actividad quinasa [Wange et al. (1993)]. También se ha detectado en timocitos y linfocitos T de nódulo linfático formas inactivas de ZAP-70 unidas a cadenas CD3 fosforiladas en tirosina basalmente [Wiest et al. (1996)]. La fosforilación en tirosina de Y493 en ZAP-70 por PTKs de la familia Src produce la activación de ZAP-70. La tirosina Y492 no es similar a las tirosinas de autofosforilación existentes en Src quinasas, sino que debe ser considerada más bien un sitio de transfosforilación/activación por otras moléculas de ZAP-70 asociadas a ITAMs adyacentes [Neumeinster et al. (1995)].

Durante la activación, al fosforilarse ZAP-70 en tirosina le permite interactuar con los dominios SH2 de otras proteínas. Es muy difícil determinar que PTKs son responsables de la fosforilación de una determinada proteína. En ese sentido, ZAP-70 no parece ser la responsable de la fosforilación de los ITAMs del CD3, sino que este papel correspondería a las proteínas de la familia Src. ZAP-70 puede fosforilar al dominio citoplasmático de la eritrocito banda 3 (cdb3) y a la tubulina *in vitro* [Isakov et al. (1995; Wange et al. (1995)]. Además de su papel como enzima, ZAP-70 tiene una función como adaptadora para formar complejos señalizadores. Moléculas como Lck, Vav, c-Cbl, PLC  $\gamma$ , Grb2-Sos han sido encontradas en asociación con ZAP-70. *In vivo* tanto ZAP-70 como Vav se han encontrado asociadas a tubulina [Ley et al. (1994)]. La asociación de Lck y Vav a ZAP-70 parece estar mediada por sus dominios SH2 de Lck y Vav [Fournel et al. (1996)]. El complejo Grb2-Sos-PLC  $\gamma$ -p36/38-ZAP-70 se ha postulado como un complejo molecular asociado al TCR que regula a la vez la activación de Ras y el recambio de fosfolípidos de inositol [Nel et al. (1995)]. La proteína SHP-1 se asocia a ZAP-70 mediante sus dominios SH2 y las tirosinas fosforiladas de ZAP-70. De este modo se activa la actividad fosfatasa de SHP-1 que desfosforila a ZAP-70 reduciendo su actividad quinasa.

La proteína adaptadora Grb2 se encuentra asociada a la proteína activadora de Ras, Sos. Algunos autores proponen que otra proteína adaptadora Shc podría formar parte de este mismo complejo mediante su asociación a Grb2. Sin embargo aunque esta asociación parece clara con respecto a receptores de factores de crecimiento, su existencia y posible papel en la señalización por el TCR/CD3 continúa siendo objeto de debate [Ravichandran et al. (1993); Osman et al. (1995)]. A parte del complejo Grb2-Sos, Grb2 también se ha encontrado unida a otros sustratos de las PTKs asociadas al TCR/CD3. La proteína c-Cbl se asocia a Grb2 mediante el dominio SH3 N-terminal de Grb2 [Donovan et al. (1994); Meisner et al. (1995)]. La unión de c-Cbl a Grb2 y la de Sos a Grb2 parecen ser excluyentes, ya que ambas competirían por el

mismo dominio de unión [Meisner et al. (1995)]. C-Cbl también puede asociarse a ZAP-70, PI 3-quinasa o

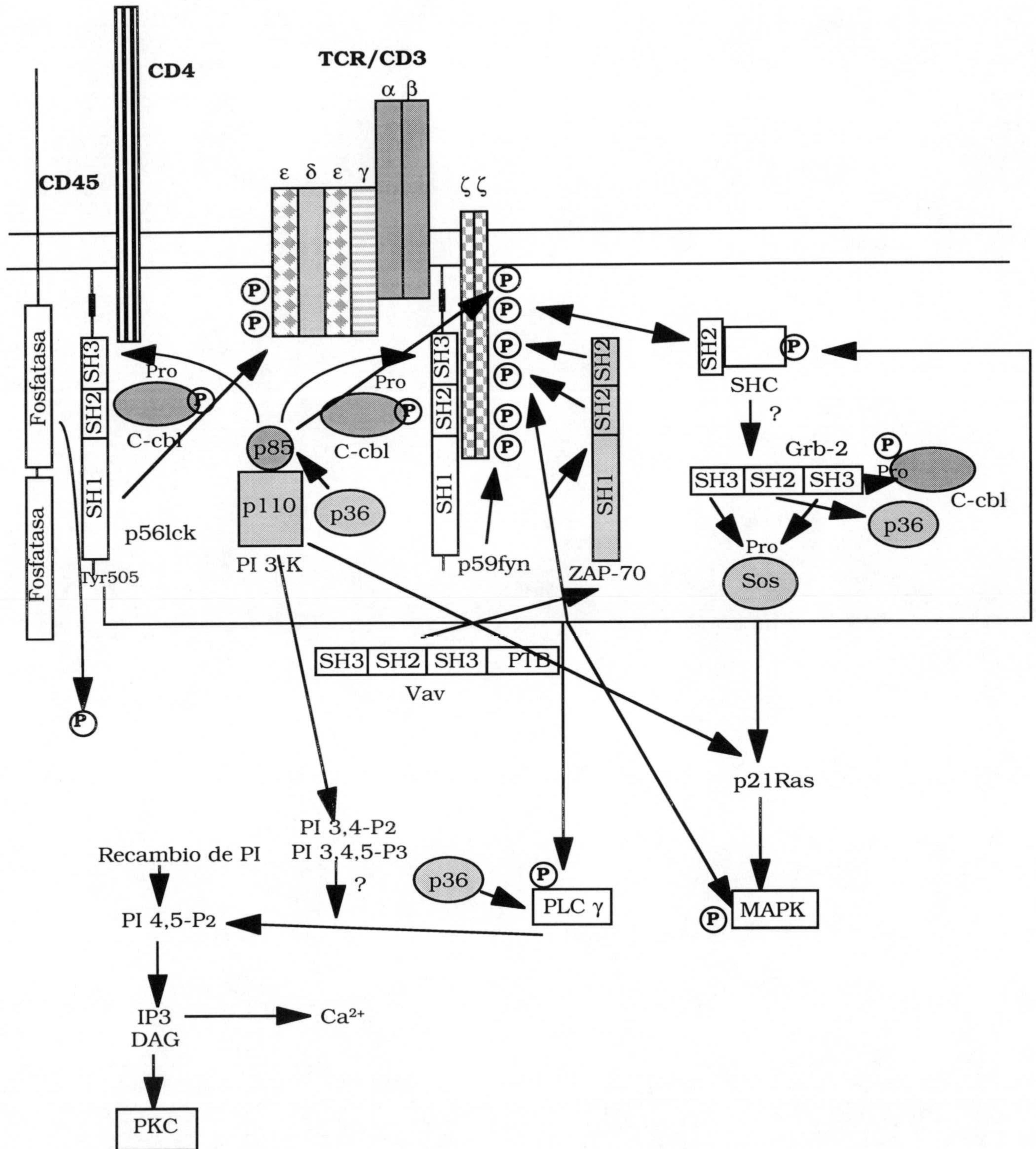


Figura 8. Vías de señalización mediadas por el TCR/CD3 y CD4 y las proteínas asociadas.

Crk. Grb2 se une a través de su dominio SH2 a una proteína denominada p36. El papel de esta proteína no es conocido, aunque se sabe se asocia a PLC  $\gamma$  y PI 3-quinasa [Cantrell (1996)].

C-Cbl también se asocia a las PTKs de la familia Src, Fyn y Lck mediante los dominios SH3 de éstas y las regiones ricas en prolina de c-Cbl. Tras la activación del TCR/CD3 c-Cbl es fosforilado en tirosina [Reedquist et al. (1994)]. Algunos autores han observado una asociación preferencial de c-Cbl a Fyn respecto a Lck y afirman que está mediada por los dominios SH2 de Fyn [Da Silva et al. (1993)].

Vav contiene dos dominios SH3, un dominio SH2 y un dominio PTB, así como una región con homología con proteínas intercambiadoras de nucleótidos de guanina en Rac/Rho. La actividad de Vav requiere actividad PTK y no es funcional en líneas celulares carentes de Lck. Aunque no se conoce bien su papel en transducción de señales se cree que requiere la interacción con otra proteína SLP-76 para su correcto funcionamiento.

CD3  $\zeta$  se une a la proteína adaptadora Shc, que mediante la asociación a Grb2-Sos podría acoplar las cadenas CD3 a la activación de Ras [Ravichandran and Burakoff (1994.)]. También ha sido descrita la unión de CD3  $\zeta$  a la PI 3-quinasa. Esta asociación es dependiente de los ITAMs de CD3  $\zeta$ , concretamente tiene preferencia por el ITAM  $\zeta_A$ . La asociación se lleva a cabo mediante la subunidad reguladora de la PI 3-quinasa p85 y la cadena CD3  $\zeta$  [Exley et al. (1994)]. También se ha demostrado la asociación de PI 3-quinasa a los dominios SH3 de Fyn y Lck y como la activación de dicha proteína requiere la presencia de las Src quinasas [von Willebrand et al. (1994); Pleiman et al. (1994.)]. Sin embargo, esta no es la única asociación en la que se ha visto implicada la PI 3-quinasa. Como he descrito anteriormente PI 3-quinasa se asocia a c-Cbl, a ZAP-70 y a p36.

#### **1.4.1. El papel de CD3- $\epsilon$ en la transducción de señales.**

Las cadenas CD3  $\epsilon$ ,  $\delta$  y  $\gamma$  son también excelentes sustratos de Lck y las tirosinas contenidas en sus ITAMs son fosforiladas *in vivo*. CD3  $\epsilon$  fosforilada se asocia a ZAP-70 y puede funcionar como una unidad de señalización independiente [Straus and Weiss (1993)]. La estimulación de linfocitos T a través de las cadenas citoplasmáticas de CD3  $\zeta$  o CD3  $\epsilon$  producen un patrón de proteínas fosforiladas en tirosina cuantitativamente diferente, lo que sugiere la activación de distintas vías bioquímicas. Sin embargo, experimentos realizados en ratones transgénicos que expresan quimeras con el dominio extracelular y transmembrana de IL-2 y la región citoplasmática de CD3  $\zeta$  o CD3  $\epsilon$ , afirman que los componentes del CD3 envían señales cualitativamente idénticas [Shinkai et al. (1995)]. La presencia de dos proteínas, al menos, en un mismo receptor capaces de transducir señales independientemente provoca



cuestiones respecto al funcionamiento del receptor. ¿Son redundantes las cadenas CD3 y sus ITAMs? o ¿Cooperan en la activación de las mismas señales de transducción?. En el caso de que realicen funciones distintas: ¿Se asocian a proteínas o moléculas efectoras diferentes? [Letourneur and Klausner (1992)]. Algunos autores afirman que el complejo TCR/CD3 estaría compuesto de al menos dos módulos de transducción autónomos [Wegener et al. (1992)].

Dado que la interacción entre el ITAM  $\zeta_A$  de la cadena CD3  $\zeta$  y la PI 3-quinasa ya ha sido descrito [Exley et al. (1994)] queríamos saber si esta relación se producía igualmente entre la cadena CD3  $\epsilon$  y la PI 3-quinasa. La posible relación entre CD3  $\epsilon$  y PI 3-quinasa ha sido muy controvertida. En 1992 Thompson et al querían probar la relación de la PI 3-quinasa con PTKs de la familia Src, especialmente Fyn y Lck, así como la participación de PI 3-quinasa en las señales de transducción inducidas por la activación de CD3 y CD4. Describían la presencia de actividad PI 3-quinasa en inmunoprecipitados de CD3  $\epsilon$  [Thompson et al. (1992)]. Establecieron dos poblaciones diferentes; la asociada a CD3  $\epsilon$  y la asociada a Lck. Ambas era distinguibles ya que la subunidad p85 de la PI 3-quinasa asociada a Lck estaba fosforilada en tirosina y la asociada a CD3  $\epsilon$  no.

La misma posibilidad de que la subunidad p85 de la PI 3-quinasa pudiera fosforilarse en tirosina ya era motivo de debate. Ward et al afirmaban que inmunoprecipitados de proteínas fosforiladas en tirosina aislados de células T estimuladas a través del TCR/CD3 no presentaban actividad PI 3-quinasa. La PI 3-quinasa no estaba fosforilada en tirosina tras la activación del TCR/CD3 y no había evidencias de que se asociara con tirosina quinasas durante la activación del linfocito T [Ward et al. (1992)].

La posibilidad de que CD3  $\epsilon$  se uniera a la subunidad p85 de la PI 3-quinasa fue investigada por Osman et al mediante el uso de péptidos sintéticos unidos a matrices de Affigel 10 [Osman et al. (1996)]. En este estudio se afirma que p85 no se asocia a CD3  $\epsilon$ . Sin embargo Cambier et al con el uso de péptidos sintéticos si observaban la asociación de p85 al ITAM de CD3  $\epsilon$  fosforilado [Cambier and Johnson (1995.)]. La probada asociación de la subunidad p85 de la PI 3-quinasa a CD3  $\zeta$  y los datos contradictorios respecto a la posibilidad de que CD3  $\epsilon$  también se asocie a p85 nos llevaron a estudiar si existe algún tipo de asociación entre la cadena polipeptídica CD3  $\epsilon$  y la PI 3-quinasa.

## **II. OBJETIVOS**

El receptor para el antígeno de los linfocitos T (TCR/CD3) es la estructura encargada del reconocimiento del antígeno en el contexto de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad y de la transducción de las señales desde la membrana al interior citoplasmático. Las subunidades CD3- $\zeta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$  y  $\epsilon$  son las encargadas de la transducción de las señales. Con el presente trabajo pretendemos examinar el papel de la cadena polipeptídica CD3- $\epsilon$  en la transducción de señales. Nuestros objetivos son:

1. Identificar proteínas que interaccionen con la subunidad CD3- $\epsilon$  del TCR/CD3. Prestar especial interés a la posible asociación entre la cadena CD3- $\epsilon$  del TCR/CD3 y la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI 3-quinasa).

2. En el caso en que se produzca la asociación CD3- $\epsilon$ /PI 3-quinasa analizar bajo que circunstancias se produce dicha asociación; si depende de la activación del TCR/CD3, así como que regiones en ambas moléculas están implicadas.

3. Estudiar si la cadena polipeptídica CD3- $\epsilon$  del TCR/CD3 se asocia a proteínas del citoesqueleto.

4. Estudiar la interacción de la cadena polipeptídica CD3- $\epsilon$  del TCR/CD3 con proteínas pequeñas de unión a GTP.

**III. MATERIAL Y METODOS**

### III.1. Material general.

- Agarosa, bromuro de etidio, SDS, Tween-20, pantallas amplificadoras, cassettes de exposición, PHA, ampicilina, neomicina (SIGMA).
- NP-40, Super-Signal (Pierce).
- RPMI 1640, FBS, L-glutamina, penicilina-estreptomicina, DMEM (GIBCO).
- Hyperfilm ECL (Amersham).
- Anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosina HRP conjugado RC20 (E120H Transduction Laboratories).
- Cocktail de anticuerpos monoclonales antifosfotirosina PY-Plus (Zymed).
- Anticuerpo policlonal anti-subunidad p85 $\alpha$ -PI3 quinasa (generosamente cedido por la Dra. L. Varticovski, Saint Elisabeth's Medical Center, Boston, MA).
- Anticuerpo policlonal anti-p120c-Cbl (Santa Cruz).
- Anticuerpo policlonal anti-Lck humana (CT) (UBI).
- Anticuerpo policlonal anti-Fyn humana (Santa Cruz).
- Anticuerpo policlonal anti-Shc (Transduction Laboratories).
- Anticuerpo policlonal anti-CD3- $\epsilon$  (Dako).
- Anticuerpo policlonal anti ZAP-70 L222 (generosamente cedido por el Dr. A. Weiss, Howard Hughes Medical Institute, UCSF, San Francisco, CA).
- Anticuerpos monoclonales OKT3 (anti-CD3<sup>H</sup>, ortho) y OKT8 purificados por afinidad a partir de sobrenadantes de cultivos de hibridomas de OKT3 y OKT8 adquiridos a la ATCC.

### III.2. Cultivos celulares.

#### III.2.1. Líneas celulares.

- Líneas de células humanas T leucémicas:
  - Jurkat E6.1 clon 77.
  - Jurkat CD8- $\epsilon$  que expresan establemente la quimera CD8- $\epsilon$  tras ser transfectada por electroporación en células Jurkat E6.1 y los clones seleccionados por crecimiento en medio con neomicina. Fueron generosamente por el Dr. Dexian Zheng, Dept. Biochemistry and Molecular Biology, Institute of Basic Medical Sciences, Beijing, China.
  - Jurkat JCAM 1.6.
- Línea de células epiteliales de riñón de mono COS-7.
- Linfocitos T de nódulo linfático y bazo de ratones  $\zeta$ -/- y wild tipe.

### III.2.2. Mantenimiento.

Las líneas celulares T leucémicas descritas se cultivan en medio base compuesto por RPMI 1640 suplementado con 1mM L-glutamina, 60 µg/ml gentamicina (Llorente S.A.), penicilina-estreptomina y 10% FBS previamente descomplementado por calentamiento a 56°C durante 30 minutos.

La línea epitelial COS-7 se cultiva en medio base compuesto por DMEM suplementado con 1 mM L-glutamina, 60 µg/ml gentamicina, penicilina-estreptomina y 10% FBS.

Todas las líneas celulares se mantienen en cultivo en incubador a 37°C y una atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

### III.3. Determinación de la viabilidad celular.

Se tiñen las células con el colorante de exclusión azul tripán (solución al 0.4% de SIGMA) y se determina el porcentaje de células vivas basándose en su capacidad para impedir la entrada de dicho colorante a través de la membrana plásmica.

El conteo se realiza en una cámara de Neubauer observando a través de un microscopio de contraste de fases (Olimpus CK2).

### III.4. Generación de las quimeras.

Los 792pb de CD8-ε de los cuales 624 pb pertenecen a los dominios extracelular y transmembrana de la secuencia codificante de la cadena CD8α humana (desde 1ATG a CAC624) ligados a los 168 pb del dominio citoplasmático de la cadena murina de CD3-ε (desde 481AAG a TGA648) fueron construidos del siguiente modo:

Para amplificar el fragmento de 1-624 pb de la cadena humana de CD8α por PCR se usaron los oligonucleótidos 5'CGCGAAGCTTTGGCCATGGCCTTACCAG3' y 5'CTTGGCCTTGGCCTTCCTATTCTTGTGGTTGCAGTAAAGGGTGATAAC3' y el cDNA de CD8α humano en el plásmido pCD8α/pink2 [Howard et al. (1992)] como molde.

Para amplificar el fragmento de 481-648 pb del dominio citoplasmático de la cadena CD3-ε murina por PCR se usaron los oligonucleótidos 5'GTTATCACCCCTTTACTCGAACCACAATAGGAAGGCCAAGGCCAAG3' y 5'CGGGATCCTCAGACTGCTCTCTGATTC3' y el cDNA de CD3-ε murino en pDL1 [Gold et al. (1987)] como molde.

Se procedió a la hibridación de los productos anteriormente obtenidos mediante una tercera PCR. Se digirió el producto con las enzimas de restricción HindIII (5') y BamH I (3') (Bóehringer Mannheim) y se insertó en el vector de expresión pcDNA3 (Invitrogen).

La quimera mutante CD8-ε Y170F presenta una sustitución de la tirosina en posición 170 por una fenilalanina y fue generada por la técnica de PCR utilizando la quimera CD8-ε como molde. La quimera mutante CD8-ε Y181F presenta una sustitución de la tirosina en posición 181 por una fenilalanina y la quimera mutante CD8-ε Y170F/Y181F presenta ambas tirosinas en posiciones 170 y 181 sustituidas por fenilalaninas.

### **III.5. Preparación de las matrices de afinidad.**

Los péptidos sintéticos fueron sintetizados por C. Dahl (Harvard Medical School, Boston, MA, USA). En resumen, los péptidos fueron sintetizados por el procedimiento de fase sólida usando aminoácidos fluorenilmetoxicarbonil en un sintetizador de péptidos Ranin Symphony [Atherton et al. (1975; Chang and Meinhofer (1978)]. El residuo inicial se unió a una resina de alcohol p-alkoxilbenzil que proporcionaba así el grupo c-terminal carboxilo. Los péptidos fueron desbloqueados y separados de la resina con una mezcla de ácido trifluoroacético:thioanisole:etaneditiol:anisole (9:0.5:0.3:0.2) para minimizar las reacciones co-laterales. Los péptidos fueron precipitados con la mezcla de ruptura TFA con dietileter y lavados varias veces con eter frio para eliminar impurezas generadas por la ruptura. Se utilizó el método de HPLC para purificar los péptidos.

Los péptidos se asociaron químicamente a través de la cisteína amino-terminal con ester maleimidobenzoil-N-hidroxisulfosucinimido a lisina-Sepharose. Los péptidos CT26 y CT26P fueron sintetizados químicamente con una secuencia carboxiteminal adicional Arg-Arg-Ala-Ser-Val (RRASV) para medir cuantitativamente la eficiencia de asociación de los péptidos a la matriz de lisina-Sepharose. El residuo de serina de la secuencia RRASV puede ser fosforilado mediante la quinasa de músculo de corazón y [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP.

#### **III.5.1. Material.**

- Lisina-Sepharose alpha-amino asociada (SIGMA). Reconstituida en agua y lavada en 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O pH 8.0 sin azida.
- Sulfo-MBS (Pierce).

#### **III.5.2. Soluciones.**

50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O pH 8.0.

50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O pH 6.5.

#### Solución de bloqueo.

136 mM NaCl, 25 mM Tris pH 7.4, 2,5 mM KCl, 1% BSA, 0.1% azida sódica.

### III.5.3. Asociación de los péptidos a las matrices de afinidad.

Se une 1 mg de Sulfo-MBS a 1 ml de lisina-Sepharose en 12 ml de 50 mM de fosfato sódico pH. 8. Se deja en agitación a temperatura ambiente durante 30-60 minutos. Se centrifuga y elimina el sobrenadante. Se añade al sedimento 12 ml de 50 mM de fosfato sódico pH. 6.5. Se añade 1 mg de péptido y agita a temperatura ambiente durante 60 minutos [Dell'Arciprete et al. (1988)].

Tras centrifugar, se toma una muestra de sobrenadante para medir la cantidad de péptido unida. Se lava el sedimento 2 veces con la solución de bloqueo. La medida cuantitativa de la eficiencia de asociación del péptido se realiza mediante Western Blot utilizando anticuerpos anti-péptido y anti-fosfotirosina y por azul de Coomassie.

### III.5.4. Marcaje mediante quinasa de músculo de corazón.

#### III.5.4.1. Material.

- Quinasa de músculo de corazón (SIGMA).
- P4 Bio-Gel (Bio-Rad).
- Adenosin trifosfato (SIGMA).
- [ $\gamma$ - $^{32}$ P] adenosin trifosfato ( Amersham).
- DTT (Böehringer Mannheim).

#### III.5.4.2. Soluciones.

##### Tampón HMK 5X.

1 M Tris pH 7.6, 1 M DTT, 1 M MgCl<sub>2</sub>, 5 M NaCl.

#### III.5.4.3. Marcaje de los péptidos mediante la quinasa de músculo de corazón.

Se reconstituye la quinasa de músculo de corazón en 60  $\mu$ l de una solución 20  $\mu$ l 1 M DTT y 40  $\mu$ l agua destilada.

Se prepara 4  $\mu$ l de péptido (1  $\mu$ g/ $\mu$ l), 20  $\mu$ l tampón 5X, 4  $\mu$ l [ $\gamma$ - $^{32}$ P]-ATP, 10  $\mu$ l quinasa de músculo de corazón y 62  $\mu$ l de agua bidestilada. Se incuba 1 hora a 37°C. Se añade 5  $\mu$ l de una solución de ATP 10  $\mu$ M frío y 5  $\mu$ l de quinasa de músculo de corazón e incuba 1 hora a 37°C.

Antes de la incubación se resuspende 1 g de P4 Bio-Gel en 10 ml de tampón HMK 1X. Se deja hidratando durante 4 horas. Se elimina el sobrenadante y aplica vacío al gel durante 5 a 10 minutos. Se lava 3 veces con tampón HMK 1X. Se empaqueta el gel en una columna.

Se añade la solución de reacción a la columna P4 Bio-Gel y se recogen muestras de 50  $\mu$ l. Mediante un contador de centelleo se mide la radioactividad asociada a cada muestra recogida para identificar la muestra donde tenemos el péptido marcado y



purificado. También se correrá 1 µl de cada muestra en un gel de separación de proteínas y se procederá a una autoradiografía con el fin de ratificar los resultados obtenidos mediante el contador de centelleo.

### III.6. Análisis e identificación de proteínas mediante Western-Blot.

#### III.6.1. Material.

- DTT, PMSF (Böehringer Mannheim).
- Iodoacetamida, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, glicina (SIGMA).
- Acrilamida, bisacrilamida, TEMED, persulfato amónico, marcadores de peso molecular (Prestained SDS-PAGE Standards) (Bio-Rad).
- Membranas de PVDF Immobilon (Millipore).
- Anti-IgG de ratón-HRP, anti-IgG de conejo-HRP (Promega).
- Reactivo ECL: Western blotting analysis reagents. (Amersham).
- SuperSignal (Pierce).
- Mighty Small. Gel electrophoresis unit (Hoefer).
- TE 70 Semiphor. Semi-dry transfer unit (Hoefer).

#### III.6.2. Soluciones.

##### Tampón de separación 4X.

1,5 M Tris pH. 8.8, 0.4% SDS.

##### Tampón de empaquetamiento 4X.

0.5 M Tris, pH. 6.8, 0.4% SDS.

##### Tampón de electroforesis.

5 mM Tris, 40 mM glicina, 0.2% SDS pH. 8.3.

##### Tampón de carga o Laemmli.

3% SDS, 50 mM Tris pH. 6.8, 10% glicerol, 0.003% azul de bromofenol, 5% β-mercaptoetanol.

##### Solución de teñir.

45% metanol, 9.2% ácido acético, 5% azul brillante de Coomassie.

##### Solución de desteñir.

20% metanol, 7.5% ácido acético.

##### Gel de empaquetamiento.

3.8% Acrilamida, 0.1% Bisacrilamida, 125 mM Tris pH. 6.8, 0.1% SDS, 0.05% Persulfato amónico, 0.05% TEMED.

##### Gel de separación.

12% Acrilamida, 0.32% Bisacrilamida, 125 mM Tris pH. 8.8, 0.1% SDS, 0.05% persulfato amónico, 0.05% TEMED.

Tampón de transferencia semiseca.

20% metanol, 38 mM glicina, 47.8 mM Tris.

Tampón de lavados TNA-Tween.

0.15 M NaCl, 10 mM Tris, pH. 7.4, 0.1% (v/v) Tween 20.

Tampón de limpieza.

150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH. 2.3.

**III.6.3. Electroforesis de proteínas.**

Las muestras se resuspenden en tampón de carga, se hierven 5 minutos y se separan en un gel 12% SDS-PAGE. Realizamos la electroforesis a 15 mA y tras entrar la muestra en el gel de separación aumentamos el amperaje a 30 mA [Laemmli (1970)].

**III.6.4. Inmunotransferencia y Western-Blot.**

La transferencia semiseca se llevó a cabo en una unidad Semiphor de Hoefer usando el tampón de transferencia descrito en el apartado III.5.2. La transferencia se realizó a un amperaje constante determinado en cada caso por el producto del área de la membrana a transferir por 0.8.

La detección de las proteínas objeto de estudio se llevó a cabo por el siguiente procedimiento:

- Bloqueo de la membrana durante 1 hora a temperatura ambiente con 1% BSA en solución TNA-Tween.
- Incubación durante 1 hora a T<sup>a</sup> ambiente con el anticuerpo indicado en cada caso diluido en la solución de bloqueo.
- 3 lavados de 5 minutos con TNA-Tween.
- Incubación con un segundo anticuerpo frente a IgG de ratón (1/7500) o de conejo (1/7500), según el caso, conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) durante 1 hora a T<sup>a</sup> ambiente preparados en solución de bloqueo.
- 3 lavados de 5 minutos con TNA-Tween.

Revelado mediante quimioluminiscencia con el reactivo ECL o SuperSignal.

**III.6.5. Estudio de proteínas fosforiladas en tirosina.**

Para ello se han utilizado diferentes anticuerpos antifosfotirosina:

- 1/2500 del anticuerpo recombinante RC20H (Transduction Laboratories). Este anticuerpo está directamente conjugado con HRP. Tras la incubación se lava la membrana 3 veces en TNA-T y se revela directamente con el método ECL.
- 1/20000 del anticuerpo recombinante PY-Plus (Zymed). Este anticuerpo está igualmente directamente conjugado a HRP. Tras la incubación se lava la membrana 3 veces en TNA-T y se revela directamente con el método SuperSignal.

### **III.6.6. Reincubación de las membranas.**

Para poder incubar la misma membrana con un nuevo anticuerpo y realizar así un Western-blot frente a otra proteína es necesario eliminar el anticuerpo previamente unido. Para ello se utiliza el tampón de limpieza que debido a su bajo pH. elimina el anticuerpo unido a las proteínas de la membrana pero permite que las proteínas continúen unidas a la membrana. Se lava la membrana 10 min con el tampón de limpieza a temperatura ambiente en agitación. Tras ello se lava la membrana 3 veces con TNA-T 10 min cada vez a temperatura ambiente, en agitación. Tras el proceso es necesario bloquear nuevamente la membrana antes de proceder a un nuevo Western-blot.

### **III.6.7. Tinción de geles de acrilamida con azul brillante de Coomasie.**

Sumerjimos el gel en al menos 5 volúmenes de la solución de tinción y lo dejamos en movimiento durante 1 hora a temperatura ambiente. Desteñimos el gel introduciéndolo en la solución de metanol/ácido acético y dejándolo en movimiento entre 4-8 horas, cambiando la solución de desteñir varias veces. Los geles pueden ser almacenados en agua con un 20% de glicerol y secados.

## **III.7. Estimulación celular.**

### **III.7.1. Material.**

- Anticuerpo de cabra anti-ratón y fragmentos Fab'2 de anticuerpos de cabra anti-ratón (Cappel).
- Herbimicina A (SIGMA).

### **III.7.2. Soluciones.**

RPMI 1640, 20 mM HEPES pH. 7.4, 0.1% FBS.

RPMI 1640, 20 mM HEPES pH. 7.4.

#### Tampón de lisis 1X.

20 mM HEPES, pH. 7.5, 150 mM NaCl, 50 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM EGTA, 50 μM óxido de fenilarsina, 1 μg/ml inhibidores de proteasas (antipaina, chimostatina, leupeptina y pepstatina), 1 mM PMSF, 10 mM iodoacetamida y 1% NP-40.

### **III.7.3. Activación celular.**

Las células se lavan en PBS esteril e incuban en RPMI 1640 0.1% FBS durante 4 horas a 37°C. Tras la incubación las células son lavadas en RPMI libre de suero con 20

mM HEPES pH. 7.4 y contadas. El número de células utilizadas generalmente para cada punto de estimulación es de  $20 \times 10^6$ . Las células son resuspendidas a una concentración de  $10 \times 10^6$  por cada 100  $\mu$ l en RPMI sin suero. Las células se incubaron a 37°C durante 10 min. previamente a la estimulación.

Las células Jurkat en sus distintas variantes son estimuladas mediante anticuerpos monoclonales (5  $\mu$ g/ $10^7$  células) a 37°C durante 5 min. Los anticuerpos monoclonales utilizados fueron OKT3 (anti-CD3) y OKT8 (anti-CD8), según el experimento. Si se utiliza un segundo anticuerpo de cabra anti-ratón o los fragmentos Fab'2 la concentración utilizada de los mismos es 20  $\mu$ g/ $10^7$  células. En este caso después de 2 min de estimulación con el primer anticuerpo monoclonal se añade el segundo anticuerpo y se continúa la estimulación 3 min más.

La lisis se efectúa con un tampón de lisis 2X a 4°C durante 15 min. Los lisados totales son aclarados mediante centrifugación a 13,000 g durante 15 min a 4°C.

#### **III.7.4. Pretratamiento con herbimicina A.**

Células Jurkat fueron incubadas durante 24 h a 37°C con medio RPMI 10% FBS o 3  $\mu$ M de herbimicina A. Las células fueron lavadas en PBS estéril y resuspendidas en RPMI libre de suero. Las estimulaciones se llevaron a cabo mediante el método descrito en el capítulo III.7.3.

#### **III.7.5. Tratamiento con pervanadato.**

Preparar pervanadato fresco incubando durante 15 min a temperatura ambiente una mezcla de 0.1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  y 0.1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  en PBS. Incubamos las células 20 min con pervanadato o bien realizamos un pretratamiento con pervanadato durante 2 min previamente a la estimulación con anticuerpos. El pervanadato es un potente inhibidor de las fosfatasa lo que provoca la fosforilación masiva de las proteínas. Especialmente aumenta la fosforilación en tirosina de las proteínas de los lisados celulares.

#### **III.7.6. Obtención de material insoluble en NP-40.**

Las células se activan y lisan tal y como se describe en el apartado III.7.3. Tras la lisis y centrifugación el sobrenadante es considerado "fracción soluble". Se lava el sedimento con 200  $\mu$ l de tampón de lisis. Centrifugamos a 13,000 rpm, 15 min a 4°C. Descartamos el sobrenadante y solubilizamos el sedimento añadiendo 50  $\mu$ l de la solución 20 mM Tris, pH. 8.0, 0.15 M NaCl, 2% SDS. Agitamos en vortex, procurando no formar espuma. Se calienta a 90°C durante 5 min.

Centrifugamos a través de una membrana Micropure (0.45 micras) en la centrifuga a 13,000 rpm, 1 min a temperatura ambiente. 5  $\mu$ l de la "fracción insoluble"

se mezclan con 15  $\mu$ l de tampón de carga para analizarlo por Western-Blot, el resto se diluye en 945  $\mu$ l de tampón de lisis 1X 1% NP-40 para proceder a la inmunoprecipitación.

### **III.8. Inmunoprecipitación.**

#### **III.8.1. Material.**

- BSA-Sepharose.
- Proteína A Sepharose CL-4B (Pharmacia).
- Suero normal de ratón (SIGMA).

#### **III.8.2. Soluciones.**

##### Solución A.

0.5% NP-40, 150 mM NaCl, 20 mM HEPES, pH. 7.6, 100  $\mu$ M Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>.

##### Solución B.

0.1% NP-40, 150 mM NaCl, 0.5 M LiCl, 20 mM HEPES, pH. 7.6, 100  $\mu$ M Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>.

##### Solución C

150 mM NaCl, 20 mM HEPES, pH. 7.6.

#### **III.8.3. Preparación de las muestras.**

20 X 10<sup>6</sup> de células Jurkat (en sus distintas variantes) por punto son activadas según el experimento y lisadas tal y como se describe en el apartado III.7. Una vez obtenido el lisado celular, se le hacen dos preaclaramientos mezclándolo con 20  $\mu$ l de BSA-Sepharose e incubando 1 hora a 4°C en agitación, cada vez.

Una vez preaclorado, se añade a los lisados totales de las células activadas mediante anticuerpo 20  $\mu$ l de proteína A-Sepharose. A los lisados totales de las células no estimuladas se les adiciona la misma cantidad del anticuerpo monoclonal utilizado para la estimulación y que servirá en ese momento para la inmunoprecipitación junto con 20  $\mu$ l de proteína A-Sepharose. Incubamos durante 1 hora a 4°C en agitación. Se centrifugan las muestras y se lavan del siguiente modo:

- 2X solución A.
- 2X solución B.
- 1X solución C.

Las muestras se resuspenden en tampón de carga Laemmli reductor y se procede a la electroforesis de las mismas.

En el caso de las células COS que no son activadas previamente, los lisados totales obtenidos son preaclorados dos veces mediante la adición al lisado total de 2  $\mu$ l de suero normal de ratón junto a 20  $\mu$ l de proteína A-Sepharose e incubando 1 hora a

4°C en agitación. Tras realizar los preaclaramientos se añade a los lisados totales el anticuerpo frente a la proteína que queremos inmunoprecipitar junto a 20 µl de proteína A-Sepharose y se incuba 1 hora a 4°C en agitación. Finalmente se lavan tal y como se describió anteriormente.

### III.9. Determinación *in vitro* de la actividad PI- 3 quinasa.

#### III.9.1. Material.

- L- $\alpha$ -Fosfatidilinositol (Avanti Polar Lipids). 10 mg/ml en cloroformo.
- L- $\alpha$ -Fosfatidilinositol 4,5-difosfato (SIGMA). 1 mg/ml en una solución 2:1:0.01 CHCl<sub>3</sub>:MeOH:1N HCl
- L- $\alpha$ -Fosfatidilinositol 4-monofosfato (SIGMA). 1 mg/ml en una solución 2:1 CHCl<sub>3</sub>:MeOH
- L- $\alpha$ -Fosfatidil-L-serina (SIGMA). 10 mg/ml en cloroformo
- Viales de cristal marrón y tapones de teflón tamaño 8-425 (Baxter).
- Papel sellador de teflón MIL-SPECT 27730A (Baxter).
- Placas de silica Gel 60 20x20 cm, 250 µm para cromatografía en capa fina (Fisher).
- [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] adenosin trifosfato (Amersham).

#### III.9.2. Soluciones.

##### Solución de pretratamiento de las placas de cromatografía.

1 mM EDTA, 1% oxalato de potasio, 10% metanol.

##### Tampón de sonicación.

25 mM MOPS pH. 7.0, 1mM EGTA.

##### Tampón fosfatidilinositol quinasa 5X.

125 mM MOPS pH. 7.0, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM EGTA.

##### Tampón de parada.

Metanol, 1 N HCl (1:1)

##### Tampón de resuspensión.

CHCl<sub>3</sub>, MeOH, agua (2:1:0.1)

#### III.9.3. Ensayo de actividad PI- 3 quinasa.

Se preparan los fosfolípidos (almacenados a -70°C). Después de tener los lípidos durante 5-10 min a temperatura ambiente se mezclan los lípidos en un ratio 1:1:1:1 de las soluciones base de PI:PIP:PIP<sub>2</sub>:PS. Se mezclan los lípidos en un eppendorf y se secan bajo N<sub>2</sub>. Se le añade tampón de sonicación a una concentración de 1 mg/ml (10 ml por ensayo) y se sonica durante 15-20 min utilizando la máxima intensidad.

Se mezclan 0.001  $\mu\text{M}$  de ATP frio con 25  $\mu\text{Ci}$  de  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  por cada ensayo. La concentración de ATP frio final en el ensayo será de 150  $\mu\text{M}$  y el volumen de ATP 5  $\mu\text{l}$ .

Las muestras de inmunoprecipitados se lavan previamente al ensayo:

- 2X PBS.
- 2X Solución 10 mM LiCl.
- 2X PBS.

Sobre las muestras de inmunoprecipitados de lisados de células Jurkat se añade la mezcla de fosfolípidos y el tampón a temperatura ambiente. La mezcla de ATP se añade para iniciar la reacción que se lleva a cabo a 37°C durante 20 min. Se agitan las muestras suavemente con la mano cada 5-10 min.

Mezcla de reacción:

Fosfolípidos	10 $\mu\text{l}$
Tampón de reacción 5X	10 $\mu\text{l}$
Mezcla de ATP	5 $\mu\text{l}$

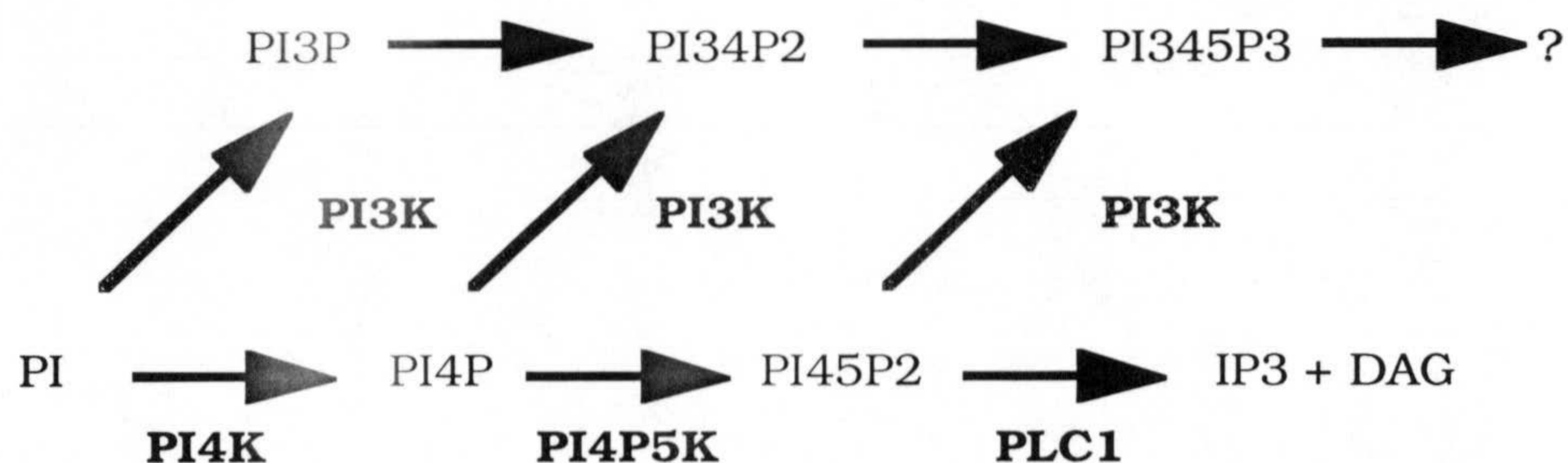
#### III.9.4. Extracción de fosfolípidos y análisis de los productos.

Se para la reacción con 100  $\mu\text{l}$  de la reacción de parada. Se extrae la fase acuosa tras añadir 110  $\mu\text{l}$  de cloroformo y dar una pequeña agitación. Repetir este paso una segunda vez. La fase orgánica se seca entonces bajo  $\text{N}_2$  y se resuspende en 15  $\mu\text{l}$  de la mezcla de resuspensión.

Las placas de cromatografía en capa fina pretratadas con 1% de oxalato de potasio y 10% MeOH deben haber sido secadas durante 1-2 horas al aire y a 100 °C en un horno durante 2-4 horas. Tratadas de este modo pueden ser almacenadas y recalentadas durante 20-30 min. a 110°C antes de su uso.

Las muestras se cargan sobre la placa de cromatografía en capa fina y se corre en un tanque con agua: HOAc glacial: n-propanol (34:1:65) durante 5-18 horas.

Una vez corrida la placa se expone en una película y revela la misma. En la misma y por este orden veremos un punto correspondiente al fosfatidilinositol monofosfato, fosfatidilinositol difosfato, fosfatidilinositol trifosfato,  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  y suciedad. Cuantificaremos el fosfatidilinositol trifosfato. Con la ayuda de una hoja de transparencias situada sobre la película revelada realizamos una plantilla que situa los puntos donde se encuentran el fosfatidilinositol trifosfato y el tamaño de los mismos. Con la plantilla cortaremos dichos puntos en la placa de cromatografía en capa fina. La radioactividad incorporada al fosfatidilinositol trifosfato se determina mediante análisis por centelleo líquido.



### III.10. Ensayo de unión a GTP.

#### III.10.1. Material.

- Membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad).
- GTP [ $\alpha^{32}\text{P}$ ] (Amersham).

#### III.10.2. Soluciones.

##### Tampón de unión a GTP.

50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.5, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM DTT, 0,2% Tween 20, 4  $\mu\text{M}$  ATP.

#### III.10.3. Ensayo de unión a GTP.

Transferimos el gel SDS-PAGE a una membrana de nitrocelulosa. Incubamos la membrana 30 min en el tampón de unión a GTP. Incubamos durante 2 horas la membrana con 50 ml de tampón de unión a GTP con 5  $\mu\text{l}$  de GTP [ $\alpha^{32}\text{P}$ ] a 10 mCi/ml. Lavamos la membrana durante 1 hora haciendo varios cambios del tampón de unión a GTP. Dejamos secar al aire. Visualizamos por autoradiografía exponiendo en películas Kodak Xomat y una pantalla intensificadora.

#### III.10.4. Western-Blot despues del ensayo de unión a GTP.

Para eluir el GTP [ $\alpha^{32}\text{P}$ ] incubamos la membrana con 3% tricloroacético durante 3 min. Tras este paso bloqueamos la membrana tal y como se describe en el capítulo III.6.4. y procedemos a realizar el Western-Blot.

### III.11. Purificación y aislamiento de ADN plasmídico.

#### III.11.1. Material.

- Quiagen Plasmid Maxi Kit (Quiagen).
- Triptona, extracto de levadura (DIFCO).
- Agarosa, bromuro de etidio (SIGMA).



- ADN Marcadores de peso molecular. Lambda ADN digerido con HindIII (Böehringer Mannheim).
- Azul de bromofenol, xileno cianol, sacarosa (Amresco).

### **III.11.2. Soluciones.**

#### Tampón TE 1X.

10 mM Tris-HCl pH. 7.4, 1 mM EDTA. Autoclavado.

#### Medio LB Luria- Bertaini.

10 g/l triptona, 5 g/l extracto de levadura, 5 g/l NaCl pH. 7.5. Autoclavado.

#### Bromuro de etidio 10 mg/ml.

#### TBE 10X.

1 M Tris, 1 M ácido bórico, 20 mM EDTA, pH. 8

#### Tampón de carga.

25% azul de bromofenol, 25% xileno cianol, 40% sacarosa.

### **III.11.3. Protocolo de purificación de ADN plasmídico.**

Se utiliza el Kit de purificación Quiagen. El protocolo de purificación está basado en una modificación del método de lisis alcalina de Birnboim y Doly [Birnboim and Doly (1979)], seguido de la unión del ADN plasmídico a las resinas de intercambio aniónico Quiagen bajo condiciones apropiadas de baja salinidad y pH. El procedimiento utilizado es el siguiente:

Partimos de 100-250 ml de cultivo bacteriano en medio LB. Centrifugamos y resuspendemos el pellet en 10 ml del Tampón 1 (50 mM Trs.HCl, pH. 8.0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNAsa A). Las bacterias son lisadas con 10 ml de Tampón 2 (200 mM NaOH, 1% SDS). El SDS solubiliza los fosfolípidos y componentes protéicos de la membrana, dando lugar a la lisis del contenido celular. El NaOH desnaturaliza el ADN cromosómico y plasmídico, así como las proteínas. El tiempo de lisis (5 min) permite máxima liberación del ADN plasmídico sin liberación del cromosómico. La lisis se neutraliza con la adición de 10 ml del Tampón 3 (3 M acetato de potasio, pH. 5.5) a 4°C durante 20 min. La alta concentración de sal hace precipitar al SDS y las proteínas, el DNA cromosómico y la suciedad quedan atrapados en los complejos de sal y detergente. Se centrifuga 30 min. a 20,000 g a 4°C. El lisado aclarado por la centrifugación se carga en una columna Quiagen pre-equilibrada dejando que pase por gravedad. La columna es lavada con 60 ml del tampón QC (1 M NaCl, 50 mM MOPS, pH. 7.0, 15% etanol). Este tampón evita las interacciones no específicas y permite la eliminación de proteínas que se asocian a ácidos nucleicos sin el uso del fenol. El plásmido se eluye con el tampón QF (1.25 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.5, 15% etanol). El plásmido eluido es desalado y concentrado mediante una precipitación con

isopropanol. Tras la centrifugación el sedimento es lavado con 70% etanol que quita la sal residual y reemplaza el isopropanol por etanol que es volátil y fácilmente eliminable. El ADN es resuspendido en tampón TE.

La concentración y el grado de contaminación protéica del ADN obtenido se calcula tras medir su absorbancia a 260 y 280 nm siguiendo la fórmula:

$$\mu\text{g de ADN/ml} = \text{D. O. } 260 \text{ nm} \times \text{Factor de dilución} \times 50$$

Donde 50 es un factor de corrección introducido ya que una unidad de densidad óptica con una luz incidente de 260 nm es el valor de la absorbancia que tienen 50  $\mu\text{g}$  de ADN/ml. El cociente D.O. 260/D.O. 280 se utiliza para determinar el grado de contaminación protéica, considerando valores adecuados los comprendidos entre 1.65 y 2. Valores inferiores a los señalados indican contaminación protéica o con solventes orgánicos. Valores superiores indican un exceso de ARN.

#### **III.11.4. Análisis del ADN plásmidico.**

Los plásmidos aislados se separan por tamaño molecular mediante electroforesis en tampón TBE 1X en geles horizontales de agarosa. La agarosa se dispersa en agua fría antes de disolverla por ebullición. La mezcla se deja enfriar hasta unos 60°C, añadiendo posteriormente 0.5  $\mu\text{g/ml}$  de bromuro de etidio. Se pasa la mezcla a un molde y se permite que solidifique a temperatura ambiente. 1  $\mu\text{l}$  de cada plásmido aislado se mezclan con 1  $\mu\text{l}$  de tampón de carga y se cargan en los pocillos del gel. Un pocillo de cada gel se reserva para correr en paralelo a las muestras a analizar los marcadores de tamaño. La electroforesis se realiza con una diferencia de potencial constante de 40-50 voltios durante 2-3 horas. Para monitorizar la migración del ADN las muestras están incluidas en un tampón de carga con dos colorantes. La visualización del ADN se realiza con luz ultravioleta (366nm) en un transiluminador y se obtiene un registro fotográfico con un sistema Polaroid 665 o con el sistema Gelprinter (TDI).

#### **III.11.5. Digestión mediante enzimas de restricción.**

2  $\mu\text{l}$  de cada producto aislado se digiere con 2 unidades de la endonucleasa de restricción apropiada (Boehringer Mannheim). Una unidad se define teóricamente como la cantidad de enzima necesaria para digerir totalmente 1  $\mu\text{g}$  de ADN en una hora a la temperatura óptima de incubación. Tras digerir el ADN durante 1 hora, se detiene la reacción añadiendo 1/10 de volumen de tampón de carga y se procede a su análisis mediante un gel de agarosa tal y como se describe en III.10.4.

### III.12. Transformación de bacterias.

#### III.12.1. Soluciones.

0.1 M MgCl<sub>2</sub>

0.1 M CaCl<sub>2</sub>

TE y LB (ver III.10.2).

Placas de LB.

Añadir 15 g/l de agar por litro de LB (ver III.10.2). Se esteriliza en autoclave. Se deja enfriar a 45°C y se añade a las placas de 240 mm. Permitimos que el agar solidifique dejándolas 2 días a temperatura ambiente y luego se almacenan a 4°C. Las placas pueden prepararse igualmente añadiéndole algún antibiótico como agente selector.

#### III.12.2. Protocolo para hacer competentes las bacterias.

Se inocula una colonia en 3 ml de LB y dejamos crecer toda la noche a 37°C en agitación. Diluimos 1:200 en medio LB y dejamos en agitación a 37°C hasta que la D.O. 590 nm sea de 0.375. Se enfrían en hielo 15 min. Se centrifugan a 3000 rpm, 7 min a 4°C. Resuspendemos el sedimento en 8 ml de 0.1 M MgCl<sub>2</sub> y se dejan a 4°C 15-20 min. Se centrifugan a 3000 rpm, 7 min a 4°C. Se resuspende el sedimento en 0.8 ml de 0.1 M CaCl<sub>2</sub> y se deja a 4°C durante 1 hora. Para almacenarlos se añade glicerol en la suspensión bacteriana hasta una concentración final de 15%. Se guarda a -80°C.

#### III.12.3. Transformación de las bacterias.

Se toman 100 µl de bacterias competentes y se añade 1 µl de plásmido (1 µg/µl) y 60 µl de TE 1X. Se dejan a 4°C durante 1 hora. Se les produce un choque térmico calentando la mezcla a 42°C 45 sg. Se pone la mezcla 2 min a 4°C. Añadimos 0.9 ml de LB e incubamos a 37°C, 1 hora y se alicuota en placas de LB agar con el antibiótico selector. Se incuba toda la noche en un incubador a 37°C.

### III.13. Transfección en células de mamífero.

#### III.13.1. Material.

- DEAE-Dextrano, cloroquina (Promega).
- NU-Serum (Collaborative Research Inc).

#### III.13.2. Soluciones.

PBS 1X.

137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

PBS, 10% DMSO.

PBS, 10 mg/ml DEAE-Dextrano, 2.5 mM cloroquina.

DMEM, 10% NU-Serum, 1 mM glutamina.

### **III.13.3. Transfección en células de mamífero.**

Se prepara una mezcla de reacción de 5 ml de DMEM 10% NU-Serum junto con 200 µl de la solución PBS-DEAE-Dextrano-cloroquina por cada punto. A cada punto se le adiciona el plásmido correspondiente. Las placas de células COS en crecimiento se lavan con PBS esteril para eliminar los restos de FBS que pueden hacer precipitar el plásmido. Se añade a las placas debidamente rotuladas la mezcla DMEM-DEAE-Dextrano-plásmido. y se incuba a 37°C en el incubador durante 3 horas y media.

Pasado el periodo de incubación se aspira la mezcla y se añade 5 ml de PBS 10% DMSO durante 2 min. Se lavan las células 2 veces con PBS y se añade el medio de cultivo habitual DMEM, 10% FBS. Se mantienen en cultivo de 2-3 días, tiempo en el cual la proteína codificada en el plásmido introducido se expresará. Cuando la proteína transfectada es una proteína de membrana se puede verificar su expresión mediante citometría de flujo. En caso de tratarse de una proteína intracelular se procede a su verificación mediante Western-blot.

### **III.14. Detección de antígenos mediante citometría de flujo.**

#### **III.14.1. Material.**

- FACS-Scan (Benton Dickinson).
- Anti-Ig de ratón conjugado con fluoresceina (DAKO).
- Paraformaldehido, glutaraldehido (SIGMA).

#### **III.14.2. Soluciones.**

##### Tampón de fijación.

4% paraformaldehido, 0.1 M fosfato sódico pH. 7.3.

##### Solución de lavado.

PBS, 0.1% BSA, 0.1% azida sódica.

#### **III.14.3. Análisis de la expresión de antígenos en superficie.**

Se lavan  $2 \times 10^5$  células con PBS y se resuspenden en 100 µl de la solución de lavado. Se añade el anticuerpo frente a la molécula que queremos detectar en la concentración adecuada y se incuba 15 min a 4°C. Se lavan las células con la solución de lavado para eliminar el anticuerpo no ligado a su antígeno correspondiente y se vuelve a incubar 15 min a 4°C con un segundo anticuerpo frente a Ig de ratón

conjugado con fluoresceína y preparado en la solución de lavado. Finalizada esta segunda incubación, se lavan de nuevo con la solución de lavado, se resuspenden en 200  $\mu$ l de la solución de lavado y se analiza la fluorescencia emitida tras excitación con un láser de argón de longitud de onda 488 nm en el citómetro de flujo.

### **III.15. Estudios de señal de transducción en linfocitos T periféricos de ratón CD3- $\zeta$ / $\eta$ <sup>null</sup> y wild type.**

#### **III.15.1. Ratones.**

Los ratones CD3- $\zeta$ / $\eta$ <sup>null</sup> (ZKO) fueron criados en las facilidades para el cuidado de animales del Beth Israel Deaconnes Medical Center, Boston, MA, con backgrounds C57BL/6 x 129/Sv. Ratones control c57BL/6NTacfBr y 129/SvEvTacfBR fueron adquiridos en Taconic Laboratory (Germantown, NY).

#### **III.15.2. Anticuerpos .**

- Anti-mouse B220 (CD45R) unido a microbeads (Miltenyi).
- Biotin anti-mouse CD11b (Integrin  $\alpha$ m chain) (Pharmigen).
- Biotin anti-mouse Ly-6G (Gr-1) (Pharmigen).
- Anti-mouse CD4 FITC (Pharmigen).
- Anti-mouse CD8 $\alpha$  (Pharmigen).
- Anti-mouse CD3  $\epsilon$  (2C11) (Pharmigen).
- IgG de cabra anti-hamster purificado por afinidad (Cappel).
- Rojo-670 conjugado con estreptavidina (Gibco).

#### **III.15.3. Material.**

- Tampón de lisis de células rojas (SIGMA).
- Separador de células mediante el sistema de alto gradiente magnético (Miltenyi Biotec)

#### **III.15.4. Aislamiento y purificación celular.**

Suspensiones celulares de bazo y nódulos linfáticos se preparan en medio DMEM suplementado con 1 mM L-glutamina, 60  $\mu$ g/ml gentamicina, 1000 unidades internacionales de penicilina-estreptomomicina y 10% FBS. Se agrupan las células de bazo y nódulos linfáticos de 10 ratones de cada tipo y se utiliza el tampón de lisis de células rojas sanguíneas (SIGMA) para lisar los eritrocitos y así eliminarlos de la suspensión. La suspensión se incubó con los anticuerpos monoclonales y biotinilados anti-CD11b y anti-Ly-6G, a 10  $\mu$ g/ $10^7$  células en medio DMEM 15 min a 4°. Tras la incubación las células se lavan en PBS. Las células se incuban con una solución de

estreptavidina microbeads y anticuerpo monoclonal anti-B220 conjugado con microbeads, a  $10 \mu\text{g}/10^7$  células en medio DMEM 15 min a  $4^\circ$ . Se realiza un nuevo lavado con PBS. Los linfocitos T se purifican por depleción de células B, monocitos y granulocitos mediante el paso de la solución por un sistema separador de células de alto gradiente magnético.

Una muestra de cada grupo de células purificadas se tiñe con los anticuerpos monoclonales anti-CD4 FITC y anti-CD8a PE y la pureza de las células se mide por análisis de citometría de flujo.

#### **IV. RESULTADOS**

#### **IV.1. Estudio de la interacción entre la subunidad p85 de la PI 3-quinasa y la cadena CD3-ε del receptor TCR/CD3 en células Jurkat y Jurkat CD8-ε.**

##### **IV.1.1. En células Jurkat la estimulación del TCR/CD3 induce la asociación de la subunidad p85α de la PI 3-quinasa a CD3-ε fosforilada.**

Se ha descrito la asociación *in vitro* de la PI 3-quinasa al ITAM (motivo de activación de inmunoreceptores basado en tirosina) de la cadena CD3-ζ más cercano a la membrana (ζ<sub>A</sub>-ITAM) [Exley et al. (1994)]. La máxima actividad PI 3-quinasa asociada al ζ<sub>A</sub>-ITAM se observa tras la estimulación del TCR/CD3. Queríamos conocer si esta afirmación era extensible a la cadena polipeptídica CD3-ε, es decir, si la transducción de señales a través de CD3-ε tras la estimulación del TCR/CD3 requiere la asociación de la PI 3-quinasa.

Utilizamos la línea celular T leucémica Jurkat para realizar una primera aproximación. Las células fueron estimuladas con anticuerpo monoclonal anti-CD3, OKT3 o mediante el uso de pervanadato. El pervanadato es un fuerte inhibidor de las tirosina fosfatasas [O'Shea et al. (1992)]. Se ha descrito que el tratamiento de células Jurkat con pervanadato induce rápidamente una serie de procesos similares a los desencadenados tras la estimulación del TCR/CD3, como la inducción de la actividad de las quinasas Fyn y Lck. El tratamiento con pervanadato inhibe significativamente la actividad de la tirosina fosfatasa CD45 aunque no actúa sobre esta proteína exclusivamente [Secrist et al. (1993)].

Los lisados celulares fueron inmunoprecipitados con OKT3. La cadena CD3-ε no se encontraba fosforilada en tirosina basalmente (Fig. 1A, carril 3). Tras la estimulación con OKT3 se producía la fosforilación en tirosina (Fig. 1A, carril 4), alcanzando un mayor nivel de fosforilación de CD3-ε tras el tratamiento con pervanadato (Fig. 1A, carril 6) y el máximo nivel cuando se pretrataban las células con pervanadato seguido de una estimulación con OKT3 (Fig. 1A, carril 5).

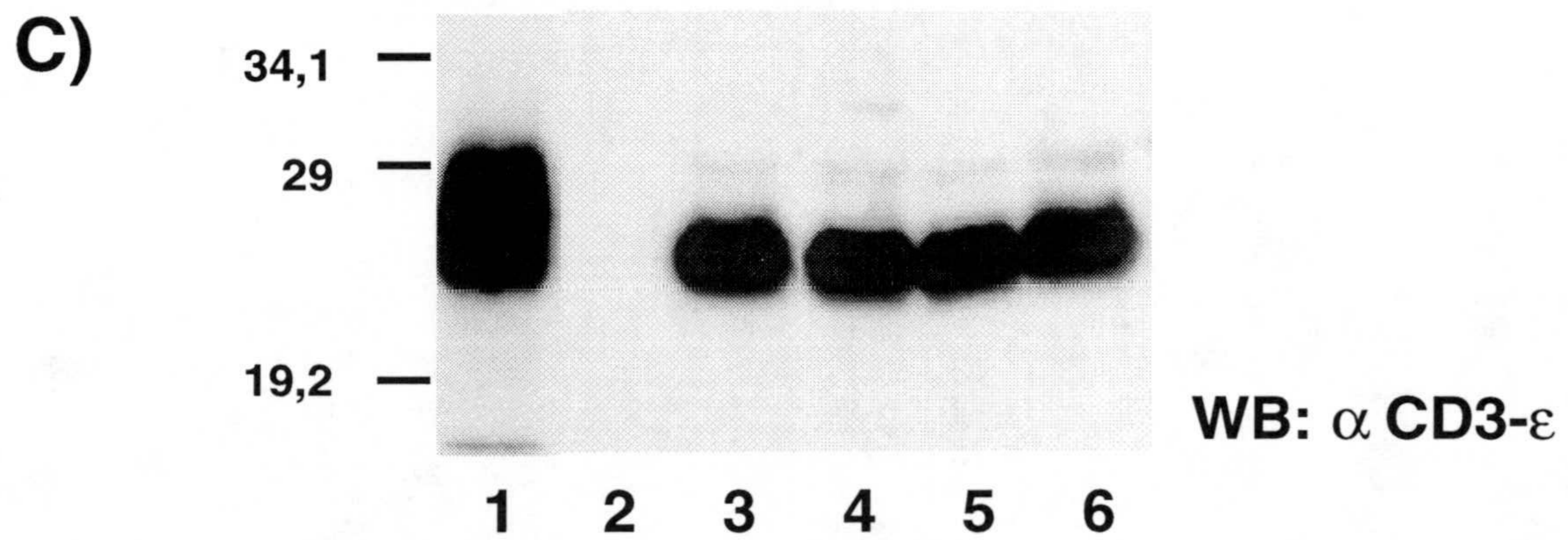
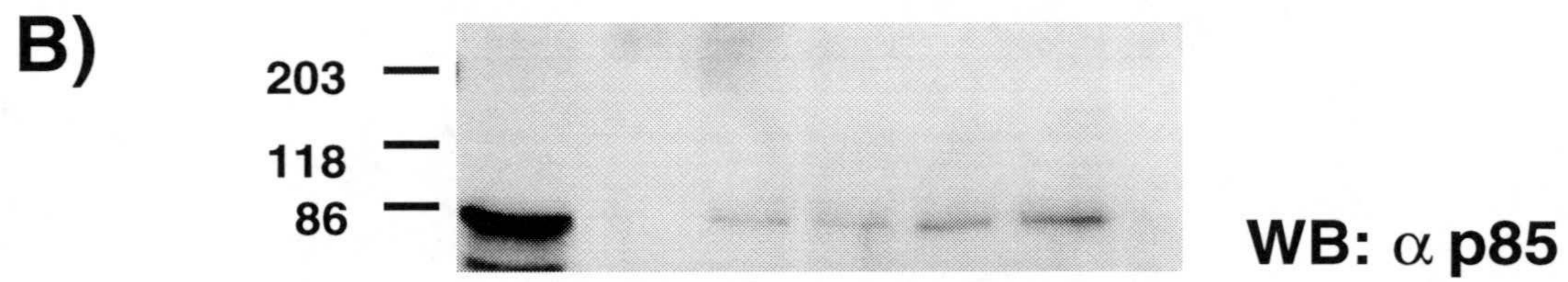
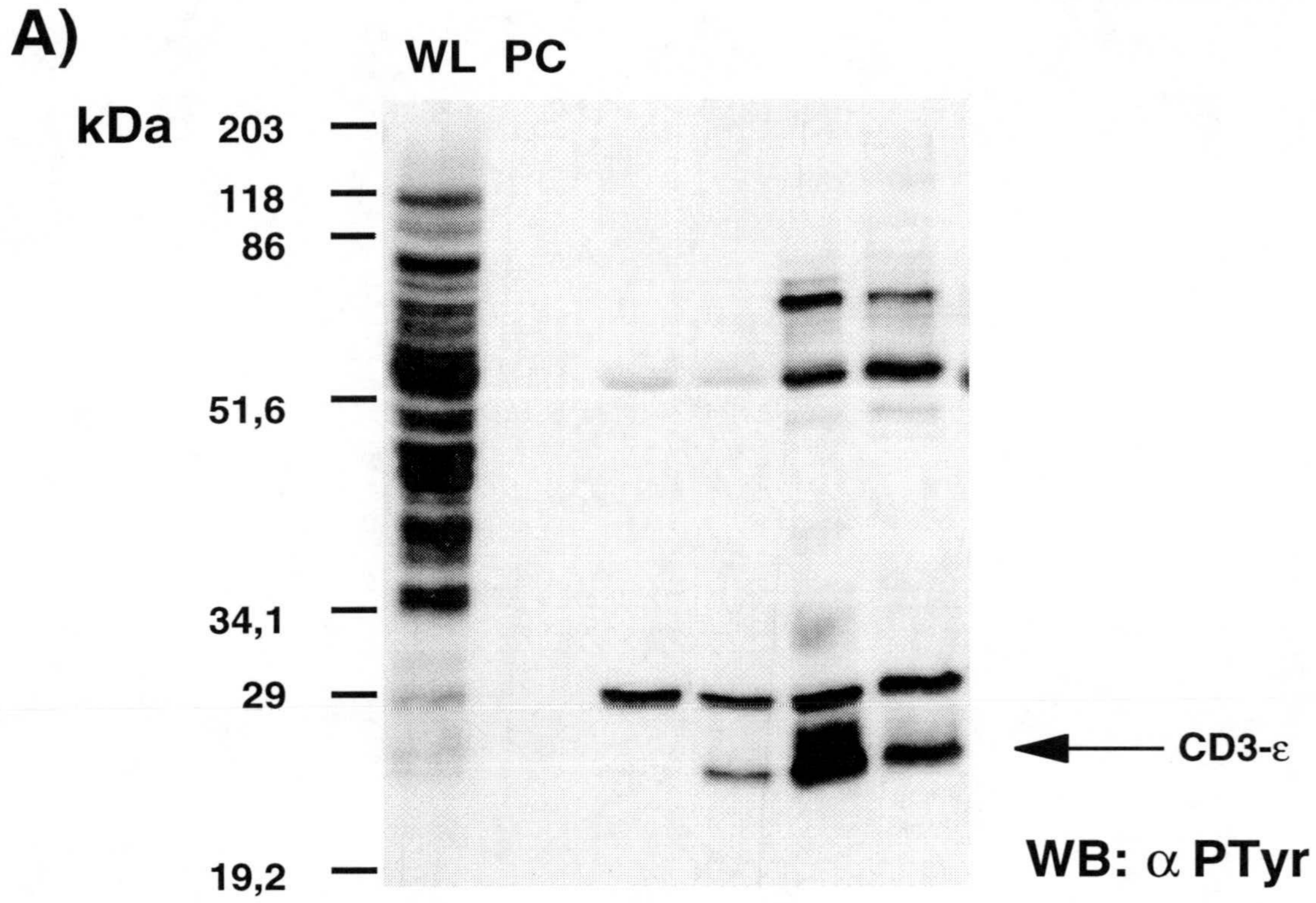
Realizamos sobre la membrana un nuevo Western-Blot anti-p85α para intentar detectar la presencia de la subunidad p85α de la PI 3-quinasa asociada a los inmunoprecipitados de CD3-ε. La subunidad p85α de la PI 3-quinasa se detectaba débilmente unida a los inmunoprecipitados con OKT3 de las células Jurkat no estimuladas o estimuladas sólo con OKT3 (Fig. 1B, carriles 3 y 4). La asociación aumentaba en los inmunoprecipitados de CD3-ε de células estimuladas con pervanadato más OKT3 o pervanadato sólo (Fig. 1B, carriles 5 y 6 respectivamente). Esto, pone de manifiesto que existe una asociación entre la subunidad p85α de la PI 3-quinasa y la cadena CD3-ε del receptor TCR/CD3. Esta asociación aumenta tras la estimulación del complejo TCR/CD3 o mediante la inhibición específica de las



tirosina fosfatasas con pervanadato. Sin embargo no podemos afirmar que ninguna de las otras cadenas del TCR/CD3 no jueguen un papel en esta asociación, ya que dependiendo del detergente y el protocolo utilizado para la lisis de las células las otras cadenas CD3 co-inmunoprecipitan con CD3- $\epsilon$  [Manolios et al. (1991)].

*Figura 1. Detección de la subunidad p85 $\alpha$  de la PI 3-quinasa en inmunoprecipitados de CD3- $\epsilon$  en células Jurkat estimuladas con OKT3 y/o pervanadato. 20 X 10<sup>6</sup> de células por punto fueron estimuladas 5 min a 37°C con 5  $\mu$ g/10<sup>7</sup> cels de OKT3 (carriles 4 y 5), 2 min con pervanadato (carriles 5 y 6) o no estimuladas (carril 3). Las células fueron lisadas en tampón de lisis 1% NP-40. Los lisados celulares (WL, carril 1) fueron preaclerados con BSA-Sepharose (PC, carril 2) e inmunoprecipitados con 5  $\mu$ g/10<sup>7</sup> cels de OKT3 (carriles 3 al 6). Las proteínas fueron separadas mediante un gel SDS-PAGE 12,5%, transferidas a una membrana de PVDF y realizado un Western Blot con: A) anti-fosfotirosina RC20. B) anti-p85 $\alpha$  PI 3-quinasa pAb. C) anti-CD3- $\epsilon$  pAb. Las bandas fueron visualizadas mediante el método de ECL.*

					<b>Estimulación</b>
		-	+	+	-
					<b>OKT3</b>
		-	-	+	+
					<b>Pervanadato</b>



**IV.1.2. En células Jurkat CD8-ε la estimulación del TCR/CD3 o de CD8-ε induce la asociación de la subunidad p85α de la PI 3-quinasa a CD3-ε y CD8-ε fosforilados.**

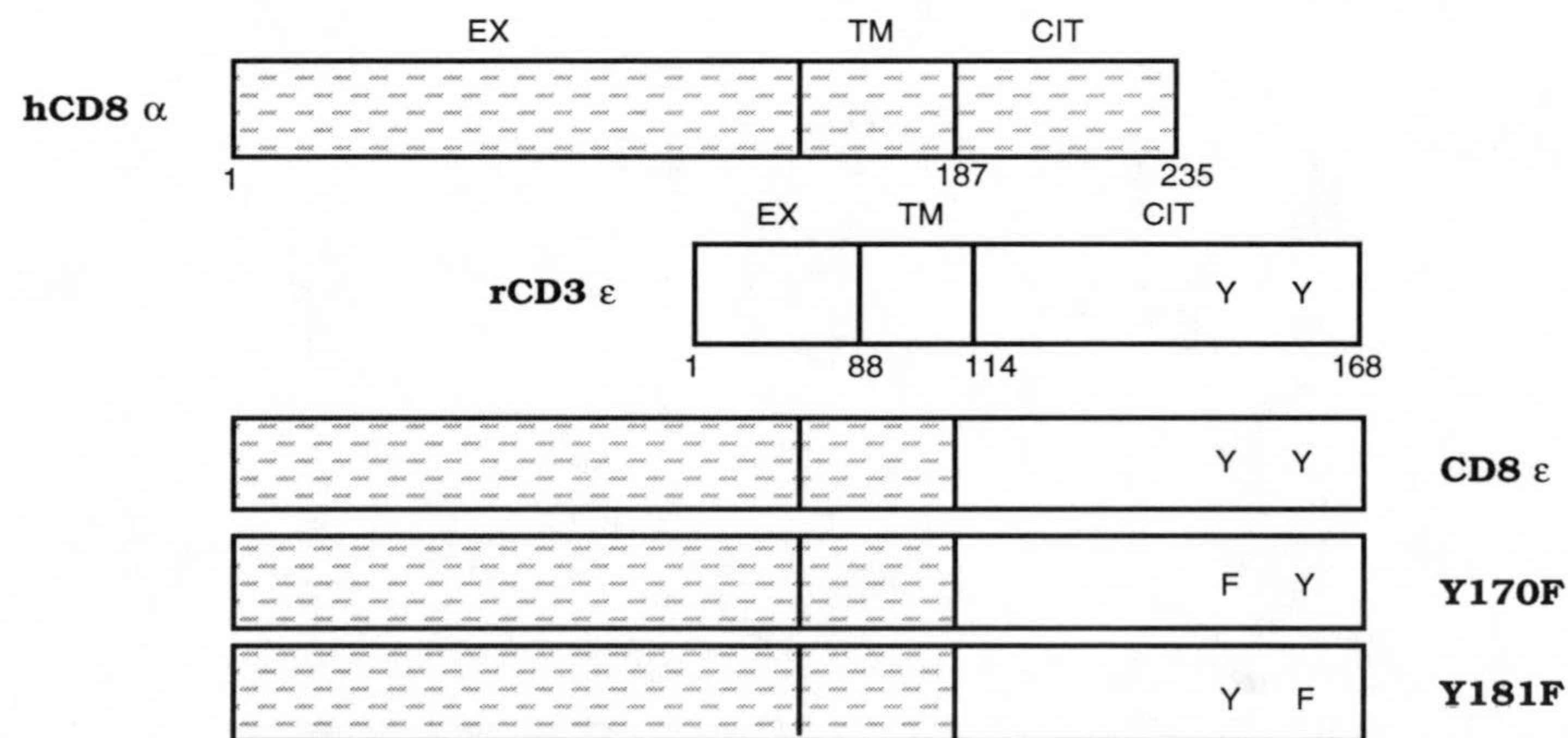
Se construyó una quimera compuesta del dominio extracelular y transmembrana de CD8 y el dominio intracitoplasmático de CD3-ε (denominada CD8-ε), para determinar *in vivo* si el dominio intracelular de la cadena CD3-ε era capaz de asociar la PI 3-quinasa independientemente de la presencia de otras cadenas del TCR/CD3 (ver Tabla 1). La quimera CD8-ε fue transfectada establemente en la línea celular Jurkat, que expresaba el complejo TCR/CD3. La presencia de la quimera CD8-ε así como el complejo TCR/CD3 en la membrana celular fue detectada mediante citometría de flujo (Fig. 2).

Las células fueron estimuladas con el anticuerpo monoclonal anti-CD8, OKT8 o con el anticuerpo monoclonal anti-CD3, OKT3 sólomente o con un segundo anticuerpo contra inmunoglobulinas de ratón (GαmIg). En estas células el patrón de proteínas fosforiladas en tirosina tras la estimulación mediante OKT8 era similar aunque ligeramente más débil que el inducido por la estimulación del TCR mediante el OKT3 (Fig. 3, comparar carriles 3 y 5 y carriles 4 y 6).

**A)**

114	168	
		<b>rCD3-ε</b>
		<b>Y170F</b>
		<b>Y181F</b>

**B)**



**Tabla 1. Estructuras de las quimeras CD8-ε.** A) La secuencia de la región citoplasmática de CD3-ε así como de las dos moléculas trucadas Y170F e Y181F están representadas mediante el código de aminoácidos de una sólo letra. B) Construcción de las quimeras CD8-ε, Y170F e Y181F. Las quimeras fueron construídas uniendo el cDNA del segmento que codifica las regiones

extracelular y transmembrana de CD8 y las secuencias de la región citoplasmática de CD8-ε, Y170F e Y181F. Las tirosinas del ITAM de CD3-ε así como las mutaciones realizadas están indicadas.

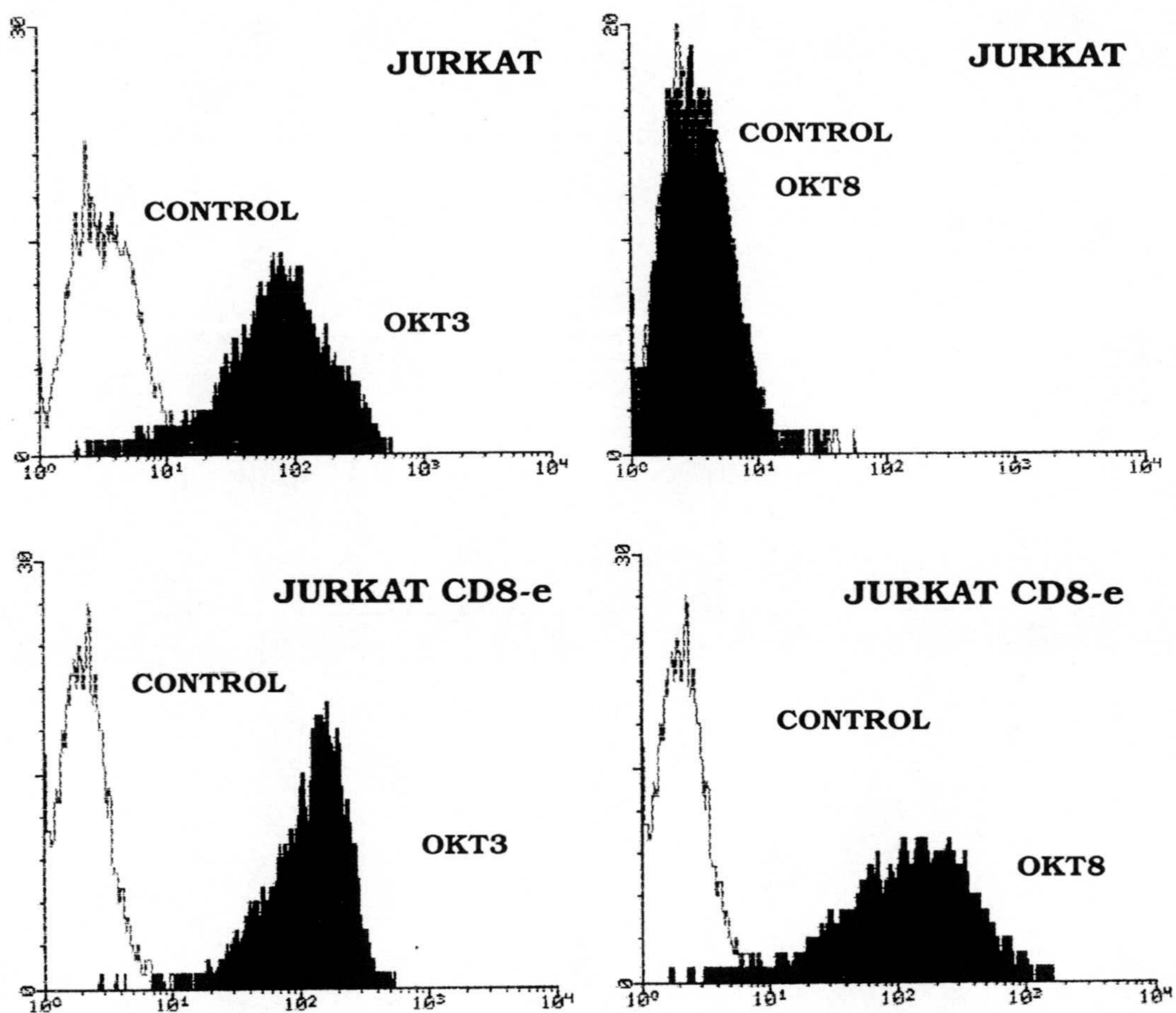
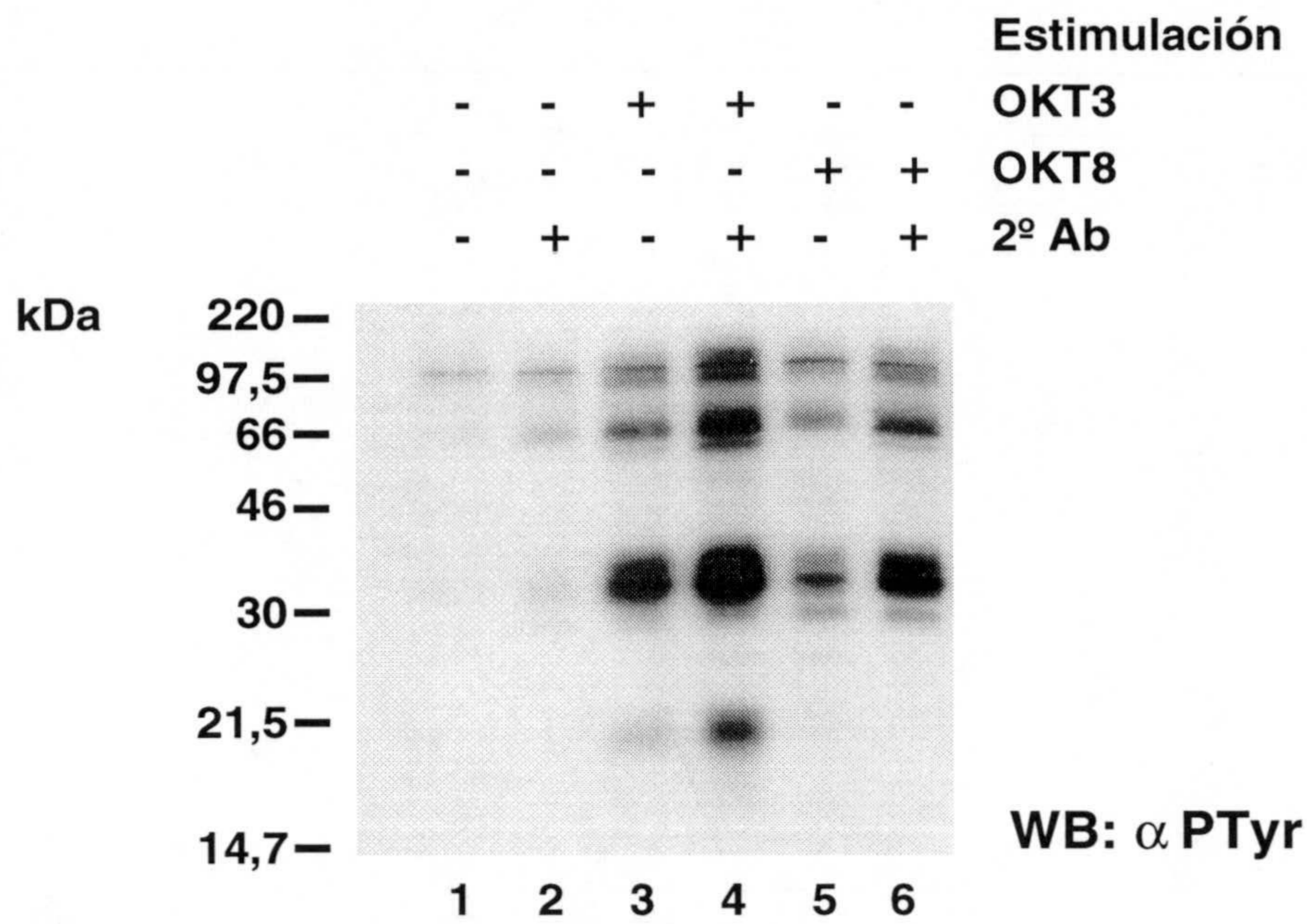


Figura. 2. Análisis fenotípico de las células Jurkat y Jurkat CD8-ε. Las células fueron examinadas para establecer la expresión en la superficie celular del TCR/CD3 y CD8. Las células fueron marcadas mediante anticuerpos monoclonales anti-CD3 (OKT3) o anti-CD8 (OKT8) seguidos de un anticuerpo secundario de conejo anti-ratón unido a FITC (RαmIg-FITC). Los controles negativos fueron teñidos sólo con el RαmIg-FITC. Los datos de citometría de flujo están presentados como el logaritmo de la intensidad de fluorescencia.

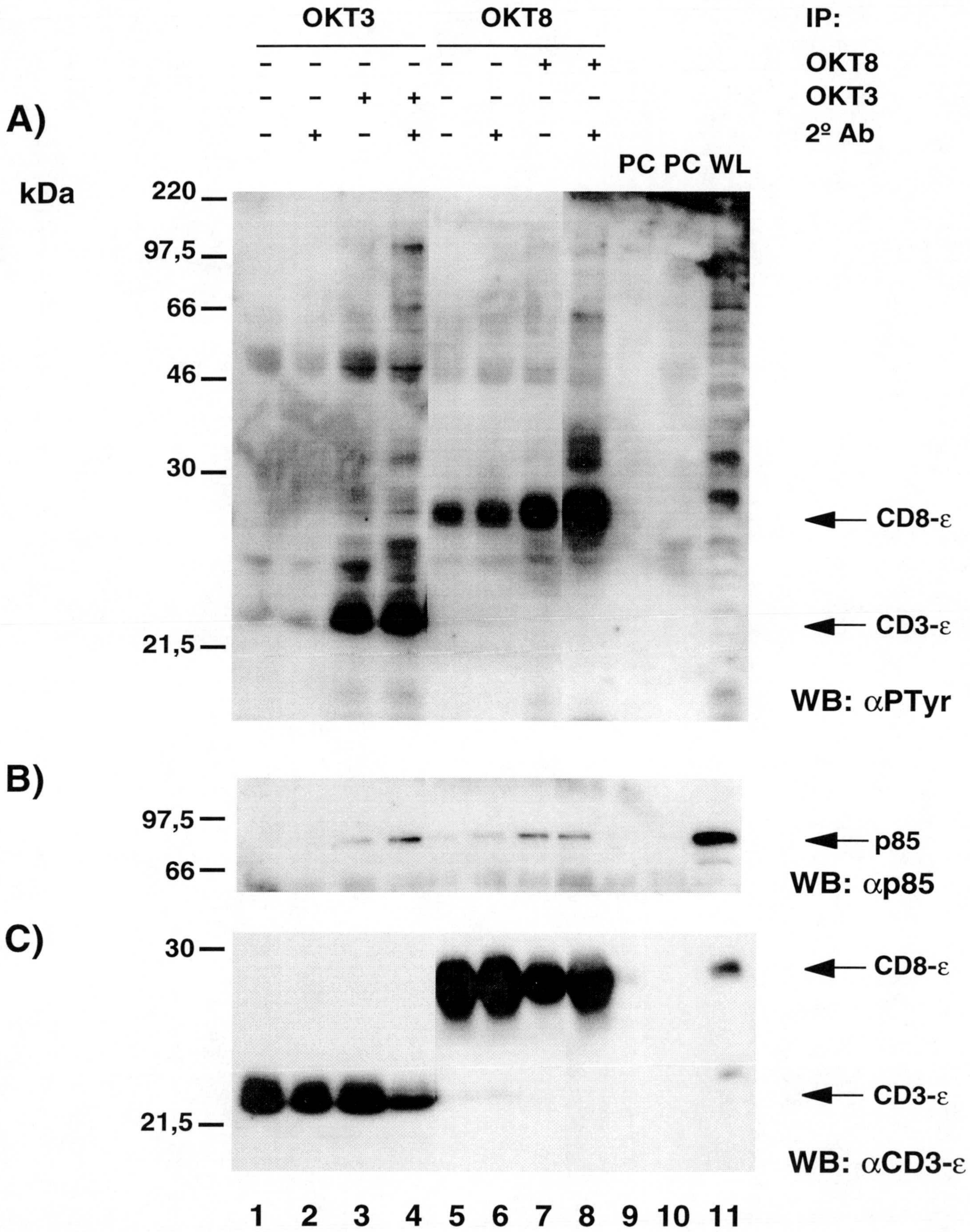
Los lisados totales fueron inmunoprecipitados con OKT3 u OKT8. La fosforilación en tirosina basal de la quimera CD8- $\epsilon$  en células no estimuladas o estimuladas con G $\alpha$ mIg (Fig. 4A, carriles 5 y 6) era superior a la fosforilación en tirosina basal de la cadena CD3- $\epsilon$  endógena observada en los mismos puntos (Fig. 4A, carriles 1 y 2). Sin embargo el incremento en los niveles de fosforilación en tirosina de CD8- $\epsilon$  inducido tras la estimulación de la quimera con el anticuerpo OKT8 era similar al observado en la cadena CD3- $\epsilon$  endógena tras la estimulación con OKT3 (Fig. 4A, comparar carriles 7 y 8 con carriles 3 y 4). Tanto la chimera CD8- $\epsilon$  como el CD3- $\epsilon$  endógeno se fosforilan en tirosina como respuesta a la activación de la quimera y del receptor TCR/CD3, respectivamente.

Para probar en estas células si ocurría una interacción *in vivo* entre CD8- $\epsilon$  y la subunidad p85 de la PI 3-quinasa realizamos un Western-Blot en la membrana con un anticuerpo anti-p85 $\alpha$ . La subunidad p85 de la PI 3-quinasa se detectaba débilmente en los inmunoprecipitados con OKT8 de las Jurkat CD8- $\epsilon$  no estimuladas o estimuladas con G $\alpha$ mIg (Fig. 4B, carriles 5 y 6). La asociación aumentaba en gran medida en los inmunoprecipitados con OKT8 de células estimuladas con OKT8 u OKT8 más el segundo anticuerpo G $\alpha$ mIg (Fig. 4B, carriles 7 y 8). La subunidad p85 $\alpha$  de la PI 3-quinasa no se detectaba asociada en los inmunoprecipitados con OKT3 de células Jurkat CD8- $\epsilon$  sin estimular o estimuladas con G $\alpha$ mIg (Fig. 4B, carriles 1 y 2). Mientras que p85 co-inmunoprecipitaba con CD3- $\epsilon$  endógeno cuando las células Jurkat CD8- $\epsilon$  eran estimuladas con OKT3 u OKT3 mas G $\alpha$ mIg (Fig. 4B, carriles 3 y 4). El nivel basal de asociación de p85 a CD8- $\epsilon$  en células no estimuladas o estimuladas con G $\alpha$ mIg podría deberse al nivel de fosforilación basal en tirosina de CD8- $\epsilon$  más alto que el de la cadena CD3- $\epsilon$  (Fig. 4A, comparar carriles 5 y 6 con los carriles 1 y 2). Estos resultados sugieren un mecanismo de asociación de la subunidad p85 de la PI 3-quinasa al dominio intracelular de CD3- $\epsilon$  dependiente de fosforilación en tirosina y en el que ninguna de las otras cadenas CD3 parecen jugar un papel.



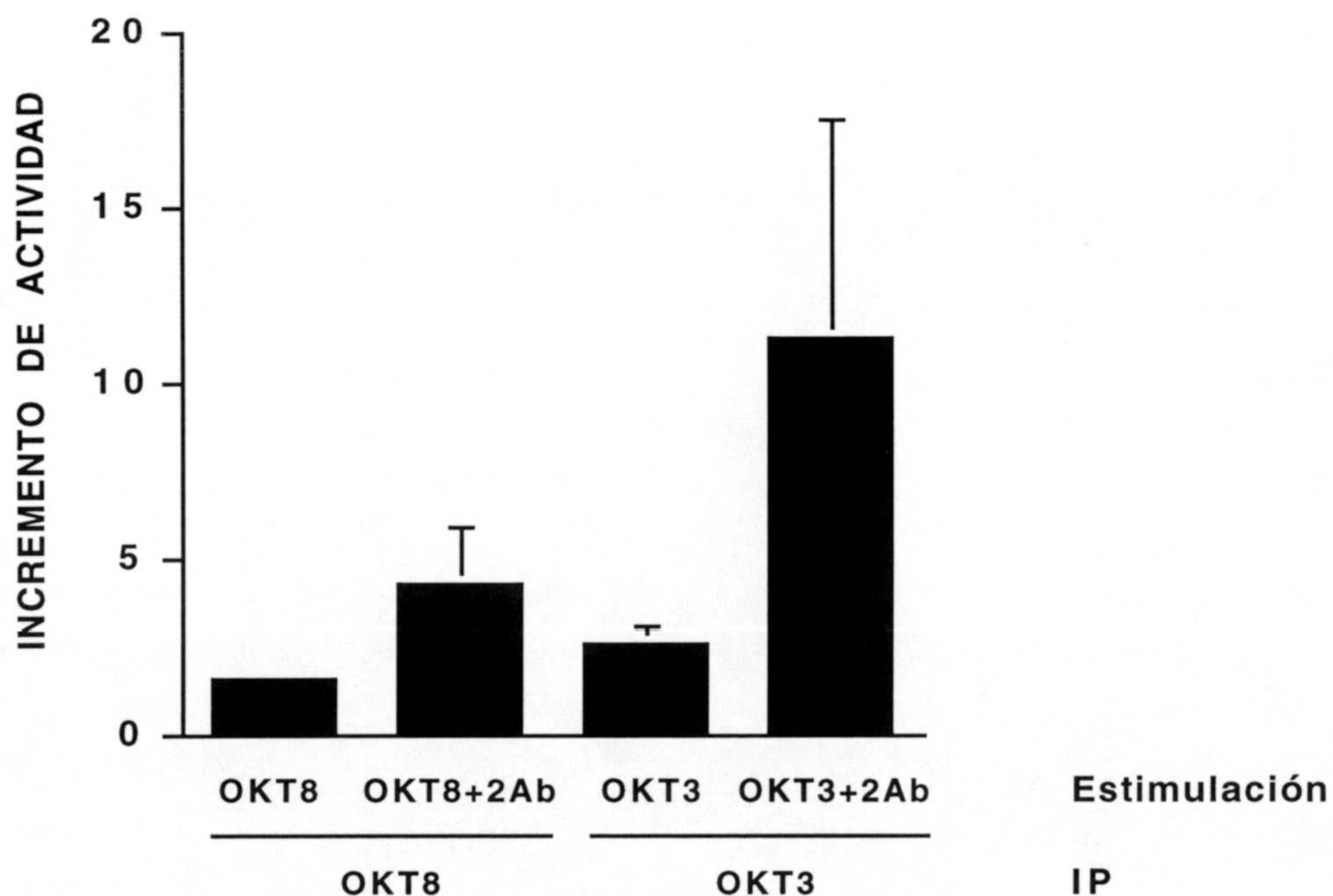
**Figura 3. Activación de las células Jurkat CD8- $\epsilon$ .**  $20 \times 10^6$  de células Jurkat CD8- $\epsilon$  fueron estimuladas 5 min con  $5 \mu\text{g}/10^7$  cels de OKT3 (carriles 3 y 4), 5 min con  $5 \mu\text{g}/10^7$  cels de OKT8 (carriles 5 y 6), 3 min con  $20 \mu\text{g}/10^7$  cels de segundo anticuerpo (cabra anti-ratón,  $G\alpha\text{mIg}$ ) (carriles 2, 4 y 6) o no estimulados (carril 1). Las células fueron lisadas en tampón de lisis 1% NP-40. Las proteínas fueron separadas mediante un gel de SDS-PAGE 12,5%, transferidas a una membrana de PVDF y realizado un Western Blot con anti-fosfotirosina Py-Plus. Las bandas fueron visualizadas mediante el método Super-Signal.

**Figura 4. Detección de la subunidad p85 $\alpha$  de la PI 3-quinasa en inmunoprecipitados de CD3- $\epsilon$  y CD8- $\epsilon$  de células Jurkat CD8- $\epsilon$  estimuladas con OKT3 u OKT8 respectivamente.** Las células Jurkat CD8- $\epsilon$  fueron estimuladas con  $5 \mu\text{g}/10^7$  cels de OKT3 (carriles 3 y 4), con  $5 \mu\text{g}/10^7$  cels de OKT8 (carriles 7 y 8),  $20 \mu\text{g}/10^7$  cels de segundo anticuerpo (carriles 2, 4, 6 y 8) o no estimuladas (carriles 1 y 5). Las células fueron lisadas en tampón de lisis 1% NP-40. Los lisados celulares (WL, carril 11) fueron preacclarados con BSA-Sepharose (PC, carriles 9 y 10) e inmunoprecipitados con  $5 \mu\text{g}/10^7$  cels de OKT3 (carriles 1 al 4) o  $5 \mu\text{g}/10^7$  cels de OKT8 (carriles 5 a 8). Las proteínas fueron separadas mediante un gel SDS-PAGE 12,5%, transferidas a una membrana de PVDF y realizado un Western Blot con: A) anti-fosfotirosina Py-Plus. B) anti-p85 $\alpha$  PI 3-quinasa pAb. C) anti-CD3- $\epsilon$  pAb. Las bandas fueron visualizadas mediante el método de Super-Signal.



**IV.1.3. En células Jurkat CD8-ε se detecta actividad PI 3-quinasa asociada a CD3-ε y CD8-ε en respuesta a la activación del receptor.**

La PI 3-quinasa de linfocitos T es un heterodímero de dos subunidades de 85 y 110 kDa. Es la subunidad p110 la que presenta la actividad PI 3-quinasa [Dhand et al. (1994); Dhand et al. (1994)]. Dado que habíamos observado un incremento en la asociación de la subunidad p85 a la cadena CD3-ε tras la estimulación del receptor, queríamos saber si se detectaba actividad enzimática PI 3-quinasa asociada a la cadena citoplasmática de CD3-ε. Se realizó un ensayo de actividad PI 3-quinasa en inmunoprecipitados con OKT8 u OKT3 de células Jurkat CD8-ε estimuladas con anti-CD8, OKT8 o anti-CD3, OKT3, respectivamente (Fig. 5). En concordancia con los estudios de Western-Blot, tras la activación de los receptores con los anticuerpos específicos se detectó un incremento de la actividad PI 3-quinasa asociada a la quimera CD8-ε y al CD3-ε endógeno (Fig. 5 columna primera y tercera). La actividad PI 3-quinasa asociada a los receptores se incrementaba aún más por la co-estimulación de las células con OKT8 u OKT3 más GαmIg (Fig. 5, columnas segunda y cuarta). Al igual que en los estudios de asociación donde la co-estimulación provocaba un incremento de la unión de p85 (Fig. 4B, carriles 4 y 8), en condiciones de co-estimulación también aumentaba la actividad PI 3-quinasa detectada en asociación con CD8-ε o CD3-ε (Fig. 5, columnas segunda y cuarta). Dado que para detectar la actividad enzimática de PI 3-quinasa es necesaria tanto la subunidad p85 como la p110, estos resultados sugieren que en las células Jurkat CD8-ε, la estimulación del TCR/CD3 o de CD8-ε provoca la unión del heterodímero p85α/p110 a la región citoplasmática de CD3-ε.

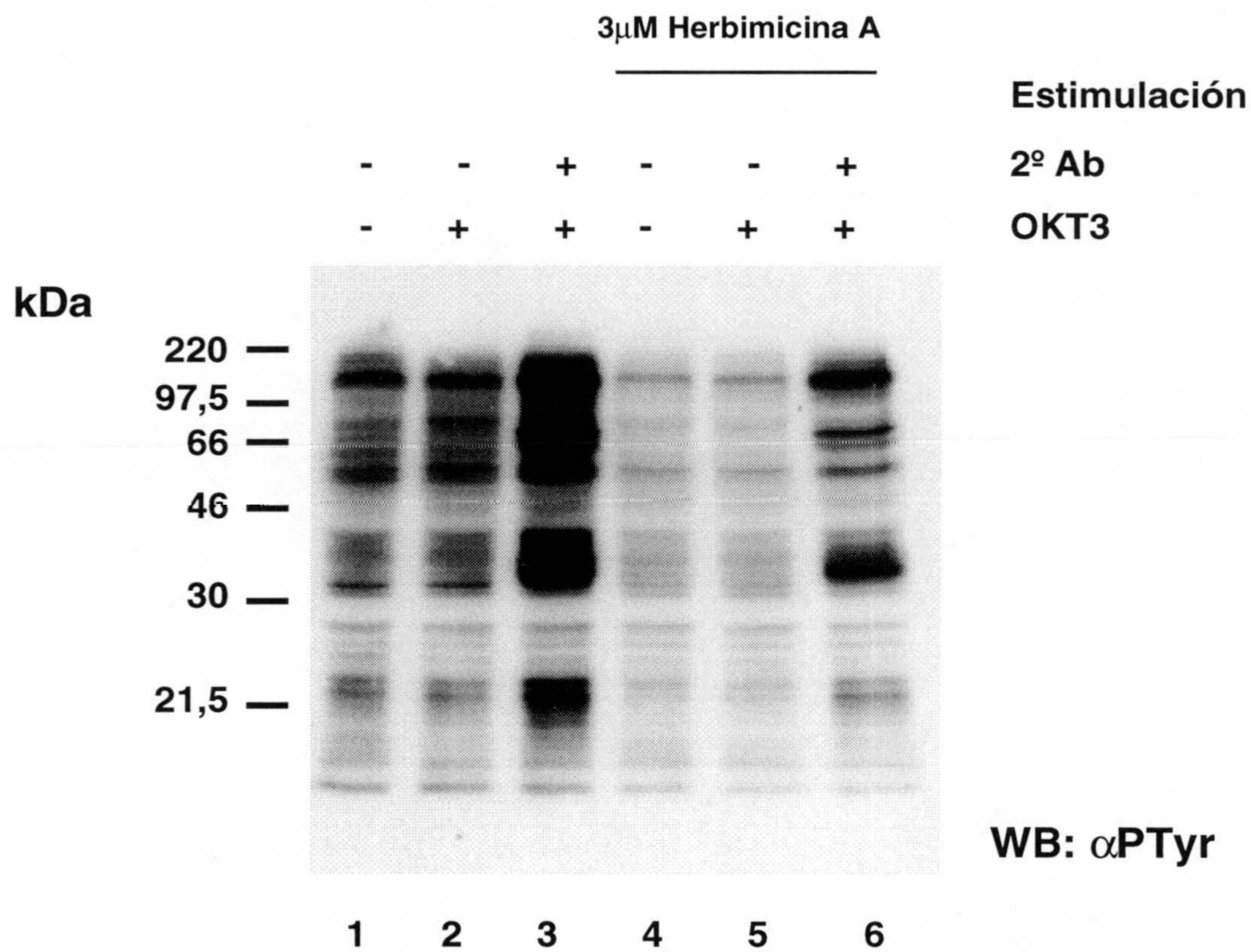




*Figura 5. Incremento de la actividad PI 3-quinasa asociada a los inmunoprecipitados de CD3-ε y CD8-ε en células Jurkat CD8-ε estimuladas con OKT3 u OKT8 respectivamente. Células Jurkat CD8-ε fueron activadas con OKT8 (primera columna), OKT8 más segundo anticuerpo (segunda columna), OKT3 (tercera columna) u OKT3 más segundo anticuerpo (cuarta columna). Los lisados fueron inmunoprecipitados con OKT8 (columnas primera y segunda) u OKT3 (columnas tercera y cuarta). La actividad PI 3-quinasa fue medida antes y después de la activación. Los resultados se muestran como incremento de actividad respecto a la actividad basal medida en células sin estimular, más/menos la desviación estandar. Los resultados son una media de 4 experimentos independientes.*

**VI.1.4. El tratamiento de las células Jurkat con herbimicina A reduce la asociación de la subunidad p85 $\alpha$  a la cadena CD3- $\epsilon$ .**

Para entender el papel las PTKs de la familia Src en la asociación de la subunidad p85 de la PI 3-quinasa a la cadena CD3- $\epsilon$  decidimos utilizar el inhibidor de la actividad tirosina quinasa, herbimicina A. Se cree que este inhibidor es específico de PTKs de la familia Src, a las que se une por su dominio C-terminal e induce su degradación [Anel et al. (1994)]. El pretratamiento de las células Jurkat con 3  $\mu$ M de herbimicina A durante 24 h reducía claramente tanto el nivel basal de proteínas fosforiladas en tirosina (Fig. 6, comparar carril 4 con carril 1) como tras la activación de las células con anticuerpo anti-CD3, OKT3 y un segundo anticuerpo G $\alpha$ mIg (Fig. 6, comparar carriles 6 con carril 3).



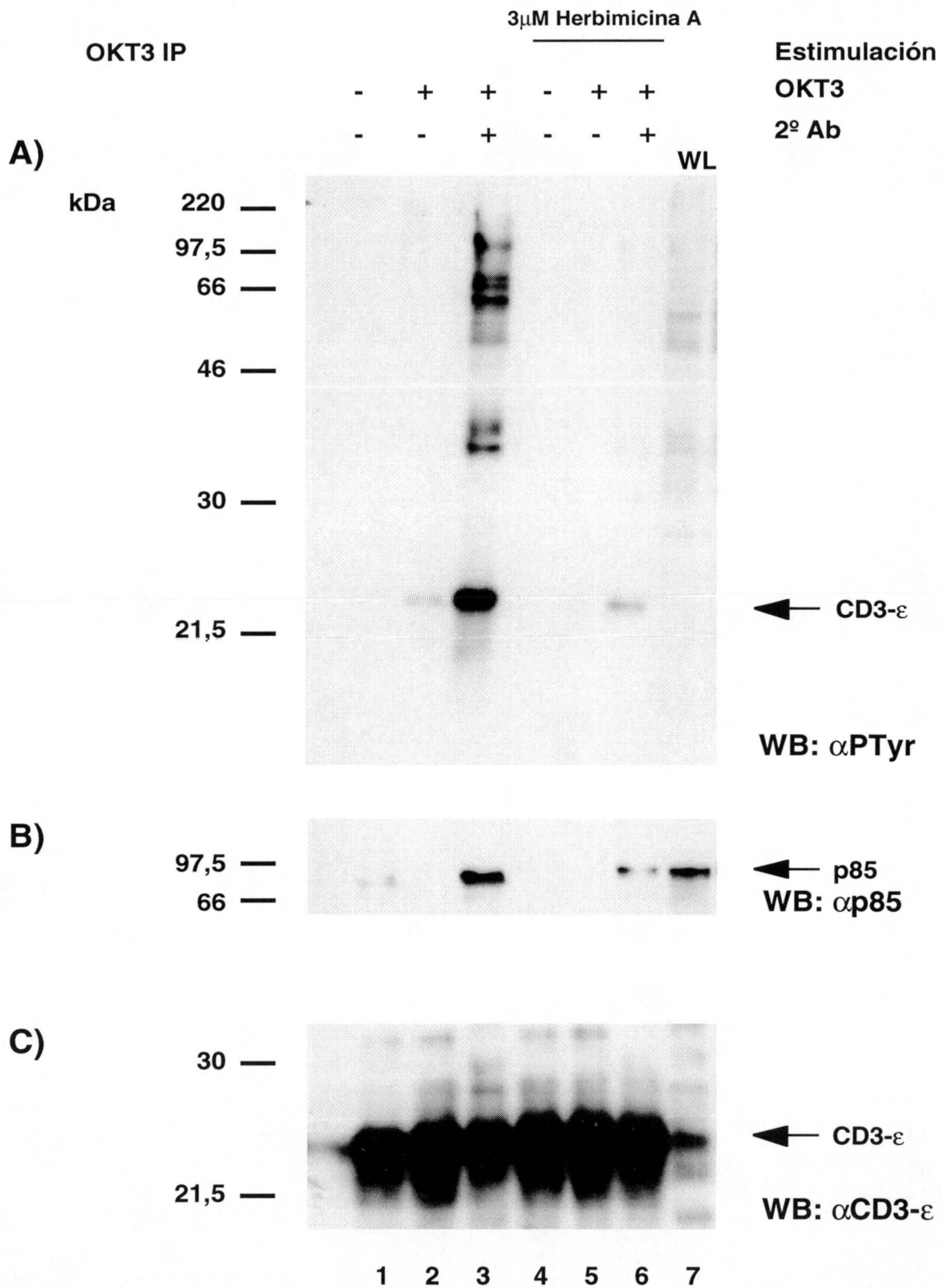
*Figura 6. Efecto del inhibidor de PTKs, herbimicina A, en la fosforilación en tirosina inducida tras la activación del TCR/CD3. Células Jurkat fueron preincubadas 24 h a 37°C con medio RPMI 10% FBS (carriles 1-3) o con 3  $\mu$ M herbimicina A (carriles 4-6). Las células fueron lavadas en PBS y resuspendidas en RPMI-HEPES sin suero. Las células Jurkat fueron estimuladas 5 min con 5  $\mu$ g/10<sup>7</sup> cels de OKT3 (carriles 3 y 6), 3 min con 20  $\mu$ g/10<sup>7</sup> de segundo anticuerpo (carriles 2, 3, 5 y 6) o no estimuladas (carriles 1 y 4). Las células fueron lisadas en tampón de lisis 1% NP-40. Las proteínas fueron separadas mediante un gel SDS-PAGE 12%, transferidas a una membrana de PVDF y realizado un Western-Blot con anti-fosfotirosina PY-Plus. Las bandas fueron visulizadas mediante el método Super-Signal.*

Examinamos el efecto de la herbimicina A sobre la asociación de la subunidad p85 $\alpha$  de la PI 3-quinasa con la molécula de CD3- $\epsilon$ . Los lisados totales de las células Jurkat que habían sido estimuladas con el anticuerpo monoclonal anti-CD3, OKT3 solamente o con un segundo anticuerpo contra inmunoglobulinas de ratón (G $\alpha$ mIg) fueron inmunoprecipitados con OKT3. La molécula de CD3- $\epsilon$  se fosforilaba en tirosina tras la activación con OKT3 más un segundo anticuerpo (Fig. 7A, carril 3). La fosforilación en tirosina de CD3- $\epsilon$  tras el pretratamiento con herbimicina A se reducía fuertemente así como las proteínas fosforiladas en tirosina co-inmunoprecipitadas con CD3- $\epsilon$  (Fig. 7A, carril 6).

Para poner de manifiesto como afectaba la inhibición de las PTKs a la asociación de PI 3-quinasa con CD3- $\epsilon$  hicimos un Western-Blot a la membrana con un anticuerpo anti-p85 $\alpha$ . La subunidad p85 $\alpha$  de la PI 3-quinasa se detectaba en los inmunoprecipitados con OKT3 de las células Jurkat estimuladas con OKT3 y segundo anticuerpo (Fig. 7B, carril 3). En células estimuladas con OKT3 más segundo anticuerpo, el pretratamiento con herbimicina A inhibía en gran medida, pero no totalmente la asociación de la p85 $\alpha$  con CD3- $\epsilon$  (Fig. 7B, carril 6). La fosforilación en tirosina de CD3- $\epsilon$  se había reducido fuertemente por el tratamiento con herbimicina A, aunque no en su totalidad. El nivel basal de p85 $\alpha$  que se observa en los inmunoprecipitados de OKT3 de células tratadas con herbimicina A podría atribuirse a la fosforilación residual de CD3- $\epsilon$  en estas células cuando son activadas con OKT3 más segundo anticuerpo. También podría tratarse de una asociación basal no dependiente de fosforilación de CD3- $\epsilon$ , sin embargo, dado que no se ha anulado la fosforilación en tirosina de CD3- $\epsilon$  totalmente no podemos afirmar esto último. Cuando se produce la fosforilación en tirosina de CD3- $\epsilon$  se incrementa la cantidad de la subunidad p85 $\alpha$  de la PI 3-quinasa co-inmunoprecipitada con CD3- $\epsilon$  (Fig. 7B, carril 3). Estos resultados sugieren que la actividad PTK de miembros de la familia Src se requiere para la asociación de la subunidad p85 de la PI 3-quinasa a CD3- $\epsilon$ .

*Figura 7. Efecto del inhibidor de las PTKs, herbimicina A, en la asociación de la subunidad p85 $\alpha$  de la PI 3-quinasa a la cadena polipeptídica CD3- $\epsilon$ . Células Jurkat fueron preincubadas 24 h a 37°C con medio RPMI 10% FBS (carriles 1-3) o con 3  $\mu$ M herbimicina A (carriles 4-6). Las células fueron lavadas en PBS y resuspendidas en RPMI-HEPES sin suero. Las células Jurkat fueron estimuladas con 5  $\mu$ g/10<sup>7</sup> cels de OKT3 (carriles 3 y 6), 20  $\mu$ g/10<sup>7</sup> de segundo anticuerpo (carriles 2, 3, 5 y 6) o no estimuladas (carriles 1 y 4). Las células fueron lisadas en tampón de lisis 1% NP-40. Los lisados celulares (WL; lisados totales, carril 7) fueron preaclarados con BSA-Sepharose e inmunoprecipitados con 5  $\mu$ g/10<sup>7</sup> cels de OKT3. Las proteínas fueron separadas mediante un gel SDS-PAGE 12,5%, transferidas a una membrana de PVDF y*

realizado un Western-Blot con: A) anti-fosfotirosina PY-Plus. B) antip85 $\alpha$  PI 3-quinasa pAb. C) anti-CD3- $\epsilon$  pAb. Las bandas fueron visualizadas mediante el método del Super-Signal.



#### IV.1.5. Estudio de la interacción entre la subunidad p85 $\alpha$ de la PI 3-quinasa y la cadena CD3- $\epsilon$ en ausencia de Lck.

Los resultados en células Jurkat tratadas con herbimicina A apuntan a la importancia de la actividad PTK de los miembros de la familia Src para que la asociación entre la subunidad p85 $\alpha$  de la PI 3-quinasa y la cadena CD3- $\epsilon$  del TCR/CD3 tenga lugar tras la estimulación del receptor. En células linfoides dos miembros de la familia Src juegan un importante papel en la transducción de señales mediadas por la activación del TCR/CD3: Lck y Fyn [Mustelin and Burn (1993)]. Una variante de células Jurkat, JCaM 1.6 carece de una Lck funcional y es incapaz de transmitir señales de transducción tras la estimulación del TCR que lleven a la producción de IL-2 [Straus and Weiss (1992)].

Para examinar el papel de Lck en la asociación de la PI 3-quinasa y CD3- $\epsilon$  tras la estimulación del receptor TCR/CD3 utilizamos la línea celular JCaM 1.6 y la comparamos con células Jurkat normales. Las células fueron estimuladas con el anticuerpo anti-CD3, OKT3. A nivel de lisados celulares las células Jurkat experimentaban un incremento en la fosforilación en tirosina de sus proteínas citoplasmáticas tras la estimulación del receptor (Fig. 8A, comparar carriles 1 y 2). Sin embargo, las proteínas citoplasmáticas de los lisados de células JCaM 1.6 no experimentaban un aumento en los niveles de fosforilación en tirosina tras la estimulación con OKT3 (Fig. 8A, comparar carriles 3 y 4 con carriles 1 y 2). El Western-Blot anti-fosfotirosina de los inmunoprecipitados de CD3- $\epsilon$  revela que tras la estimulación de células Jurkat, CD3- $\epsilon$  se fosforila fuertemente en tirosina (Fig. 8A, carril 6) y en células JCaM 1.6, a pesar de la ausencia de una Lck funcional, CD3- $\epsilon$  se fosforila en tirosina ligeramente tras la activación (Fig. 8A, carril 8). Hay que apuntar que Fyn, otra PTK que juega un papel en la señalización a través del TCR/CD3, se expresa en la línea JCaM 1.6 en cantidades equivalentes a las que presentan las células Jurkat [Sunder-Plassmann et al. (1997)].

Realizamos un Western-Blot anti-p85 $\alpha$  sobre la membrana. Cantidades equivalentes de p85 $\alpha$  son reconocidas por el anticuerpo en todos los carriles correspondientes a los lisados celulares tanto de células Jurkat como JCaM 1.6 (Fig. 8B, carriles 1 a 4). La subunidad p85 de la PI 3-quinasa se asociaba a la cadena polipeptídica CD3- $\epsilon$  tras la estimulación del receptor TCR/CD3 en células Jurkat (Fig. 8B, carril 6). La molécula CD3- $\epsilon$  en células JCaM 1.6 estimuladas vía TCR/CD3 también presentaba una débil asociación de la subunidad p85 de la PI 3-quinasa, a pesar del escaso nivel de fosforilación que CD3- $\epsilon$  experimentaba tras la activación del receptor. Estos resultados indican que la subunidad p85 de la PI 3-quinasa puede asociarse a CD3- $\epsilon$  incluso en ausencia de Lck, pero requiere al menos la fosforilación de CD3- $\epsilon$  en cierta medida.

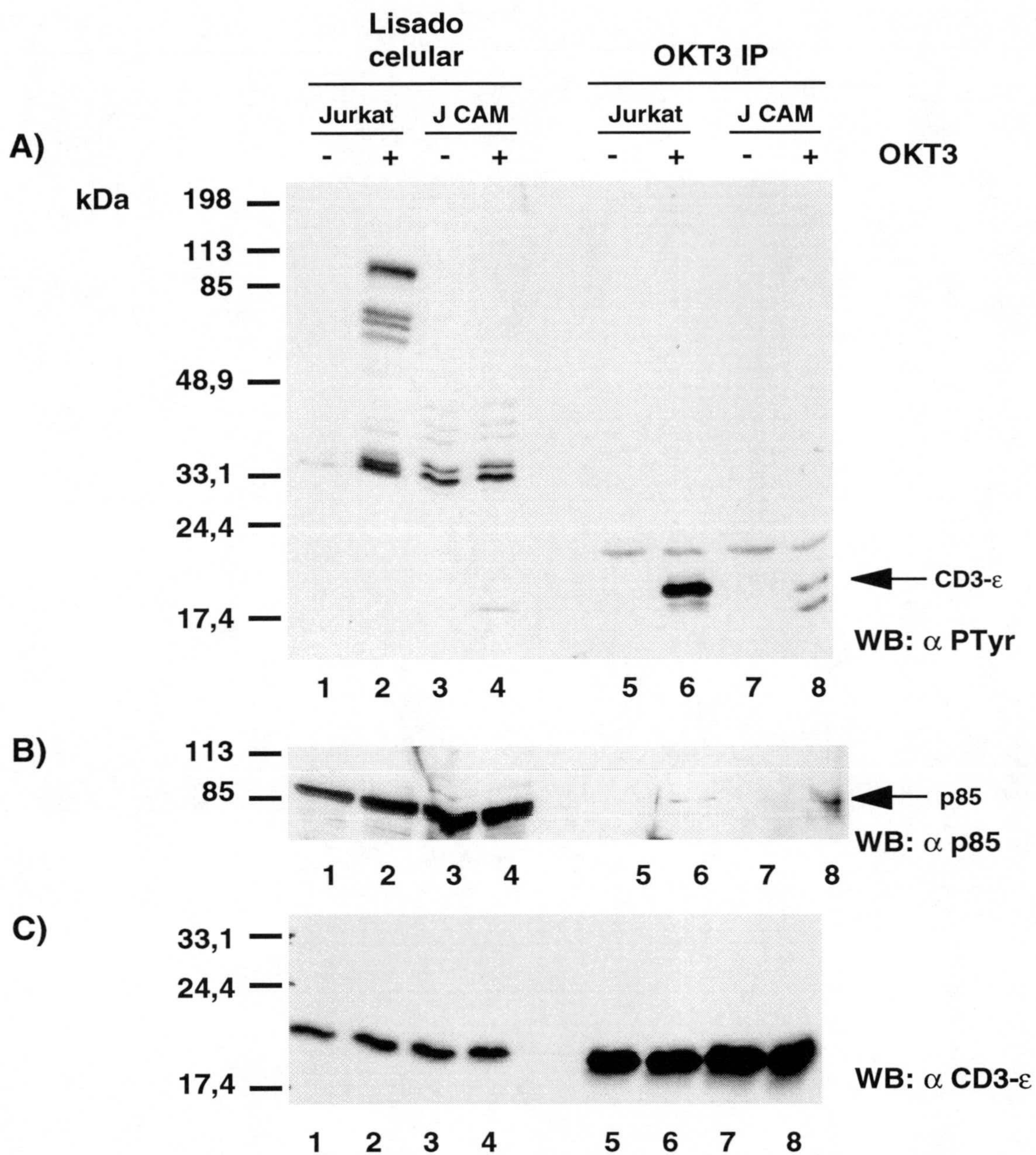


Figura 8. Asociación de la subunidad p85 de la PI 3-quinasa y la cadena CD3-ε en ausencia de Lck. 20 X 10<sup>6</sup> células Jurkat (carriles 1, 2, 5 y 6) o JCaM 1.6 (carriles 3, 4, 7 y 8) por punto fueron estimuladas con 5 μg/10<sup>7</sup> cels de OKT3 (carriles 2, 4, 6 y 8) o no estimuladas (carriles 1, 3, 5 y 7). Las células fueron lisadas en tampón de lisis 1% NP-40. Los lisados celulares (carriles 1-4) fueron preclarados con BSA-Sepharose e inmunoprecipitados con 5 μg/10<sup>7</sup> cels de OKT3 (carriles 5-8). Las proteínas fueron separadas mediante un gel SDS-PAGE 12,5%, transferidas a una membrana de PVDF y realizado un Western Blot con: A) anti-fosfotirosina RC20. B) anti-p85α PI 3-quinasa pAb. C) anti-CD3-ε pAb. Las bandas fueron visualizadas mediante el método de ECL.

#### IV.1.6. Estudio de la relación de la cadena polipeptídica CD3- $\epsilon$ con proteínas del citoesqueleto.

Se ha demostrado la asociación de la cadena CD3- $\zeta$  con proteínas del citoesqueleto [Caplan et al. (1995)]. Esta asociación parece ser ubicua y depende de una secuencia de 42 aminoácidos en la región intracitoplasmática de la cadena CD3- $\zeta$ , concretamente la zona del  $\zeta_C$ -ITAM. La técnica más utilizada para determinar la asociación al citoesqueleto se basa en la lisis de las células en presencia de un detergente (NP-40, CHAPS, etc) y la separación en dos fracciones: soluble e insoluble en el detergente [Caplan and Baniyash (1995)]. La importancia de la participación del citoesqueleto en los procesos de señalización ya se ha demostrado en el caso de la redistribución del complejo Grb-2/p36-p38/ZAP-70/CD3- $\zeta$  a la fracción insoluble tras la activación del linfocito T [Nel et al. (1995)]. En nuestros experimentos habíamos observado que en células activadas con OKT3 más un segundo anticuerpo detectábamos una cantidad ligeramente menor en los inmunoprecipitados con OKT3. Queríamos comprobar si la cadena CD3- $\epsilon$  experimentaba una traslocación celular tras la activación del linfocito T y si la transducción de señales a través del CD3- $\epsilon$  suponía la interacción con el citoesqueleto.

Después de la activación de las células Jurkat con anticuerpo anti-CD3, OKT3 sólo o OKT3 más un segundo anticuerpo se lisaron las células en un tampón de lisis 1% NP-40. Se centrifugó el lisado y el sobrenadante fue considerado "fracción soluble". El sedimento fue resuspendido en una solución 2% SDS y sometido a agitación y calentamiento. Posteriormente fue filtrado a través de una membrana Micropure y al filtrado se le denominó "fracción insoluble". Las proteínas presentes en la fracción soluble experimentaban un aumento en la fosforilación en tirosina tras la estimulación con OKT3 (Fig. 9A, carril 2), que aumentaba mucho más si las células eran co-estimuladas con OKT3 más un segundo anticuerpo (Fig. 9A, carril 3). Una exposición más prolongada de la membrana permitía observar que en la fracción insoluble también estaban presentes proteínas que tras la estimulación con OKT3 más un segundo anticuerpo incrementaban su fosforilación en tirosina (Fig. 9A, carril 6'). El estudio de las proteínas presentes en ambas fracciones demostraba la presencia de CD3- $\epsilon$  en la fracción soluble (Fig. 9B, carriles 1, 2 y 3) mientras que no se detectaba la molécula en la fracción insoluble, ni siquiera una movilización de CD3- $\epsilon$  a la fracción insoluble dependiente de activación (Fig. 9B, carriles 4, 5 y 6).

Las fracciones solubles e insolubles de las células estimuladas y no estimuladas fueron inmunoprecipitadas con OKT3. En los inmunoprecipitados de la fracción soluble en NP-40 se detectaba la molécula CD3- $\epsilon$  (Fig. 10B, carriles 2, 3 y 4). La cadena CD3- $\epsilon$  se fosforilaba en tirosina tras la estimulación mediante el anticuerpo OKT3, (Fig. 10A, carril 3) aumentando los niveles de fosforilación en tirosina cuando las





(carriles 3, 4, 6 y 7), 20  $\mu\text{g}/10^7$  cels de segundo anticuerpo cabra anti-ratón (carriles 4 y 7) o no estimuladas (carriles 2 y 5). Las células fueron lisadas en tampón de lisis 1% NP-40. El sobrenadante fué considerado "fracción soluble" (WL: lisado total carril 1) y el sedimento tratado con un tampón 2% SDS y considerado "fracción insoluble". Las proteínas fueron separadas mediante un gel SDS-PAGE 12,5%, transferidas a una membrana de PVDF y realizado un Western-Blot con: A) anti-fosfotirosina RC20. B) anti-CD3- $\epsilon$  pAb. Las bandas fueron visualizadas mediante el método de ECL.

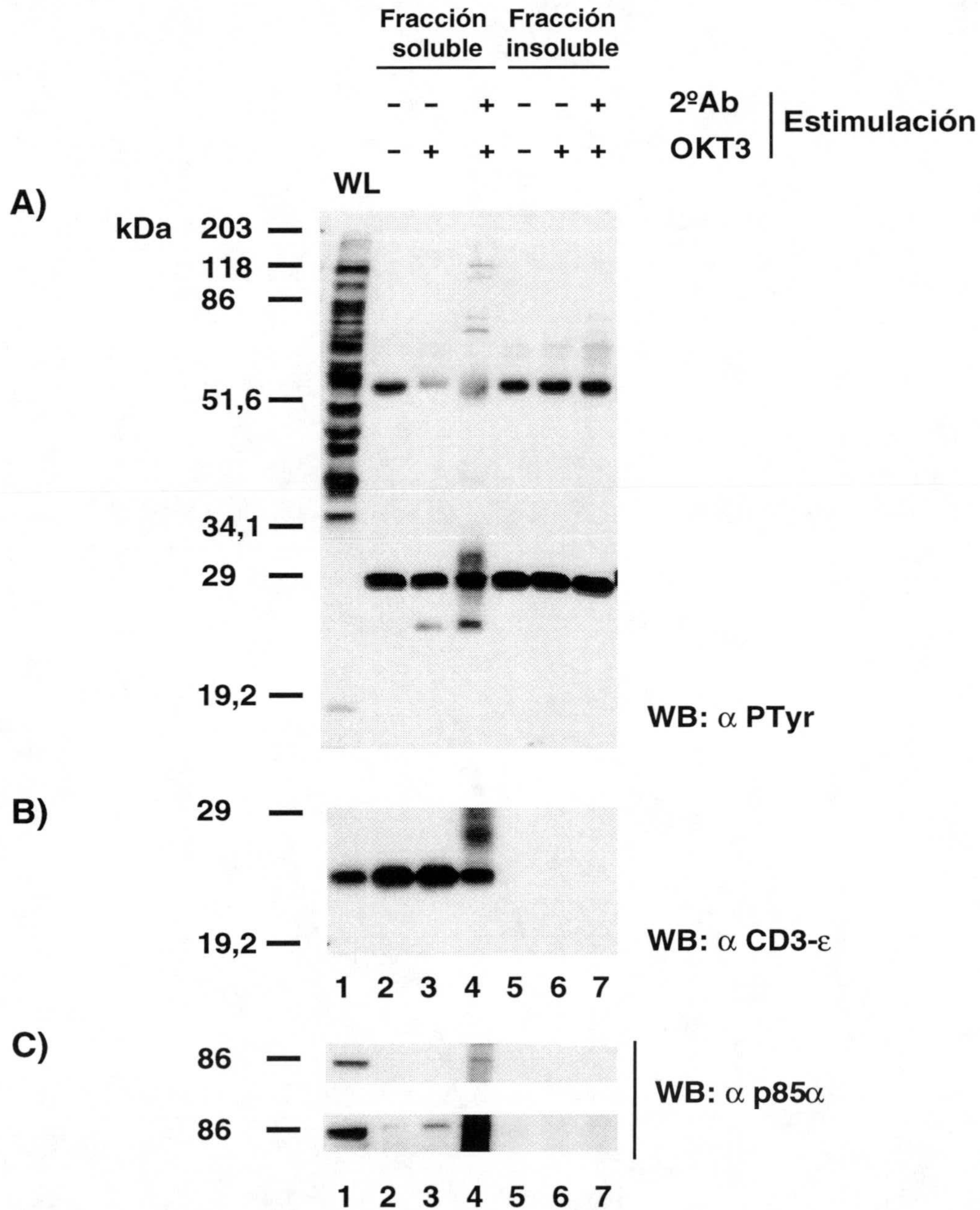


Figura 10. La subunidad p85 de la PI 3-quinasa sólo se asocia a la cadena CD3- $\epsilon$  en la fracción soluble en NP-40 tras la activación del TCR/CD3. 20 X 10<sup>6</sup> cels por punto fueron

*estimuladas con 5  $\mu\text{g}/10^7$  cels de OKT3 (carriles 3, 4, 6 y 7), 20  $\mu\text{g}/10^7$  cels de segundo anticuerpo cabra anti-ratón (carriles 4 y 7) o no estimuladas (carriles 2 y 5). Las células fueron lisadas en tampón de lisis 1% NP-40. El sobrenadante fue considerado "fracción soluble" (WL: lisado total carril 1) y el sedimento tratado con un tampón 2% SDS y considerado "fracción insoluble". Ambas fracciones fueron preaclaradas con BSA-Sepharose e inmunoprecipitadas con 5  $\mu\text{g}/10^7$  cels de OKT3. Las proteínas fueron separadas mediante un gel SDS-PAGE 12,5%, transferidas a una membrana de PVDF y realizado un Western-Blot con: A) anti-fosfotirosina RC20. B) anti-CD3- $\epsilon$  pAb. C) anti-p85 $\alpha$  PI 3-quinasa pAb. Las bandas fueron visualizadas mediante el método de ECL.*

## **IV. 2. Estudio de la interacción entre la subunidad p85 $\alpha$ de la PI 3-quinasa y la región citoplasmática de la cadena CD3- $\epsilon$ del receptor TCR/CD3 en células COS.**

### **IV.2.1. La cotransfección de Fyn y la quimera CD8- $\epsilon$ puede reconstituir la fosforilación en tirosina de CD8- $\epsilon$ en una línea celular no hematopoyética.**

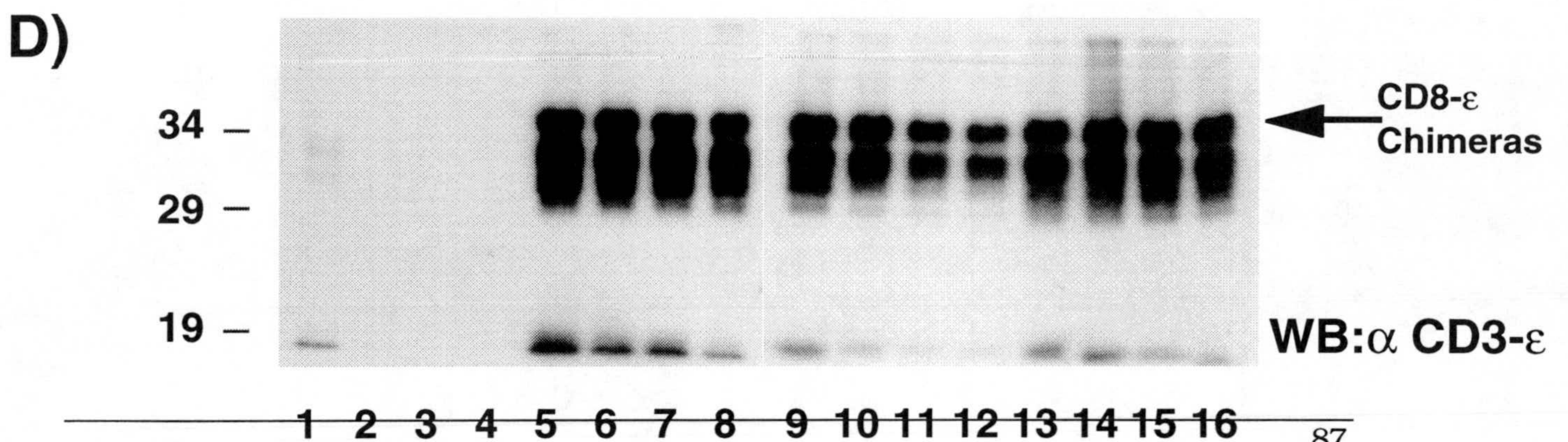
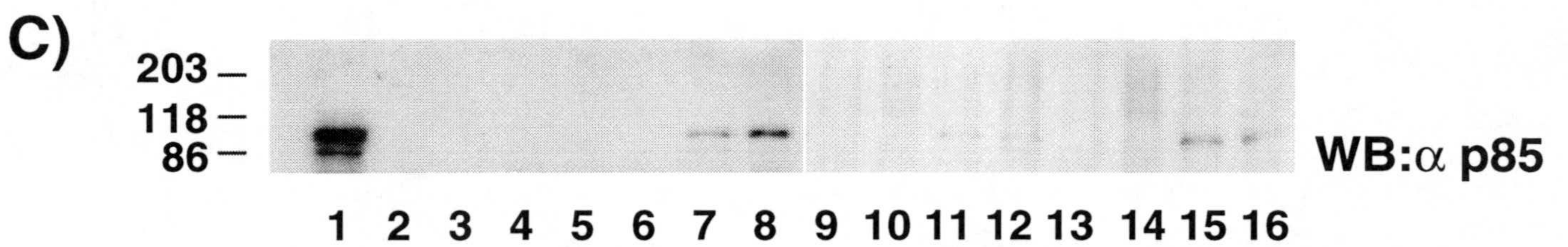
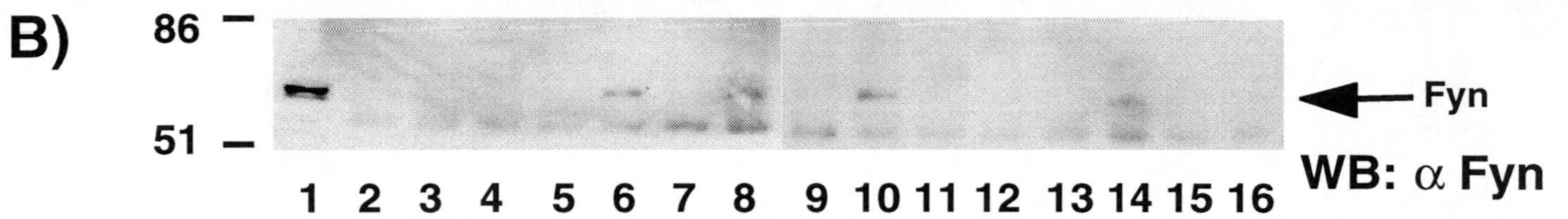
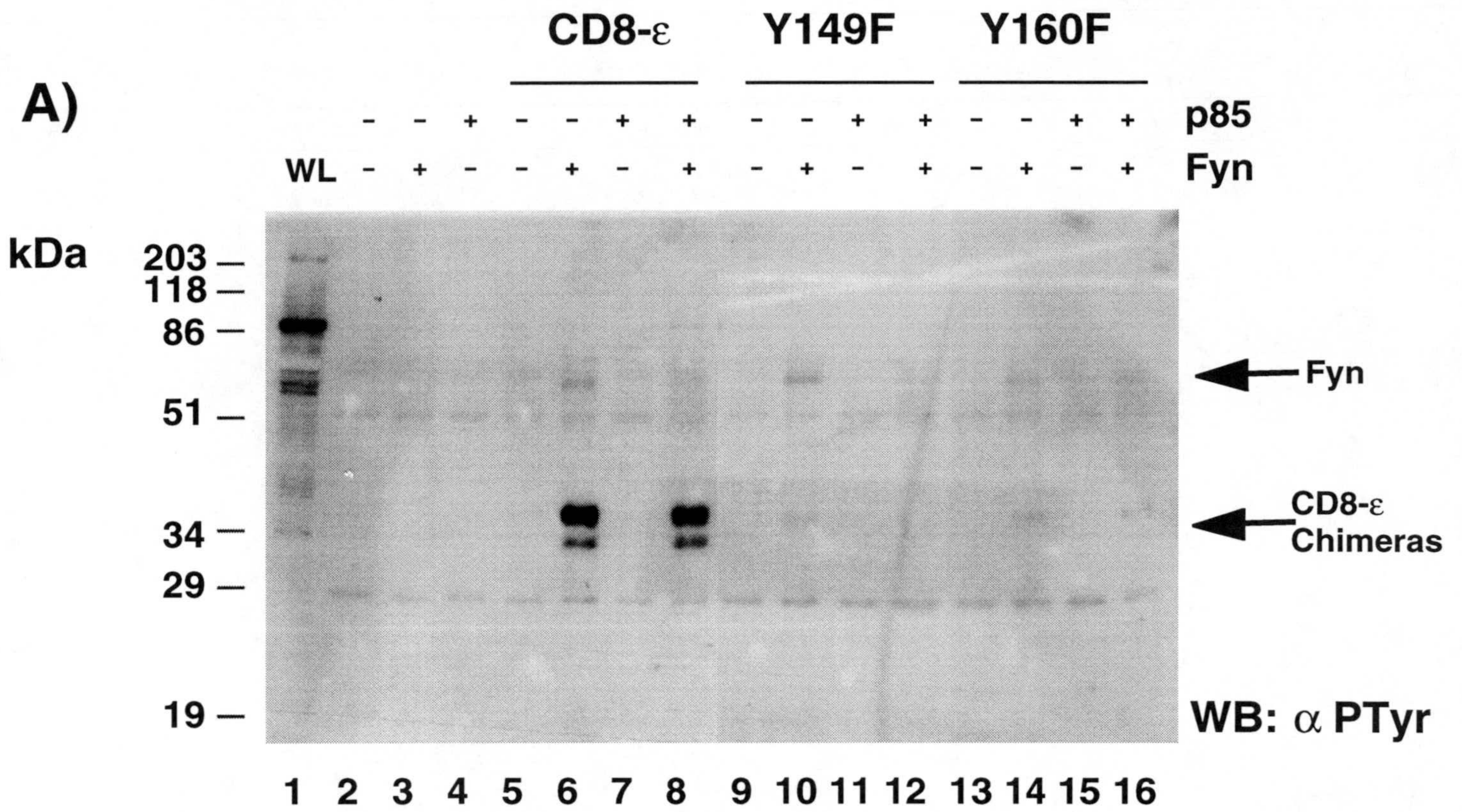
Los resultados presentados anteriormente estarían en concordancia con un mecanismo en el cual Lck (o Fyn) fosforilarían directamente la quimera y en consecuencia p85 $\alpha$  se uniría directa o indirectamente a CD8- $\epsilon$ . Sin embargo, las células T Jurkat tienen otras tirosina quinasas específicas de células hematopoyéticas (como ZAP-70) y otras moléculas señalizadoras que nos impiden llegar a conclusiones definitivas a este respecto. Utilizamos el sistema de reconstitución en células COS descrito en el apartado III.13. para determinar si Fyn era capaz de fosforilar directamente la quimera CD8- $\epsilon$ . Las células COS-7 carecen de las tirosina quinasas específicas del linaje hematopoyético como Lck, Fyn y ZAP-70, aunque expresan las tirosina quinasas de la familia Src, Yes y Src. Las células COS-7 fueron transfectadas transitoriamente con los cDNAs de Fyn humano, p85 $\alpha$  PI 3-quinasa de ratón, o CD8- $\epsilon$ , solos o en distintas combinaciones. La quimera CD8- $\epsilon$  fue aislada por inmunoprecipitación con el anticuerpo OKT8, analizado por electroforesis en SDS-PAGE y realizado un Western-Blot con un anticuerpo anti fosfotirosina (Fig. 11A). Se apreciaba una debil fosforilación en tirosina en CD8- $\epsilon$  en ausencia en la célula COS-7 de la expresión de una quinasa exógena. (Fig. 11A , carril 5). Cuando la quinasa Fyn era co-transfectada con CD8- $\epsilon$  en estas células se observaba un marcado incremento en el nivel de fosforilación en tirosina de CD8- $\epsilon$  (Fig. 11A, carril 6). La co-expresión de ambas proteínas producía la co-inmunoprecipitación con CD8- $\epsilon$  de una proteína fosforilada en tirosina de unos 59 kDa identificada como Fyn (Fig. 11A, y B, carril 6). En células transfectadas con el cADN de Fyn solamente, el anticuerpo OKT8 no inmunoprecipitó ninguna banda de 59 kDa, sugiriendo que la interacción de CD8- $\epsilon$  con Fyn es específica (Fig. 11B, carril 3). Los resultados indican que sin la PTK ZAP-70, Fyn es capaz de fosforilar en tirosina la cola citoplasmática de la quimera CD8- $\epsilon$  y sugiere que Fyn se asocia a esta quinasa a través del ITAM de CD3- $\epsilon$ .

### **IV. 2.2. En células COS-7 transfectadas la subunidad p85 $\alpha$ de la PI 3-quinasa se une preferentemente a la quimera CD8- $\epsilon$ fosforilada en tirosina.**

También se analizó la asociación de la quimera CD8- $\epsilon$  con la subunidad p85 $\alpha$  de la PI3 quinasa murina transfectada. Mientras que en las células COS-7 co-transfectadas con el cDNA de CD8- $\epsilon$  y p85 $\alpha$  de ratón una pequeña cantidad de p85 $\alpha$  co-

inmunoprecipitaba con CD8- $\epsilon$  no fosforilado (Fig. 11C, carril 7), en las células co-transfectadas con los cDNAs de CD8- $\epsilon$ , p85 $\alpha$  y Fyn había un incremento significativo de la cantidad de p85 $\alpha$  co-inmunoprecipitado con CD8- $\epsilon$  fosforilado (Fig. 11C, carril 8). Sin embargo, en células transfectadas sólo con el cADN de p85 $\alpha$ , la proteína no se unía al anticuerpo monoclonal OKT8 utilizado para la inmunoprecipitación (Fig. 11C, carril 4), sugiriendo que la interacción CD8- $\epsilon$ /p85 $\alpha$  es específica.

*Figura 11. En las células COS-7 la subunidad p85 $\alpha$  de la PI 3-quinasa se asocia preferentemente a la quimera CD8- $\epsilon$  fosforilada en tirosina. Células COS-7 fueron transfectadas con cDNAs que codifican para CD8- $\epsilon$  (carriles 5-8), Fyn (carriles 3, 6, 8, 10, 12, 14 y 16), CD8- $\epsilon$  Y170F (carriles 9-12), CD8- $\epsilon$  Y181F (carriles 13-16) y p85 $\alpha$  (carriles 4, 7, 8, 11, 12, 15 y 16) por el método del DEAE-Dextrano. 72 horas después de la transfección las células fueron recogidas y lisadas en tampón de lisis 1% NP-40. Los lisados celulares (WL, carril 1) fueron preaclerados con suero normal de ratón y proteína A-Sepharose e inmunoprecipitados con 5  $\mu$ g/10<sup>7</sup> cels de OKT8. Las proteínas fueron separadas en un gel de SDS-PAGE 12,5%, transferidas a una membrana de PVDF y realizados Western-Blots: A) anti-fosfotirosina RC20, B) anti-Fyn pAb, C) anti-p85 $\alpha$  PI 3-quinasa pAb, D) anti-CD3- $\epsilon$  pAb. Las bandas fueron visualizadas mediante el método de ECL. Las posiciones de Fyn, p85 $\alpha$  y las quimeras CD8- $\epsilon$  se muestran a la derecha.*



Fyn puede unirse eficientemente a la quimera CD8- $\epsilon$  (Fig. 11A, carril 6 y Fig. 11B, carril 6), y el dominio SH3 de Fyn puede mediar la unión de Fyn a la PI 3-quinasa en linfocitos T [Prasad et al. (1993; Pleiman et al. (1994.)). Por lo tanto, el incremento de asociación de p85 $\alpha$  a la quimera CD8- $\epsilon$  observado en las células COS que fueron transfectadas con Fyn (Fig. 11C, carril 8) podía sugerir que Fyn era el nexo entre CD8- $\epsilon$  y la subunidad p85 de la PI 3-quinasa, o que la fosforilación de las dos tirosinas del ITAM de la quimera podía proporcionar lugares de alta afinidad de unión para los dominios SH2 de la subunidad p85 de la PI 3-quinasa. Para distinguir entre estas dos posibilidades se construyeron dos quimeras CD8- $\epsilon$  mutadas (ver Tabla 1). En una quimera la primera tirosina del ITAM de CD3- $\epsilon$  fue reemplazada por fenilalanina (Y170F). En la segunda quimera la segunda tirosina del ITAM fue sustituida por fenilalanina (Y181F). La figura 11 muestra que en células COS co-transfectadas con Y170F y Fyn, o Y181F y Fyn, las quimeras mutadas eran susceptibles de ser fosforiladas aunque con menor eficiencia que la quimera salvaje (Fig. 11A, comparar carriles 10 y 14 con carril 6). Sin embargo, Fyn se detectaba asociado a las quimeras Y170F y Y181F (Fig. 11A, carriles 10 y 14 y Fig. 11B, carriles 10 y 14). Estos resultados sugieren que la fosforilación de una sola tirosina en el ITAM CD3- $\epsilon$  es suficiente para la unión de Fyn a la cola citoplasmática de CD3- $\epsilon$ .

En células COS transfectadas con los cDNAs de Y170F, o Y181F y p85 $\alpha$ , la cantidad de p85 $\alpha$  co-inmunoprecipitada con las quimeras era baja (Fig. 11C, carriles 11 y 15). Sin embargo, en células transfectadas con los cDNAs de Y170F, o Y181F y p85 $\alpha$  y Fyn, la cantidad de p85 $\alpha$  co-inmunoprecipitada con la quimera Y170F o Y181F no aumentaba comparada con las dobles transfecciones (Fig. 11C, comparar carriles 12 y 16 con carriles 11 y 15 respectivamente). Estos resultados sugieren que Fyn no es la molécula adaptadora que une la subunidad p85 de la PI 3-quinasa con el ITAM de CD3- $\epsilon$ . Los datos también apoyan la idea de que existen dos tipos de complejos p85/CD3- $\epsilon$  dependiendo del estado de fosforilación de las tirosinas presentes en el ITAM de CD3- $\epsilon$ .

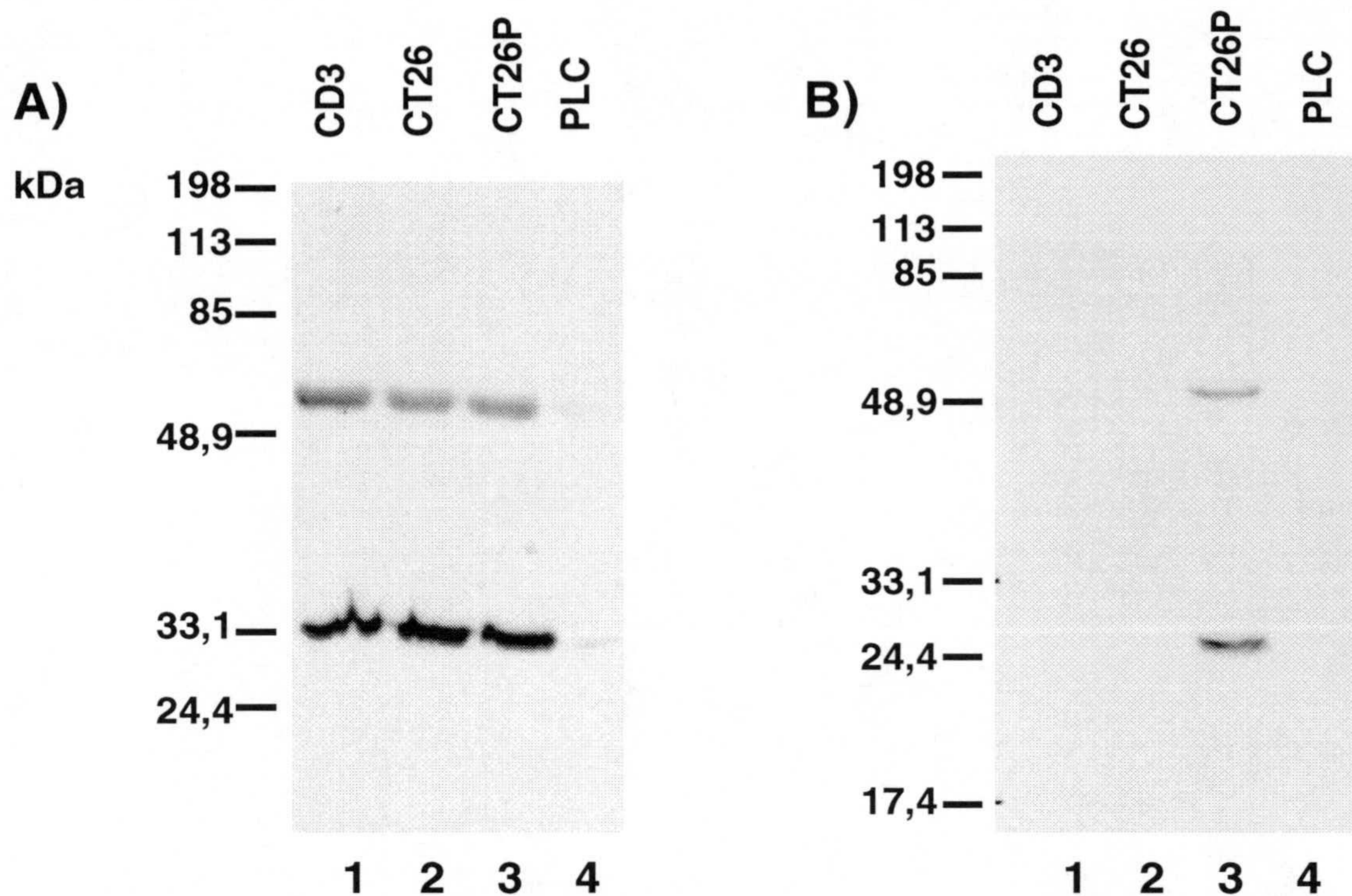
### IV.3. Estudio de la interacción entre la subunidad p85 $\alpha$ de la PI 3-quinasa y la región citoplasmática de la cadena CD3- $\epsilon$ del receptor TCR/CD3 *in vitro* mediante péptidos sintéticos.

#### IV.3.1. La subunidad p85 $\alpha$ de la PI 3-quinasa se une *in vitro* al ITAM de CD3- $\epsilon$ fosforilado en tirosina.

Para examinar si segmentos que representan al ITAM de CD3- $\epsilon$  unen específicamente a la subunidad p85 de la PI 3-quinasa se utilizaron péptidos sintéticos que correspondían al ITAM de CD3- $\epsilon$ . Los péptidos fueron unidos a través de la L-cisteína N-terminal a bolitas de L-Lisina-Sepharose. Los péptidos utilizados (Tabla 2) representan el ITAM de CD3- $\epsilon$  no fosforilado (CT26), el ITAM de CD3- $\epsilon$  fosforilado (CT26P) y un péptido no fosforilado que codifica la cadena citoplasmática completa de CD3- $\epsilon$  (CD3). El estado de fosforilación de los péptidos así como la cantidad utilizada de cada uno fue controlada tal y como se describe en el apartado III.5. (Fig. 12). Para precipitar proteínas de lisados de células Jurkat se utilizaron cantidades similares de cada péptido sintético unido a bolitas de Lisina-Sepharose. La figura 13 muestra un Western Blot anti-fosfotirosina de las proteínas unidas a los péptidos. Había muchas proteínas fosforiladas en tirosina unidas tanto a los péptidos fosforilados como no fosforilados y sólo una fosfoproteína de unos 70 kDa unida exclusivamente al péptido CT26P fosforilado.

<b>CD3</b>	<u>C</u> KNRKAKAKPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPPVP NPDYEPIRKGQRDLYSGLNQRRRI
<b>CT26</b>	<u>C</u> GDYEPiRKGQRDLYSGLNQRRASV
<b>CT26 P</b>	<u>C</u> GDYEPiRKGQRDLYSGLNQRRASV

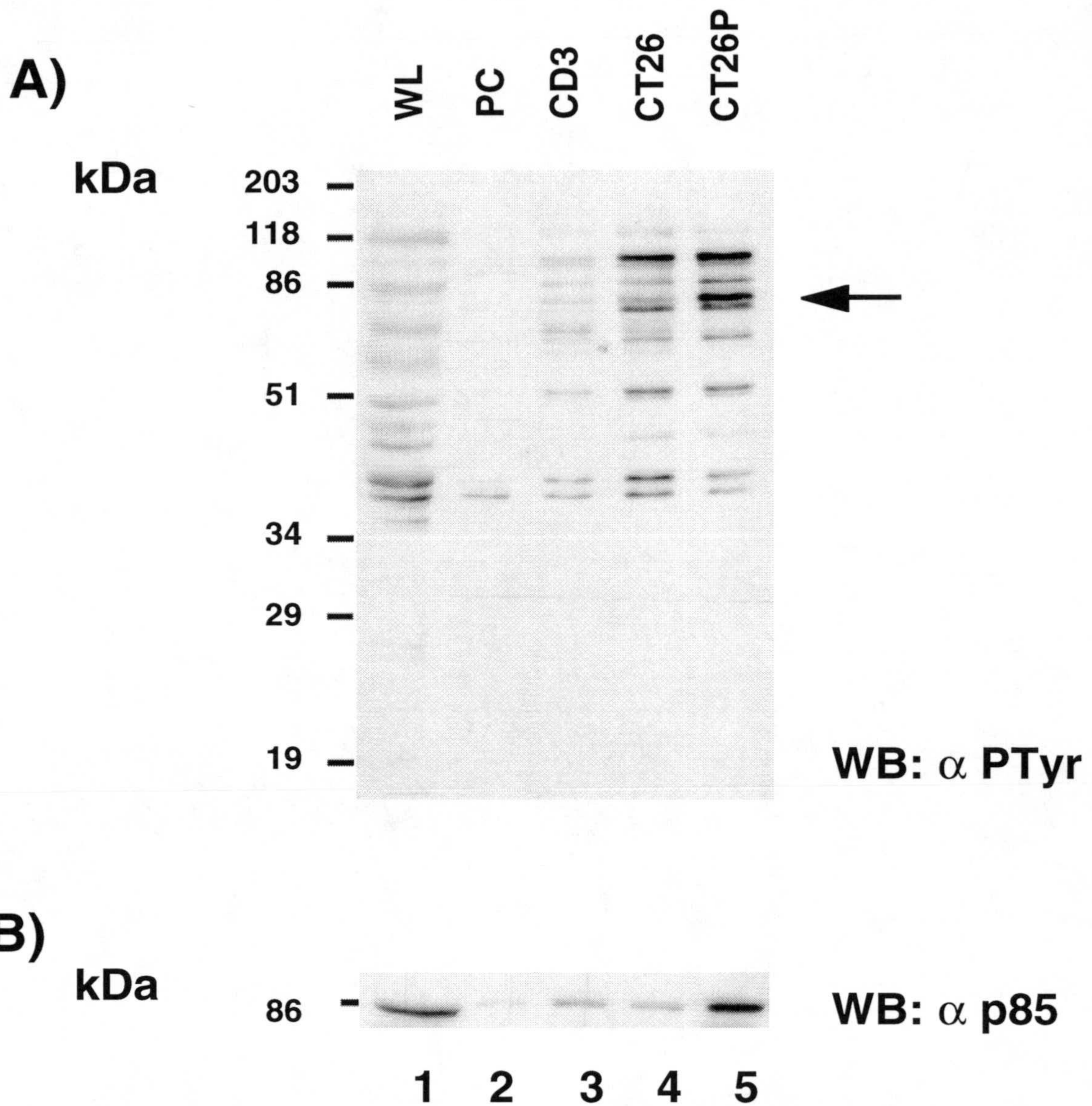
*Tabla 2. Secuencia de aminoácidos de los péptidos sintetizados. Todos los péptidos fueron sintetizados químicamente con una cisteína N-terminal adicional para facilitar la unión a Lys-Sepharose. Los péptidos CT26 y CT26P fueron sintetizados con una secuencia C-terminal adicional Arg-Arg-Ala-Ser-Val (RRASV) para determinar cuantitativamente la eficiencia de unión de los péptidos a la matriz de Lys-Sepharose. La Ser de la secuencia RRASV puede ser fosforilada por la quinasa de músculo de corazón y [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP.*



**Figura 12. Comprobación del estado de los péptidos.** 1.5  $\mu\text{M}$  de CD3 (carril 1), 3  $\mu\text{M}$  CT26 (carril 2) y 3  $\mu\text{M}$  CT26P (carril 3) y 3  $\mu\text{M}$  de un péptido control con una secuencia perteneciente a la molécula PLC- $\gamma$  (carril 4) unidos a bolitas de Lisina-Sepharose fueron utilizados para el ensayo. Los péptidos fueron puestos en contacto con 1  $\mu\text{l}$  de anticuerpo: A) 2F4, anti-CD3- $\epsilon$  y B) PY20, anti-fosfotirosina. Tras una hora de incubación a 4°C las bolitas fueron lavadas. Los anticuerpos asociados a las bolitas fueron separados en geles de SDS-PAGE 12,5 %, transferidos a membranas de PVDF y realizado un Western-Blot con anticuerpo de conejo contra inmunoglobulinas de ratón unido a peroxidasa de rábano. Las proteínas fueron visulizadas mediante el método del ECL.

Probamos si la subunidad p85 $\alpha$  de la PI 3-quinasa interaccionaba con los péptidos de CD3- $\epsilon$  ITAM mediante análisis por Western Blot con un anticuerpo policlonal anti-p85 $\alpha$ . Se observaba una unión preferencial de la subunidad p85 $\alpha$  de PI 3-quinasa al péptido doblemente fosforilado (CT26P) comparado con los péptidos no fosforilados CT26 y CD3 (Fig. 13B, carril 5 comparado con carriles 3 y 4). Estos resultados sugieren que la asociación del ITAM de CD3- $\epsilon$  con la p85 $\alpha$  de PI 3-quinasa depende de la fosforilación de las dos tirosinas.





*Figura 13. La subunidad p85 $\alpha$  de la PI 3-quinasa se asocia preferentemente con el péptido que representa al ITAM de CD3- $\epsilon$  doblemente fosforilado. 20 X 10<sup>6</sup> de células Jurkat por punto fueron lisadas con tampón de lisis 1% NP-40. Los lisados celulares fueron preacclarados dos veces con Lisina-Sepharose e incubados con las matices de afinidad 1.5  $\mu$ M de CD3 (carril 3), 3  $\mu$ M CT26 (carril 4) y 3  $\mu$ M CT26P (carril 5). Las proteínas unidas a las bolitas fueron separadas en geles de SDS-PAGE 12,5 %, transferidas a membranas de PVDF y realizado un Western-Blot con: A) anti-fosfotirosina RC20. B) anti-p85 $\alpha$  PI 3-quinasa pAb. Las bandas fueron visualizadas por el método de ECL. WL: lisado total (carril 1). PC: preaclaramiento (carril 2). Cada carril representa 10 x 10<sup>6</sup> cels. WL representa aproximadamente 700.000 cels.*

#### IV.3.2. Requerimientos de la unión de la subunidad p85 $\alpha$ de la PI 3-quinasa con los péptidos CD3- $\epsilon$ -ITAM.

El hecho de que la unión *in vitro* de la subunidad p85 $\alpha$  a CD3- $\epsilon$  requiere la fosforilación en tirosina del ITAM se confirmó probando la capacidad de la fosfotirosina para bloquear la unión de p85 $\alpha$  con el péptido fosforilado en tirosina CT26P. La adición de fosfotirosina soluble a lisados de células Jurkat previamente a la puesta en contacto con las bolitas de CT26P-Sepharose, provocaba una inhibición dosis-dependiente de la asociación de la subunidad p85 $\alpha$  de la PI 3-quinasa con CT26P (Fig. 14A, carriles 5 y 6).

También se probó la capacidad de otras sustancias para competir la asociación de la subunidad p85 $\alpha$  de la PI 3-quinasa con el péptido CT26P (Fig. 14B). La adición de 80 mM de fosfotreonina o fosfoserina tenía sólo un efecto parcial (Fig. 14B, carriles 4 y 5, respectivamente) mientras que la adición de 80 mM de fosfotirosina o 50 mM de fenilfosfato a la reacción bloqueaba completamente la asociación de la subunidad p85 $\alpha$  de la PI 3-quinasa con el péptido CT26P (Fig. 14B, carriles 3 y 6). Por lo tanto estos resultados indican que la unión de la subunidad p85 $\alpha$  de la PI 3-quinasa a CD3- $\epsilon$  depende en gran medida de la fosforilación de las tirosinas del ITAM de CD3- $\epsilon$ .

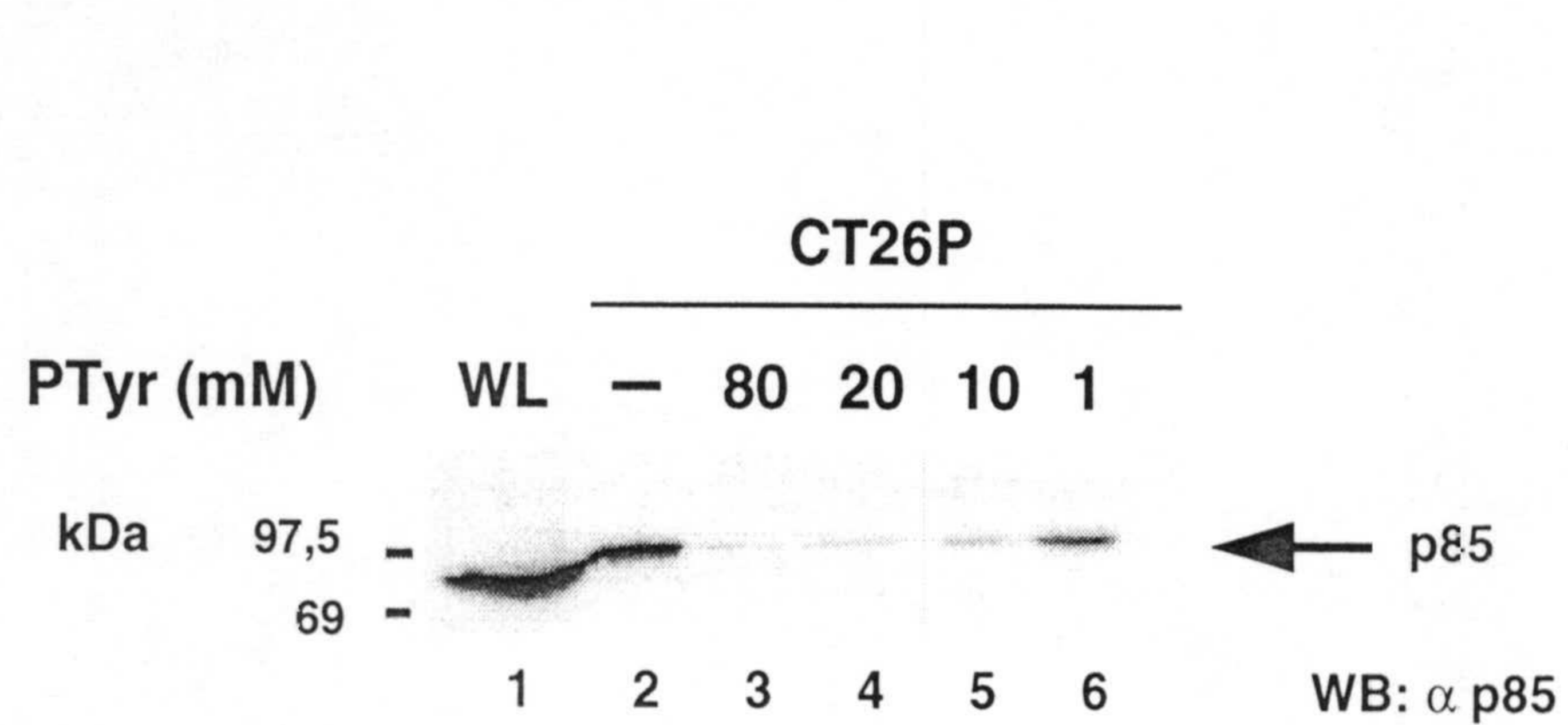
Una vez unidos, el complejo p85 $\alpha$ -PI 3-quinasa/CD3- $\epsilon$ -ITAM parecía ser muy estable y cumplía requerimientos de unión similares a los de la asociación de la subunidad p85 $\alpha$  de la PI 3-quinasa al receptor de PDGF- $\beta$  fosforilado [Kazlauskas and Cooper (1990)]. Así, cuando los péptidos CT26P unidos a bolitas de Sepharose con las proteínas asociadas fueron lavados en un detergente noiónico, NP-40, y posteriormente incubados 15 min en soluciones que contenían 2 M NaCl o 1 M Urea, no se detectó disociación de la PI 3-quinasa (Fig. 14B, carriles 7 y 9, respectivamente). Condiciones de disociación más fuertes, como la presencia de detergentes iónicos (Tampón RIPA con SDS), sólo alteraban parcialmente la unión de la subunidad p85 $\alpha$  de PI 3-quinasa al péptido CT26P (Fig. 14B, carril 8). Estos experimentos indican la alta afinidad y la especificidad de la asociación de la subunidad p85 $\alpha$  de PI 3-quinasa con el ITAM de CD3- $\epsilon$  fosforilado.

Comparamos la eficiencia de la unión de la subunidad p85 $\alpha$  de PI 3-quinasa al ITAM de CD3- $\epsilon$  doblemente fosforilado con la alta afinidad de unión de ZAP-70 al ITAM de CD3- $\epsilon$  que ya ha sido previamente descrita [Osman et al. (1996)]. Un control negativo en estos experimentos era la comparación con la unión presumiblemente de baja afinidad de Grb-2 al ITAM de CD3- $\epsilon$ . Como se observa en la figura 14, p85 $\alpha$  y ZAP-70 se unían en diferentes concentraciones al péptido del ITAM de CD3- $\epsilon$  doblemente fosforilado (CT26P), mientras que Grb-2 sólo se unía a la concentración más alta de péptido utilizada, sugiriendo la existencia de una jerarquía de las proteínas que

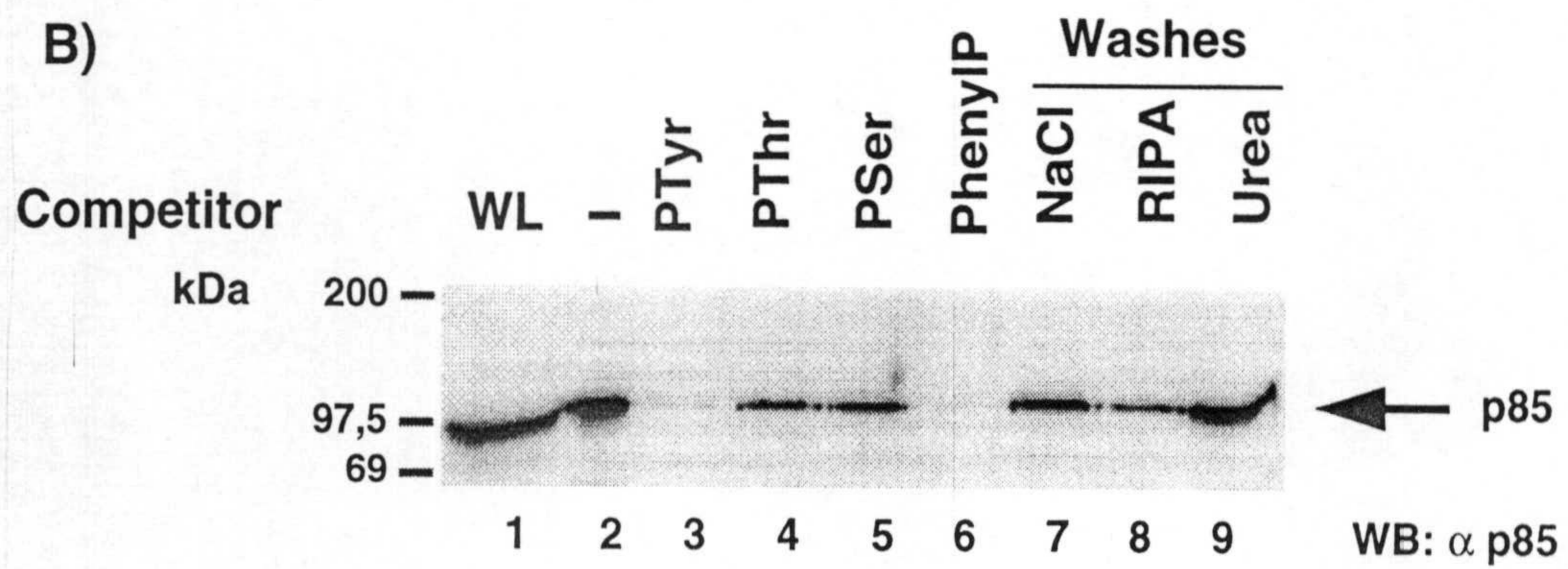
contienen dominios SH2 para unirse a el ITAM de CD3- $\epsilon$  dóblemente fosforilado: p85>ZAP-70>>Grb-2.

**Figura 14. Requerimientos de la interacción entre la subunidad p85 $\alpha$  de la PI 3-quinasa y el ITAM de CD3- $\epsilon$ .** A)  $10 \times 10^6$  de células Jurkat por punto fueron lisadas en tampón de lisis 1% NP-40. Los lisados celulares fueron preaclarados con Lisina-Sepharose e incubados con la matriz de afinidad CT26P con (carriles 3-6) o sin (carril 2) fosfotirosina soluble como competidor a 80 mM (carril 3), 20 mM (carril 4), 10 mM (carril 5) y 1 mM (carril 6). Las proteínas unidas fueron separadas en un gel SDS-PAGE 12,5%, transferidas a una membrana de PVDF y realizado un Western-Blot anti-p85 $\alpha$  PI 3-quinasa pAb. Las bandas fueron visualizadas mediante el método de ECL. WL lisado celular (carril 1). B)  $20 \times 10^6$  células Jurkat por punto fueron lisadas en tampón de lisis 1% NP-40. Los lisados celulares fueron preaclarados con Lisina-Sepharose e incubados con la matriz CT26P en presencia (carriles 3-6) o ausencia (carril 2 y 7-9) de los siguientes competidores: carril 3, 80 mM P<sub>tyr</sub>, carril 4, 80 mM P<sub>Thr</sub>, carril 5, 80 mM P<sub>ser</sub> y carril 6, 50 mM FenilP. Tras 1 hora de incubación algunas muestras (carriles 7-9) fueron lavadas e incubadas durante 15 min con 2 M NaCl (carril 7), tampón RIPA (carril 8) y 1 M urea (carril 9). Las proteínas unidas a las bolitas fueron separadas en un gel SDS-PAGE 12,5%, transferidas a una membrana de PVDF y realizado un Western-Blot anti-p85 $\alpha$  PI 3-quinasa pAb. Las bandas fueron visualizadas mediante el método de ECL. WL lisado celular (carril 1). C-E)  $10 \times 10^6$  de células Jurkat por punto fueron lisadas con tampón de lisis 1% NP-40. Los lisados celulares (WL: lisado total, carril 1) fueron preaclaradas con Lysina-Sepharose e incubadas con la matriz de afinidad CT26P a diferentes concentraciones. 10  $\mu$ l de CT26P (1.5  $\mu$ M) (carril 2), 1  $\mu$ l (150 nM) (carril 3), 0,1  $\mu$ l (15 nM) (carril 4) y sin CT26P (carril 5). Las proteínas unidas a las bolitas fueron separadas en un gel SDS-PAGE 12,5%, transferidas a una membrana de PVDF y realizado un Western-Blot con C) anti-p85 PI 3-quinasa pAb. D) anti-ZAP-70. E) anti-Grb-2.

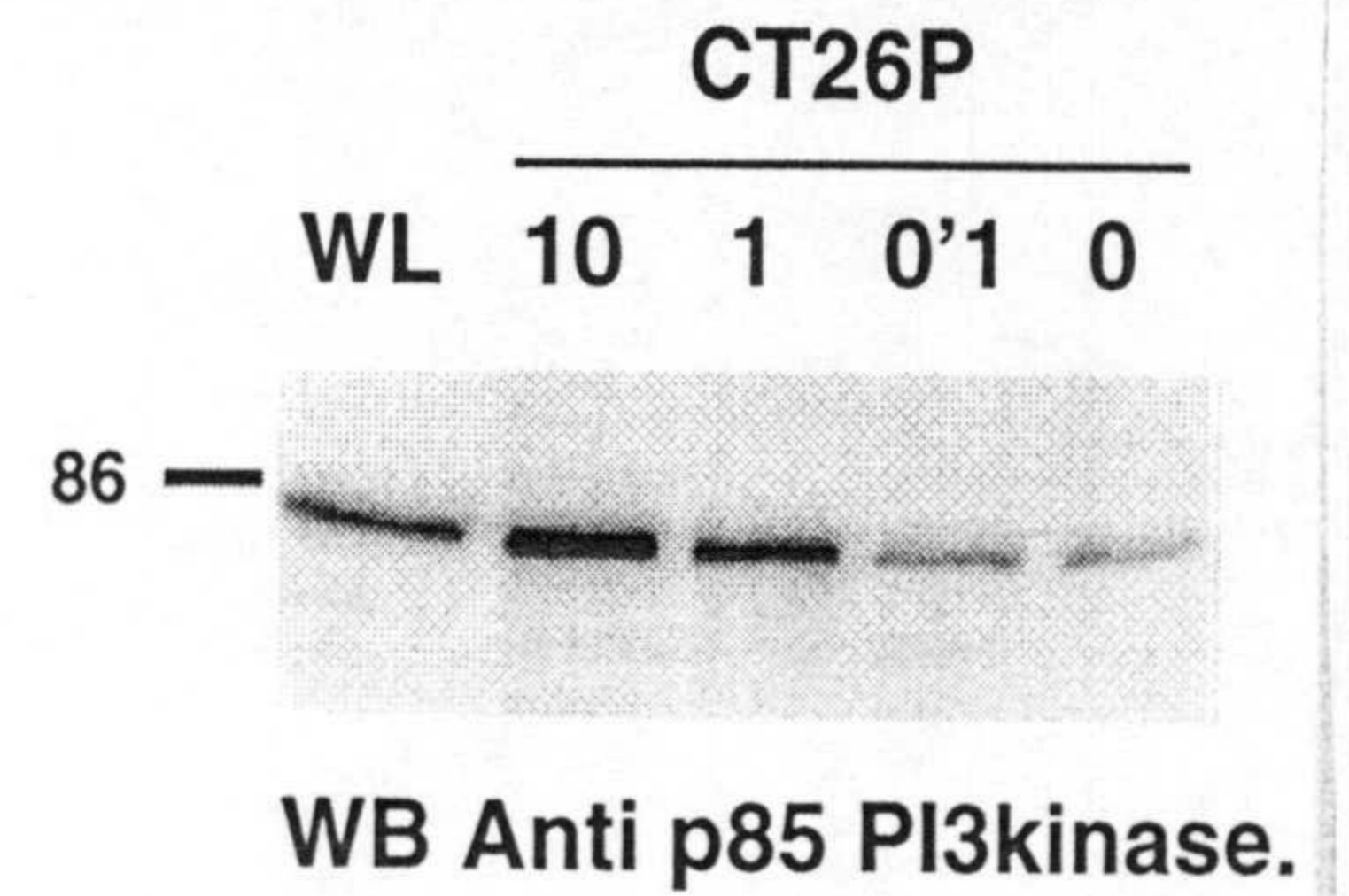
A)



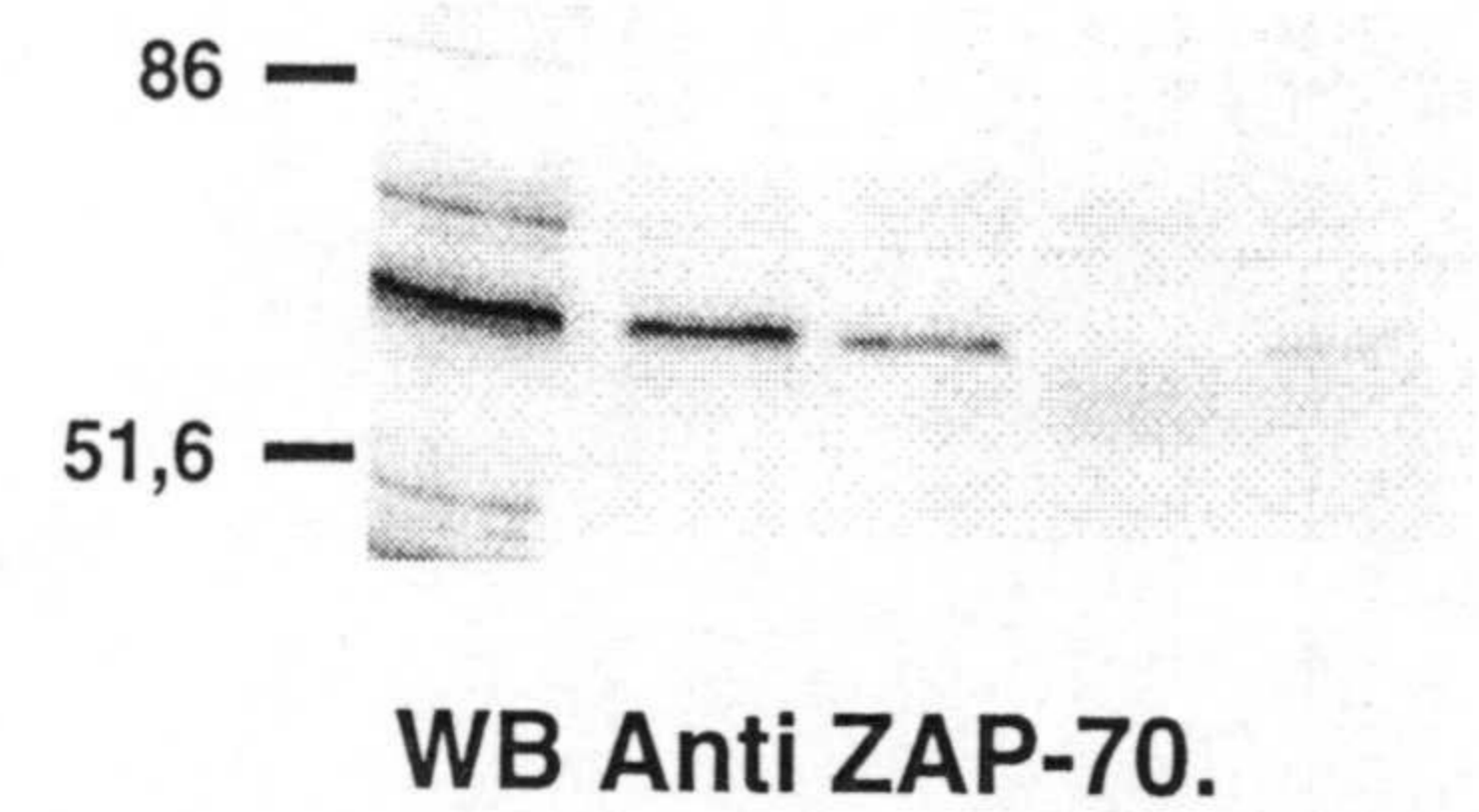
B)



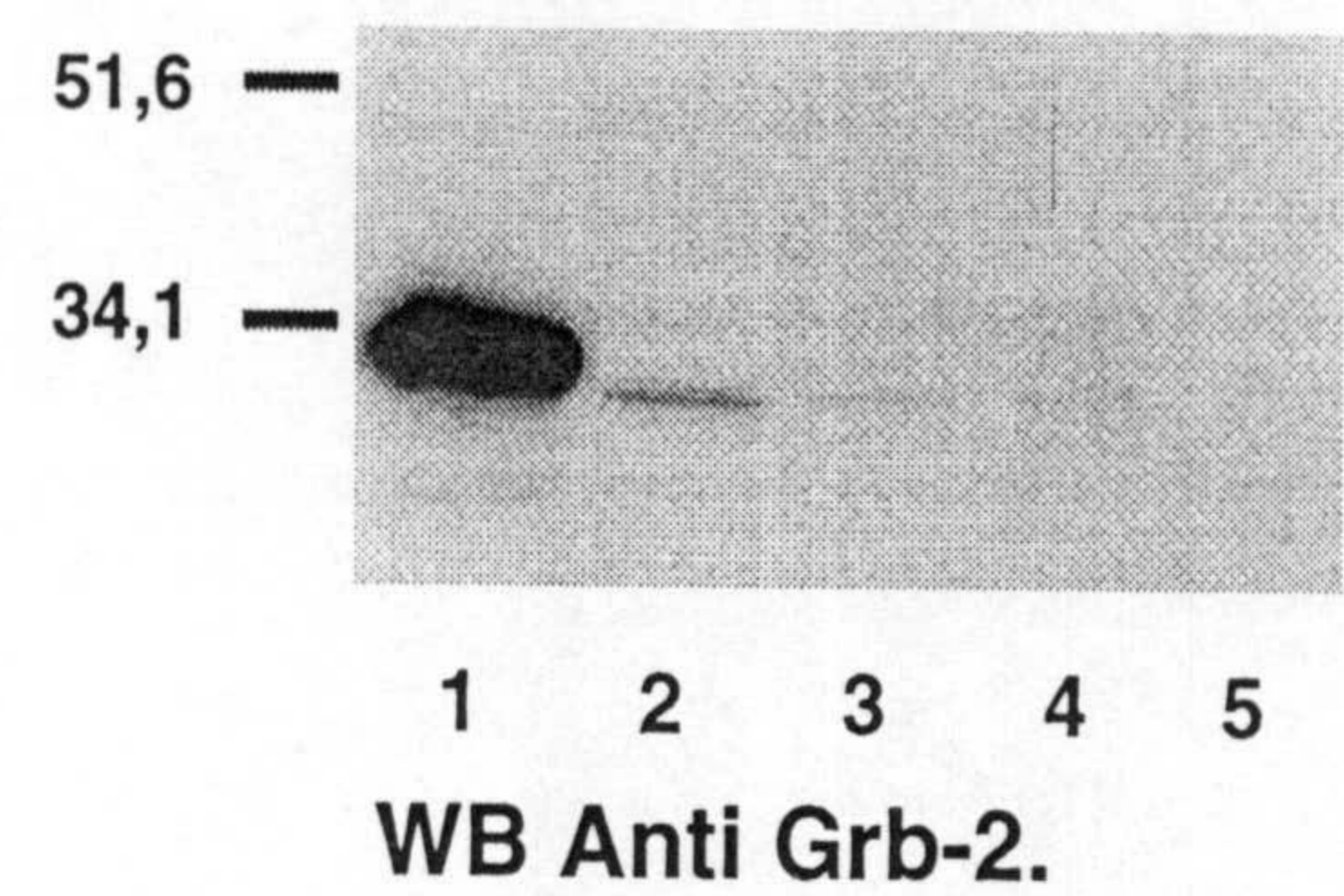
C)



D)



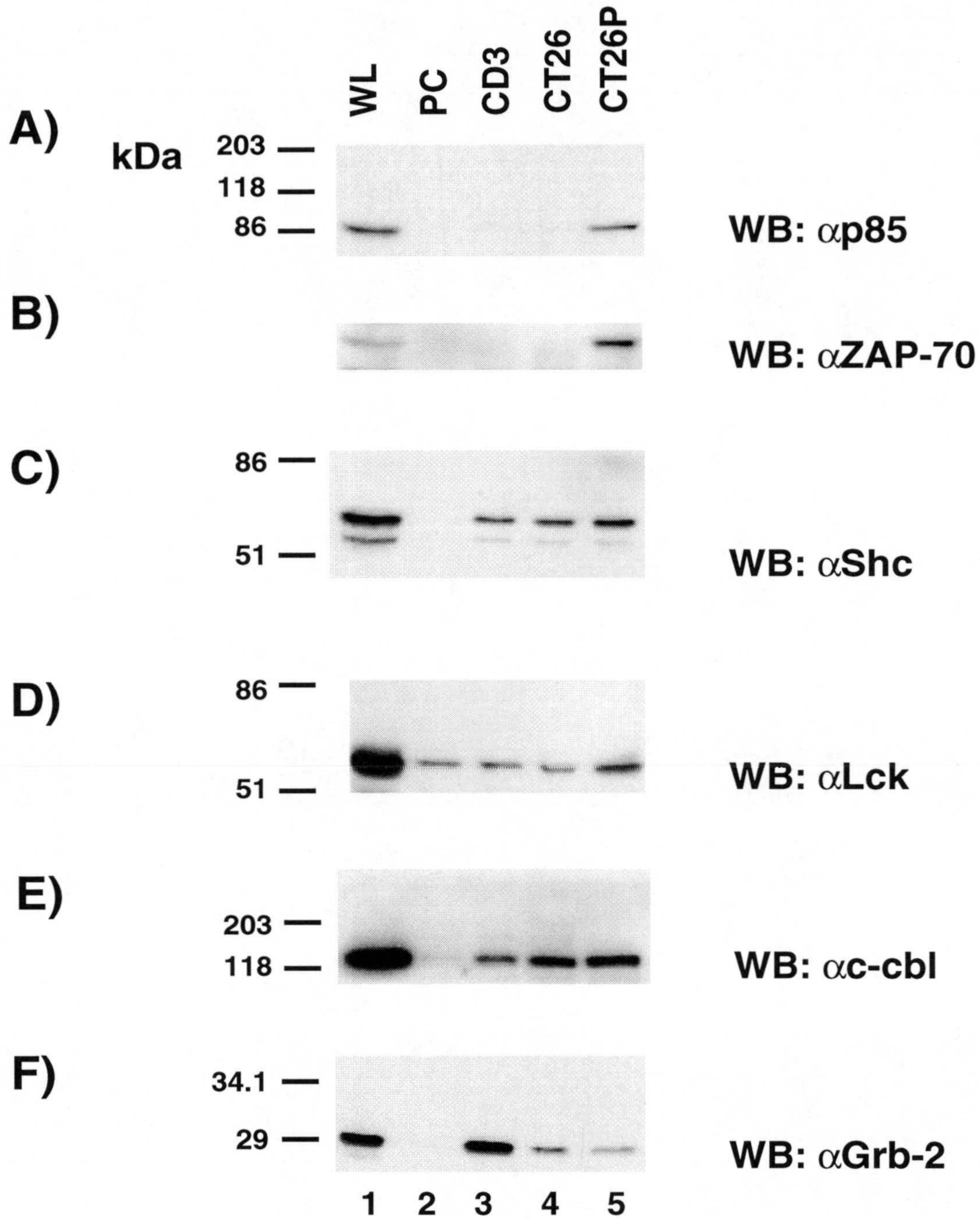
E)



#### IV.3.3. Comparación de la unión de p85 $\alpha$ , ZAP-70, Shc, Lck, Cbl y Grb-2 al ITAM de CD3- $\epsilon$ no fosforilado y doblemente fosforilado.

Las interacciones específicas de alta afinidad entre dominios SH2 individuales de la subunidad p85 $\alpha$  de PI 3-quinasa y residuos de tirosina fosforilados (Y<sup>PO4</sup>) parecen preferir metionina como el tercer aminoácido en la posición C-terminal tras la Y<sup>PO4</sup> (Y<sup>PO4</sup>-X-X-M), mientras que los dominios SH2 de ZAP-70, Shc, y Fyn requieren la secuencia consenso de unión Y<sup>PO4</sup>-X-X-L/I presente en el ITAM de CD3- $\epsilon$  [Songyang et al. (1993; Yoakim et al. (1994)]. El dominio SH3 de Fyn podría unirse a los motivos ricos en prolina en p85 y el dominio SH3 de la subunidad p85 de la PI 3-quinasa podría unirse a las regiones ricas en prolina de la zona N-terminal de Shc o Cbl. Cualquiera de estas moléculas podría ser un candidato como intermediario entre el ITAM fosforilado de CD3- $\epsilon$  y la subunidad p85 $\alpha$  de PI 3-quinasa. También hay que destacar que la fosforilación de las dos tirosinas del ITAM CD3- $\epsilon$  puede crear un sitio de unión más fuerte para proteínas con dominios SH2 en tandem (como ZAP-70 o la subunidad p85 de PI 3-quinasa) que para proteínas con un sólo dominio SH2 (como Fyn, Lck, Shc, etc). La posibilidad de una unión directa entre p85 y el ITAM de CD3- $\epsilon$  tampoco debe ser excluida.

Se realizaron análisis mediante Western Blot para determinar si varias de las proteínas que poseen dominios SH2 como la subunidad p85 $\alpha$  de PI 3-quinasa, ZAP-70, Shc, Lck, Cbl y Grb-2 podían unirse selectivamente al péptido del ITAM de CD3- $\epsilon$  doblemente fosforilado en tirosina con respecto a péptido no fosforilado. Se utilizó también el péptido correspondiente a la cadena citoplasmática de CD3- $\epsilon$  completa. La figura 14 muestra que las interacciones entre las proteínas con dominios SH2 y el ITAM de CD3- $\epsilon$  eran bastante selectivas dependiendo del estado de fosforilación del péptido usado. Así, proteínas con dos dominios SH2 en tandem como la subunidad p85 $\alpha$  de la PI 3-quinasa y ZAP-70 se unían exclusivamente al péptido del ITAM de CD3- $\epsilon$  doblemente fosforilado (Fig. 15A y B, respectivamente). Mientras, proteínas con un solo dominio SH2 se unían a los péptidos fosforilados y no fosforilados con diferentes niveles de eficiencia (Fig. 15). Lck y en menor grado, Shc mostraban una unión preferencial al péptido fosforilado comparado con los péptidos no fosforilados (Fig. 15D y C, respectivamente). Por el contrario, Grb-2 que se unía débilmente a los dos péptidos que comprenden el ITAM de CD3- $\epsilon$  (Fig. 15F, carriles 4 y 5), interaccionaba fuertemente con el péptido correspondiente a la cola citoplasmática completa de CD3- $\epsilon$  (Fig. 15F, comparar carril 3 con carriles 4 y 5 y con el carril 3 de otros paneles). Cbl, que no contiene dominios SH2, se unía a todos los péptidos probados (Fig. 15E).



*Figura 15. Comparación de la unión de p85 $\alpha$ , ZAP-70, Shc, Lck, Cbl y Grb-2 al ITAM de CD3- $\epsilon$  no fosforilado y doblemente fosforilado.  $10 \times 10^6$  células Jurkat por punto fueron lisadas en tampón de lisis 1% NP-40. Los lisados celulares (WL, carril 1) fueron preacclarados con lisina-Sepharose (PC, carril 2) e incubados con  $0.75 \mu\text{M}$  CD3 (carril 3),  $1,5 \mu\text{M}$  CT26 (carril 4),  $1,5 \mu\text{M}$  CT26P (carril 5). Las proteínas unidas a las bolitas fueron analizadas por SDS-PAGE 12,5%, transferidas a membranas de PVDF y realizados Western-Blot con A) anti-p85  $\alpha$  pAb. B) anti-ZAP-70. C) anti- Shc pAb. D) anti-Lck (CT) pAb. D) anti-p120 c-Cbl pAb. y F) anti-Grb-2. Las bandas fueron visualizadas mediante el método del ECL.*

#### IV.4. Estudio de la interacción entre la subunidad p85 $\alpha$ de la PI 3-quinasa y la cadena CD3- $\epsilon$ del receptor TCR/CD3 *in vivo* en ratones deficientes en la cadena CD3- $\zeta$ .

La importancia de la cadena CD3- $\zeta$  en el desarrollo de los linfocitos T se puso de manifiesto mediante el uso de un ratón en el que los genes que codifican la cadena CD3- $\zeta$  fueron inactivados por recombinación homóloga [Liu et al. (1993; Malissen et al. (1993; Shores and Love (1996; Shores and Love (1997)]. El timo de los ratones  $\zeta^{-/-}$  tiene un tamaño reducido y el fenotipo de los timocitos demuestra la ausencia de la cadena CD3- $\zeta$ . El desarrollo de los linfocitos T está inhibido. Los ratones  $\zeta^{-/-}$  presentan sobre todo células T doble positivas (CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>) y doble negativas (CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup>). Los timocitos maduros CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup> o CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>-</sup> son muy escasos. Los timocitos y los linfocitos T del ratón  $\zeta^{-/-}$  presentan niveles muy bajos de TCR/CD3 en su superficie. A pesar de la escasez de células CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup> y CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>-</sup> en el timo, en la periferia de estos animales se detecta un mayor número y parecen acumularse con los años. Bajos niveles de CD3- $\epsilon$  han sido detectados en la superficie de estas células mediante citometría de flujo. También se han creado ratones en los que se reconstituye el ratón  $\zeta^{-/-}$  con una cadena  $\zeta$  que carece de las secuencias necesarias para la transducción de las señales. Esta proteína es capaz de dimerizar y de ensamblarse con los otros componentes del TCR y restablecer la expresión en superficie del complejo TCR/CD3. En estos ratones se restablece el número de timocitos y linfocitos T hasta la normalidad. Estos experimentos favorecen un modelo cuantitativo en los procesos de desarrollo de los timocitos y en el que las cadenas CD3- $\epsilon$  y  $\zeta$  contribuyen igualmente al potencial de señalización del complejo TCR/CD3 [Shores and Love (1996)].

Queríamos estudiar la asociación de CD3- $\epsilon$  con la PI 3-quinasa en linfocitos T de ratón. Los ratones  $\zeta^{-/-}$  ofrecían la posibilidad de estudiar esta asociación en células carentes de CD3- $\zeta$  de modo que la subunidad p85 de la PI 3-quinasa podía unirse a CD3- $\epsilon$  sin presentar ningún tipo de competición por parte de la cadena CD3- $\zeta$  y el ITAM  $\zeta_A$  de la misma.

Utilizamos células extraídas del bazo y nódulos linfáticos de ratones salvajes y  $\zeta^{-/-}$ . Los eritrocitos fueron eliminados de la suspensión celular mediante lisis y los monocitos, granulocitos y linfocitos B fueron separados mediante el uso de anticuerpos unidos a bolitas magnéticas. Muestras de las suspensiones de linfocitos T fueron teñidas con anticuerpos anti-CD4, anti-CD3 y anti-CD8 unidos a sustancias fluorescentes y se midió la pureza de la preparación mediante citometría de flujo. La figura 16 muestra el análisis de citometría de flujo de las muestras de linfocitos T de ratones salvajes y  $\zeta^{-/-}$ .

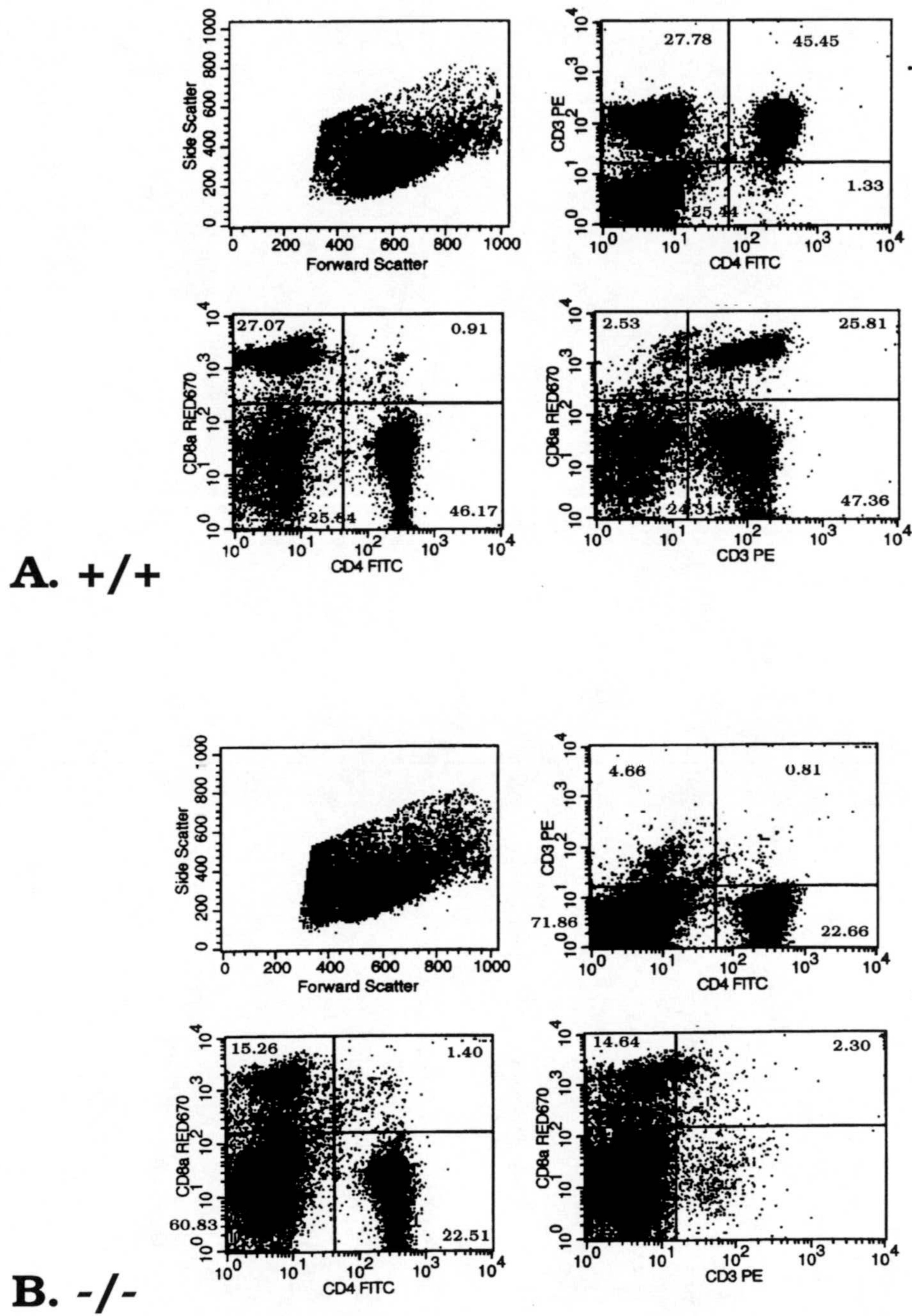


Figura 16. Análisis de la pureza de la preparación de linfocitos T extraídos de bazo y nódulos linfáticos de ratones salvajes y  $\zeta^{-/-}$ . Las células de ratón salvaje (A) y de ratón  $\zeta^{-/-}$  (B) fueron examinadas para establecer la expresión en la superficie celular de CD3- $\epsilon$ , CD4 y CD8 así como la pureza de la preparación de linfocitos T. Las células fueron marcadas mediante anticuerpos monoclonales anti-CD3 PE, anti-CD4 FITC y anti-CD8a RED670. Se realizó un análisis de citometría de flujo en dos colores. Se ha indicado el porcentaje de células en cada cuadrante.



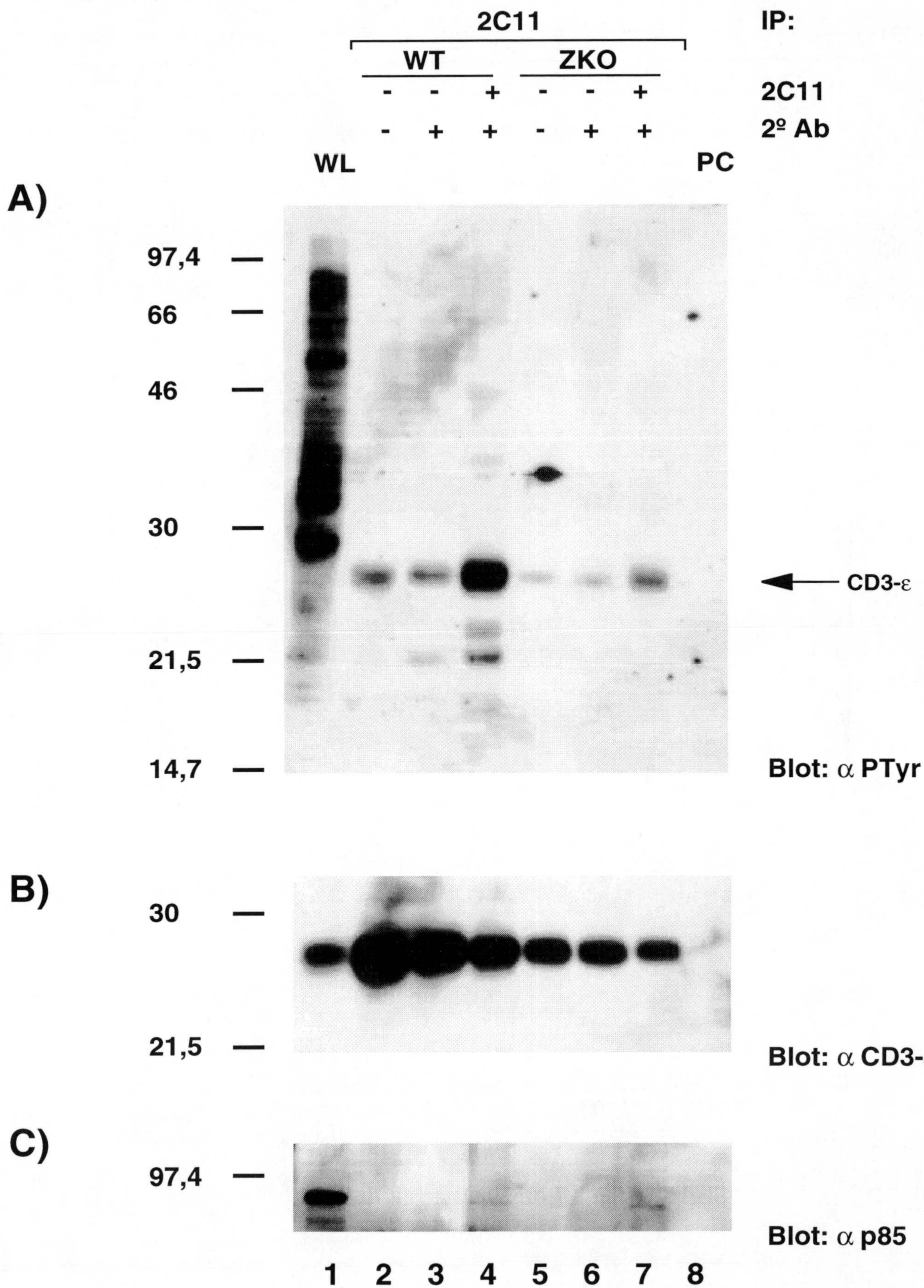
Los linfocitos T obtenidos fueron estimulados con un anticuerpo anti-CD3 de ratón hecho en hamster, 2C11, más un segundo anticuerpo de cabra anti-hamster. La cadena CD3- $\epsilon$  fue inmunoprecipitada mediante el anticuerpo 2C11. En las células de ratones salvajes no estimuladas existía una fosforilación basal en tirosina de CD3- $\epsilon$  (Fig. 17A, carril 2). La estimulación de las células con el segundo anticuerpo exclusivamente no provocaba un aumento de la fosforilación basal observada (Fig. 17A, carril 3) mientras que la activación de las células con el anticuerpo 2C11 más el segundo anticuerpo provocaba un aumento en la fosforilación de CD3- $\epsilon$  muy pronunciado (Fig. 17A, carril 4). En las células de ratones  $\zeta^{-/-}$  también existía una fosforilación basal de CD3- $\epsilon$  pero menor que el caso de células sin estimular de ratones salvajes (Fig. 17A, comparar carriles 4 y 2). Esta diferencia de fosforilación probablemente se debía a la menor cantidad de CD3- $\epsilon$  inmunoprecipitada (Fig. 17B, comparar carriles 5, 6 y 7 con 2, 3 y 4). Esto pone de manifiesto que para un mismo número de linfocitos T utilizados para la inmunoprecipitación la cantidad de CD3- $\epsilon$  inmunoprecipitada en las células de ratones  $\zeta^{-/-}$  es menor. La utilización sólo del segundo anticuerpo para estimular las células aisladas de ratones  $\zeta^{-/-}$  no aumentaba la fosforilación basal de CD3- $\epsilon$  (Fig. 17A, carril 6). El uso del anticuerpo específico 2C11 más un segundo anticuerpo si provocaba un incremento en la fosforilación en tirosina de CD3- $\epsilon$  (Fig. 17A, carril 7). Estos resultados demuestran que a pesar de la ausencia de la cadena CD3- $\zeta$  los linfocitos T aislados de ratones  $\zeta^{-/-}$  pueden activarse mediante un estímulo correcto que actúe sobre los escasos receptores TCR/CD3 presentes en su membrana extracelular.

Realizamos un Western-Blot anti-p85 $\alpha$  PI 3-quinasa sobre la membrana. La subunidad p85 $\alpha$  de la PI 3-quinasa estaba asociada a la cadena CD3- $\epsilon$  inmunoprecipitada en células de ratón salvaje estimuladas con 2C11 más segundo anticuerpo mientras que no se asociaba en células no estimuladas o estimuladas con segundo anticuerpo sólomente (Fig. 17C, comparar carril 4 con carriles 2 y 3). La asociación era débil cuantitativamente hablando. La asociación se producía tras la estimulación de los linfocitos T mediante el anticuerpo específico y la fosforilación de CD3- $\epsilon$ , pero no se observaba en las células sin estimular a pesar de que presentaban una fosforilación basal (Fig. 17A, comparar carriles 4 y 2). En los ratones  $\zeta^{-/-}$  se observaba la asociación de la subunidad p85 de la PI 3-quinasa a la cadena CD3- $\epsilon$  tras la activación de los receptores TCR/CD3 que existen en la membrana (Fig. 17C, carril 7). Las células no estimuladas o estimuladas con segundo anticuerpo sólomente no presentaban ningún tipo de asociación de la PI 3-quinasa con la cadena CD3- $\epsilon$  inmunoprecipitada (Fig. 16C, carriles 5 y 6). La cantidad de p85 co-inmunoprecipitada con CD3- $\epsilon$  en ratones  $\zeta^{-/-}$  era mayor que la inmunoprecipitada en asociación con CD3- $\epsilon$  en ratones salvajes (Fig. 17C, comparar carriles 7 y 4) a pesar de que la cantidad

---

de CD3- $\epsilon$  inmunoprecipitada era menor en ratones  $\zeta^{-/-}$  (Fig. 17B, comparar carriles 7 y 4).

*Figura 17. La subunidad p85 $\alpha$  de la PI 3-quinasa se asocia a la cadena polipeptídica CD3- $\epsilon$  en linfocitos T de ratón salvaje y ratón  $\zeta^{-/-}$ . 7,5 X 10<sup>6</sup> de linfocitos T extraídos de bazo y nódulos linfáticos de ratón salvaje (carriles 2, 3 y 4) y ratón  $\zeta^{-/-}$  (carriles 5, 6 y 7) fueron estimulados con 5  $\mu$ g/10<sup>7</sup> cels de anticuerpo anti-CD3- $\epsilon$ , 2C11 (carriles 4 y 7), 20  $\mu$ g/10<sup>7</sup> cels de anticuerpo de cabra anti-hamster (carriles 3, 4, 6 y 7) o no estimulados (carriles 2 y 5). Las células fueron lisadas en un tampón de lisis 1% NP-40 y los lisados celulares (WL, carril 1) fueron preaclarados con BSA-Sepharose y posteriormente inmunoprecipitados con 5  $\mu$ g/10<sup>7</sup> cels de 2C11. Las proteínas fueron separadas mediante un gel SDS-PAGE 12,5%, transferidas a una membrana de PVDF y realizado un Western-Blot con: A) anti-fosfotirosina RC20. B) anti-CD3- $\epsilon$  pAb. C) anti-p85 $\alpha$  PI 3-quinasa pAb. Las bandas fueron visualizadas mediante el método de ECL.*



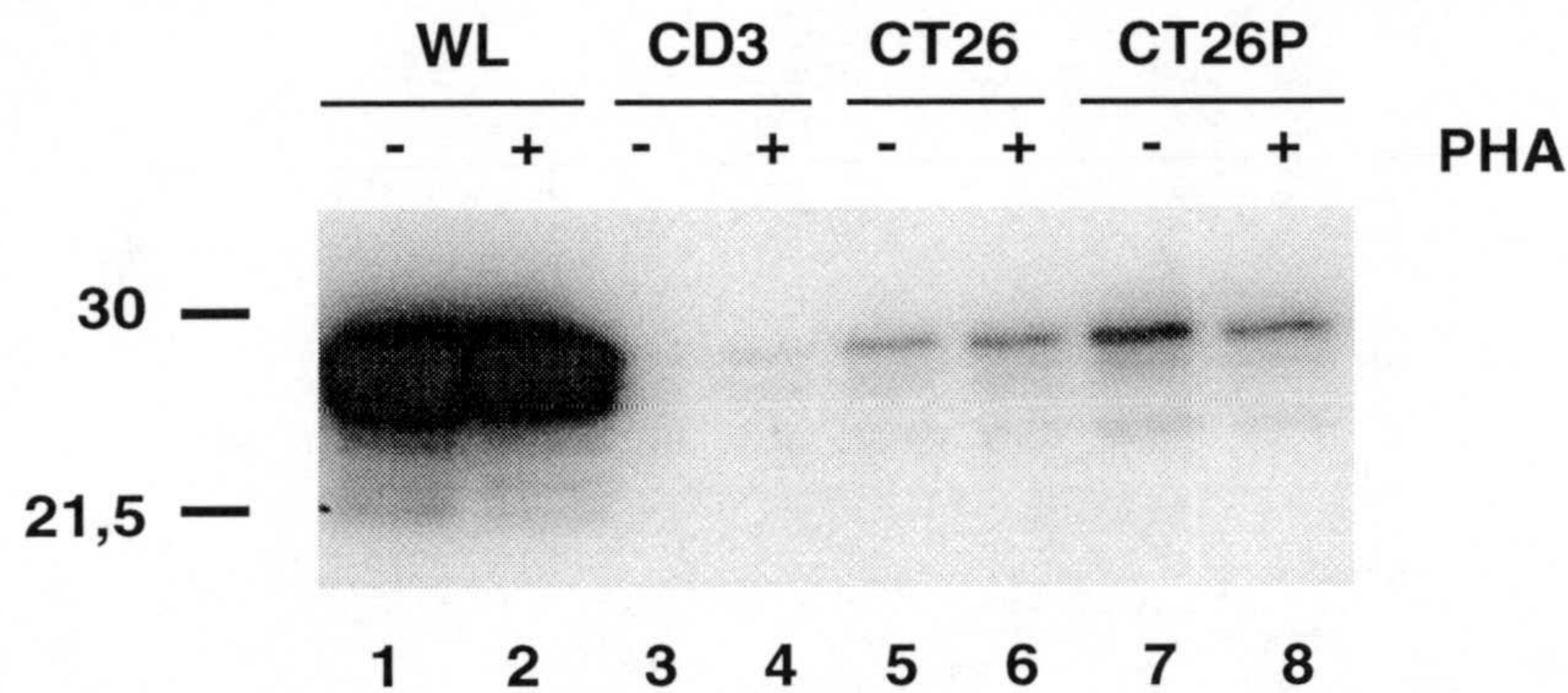
#### **IV.5. Estudio de la interacción de la cadena CD3- $\epsilon$ con proteínas pequeñas de unión a GTP.**

A diferencia de las proteínas hetero-triméricas de gran tamaño que unen GTP, existen unas proteínas relacionadas con Ras que son de pequeño tamaño (22 a 30 kDa) y monoméricas. Todas tienen la misma función bioquímica, la unión e hidrólisis del GTP. La superfamilia Ras de proteínas de unión a GTP se pueden subdividir en 3 grandes grupos; las subfamilias Ras, Rho y Rab. Cada una parece estar involucrada en áreas diferentes de la biología celular. Las proteínas Ras están presentes en puntos de control de la transducción de señales y la proliferación celular. Las proteínas Rho parecen regular la organización de la red del citoesqueleto y las Rab están relacionadas con el control del tráfico entre membranas intracelulares [Chavrier et al. (1993)].

Estudios previos demuestran que la cadena CD3- $\zeta$  contiene un lugar de unión a GTP. La lisina 128 y la glicina 134 de CD3- $\zeta$  están implicadas en la asociación [Peter et al. (1992)]. Esta asociación puede ser modulada por señales extracelulares y sugiere que el papel del GTP unido a CD3- $\zeta$  es relacionar el TCR con otros mecanismos de señales de transducción [Sancho et al. (1993)]. Un fenómeno similar ocurre con la cadena CD3- $\gamma$ . Sin embargo, esta cadena carece de una secuencia consenso de unión a GTP por lo que se postula la unión de CD3- $\gamma$  a GTP mediante una proteína adaptadora que una GTP. La unión se produce ya desde el RE y podría estar relacionada con alguna etapa temprana en la formación y transporte del TCR/CD3 [Peter et al. (1993)].

El método de ensayo de unión a GTP (GTP overlay) es el más adecuado para la detección de pequeñas proteínas de unión a GTP ya que las subunidades  $\alpha$  de las proteínas de unión a GTP hetero-triméricas no pueden ser detectadas [Huber et al. (1994)].

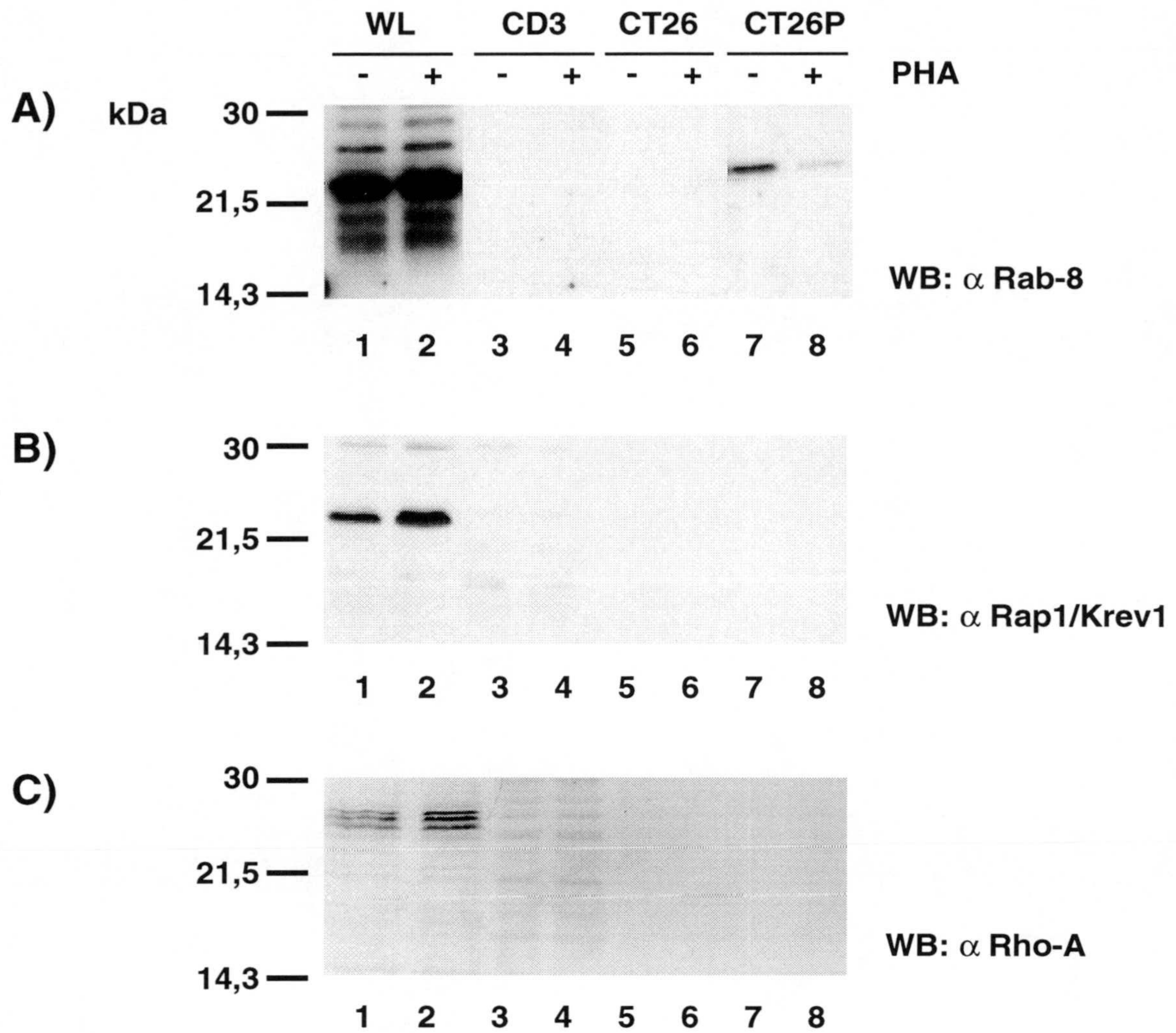
Utilizamos células Jurkat no estimuladas o estimuladas con PHA y las incubamos con las bolitas de Lisina-Sepharose unidas a los péptidos que representan el ITAM de CD3- $\epsilon$  fosforilado y no fosforilado y la cadena CD3- $\epsilon$  completa. Realizamos un ensayo de unión a GTP sobre la membrana de nitrocelulosa donde habíamos transferido las proteínas unidas a los péptidos. En la autoradiografía se podía observar la asociación de pequeñas proteínas de unión a GTP al péptido CT26 (Fig. 18, carriles 4 y 5) y a CT26P (Fig. 18, carriles 6 y 7). Estas proteínas tienen pesos moleculares comprendidos entre 30 y 21,5 kDa. La cantidad de GTP [ $\alpha^{32}\text{P}$ ] unido a las proteínas asociadas a CT26P era mayor, lo que podía evidenciar una mayor cantidad de proteínas pequeñas de unión a GTP asociada al péptido fosforilado. No había prácticamente asociación de pequeñas proteínas de unión a GTP al péptido CD3.



*Figura 18. Ensayo de unión a GTP de las proteínas precipitadas por los péptidos CT26, CT26P y CD3.  $10 \times 10^6$  células Jurkat por punto fueron estimuladas (carriles 2, 4, 6 y 8) o no estimuladas (carriles 1, 3, 5 y 7) con PHA, 5 min a 37°C. Las células fueron lisadas en tampón de lisis 1% NP-40. Los lisados celulares (WL, carril 1 y 2) fueron preacclarados con lisina-Sepharose e incubados con 0.75  $\mu$ M CD3 (carril 3 y 4), 1,5  $\mu$ M CT26 (carril 5 y 6), 1,5  $\mu$ M CT26P (carril 7 y 8). Las proteínas unidas a las bolitas fueron analizadas por SDS-PAGE 12,5%, transferidas a membranas de nitrocelulosa y realizado un ensayo de unión a GTP. El GTP [ $\alpha^{32}$ P] unido a las proteínas de pequeño peso molecular que unen GTP se visualizó mediante autoradiografía.*

Queríamos identificar las proteínas que unen GTP que habían sido precipitadas junto a los péptidos. Para ello limpiamos la membrana de nitrocelulosa y eliminamos el GTP [ $\alpha^{32}$ P] asociado a las proteínas. Posteriormente realizamos un Western-Blot frente a pequeñas proteínas de la familia Ras. Los Western-Blot anti Rho-A y Rap/Krev resultaron negativos (Fig. 19C y B), no detectándose ninguna de estas proteínas asociadas a los péptidos que representan la región citoplasmática de la cadena CD3- $\epsilon$  no fosforilado o el ITAM de CD3- $\epsilon$  fosforilado o no fosforilado.

El Western-Blot anti Rab-8 mostraba que había una asociación preferencial de esta proteína por el ITAM fosforilado en tirosina de CD3- $\epsilon$  (Fig. 19A, carriles 7 y 8), mientras que Rab-8 no se asociaba al ITAM no fosforilado de CD3- $\epsilon$  o al dominio citoplasmático completo de CD3- $\epsilon$  no fosforilado (Fig. 19A, carriles 3 a 6). La proteína Rab-8 aparecía fuertemente asociada a CT26P en células no estimuladas mientras que dicha asociación se reducía en células estimuladas con PHA (Fig. 19A, comparar carriles 7 y 8). Estos experimentos demuestran la existencia de una asociación de pequeñas proteínas de unión a GTP asociadas al ITAM de la cadena CD3- $\epsilon$ . No todas las proteínas han podido ser identificadas. Rab-8 fue la única de las proteínas probadas mediante Western-Blot que fue identificada en asociación a los péptidos. Rab-8 se une exclusivamente al péptido que representa al ITAM de CD3- $\epsilon$  fosforilado.



**Figura 19.** Rab-8 se asocia específicamente al ITAM de CD3-ε fosforilado en tirosina.  $10^6$  células Jurkat por punto fueron estimuladas (carriles 2, 4, 6 y 8) o no estimuladas (carriles 1, 3, 5 y 7) con PHA, 5 min a 37°C. Las células fueron lisadas en tampón de lisis 1% NP-40. Los lisados celulares (WL, carril 1 y 2) fueron preacclarados con lisina-Sepharose e incubados con 0.75  $\mu$ M CD3 (carril 3 y 4), 1,5  $\mu$ M CT26 (carril 5 y 6), 1,5  $\mu$ M CT26P (carril 7 y 8). Las proteínas unidas a las bolitas fueron analizadas por SDS-PAGE 12,5%, transferidas a membranas de nitrocelulosa y realizado un Western-Blot: A) anti-Rab-8. B) anti-Rap1/Krev1. C) anti-Rho-A. Las bandas fueron visualizadas mediante el método de ECL.

**V. DISCUSSION**

UNIVERSIDAD DE GRANADA

22 SET. 1997

COMISION DE DOCTORADO

## V.1. La asociación de la subunidad p85 $\alpha$ de la PI 3-quinasa y la cadena CD3- $\epsilon$ del complejo TCR/CD3.

### V.1.1. El papel de la PI 3-quinasa en la activación de los linfocitos T.

La PI 3-quinasa actúa en la formación de lípidos D-3 fosfoinosítidos transfiriendo el fosfato terminal del ATP a la posición D-3 del anillo de inositol de los lípidos. De este modo, la PI 3-quinasa puede generar tres productos: fosfatidilinositol-(3)-fosfato, fosfatidilinositol-(3,4)-bifosfato y fosfatidilinositol-(3,4,5)-trifosfato [Ward et al. (1996); Vanhaesebroeck et al. (1997)]. Este último es un importante producto en los procesos de transducción de señales. Existen tres clases de PI 3-quinasa basadas en su especificidad *in vitro* por el lípido sustrato, su estructura y su modo probable de regulación [Vanhaesebroeck et al. (1997)]. La presente en mamíferos tiene una subunidad reguladora p85 y una subunidad catalítica p110. La importancia del papel de la PI 3-quinasa parece residir en la generación de los productos lipídicos y no sólo como un adaptador. El uso de un metabolito fúngico, la wortmanina ha contribuido a aclarar la función de la PI 3-quinasa. La wortmanina es un inhibidor específico de la PI 3-quinasa en concentraciones nanomolares. La wortmanina tiene un efecto inhibitorio en la proliferación de linfocitos T dependiente de la activación del TCR/CD3. La estimulación de los linfocitos T independientemente de señales de co-estimulación también es sensible a la wortmanina. Sin embargo, la wortmanina no afecta a la activación de la fosforilación en tirosina, por lo que se piensa que la PI 3-quinasa actúa por debajo de las tirosinas quinasa [Exley and Varticovsky (1997)].

Ya se había demostrado la asociación de la PI 3-quinasa al fosfopéptido correspondiente a ITAM- $\zeta_A$  [Exley et al. (1994)] y también se ha detectado en inmunoprecipitados de CD3- $\zeta$  [Carrera et al. (1994)]. Otros autores detectaron actividad PI 3-quinasa en inmunoprecipitados de CD3- $\epsilon$  tras la activación del TCR/CD3 [Thompson et al. (1992)] y el presente trabajo viene a constatar la asociación existente entre la subunidad p85 de la PI 3-quinasa y la cadena CD3- $\epsilon$ , así como a definir los residuos dentro del ITAM de CD3- $\epsilon$  implicados en la interacción.

El papel de la subunidad p85 de la PI 3-quinasa se ha visto como una molécula adaptadora que facilitaba la interacción de receptores activados con la subunidad catalítica p110, lo que provocaba la formación de los fosfoinosítidos que actuaban como segundos mensajeros. Sin embargo hay dos situaciones en las que la función de la p85 independientemente de la actividad quinasa son importantes. En la co-estimulación entre p21Ras y la PI 3-quinasa tras la activación de CD28 [August and Dupont (1994); Ward et al. (1996)] y en la asociación entre p85 y Grb-2 [Meisner et al. (1995); Nel et al. (1995)]. De este modo la PI 3-quinasa, actuando como una molécula adaptadora, participa en conectar el TCR/CD3 con las cascadas de señalización como



la activación de p21Ras o los mecanismos en los que participa el complejo p36-Grb-2-Sos.

También se ha observado que las isoenzimas de la PKC son activadas por los lípidos fosfoinosítidos [Toker et al. (1994)]. Hay evidencias de que PI 3-quinasa podría estar implicada en la regulación de las cascadas de señalización que regulan la activación de Erk o Jnk y en la regulación de *c-fos* y *c-jun* [Hu et al. (1995)].

#### **V.1.2. Asociación de la subunidad p85 $\alpha$ de la PI 3-quinasa y la cadena CD3- $\epsilon$ en células Jurkat .**

El complejo TCR/CD3 contiene distintos módulos de transducción de señales denominados ITAM: uno en cada dominio citoplasmático de las cadenas CD3- $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$  y tres en la cadena polipeptídica CD3- $\zeta$ . Los ITAMs se fosforilan en tirosina tras la activación del receptor. La habilidad de las regiones citoplasmáticas de las cadenas CD3 fosforiladas para transducir señales mitogénicas está basada en el reclutamiento de moléculas señalizadoras. La fosforilación en tirosina de los ITAMs de las cadenas CD3- $\epsilon$  y CD3- $\zeta$  es crucial para el reclutamiento de tirosina quinasas y moléculas efectoras al complejo TCR/CD3. Un candidato como molécula señalizadora es la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI 3-quinasa), una enzima clave en las vías señalizadoras.

La activación del linfocito T provoca la asociación de la PI 3-quinasa al TCR y un incremento en los fosfoinosítidos fosforilados en 3'. Se ha descrito un incremento de la actividad PI 3-quinasa asociada a fosfotirosina tras la activación del TCR/CD3. Se demostró que la PI 3-quinasa se asocia con la cadena CD3- $\zeta$  específicamente a través del ITAM  $\zeta_A$  y no del  $\zeta_B$  o  $\zeta_C$ . Esta asociación es máxima con el ITAM  $\zeta_A$  doblemente fosforilado [Exley et al. (1994)]. La actividad PI 3-quinasa sobre los lípidos es de gran importancia en la transducción de señales mediada por el TCR/CD3 como evidencian estudios realizados con wortmanina, un inhibidor de la PI 3-quinasa. La enzima parece actuar tras las tirosina quinasas [Exley and Varticovski. (1997)].

Analizamos la habilidad de la subunidad p85 $\alpha$  de la PI 3-quinasa para unirse a el ITAM de CD3- $\epsilon$ . Los estudios *in vivo* muestran que la subunidad reguladora de la PI 3-quinasa, p85 $\alpha$ , se asocia con CD3- $\epsilon$  en células Jurkat. La interacción ocurre a un nivel basal de fosforilación de CD3- $\epsilon$ , en células sin estimular. Dado que la fosforilación en tirosina es uno de los primeros sucesos que se producen tras la estimulación del TCR/CD3 realizamos un tratamiento con pervanadato, un inhibidor de la actividad tirosina fosfatasa, que provoca un alto nivel de fosforilación en tirosina en las proteínas intracitoplasmáticas así como en la cadena CD3- $\epsilon$  [O'Shea et al. (1992)]. Aunque el pervanadato tienen numerosos efectos no relacionados con la fosforilación

de proteínas en tirosina, el efecto de este compuesto en la movilización de  $Ca^{2+}$  y otros parámetros relacionados con la activación de linfocitos T depende de las PTKs. La estimulación del receptor TCR/CD3 mediante pervanadato provoca un incremento de la asociación de la subunidad p85 $\alpha$  a la cadena CD3- $\epsilon$ . La co-estimulación de las células Jurkat con pervanadato más un anticuerpo específico anti-CD3 provoca un incremento del nivel de fosforilación de CD3- $\epsilon$  así como un incremento de la asociación de la subunidad p85 $\alpha$  de la PI 3-quinasa a la cadena CD3- $\epsilon$ , respecto al nivel de asociación basal en células sin estimular. La subunidad p85 $\alpha$  de la PI 3-quinasa se asocia a la región citoplasmática de la cadena CD3- $\epsilon$  del complejo TCR/CD3 y esta asociación aumenta tras la estimulación del receptor.

**V.1.3. La asociación de la subunidad p85 de la PI 3-quinasa y la región citoplasmática de la cadena CD3- $\epsilon$  no depende de la presencia de otros componentes del complejo TCR/CD3.**

Las distintas cadenas CD3 del complejo TCR/CD3 pueden co-inmunoprecipitar dependiendo del detergente utilizado en la lisis de las células. Para determinar si el dominio citoplasmático de la cadena polipeptídica CD3- $\epsilon$  independientemente del resto de las moléculas CD3 es capaz de asociar la PI 3-quinasa construimos una quimera con el dominio citoplasmático de CD3- $\epsilon$  y el dominio extracelular y transmembrana de CD8. Este tipo de aproximación ya ha sido utilizada con anterioridad para estudiar distintos aspectos de la transducción de señales a través de alguna de las cadenas CD3 independientemente de las demás [Straus and Weiss (1993; Donnadieu et al. (1994)].

En células Jurkat establemente transfectadas con el cDNA que codifica para la quimera CD8- $\epsilon$  la subunidad p85 $\alpha$  de la PI 3-quinasa se asocia a la quimera CD8- $\epsilon$  y la cadena CD3- $\epsilon$  endógena. Esta interacción ocurre a pesar de los distintos niveles basales de fosforilación en tirosina de CD3- $\epsilon$  y CD8- $\epsilon$ , en células sin estimular. Sin embargo, la estimulación de CD3- $\epsilon$  y CD8- $\epsilon$  con OKT3 y OKT8 más un segundo anticuerpo que potencia la estimulación, incrementa la cantidad de p85 $\alpha$  asociada a CD3- $\epsilon$  y CD8- $\epsilon$ . Estos resultados demuestran que el dominio citoplasmático de CD3- $\epsilon$  contiene la información necesaria para la asociación con la PI 3-quinasa. La incapacidad de detectar cadenas CD3 fosforiladas en los inmunoprecipitados de CD8- $\epsilon$  indica que la presencia de la subunidad p85 $\alpha$  de la actividad PI 3-quinasa no se debe a la asociación de la quimera con el complejo TCR/CD3.

El incremento de asociación de la subunidad p85 $\alpha$  de la PI 3-quinasa a la molécula CD3- $\epsilon$  y a la quimera CD8- $\epsilon$  se ve confirmado con el estudio de la actividad PI 3-quinasa asociada a los inmunoprecipitados de CD3- $\epsilon$  y CD8- $\epsilon$ . La actividad PI 3-quinasa asociada a CD3- $\epsilon$  o a la quimera CD8- $\epsilon$  aumenta cuando las células son

estimuladas específicamente con anticuerpos contra el receptor o la quimera respectivamente. El aumento de la actividad PI 3-quinasa asociada es mayor cuando las células son estimuladas con el anticuerpo entrecruzado con un segundo anticuerpo. La actividad PI 3-quinasa reside en la subunidad catalítica p110, por lo que los resultados de actividad evidencian que la enzima PI 3-quinasa completa (p85/P110) se asocia a la región citoplasmática de CD3- $\epsilon$  y que dicha asociación está inducida por la activación del receptor TCR/CD3.

**V.1.4. En linfocitos T periféricos de ratones salvajes y  $\zeta^{-/-}$  la subunidad p85 $\alpha$  de la PI 3-quinasa y la cadena CD3- $\epsilon$  se asocian tras la estimulación del receptor TCR/CD3.**

Para estudiar la importancia de la subunidad CD3- $\zeta$  en el desarrollo de los linfocitos T existe un ratón deficiente en la expresión de CD3- $\zeta$  generado por diana genética, el ratón  $\zeta^{-/-}$  [Love et al. (1993); Malissen et al. (1993); Lin et al. (1997)]. Estos ratones  $\zeta^{-/-}$  tienen muy pocos timocitos CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> y la generación de células CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> o CD4<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> está muy disminuída pero no completamente anulada (<1% del control) [Lin et al. (1997)]. Se pueden encontrar algunas células T en la periferia que expresan niveles muy bajos del receptor TCR/CD3 en superficie. El marcaje de superficie y estudios de inmunoprecipitación revelan que estos complejos están compuestos del heterodímero  $\alpha\beta$  y de las cadenas CD3- $\gamma$ , CD3- $\delta$  y CD3- $\epsilon$  [Liu et al. (1993); Love et al. (1993); Malissen et al. (1993)]. Posteriormente se creó un ratón  $\zeta^{-/-}$  en el que se expresaba una forma de CD3- $\zeta$  truncada. La cadena  $\zeta$  expresada carece de la región intracitoplasmática donde se encuentran los ITAMs de CD3- $\zeta$  [Shores and Love (1997)]. En este ratón se reestablecen los niveles normales de expresión del complejo TCR/CD3, ya que la cadena CD3- $\zeta$  se requiere para la expresión en superficie de las demás subunidades del TCR/CD3 de un modo eficiente. Con estos dos tipos de ratón se pone de manifiesto que el desarrollo de los linfocitos T puede ocurrir en ausencia de señalización a través de CD3- $\zeta$ . Los datos sugieren que la función crítica de CD3- $\zeta$  en el desarrollo es la habilidad de promover la expresión en superficie del TCR/CD3. Las señales transducidas por los otros componentes del CD3 parecen suficientes para mediar la selección y maduración de los timocitos [Shores et al. (1994); Shores et al. (1997)].

El ratón  $\zeta^{-/-}$  es un buen medio para estudiar *in vivo* si la transducción de señales a través de CD3- $\epsilon$  tras la estimulación del TCR/CD3 induce la asociación de la PI 3-quinasa al receptor. La ausencia de la cadena polipeptídica CD3- $\zeta$  en los linfocitos T de ratón  $\zeta^{-/-}$  permite estudiar las interacciones de CD3- $\epsilon$  con otras moléculas efectoras sin la posible competencia que los ITAMs de CD3- $\zeta$  pueden suponer. En los linfocitos de ratones salvajes se produce una asociación de la subunidad p85 $\alpha$  de la PI

3-quinasa a la cadena CD3- $\epsilon$  inducida por la activación del receptor TCR/CD3. Esta asociación se reproduce en las mismas condiciones de estimulación en linfocitos T de ratones  $\zeta^{-/-}$ . Los niveles de asociación de la subunidad p85 de la PI 3-quinasa a la cadena polipeptídica CD3- $\epsilon$  en ratones  $\zeta^{-/-}$  son superiores a los que se observaban asociados a la cadena CD3- $\epsilon$  inmunoprecipitada en linfocitos T de ratones salvajes. Este resultado pone de manifiesto que la ausencia de la cadena CD3- $\zeta$  permite una mayor asociación de p85 a CD3- $\epsilon$ . También demuestran que la estimulación de un complejo receptor carente de CD3- $\zeta$  puede provocar la transducción de señales de activación. Estos resultados no prueban diferencias cualitativas entre los ITAMs de las subunidades CD3- $\zeta$  y CD3- $\epsilon$ , sino que sugieren diferencias de tipo cuantitativo. Estos experimentos y resultados previos de Shores, E. et al [Shores et al. (1997)] parecen ser indicativos de que los múltiples ITAMs en el complejo TCR/CD3 funcionarían principalmente como amplificadores de la señal inducida en el TCR/CD3.

**V.1.5. La asociación de la subunidad p85 $\alpha$  de la PI 3-quinasa y la cadena CD3- $\epsilon$  depende de la actividad tirosina quinasa.**

La inducción de la fosforilación en tirosina es uno de los fenómenos iniciales en la señalización tras la estimulación del TCR/CD3 [Straus and Weiss (1993)]. Ninguno de los polipéptidos del complejo TCR/CD3 tiene actividad quinasa intrínseca. Sin embargo, la estimulación del TCR/CD3 por el antígeno o anticuerpos anti-TCR activa la vía de las PTKs, que provoca la fosforilación en tirosina de varias proteínas celulares [Chan et al. (1994)]. El papel de la fosforilación en tirosina en la activación del TCR/CD3 se pone de manifiesto en estudios en los que se tratan los linfocitos T con inhibidores de las PTKs, como la herbimicina A que disminuye significativamente la función del TCR/CD3 [June et al. (1990)]. Tanto fenómenos proximales mediados por el TCR/CD3 (como la activación de la vía del fosfatidilinositol con la elevación del calcio intracelular y activación de PKC y Ras) como fenómenos distales mediados por el TCR (como la producción de linfoquinas y expresión de antígenos de superficie) son inhibidos por el tratamiento con herbimicina A. La cinética de activación de la vía de la PTK también apoya la idea de que las PTKs juegan un papel obligatorio y cercano en la función del TCR/CD3.

Tres PTKs citoplásmicas, Fyn, Lck y ZAP-70 han sido implicadas en la señalización proximal al TCR/CD3. La fosforilación de CD3- $\zeta$  por Lck (o Fyn) recluta ZAP-70, que a su vez puede asociar el complejo TCR/CD3 con moléculas efectoras. La co-localización de estas PTKs con el receptor activado puede permitir el reclutamiento de moléculas efectoras al complejo TCR/CD3 mediante la interacción con las PTKs [Chu and Littman (1994); Iwashima et al. (1994); Cambier (1995)].

El tratamiento de las células Jurkat con anticuerpos anti-CD3 que provocan un incremento en la actividad PTK o mediante pervanadato un inhibidor de la actividad tirosina fosfatasa aumentan la cantidad de la subunidad p85 $\alpha$  de la PI 3-quinasa unida a la cadena CD3- $\epsilon$ . Estos tratamientos provocan la fosforilación en tirosina de CD3- $\epsilon$  por lo que se puede establecer una relación entre la fosforilación en tirosina de CD3- $\epsilon$  por parte de las PTKs y el incremento de la asociación con la PI 3-quinasa. Utilizamos el inhibidor de tirosina quinasas de la familia Src, herbimicina A. El efecto de la herbimicina A sobre las PTKs de la familia Src no es del todo conocido pero se cree que reside en su capacidad de asociarse a la región C-terminal contribuyendo a la degradación de la PTK [Anel et al. (1994)]. La inhibición de las PTKs de la familia Src mediante el pretratamiento con herbimicina A reduce fuertemente la fosforilación en tirosina de la cadena CD3- $\epsilon$  tras la estimulación del complejo TCR/CD3. La asociación de la subunidad p85 de la PI 3-quinasa a la molécula CD3- $\epsilon$  también disminuye enormemente con respecto a células en las que la actividad PTK de la familia Src permanece intacta. Se demuestra el papel de las PTKs de la familia Src, Lck y Fyn en la fosforilación de la cadena polipeptídica CD3- $\epsilon$  así como la necesidad de su actividad tirosina quinasa para provocar el incremento de la asociación de la PI 3-quinasa a CD3- $\epsilon$ . En células Jurkat y Jurkat CD8- $\epsilon$  inactivadas se comprueba que existe una asociación basal entre la PI 3-quinasa y CD3- $\epsilon$  que se produce a niveles de fosforilación muy bajos. Los estudios con herbimicina A también muestran una asociación basal de la subunidad p85 de la PI 3-quinasa a CD3- $\epsilon$  independiente del estado de fosforilación en tirosina de CD3- $\epsilon$ . Los estudios realizados en células COS-7 mediante transfecciones transitorias apoyan esta observación.

Podemos distinguir la participación de la PTK de la familia Src, Lck respecto a Fyn mediante el uso de una línea celular Jurkat que carece de una molécula Lck funcional, JCaM 1.6. La cadena polipeptídica CD3- $\epsilon$  puede fosforilarse débilmente en células JCaM 1.6. A pesar de la escasa fosforilación que experimenta CD3- $\epsilon$  la subunidad p85 de la PI 3-quinasa continua uniéndose a la molécula tras la estimulación del receptor TCR/CD3. La disminución de la asociación CD3- $\epsilon$ /PI 3-quinasa no se corresponde con la disminución de la fosforilación de CD3- $\epsilon$  con lo que sugiere que Lck es importante en la asociación, pero ésta no es totalmente dependiente de Lck. Los resultados observados en células JCaM 1.6 pueden deberse a la activación de otra PTK diferente a Lck, como Fyn que se expresa con normalidad en estas células. Alternativamente, otra PTK diferente de Lck o Fyn, incluso no perteneciente a la familia Src, podría estar implicada en la fosforilación de la cadena CD3- $\epsilon$  tras la estimulación del receptor y la asociación de la subunidad p85 de la PI 3-quinasa a CD3- $\epsilon$ . Sin embargo, esta posibilidad no ha sido estudiada.

---

**V.1.6. La asociación de la subunidad p85 $\alpha$  de la PI 3-quinasa a la cadena CD3- $\epsilon$  del TCR/CD3 se produce a través del ITAM de CD3- $\epsilon$ .**

En células COS-7 la co-transfección del cADN que codifica la quimera CD8- $\epsilon$  con el cDNA que codifica la subunidad p85 $\alpha$  de la PI 3-quinasa de ratón, provoca la asociación estable de la subunidad p85 $\alpha$  de la PI 3-quinasa y CD8- $\epsilon$  aunque la quimera no esté fosforilada en tirosina. Sin embargo, en estas células la triple transfección de los cDNAs que codifican para CD8- $\epsilon$ , la subunidad p85 $\alpha$  de la PI 3-quinasa y Fyn provocan una mayor unión de la subunidad p85 a CD8- $\epsilon$  y una elevada fosforilación en tirosina de CD8- $\epsilon$ . Estos resultados parecen indicar que aunque la subunidad p85 $\alpha$  de la PI 3-quinasa se une al dominio intracelular de CD3- $\epsilon$  independientemente de su estado de fosforilación en tirosina, se une preferencialmente a la cadena CD3- $\epsilon$  fosforilada en tirosina. Hay una fuerte asociación de la PI 3-quinasa con el dominio intracelular inducida por la activación del receptor.

Aunque no se sabe concretamente cómo la estimulación del TCR/CD3 conduce a la fosforilación en tirosina, Fyn y Lck parecen estar directamente implicadas en la fosforilación en tirosina de las cadenas CD3 [Barber et al. (1989; Hall et al. (1993; Weiss and Littman (1994)]. En células COS-7 los resultados muestran que Fyn induce una fuerte fosforilación en tirosina en la quimera salvaje CD8- $\epsilon$  y una pobre fosforilación de las quimeras Y170F e Y181F en las cuales una de las tirosinas del ITAM de CD3- $\epsilon$  está sustituida por fenilalanina. Estos resultados parecen sorprendentes, ya que se ha mostrado previamente que mutaciones puntuales a lo largo del ITAM de CD3- $\epsilon$  no afectaba a la habilidad de Fyn para fosforilar la región citoplasmática de CD3- $\epsilon$  expresada como una quimera con la proteína del virus de la estomatitis vesiculosa [Timson-Gauen et al. (1994)]. Una posible explicación para estos resultados contradictorios podría estar en el hecho que Timson-Gauen et al utilizaron un ensayo *in vitro* para detectar actividad Fyn quinasa asociada a CD3- $\epsilon$  mientras que nuestros experimentos han sido realizados *in vivo*. *In vitro* puede encontrarse escasa actividad tirosina fosfatasa asociada a CD3- $\epsilon$  y por lo tanto Fyn podría fosforilar en tirosina CD3- $\epsilon$  y sus mutantes con facilidad. Sin embargo, en células COS-7 donde las tirosina fosfatasas están activas, los ITAMs de CD3- $\epsilon$  fosforilados en una sola tirosina pueden ser desfosforilados más fácilmente que los fosforilados en las dos tirosinas.

Los análisis mediante receptores quimera con mutaciones llevaron al grupo de Letourneur and Klausner [Letourneur and Klausner (1992)] a sugerir que la fosforilación de las dos tirosinas conservadas en el motivo ITAM es necesaria para la transducción de señales. Esta conclusión se deriva de la observación de que la mutación de cualquiera de las tirosinas por fenilalanina detiene la transducción de la señal. Para identificar los aminoácidos críticos en la asociación de la subunidad p85 $\alpha$

de la PI 3-quinasa al dominio citoplasmático de CD3-ε mutamos la Tyr170 y la Tyr181 sustituyéndolas por fenilalaninas. Pretendíamos valorar la contribución de los dos residuos clave en el ITAM de CD3-ε en la asociación de CD3-ε a la PI 3-quinasa. Queríamos saber si su función en la asociación con la PI 3-quinasa era similar y por lo tanto aditiva o si por el contrario alguna de las dos tirosinas tenía un papel predominante en la asociación. La doble transfección en células COS-7 de Y170F o Y181F con el cADN de la subunidad p85α de la PI 3-quinasa provoca una asociación basal entre ambas que es independiente del estado de fosforilación en tirosina de las quimeras. La triple co-transfección de cualquiera de las quimeras Y170F o Y181F con p85α y Fyn no aumenta la cantidad de p85α asociada a la quimera, que es considerablemente menor que la cantidad unida a la quimera salvaje CD3-ε, con las dos tirosinas del ITAM intactas y fosforiladas. Estos resultados prueban que la asociación entre la cadena CD3-ε y la subunidad p85 de la PI 3-quinasa tiene lugar a través del ITAM de CD3-ε. Las tirosinas del motivo ITAM de CD3-ε y su fosforilación favorecen la asociación entre ambas.

#### **V.1.7. Posibles mecanismos de asociación entre la cadena polipeptídica CD3-ε y la subunidad p85 de la PI 3-quinasa.**

Los estudios *in vitro* realizados con péptidos sintéticos nos permiten conocer mejor la naturaleza de la interacción p85 PI 3-quinasa/CD3-ε. Como ocurría en los experimentos *in vivo*, la subunidad p85 de la PI 3-quinasa de lisados de células Jurkat se une eficientemente a péptidos que representan al ITAM de CD3-ε doblemente fosforilado, pero débilmente al péptido que representa al ITAM de CD3-ε no fosforilado. La asociación de la subunidad p85 de la PI 3-quinasa al ITAM de CD3-ε fosforilado en tirosina se evita mediante un exceso de fosfotirosina libre o fenil fosfato, mientras que la fosfoserina o fosfotreonina libre no tienen prácticamente ningún efecto en la asociación. Además la interacción entre la subunidad p85 de la PI 3-quinasa y el ITAM de CD3-ε es resistente a la presencia de altas concentraciones de sal, SDS y urea en el medio, que son los requerimientos de la unión de alta afinidad de la subunidad p85α de la PI 3-quinasa al receptor β del PDGF [Kazlauskas and Cooper (1990)]. Estos resultados confirman y amplían los resultados descritos por Cambier y Johnson [Cambier and Johnson (1995.)], que mostraban que p85α se unía débilmente a péptidos que representan el ITAM de CD3-ε no fosforilado y fuertemente al fosforilado.

Tanto p85α como ZAP-70 se pueden unir, a niveles nanomolares al ITAM de CD3-ε fosforilado mientras que Grb-2 sólo podía ser detectada a concentraciones 100 veces superiores de péptido. Un alto porcentaje del total de p85α y ZAP-70 presente en

la célula podía unirse al ITAM de CD3-ε, mientras que sólo un pequeña proporción del total de Shc, Lck, Cbl y Grb-2 se unía al péptido.

Estos resultados no concuerdan con los publicados por Osman et al en linfoblastos [Osman et al. (1996)]. En ese estudio sólo ZAP-70 podía unirse a el ITAM de CD3-ε, mientras que Fyn, Shc, Grb-2 y la subunidad p85 de la PI 3-quinasa no se unían a los péptidos fosforilados que representaban el ITAM de CD3-ε incluso en concentraciones 10 veces superiores a las utilizadas en nuestros experimentos. Las diferencias con nuestros resultados eran especialmente marcadas respecto a la asociación del péptido del ITAM de CD3-ε fosforilado (CT26P) y la subunidad p85 de la PI 3-quinasa. Estas diferencias no parecen ser imputables a la secuencia RRASV introducida en el extremo C-terminal de el péptido CT26P. Quizás las diferencias en resultados entre los dos estudios podrían reflejar diferencias en los niveles relativos de las quinasas o moléculas adaptadoras de los distintos tipos de poblaciones T.

Hipotéticamente la asociación directa del ITAM de CD3-ε con los dominios SH2 en tandem de la subunidad p85α de la PI 3-quinasa puede producirse. Sin embargo, está bien establecido que los dominios SH2 individuales de p85α se unen a la secuencia consenso de fosfotirosina  $Y^{(PO_4)}MXM/Y^{(PO_4)}XXM$  [Songyang et al. (1993)], que no está presente en el ITAM de CD3-ε (ver Figura 1). Mediante el estudio de la asociación de la subunidad p85 de la PI 3-quinasa al receptor de PDGF, se ha observado que la unión de alta afinidad sólo se produce cuando los dominios SH2 de la p85 son capaces de unirse a dos aminoácidos de tirosina fosforilados en el receptor de PDGF que se encuentran separados entre si 11 aminoácidos [Kashishian et al. (1992)]. La unión de los dominios SH2 de p85 a los motivos fosforilados YXXM activan la enzima específicamente sólo cuando los dos dominios SH2 de p85 están implicados [Rordorf-Nikolic et al. (1995)]. Hay una separación similar (10 aminoácidos) entre las secuencias YEPI y YSGL del ITAM de CD3-ε y la isoleucina y la leucina en las posiciones +3 C-terminal de los residuos de tirosina son los aminoácidos más hidrofóbicos despues de la metionina. Debido a la selección más fuerte por la metionina en la posición +3, se supone que los dominios SH2 de p85 se unen muy fuertemente a las secuencias YXXM fosforiladas, aunque la separación entre los residuos de tirosina en las secuencias YEPI y YSGL de CD3-ε puede proporcionar un lugar de relativa alta afinidad de unión para los dos dominios SH2 de la subunidad p85 de la PI 3-quinasa. Encontramos que la mutación de la Tyr170 o Tyr181 en el ITAM de CD3-ε disminuye la unión de la subunidad p85α de la PI 3-quinasa en células COS-7. Un modelo posible para explicar estos resultados puede ser que las mutaciones de una sola tirosina del ITAM de CD3-ε permitiría sólo una debil interacción de la fosfotirosina restante con un sólo dominio SH2 de p85, mientras que si ambas fosfotirosinas están disponibles, la interacción con los dos dominios SH2



sería posible, la afinidad de la interacción aumentaría permitiendo la detección de la asociación. Este modelo implica que se produce la doble fosforilación del ITAM de CD3-ε y que los dos dominios SH2 de una molécula p85α participan en la unión. Si no fuera así el efecto de las mutaciones Tyr170 y 181 en la cantidad de la subunidad p85 de la PI 3-quinasa unida sería simplemente aditiva.

Las evidencias sugieren que la fosforilación de ambas tirosinas del ITAM crea un sitio de unión más fuerte para las proteínas que tienen dos dominios SH2 en tandem (como ZAP-70 o la subunidad p85 de la PI 3-quinasa) que para las proteínas que tienen un sólo dominio SH2 (como Fyn, Lck, Shc, etc). Hemos mostrado que tanto *in vivo* como *in vitro* la subunidad p85α de la PI 3-quinasa se une preferencialmente al ITAM de CD3-ε doblemente fosforilado, mientras que Fyn se unía tanto al ITAM de CD3-ε doblemente fosforilado como al que sólo presenta una tirosina fosforilada. Sin embargo, los resultados *in vitro* muestran diferencias cuantitativas y cualitativas en la capacidad de distintas proteínas con dominios SH2 para unir los péptidos del ITAM de CD3-ε no fosforilados o fosforilados. Estas diferencias eran especialmente visibles entre proteínas que tienen dos dominios SH2 (ZAP-70 o p85) y aquellas que tienen un solo dominio SH2 (Lck, Shc, Grb-2). Esto se hacía más obvio cuando se disminuía la concentración del péptido que representa al ITAM de CD3-ε doblemente fosforilado utilizado en los estudios de asociación. Esto podría demostrar nuevamente la necesidad de los dominios SH2 en tandem para que p85α se una con alta afinidad a los ITAM de CD3-ε doblemente fosforilado.

SH2 p85 PI 3-quinasa	pYXXM
SH2 ZAP-70	pYXXL/I
Shc	
Fyn	
SH3 Fyn	Motivos ricos en
Lck	prolina de PI 3-quinasa
SH3 p85 PI 3-quinasa	Motivos ricos en
	prolina de Shc

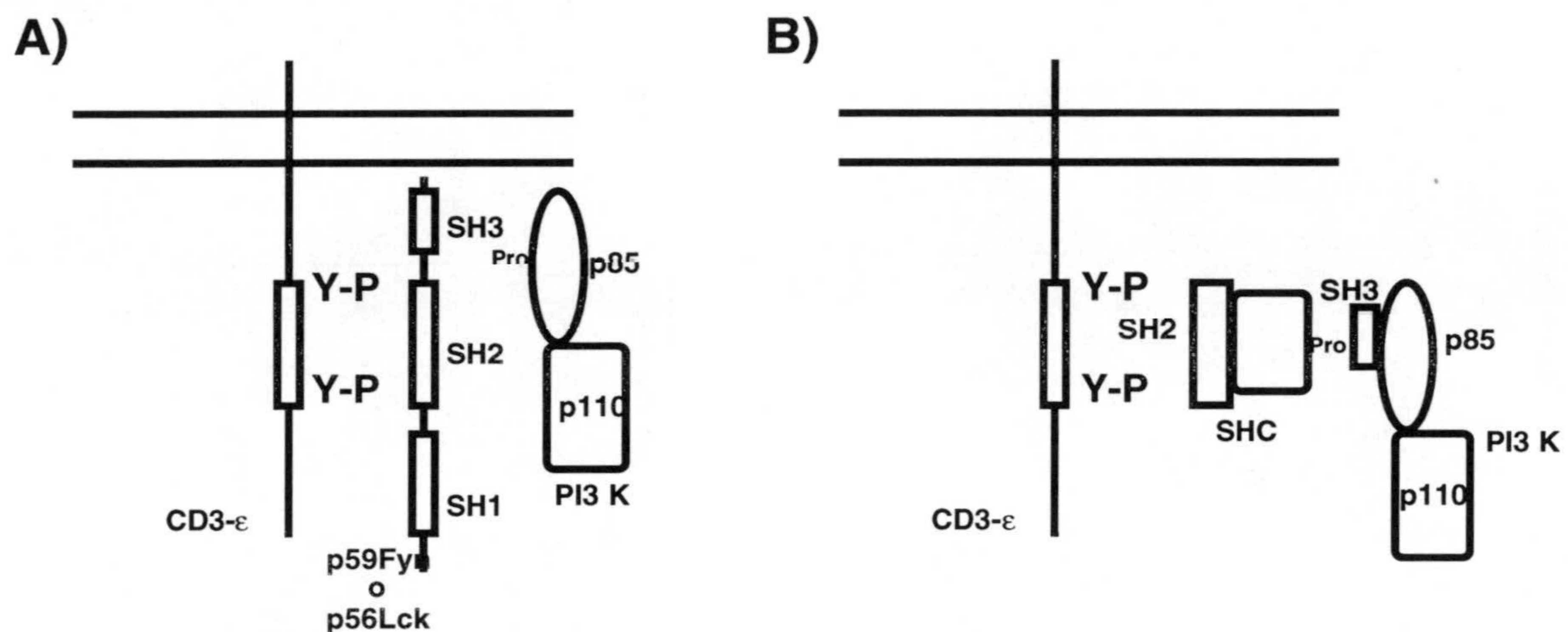
Figura 1. Esquema de las secuencias o regiones reconocidas por distintos dominios SH2 y SH3.

Alternativamente, la asociación de la subunidad p85 $\alpha$  de la PI 3-quinasa y el ITAM de CD3- $\epsilon$  podría ocurrir indirectamente mediante la interacción con tirosina quinasas de la familia Src o Syk o con la molécula adaptadora Shc, que posee un dominio SH2. Los ITAMs de los receptores de células B y T están preparados para unirse a múltiples proteínas con dominios SH2. Songyang et al afirmaban que las secuencias Y<sup>(PO<sub>4</sub>)</sup>-X-X-L/I con la Ile en la posición +3 son capaces de unirse con alta afinidad a Shc o a los miembros de la familia Src (Lck, Fyn, Lyn, etc), mientras que la Leu en la posición +3 es mejor para interaccionar con los dominios SH2 de Syk o ZAP-70 [Songyang et al. (1994)]. De este modo, varias proteínas con dominios SH2 pueden competir por los mismos puntos de unión. La unión de moléculas con dos dominios SH2 está restringida a ITAMs doblemente fosforilados [Wange et al. (1993); Iwashima et al. (1994); Koyasu et al. (1994)] y las moléculas que contienen sólo un dominio SH2 compiten con ventaja con ZAP-70 (o con p85 $\alpha$ ) en la unión al ITAM cuando sólo una tirosina del ITAM está fosforilada [Osman et al. (1995)].

Algunos autores han mostrado que Fyn utiliza su propio dominio SH3 para unirse a la subunidad p85 de la PI 3-quinasa [Prasad et al. (1993); Pleiman et al. (1994.)], y resultados similares se han obtenido con los dominios SH3 de Lck [von Willebrand et al. (1994)]. En estos trabajos las regiones PPTPKRPPRPLP (Aas 84-96) o PAPALPPKPPKP (Aas 303-314) de la subunidad p85 de la PI 3-quinasa se detectaban asociadas a Fyn sin preestimulación del complejo TCR/CD3. De este modo podríamos pensar que Fyn se puede asociar a PI 3-quinasa independientemente de la actividad tirosina quinasa y de la fosforilación. Los resultados en células COS-7 triplemente transfectadas con los cADNs de CD8- $\epsilon$  (o los mutantes Y170F o Y181F), Fyn y p85 $\alpha$ , sugieren que Fyn no es la molécula adaptadora que acerca la subunidad p85 $\alpha$  de la PI 3-quinasa a CD8- $\epsilon$ . Sin embargo, los resultados de la unión de Lck a los péptidos de los ITAMs de CD3- $\epsilon$  no fosforilados y doblemente fosforilados coinciden con la unión de la subunidad p85 $\alpha$  de la PI 3-quinasa a estos péptidos aunque con menor eficiencia. Nuestros resultados sugieren que la contribución del dominio SH3 de Fyn a la asociación de la subunidad p85 $\alpha$  de la PI 3-quinasa con el ITAM de CD3- $\epsilon$  es muy pequeña. Sin embargo, la naturaleza de la interacción de Fyn (o Lck) y el ITAM de CD3- $\epsilon$  es diferente dependiendo del estado de fosforilación del motivo [Cambier and Johnson (1995)] y por lo tanto la unión de Fyn (o Lck) al ITAM de CD3- $\epsilon$  fosforilado podría cambiar la conformación de Fyn haciendo que su dominio SH3 estuviera más disponible para interaccionar con la subunidad p85 de la PI 3-quinasa.

En estudios anteriores se mostraba que la subunidad p85 de la PI 3-quinasa se asociaba preferencialmente con el ITAM  $\zeta_A$  de la cadena CD3- $\zeta$  [Exley et al. (1994)]. Aquí demostramos una asociación alternativa de p85 $\alpha$  con el ITAM de CD3- $\epsilon$ . Una consecuencia de la unión de p85 $\alpha$  a los ITAMs fosforilados en tirosina  $\zeta_A$  y CD3- $\epsilon$

puede ser el acercamiento de la subunidad p85 de la PI 3-quinasa al receptor por lo que podría ser fosforilada por una tirosina quinasa asociada (por ejemplo ZAP-70). Otra posibilidad es que la asociación de ambos dominios SH2 de la p85 $\alpha$  a los ITAMs fosforilados podría inducir un cambio conformacional en la estructura de p85 $\alpha$ /p110 que condujera a la activación de la PI 3-quinasa. Este mecanismo ya se ha observado que juega un papel en la activación de la PI 3-quinasa, cuando sus dominios SH2 en tandem se han asociado a péptidos fosforilados [Kelly et al. (1991; Shoelson et al. (1993)]. La presencia de dos  $\zeta$ ITAMs en cada dímero  $\zeta$ - $\zeta$  y dos ITAMs de CD3- $\epsilon$  en cada pareja CD3- $\epsilon$ /CD3- $\gamma$  y CD3- $\epsilon$ /CD3- $\delta$  suponen al menos cuatro lugares de unión a p85 $\alpha$  en un solo complejo TCR/CD3. La asociación de varias subunidades p85 de la PI 3-quinasa en un solo receptor podría facilitar la activación de esta molécula señalizadora por tirosina quinasas adyacentes o por el contacto con otras moléculas efectoras.



*Figura 2. Esquemas de posibles mecanismos de asociación entre la subunidad p85 de la PI 3-quinasa y la cadena CD3- $\epsilon$  del TCR/CD3 mediante moléculas adaptadoras. A) Mediante PTKs de la familia Src. B) Mediante la proteína adaptadora Shc.*

## V.2. Interacción del ITAM de la cadena CD3- $\epsilon$ del TCR/CD3 con proteínas pequeñas que unen GTP.

Varios resultados apoyan la idea de que la unión de GTP juega un papel en las señales de transducción a través del complejo TCR/CD3. La cadena CD3- $\zeta$  del complejo tiene la capacidad de asociar específicamente GTP, concretamente a través de la lisina 128 [Peter et al. (1992)]. Esta asociación de GTP a la cadena polipeptídica CD3- $\zeta$  está modulada por señales extracelulares, sugiriendo que el papel de la unión de GTP a CD3- $\zeta$  es relacionar el TCR/CD3 con los mecanismos de señales de transducción [Sancho et al. (1993)]. Igualmente, la cadena CD3- $\gamma$  une GTP, aunque con una cinética de asociación al GTP mucho más tardía que CD3- $\zeta$  y en la que la unión parece tener lugar mediante una proteína intermediaria [Peter et al. (1993)]. En este trabajo no se especulaba cual era la posible proteína implicada en la interacción aunque dado que la asociación se producía antes de que CD3- $\gamma$  abandonara el RE, la proteína G podría pertenecer a la subfamilia Rho implicándose en pasos iniciales del transporte del complejo TCR/CD3.

Nuestros resultados prueban que la cadena polipeptídica CD3- $\epsilon$  se asocia a proteínas de pequeño peso molecular, comprendido entre 30 y 21,5 kDa capaces de unir GTP. La asociación se realiza a través del ITAM de CD3- $\epsilon$ . La unión de estas proteínas es superior con el péptido que presenta las tirosinas del motivo ITAM fosforiladas sin embargo, el péptido no fosforilado es capaz de asociarse igualmente a proteínas con capacidad de unir GTP. La proteína Rab 8 se asocia específicamente al péptido que representa el ITAM de CD3- $\epsilon$  fosforilado en tirosina y no se asocia al péptido no fosforilado o a un péptido no fosforilado que representa la región citoplasmática de CD3- $\epsilon$  completa. La asociación de Rab 8 se produce mediante el ITAM de CD3- $\epsilon$  fosforilado en tirosina.

En células de mamíferos las proteínas Rab están implicadas en la regulación del transporte de las vías de endocitosis y exocitosis. Son reguladoras del transporte de vesículas para que lleguen a los compartimentos adecuados. La subfamilia Rab tiene más de treinta miembros que están asociados con distintos compartimentos subcelulares. Concretamente Rab 8 está relacionada con el aparato de Golgi. Mientras que se conoce cual es la participación o el paso concreto en que están implicadas otras proteínas Rab, no se conoce exactamente el punto del transporte en que está implicada Rab 8. Aunque sólo ha sido detectada una de las pequeñas proteínas G que se asocia específicamente a CD3- $\epsilon$  existen otras proteínas G todavía no reconocidas. Establecer cuales son estas proteínas puede ayudar a conocer mejor el papel de las proteínas G de la familia Ras en la función de los linfocitos y cómo los sucesos desencadenados por la

---

estimulación del TCR/CD3 pueden controlar los estados de activación de las pequeñas proteínas G.

### **V.3. La cadena CD3- $\epsilon$ del receptor TCR/CD3 no se asocia con el citoesqueleto.**

Cada vez hay más datos que sugieren un posible papel del citoesqueleto en la transmisión de señales de la superficie celular al interior a través de receptores transmembrana asociados al citoesqueleto. Las señales vendrían dadas por modificaciones en los patrones de fosforilación de los receptores o de las moléculas asociadas al citoesqueleto situadas en la proximidad del receptor [Caplan and Baniyash (1995)]. Estudios llevados a cabo para establecer la relación del TCR/CD3 y el citoesqueleto muestran que la estimulación del TCR produce modificaciones estructurales del citoesqueleto que provocan la repolarización del citoesqueleto hacia el TCR/CD3. Otros resultados recientes muestran que en linfocitos T no activados hay dos poblaciones de TCR/CD3 en la superficie celular, de las cuales sólo una está asociada al citoesqueleto a través de la cadena CD3- $\zeta$  insoluble en Tritón. Esta asociación depende de los microfilamentos de actina [Caplan and Baniyash (1995; Caplan et al. (1995)]. Parece que el tercer ITAM de la cadena CD3- $\zeta$  es necesario y suficiente para esta asociación [Rozdzial et al. (1995)]. Estos resultados indican que las dos poblaciones de TCR/CD3 poseen cadenas CD3- $\zeta$  modificadas post-translacionalmente, cada una con un patrón de fosforilación diferente dependiendo de la activación. También se ha detectado una redistribución a una fracción insoluble en NP-40 de un complejo Grb-2/Sos/PLC $\gamma$ /p36-p38/ZAP-70 y CD3- $\zeta$  tras la estimulación del TCR/CD3 [Nel et al. (1995)]. Se ha observado que la hiperfosforilación de ciertas proteínas del citoesqueleto como la cortactina o la tensina depende de PTKs de la familia Src, concretamente de Fyn y Lck [Thomas et al. (1995)]. Ley et al describen estudios en los que Fyn y Lck tienen distintas localizaciones intracelulares. Mientras Lck está en el citosol y la membrana plasmática, Fyn se encuentra en estrecha asociación con el centrosoma y los microtúbulos.

Nosotros no hemos detectado CD3- $\epsilon$  en la fracción insoluble en detergente (y soluble en SDS) tras la estimulación del TCR/CD3 sólomente o con entrecruzamiento. CD3- $\epsilon$  tampoco parece estar constitutivamente asociada a la matriz de citoesqueleto en células no estimuladas. Estos resultados están en concordancia con resultados del grupo de Caplan et al aunque ellos afirmaban que había pequeños niveles de CD3- $\epsilon$  detectables en la fracción insoluble en Tritón. Incluso establecían que los niveles de componentes de CD3 que se encontraban en la fracción soluble en Tritón seguía la

siguiente jerarquía:  $\zeta > \delta > \gamma > \epsilon$  [Caplan and Baniyash (1995)]. Resultados no presentados realizados mediante otro protocolo de aislamiento de la "fracción insoluble" muestran una pequeña cantidad de CD3-e que emigra a la "fracción insoluble" tras la activación del TCR/CD3. Estos resultados pendientes de confirmación podrían poner de manifiesto la necesidad de estandarizar un método de aislamiento de las fracciones asociadas al citoesqueleto para poder analizar el significado funcional y fisiológico de la asociación TCR/CD3-citoesqueleto en la respuesta en linfocitos T.

**VI. CONCLUSIONES**

1. La subunidad CD3- $\epsilon$  del receptor para el antígeno de linfocitos T se asocia a la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI 3-quinasa). La asociación es independiente de la presencia de otros miembros del complejo CD3. El incremento de la asociación CD3- $\epsilon$ /PI 3-quinasa es dependiente de la activación del receptor TCR/CD3
2. La asociación de la cadena polipeptídica CD3- $\epsilon$  y la PI 3-quinasa se produce a través de la subunidad p85 de la PI 3-quinasa.
3. La asociación CD3- $\epsilon$ /p85 PI 3-quinasa tras la activación del receptor TCR/CD3 es dependiente de la actividad tirosina quinasa.
4. Los aminoácidos de la cadena polipeptídica CD3- $\epsilon$  que intervienen en la asociación con la subunidad p85 de la PI 3-quinasa son los comprendidos dentro del ITAM de CD3- $\epsilon$ . La asociación es dependiente de la fosforilación de las dos tirosinas comprendidas en el ITAM.
5. La subunidad CD3- $\epsilon$  del TCR/CD3 no se asocia con proteínas del citoesqueleto en estado basal ni tras la activación del receptor.
6. La subunidad CD3- $\epsilon$  del TCR/CD3 se asocia con pequeñas proteínas de unión a GTP. La asociación de pequeñas proteínas de unión a GTP se produce a través del ITAM de CD3- $\epsilon$ . La proteína Rab-8 se asocia exclusivamente al ITAM de CD3- $\epsilon$  cuando las tirosinas comprendidas dentro de este motivo se encuentran fosforiladas.



**VII. BIBLIOGRAFIA**

Alarcon, B., Berkhout, B., Breitmeyer, J. and Terhorst, C. (1988) Assembly of the human T cell receptor-CD3 complex takes place in the endoplasmic reticulum and involves intermediary complexes between the CD3-( $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ) core and single T cell receptor  $\alpha$  and  $\beta$  chains. *J. Biol. Chem.* 263, 2953-2961.

Alarcon, B., Regueiro, J., Arnaiz-Villena, A. and Terhorst, C. (1991) Familial defect in the surface expression of the T cell receptor-CD3 complex. *N. Engl. J. Med.* 319, 1203-1208.

Amrein, K. E., Panholzer, B., Flint, N. A., Bannwarth, W. and Burn, P. (1993) The src homology 2 domain of the protein-tyrosine kinase p56lck mediates both intermolecular and intramolecular interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, 10285-10289.

Anel, A., Matinez-Lorenzo, M. J., Schmitt-Verhulst, A.-M. and Boyer, C. (1997) Influence on CD8 of TCR/CD3-generated signals in CTL clones and CTL precursor cells. *J. Immunol.* 158, 19-28.

Anel, A., Buferne, M., Boyer, C., Schmitt-Verhulst, A.-M. and Golstein, P. (1994) T cell receptor-induced Fas ligand expression in cytotoxic T lymphocyte clones is blocked by protein tyrosine kinase inhibitors and cyclosporin A. *Eur. J. Immunol.* 24, 2469-2476.

Aruffo, A. and Seed, B. (1987) Molecular cloning of a CD28 cDNA by a high efficiency COS cell expression system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 8573-8577.

Atherton, E., Clive, D. L. and Sheppard, R. C. (1975) Polyamide supports for polypeptide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 97, 6584-6585.

August, A. and Dupont, B. (1994) CD28 of T lymphocytes associates with phosphatidylinositol 3-kinase. *Int. Immunol.* 6, 769-774.

Baniyash, M., Garcia-Morales, P., Luong, E., Samelson, L. E. and Klausner, R. D. (1988) The T cell antigen receptor  $\zeta$  chain is tyrosine phosphorylated upon activation. *J. Biol. Chem.* 263, 18225-18230.

---

Baniyash, M., Hsu, V., Seldin, M. and Klausner, R. (1989) The isolation and characterization of the murine T lymphocyte receptor  $\zeta$  chain gene. *J. Biol. Chem.* 263, 8628-8636.

Bank, I. and Chess, L. (1985) Perturbation of the T4 molecule transmits a negative signal to T cells. *J. Exp. Med.* 162, 1294-1303.

Barber, E. K., Dasgupta, J. D., Schlossman, S. F., Trevillyan, J. M. and Rudd, C. E. (1989) The CD4 and CD8 antigens are coupled to a protein-tyrosine kinase (p56lck) that phosphorylates the CD3 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 3277-3287.

Bell, G. M., Fargnoli, J., Bolen, J. B., Kish, L. and Imboden, J. B. (1996.) The SH3 domain of p56lck binds to proline-rich sequences in the cytoplasmic domain of CD2. *J. Exp. Med.* 183, 169-178.

Bernot, A. and Auffray, C. (1991) Primary structure and ontogeny of an avian CD3 transcript. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 38, 2550-2554.

Berridge, M. J. and Irvine, R. F. (1989) Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* 341, 197-205.

Biffen, M., McMichael-Phillips, D., Larson, T., Venkitaraman, A. and Alexander, D. (1994) The CD45 tyrosine phosphatase regulates specific pools of antigen receptor-associated p59fyn and CD4-associated p56lck tyrosine kinases in human T-cells. *EMBO J.* 13, 1920-1929.

Blaikie, P., Immanuel, D., Wu, J., Li, N., Yajnik, V. and Margolis, B. (1994) A region in Shc distinct from the SH2 domain can bind tyrosine-phosphorylated growth factor receptors. *J. Biol. Chem.* 269, 32031-32034.

Blanchard, D., Van Els, C., Aubry, J. P., de Vries, J. E. and Spits, H. (1988) CD4 is involved in a post-binding event in the cytolytic reaction mediated by human CD4<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocyte clones. *J. Immunol.* 140, 1745-1752.

Blanchard, D., van Els, C., Borst, J., Carrel, S., Boylston, A., de Vries, J. E. and Spits, H. (1987) The role of the T cell receptor CD8 and LFA-1 in different stages of the

---

cytolytic reaction mediated by alloreactive T lymphocyte clones. *J. Immunol.* 138, 2417-2421.

Blank, U., Ra, C., Miller, L., White, K., Metzger, H. and Kinet, J. P. (1989) Complete structure and expression in transfected cells of high affinity IgE receptor. *Nature* 337, 187-189.

Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids. Res.* 7, 1513-1522.

Blumberg, R., Ley, S., Sancho, J., Lonberg, N., Lacy, E. and McDermott, F. (1990) Structure of the T cell antigen receptor: Evidence for two CD3  $\epsilon$  subunits in the T cell receptor/CD3 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 7220-7224.

Bonfini, L., Migliaccio, E., Pelicci, G., Lanfrancone, L. and Pelicci, P. L. (1996) Not all Shc's roads lead to Ras. *TIBS* 21, 257-261.

Boussiotis, V. A., Barber, D. L., Lee, B. J., Gribben, J. G., Freeman, G. J. and Nadler, L. M. (1996) Differential association of protein tyrosine kinases with the T cell receptor is linked to the induction of anergy and its prevention by B7 family-mediated costimulation. *J. Exp. Med.* 184, 365-376.

Bowtell, D. D. L. and Langdon, W. Y. (1995) The protein product of the c-cbl oncogene rapidly complexes with the EGF receptor and is tyrosine phosphorylated following EGF stimulation. *Oncogene* 11, 1561-1567.

Brenner, M. B., Mclean, J., Dialynas, D., Strominger, J. L., Smith, J. A. and Owen, F. L. (1986) Identification of a putative second T cell receptor. *Nature* 322, 145-149.

Brenner, M. T. I. and Strominger, J. (1985) Cross-linking of human T cell receptor proteins: association between the T cell idiotype beta subunit and the T3 glycoprotein heavy subunit. *Cell* 40, 183-190.

Bu, J.-Y., Shaw, A. S. and Chan, A. C. (1995) Analysis of the interaction of ZAP-70 and syk protein-tyrosine kinases with the T-cell antigen receptor by plasmon resonance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 5106-5110.

---

Buday, L., Khwaja, A., Sipeki, S., Farago, A. and Downward, J. (1996) Interactions of Cbl with two adaptor proteins, Grb2 and Crk, upon T cell activation. *J. Biol. Chem.* 271, 6159-6163.

Cambier, J. C. (1995) Antigen and Fc receptor signaling. The awesome power of the immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM). *J. Immunol.* 155, 3281-3285.

Cambier, J. C. and Johnson, S. A. (1995.) Differential binding activity of ARH1/TAM motifs. *Immunol. Lett.* 44., 77-80.

Campbell, K. S., Buder, A. and Deuschle, U. (1995) Interactions between the amino-terminal domain of p56lck and cytoplasmic domains of CD4 and CD8 $\alpha$  in yeast. *Eur. J. Immunol.* 25, 2408-2412.

Cantrell, D. A. (1996) T cell antigen receptor signal transduction pathways. *Annu. Rev. Immunol.* 14, 259-274.

Caplan, S. and Baniyash, M. (1995) Multisubunit receptors in the immune system and their association with the cytoskeleton: in search of functional significance. *Immunol. Res.* 14, 98-118.

Caplan, S., Zeliger, S., Wang, L. and Baniyash, M. (1995) Cell-surface-expressed T-cell antigen-receptor  $\zeta$  chain is associated with the cytoskeleton. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 4768-4772.

Carrera, A., Rodriguez-Borlado, L., Martinez-Alonso, C. and Merida, I. (1994) *J. Biol. Chem.* 19435-19440.

Cantrell, D. A., Izquierdo, M., Reif, K. and Woodrow, M. (1993) Regulation of PtdIns-3-kinase and the guanine nucleotide binding proteins p21ras during signal transduction by the T-cell antigen receptor and the interleukin-2 receptor. *Sem. Immunol.* 3,

Chambers, C. A. and Allison, J. P. (1996) The role of tyrosine phosphorylation and PTP-1C in CTLA-4 signal transduction. *Eur. J. Immunol.* 26, 3224-3229.

---

Chan, A. C., Desai, D. M. and Weiss, A. (1994) The role of protein tyrosine kinases and protein tyrosine phosphatases in T cell antigen receptor signal transduction. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 555-592.

Chan, A. C., Irving, B. A., Fraser, J. D. and Weiss, A. (1991.) The  $\zeta$  chain is associated with a tyrosine kinase and upon T-cell antigen receptor stimulation associates with ZAP-70, a 70-kDa tyrosine phosphoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88, 9166-9170.

Chan, A. C., Iwashima, M., Turk, C. W. and Weiss, A. (1992.) ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR  $\zeta$  chain. *Cell.* 71, 649-662.

Chan, A. C., Kadlecsek, T. A., Elder, M. E., Filipovich, A. H., Kuo, W. L., Iwashima, M., Parslow, T. G. and Weiss, A. (1994) ZAP-70 deficiency in an autosomal recessive form of severe combined immunodeficiency. *Science* 264, 1599-1601.

Chang, C. D. and Meinhofer, J. (1978) *Int. J. Pept. Protein Res.* 11, 246-249.

Chavrier, P., Gorvel, J.-P. and Bertoglio, J. (1993) An immunologist's look at the Rho and Rab GTP-binding proteins. *Immunol. Today.* 14, 440-444.

Chu, K. and Littman, D. R. (1994) Requirement for kinase activity of CD4-associated p56lck in antibody-triggered T cell signal transduction. *J. Biol. Chem.* 269, 24095-24101.

Clark, M. R., Johnson, S. A. and Cambier, J. C. (1994) Analysis of Ig- $\alpha$ -tyrosine kinase interaction reveals two levels of binding specificity and tyrosine phosphorylated Ig- $\alpha$  stimulation of Fyn activity. *EMBO J.* 13, 1911-1919.

Clayton, L., Sieh, M., Pious, D. and Reinherz, E. (1989) Identification of human CD4 residues affecting class II MHC versus HIV-1 gp120 binding. *Nature* 339, 548-551.

Clayton, L. K., Dicner, A. C., Lerner, A., Tse, A. G., Koyasu, S. and Reinherz, E. L. (1992) Differential regulation of T-cell receptor processing and surface expression affected by CD3 theta, an alternatively spliced product of the CD3 zeta/eta gene locus. *J. Biol. Chem.* 267, 26023-26030.

---

Clevers, H., Alarcon, B., Wileman, T. and Terhorst, C. (1988) The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. *Ann. Rev. Immunol.* 6, 629-662.

Collins, T. L., Deckert, M. and Altman, A. (1997) Views on Vav. *Immunol. Today* 18, 221-225.

Cooper, J. A. and Howell, B. (1993) The when and how of Src regulation. *Cell* 73, 1051-1054.

Cory, G. O., Lovering, R. C., Hinshelwood, S., MacCarthy-Morrogh, L., Levinsky, R. J. and Kinnon, C. (1995) The protein product of the c-cbl protooncogene is phosphorylated after B cell receptor stimulation and binds the SH3 domain of Bruton's tyrosine kinase. *J. Exp. Med.* 182, 611-615.

Crespo, P., Schuebel, K. E., Ostrom, A. A., Gutkind, J. S. and Bustelo, X. R. (1997) Phosphotyrosine-dependent activation of Rac-1 GDP/GTP exchange by the vav proto-oncogen product. *Nature* 385, 169-172.

Crooks, M. E., Littman, D. R., Carter, R. H., Fearon, D. T., Weiss, A. and Stein, P. H. (1995) CD28-mediated costimulation in the absence of phosphatidylinositol 3-kinase association and activation. *Mol. Cell. Biol.* 15, 6820-6828.

Cross, M., Stewart, A., Wakelam, M. and Harnett, M. (1995) Wortmannin and its structural analogue demethoxyviridin inhibit stimulated phospholipase A2 activity. *J. Biol. Chem.* 270, 25352-25355.

Da Silva, A. J., Janssen, O. and Rudd, C. E. (1993) T cell receptor  $\zeta$ /CD3-p59fyn (T)-associated p120/130 binds to the SH2 domain of p59fyn (T). *J. Exp. Med.* 178, 2107-2113.

Da Silva, A. J., Yamamoto, M., Zalvan, C. H. and Rudd, C. E. (1992) Engagement of the TCR/CD3 complex stimulates p59fyn activity: detection of associated proteins at 72 and 120-130 Kd. *Mol. Immunol.* 29, 1417-1425.

Danielian, S., Alcover, A., Polissard, L., Stefanescu, M., Acuto, O., Fischer, S. and Fagard, R. (1992) Both T cell receptor (TCR)-CD3 complex and CD2 increase the tyrosine kinase activity of p56lck. CD2 can mediate TCR-CD3 independent and CD45-dependent activation of p56lck. *Eur. J. Immunol.* 22, 2915-2921.

---

Davis, C. B. and Littman, D. R. (1995) Disrupted development of thymocytes expressing a transgenic TCR upon CD4 overexpression. *Int. Immunol.* 7, 1977-1986.

Dell'Arciprete, L., Colombatti, M., Rappuoli, R. and Tridente, G. (1988) A C terminus cysteine of diphtheria toxin B chain involved in immunotoxin cell penetration and cytotoxicity. *J. Immunol.* 140, 2466-2471.

de Jong, R., ten Hoeve, J., Heisterkamp, N. and Groffen, J. (1995) Crk1 is complexed with tyrosine-phosphorylated Cbl in Ph-positive leukemia. *J. Biol. Chem.* 270, 21468-21471.

Desai, D. M., Sap, J., Silvennoinen, O., Schlessinger, J. and Weiss, A. (1994) The catalytic activity of the CD45 membrane-proximal phosphatase domain is required for TCR signaling and regulation. *EMBO J.* 13, 4002-4010.

Dhand, R., Hara, K., Hiles, I., Bax, B., Gout, I., Panayotou, G., Fry, M. J., Yonezawa, K., Kasuga, M. and Waterfield, M. D. (1994) PI 3-kinase: structural and functional analysis of intersubunit interactions. *EMBO J.* 13, 511-521.

Dhand, R., Hiles, I., Panayotou, G., Roche, S., Fry, M. J., Gout, I., Totty, N. F., Truong, O., Vicendo, P., Yonezawa, K., Kasuga, M., Courtneidge, S. A. and Waterfield, M. D. (1994) PI 3-kinase is a dual specificity enzyme: autoregulation by an intrinsic protein-serine kinase activity. *EMBO J.* 13, 522-533.

Donnadieu, E., Trautmann, A., Malissen, M., Trucy, J., Malissen, B. and Vivier, E. (1994) Reconstitution of CD3 $\zeta$  coupling to calcium mobilization via genetic complementation. *J. Biol. Chem.* 269, 32828-32834.

Donovan, J. A., Wange, R. L., Langdon, W. Y. and Samelson, L. E. (1994) The protein product of the c-cbl protooncogene is the 120-kDa tyrosine -phosphorylated protein in Jurkat cells activated via the T cell antigen receptor. *J. Biol. Chem.* 269, 22921-22924.

Elder, M. E., Lin, D., Clever, J., Chan, A. C., Hope, T. J., Weiss, A. and Parslow, T. G. (1994) Human severe combined immunodeficiency due to a defect in ZAP-70, a T cell tyrosine kinase. *Science* 264, 1596-1599.



---

Exley, M. and Varticovsky, L. (1999) Evidence for phosphatidylinositol 3-kinase dependent T cell antigen receptor (TCR) signal transduction. *Mol. Immunol.*

Exley, M., Terhorst, C. and Wileman, T. (1991) Structure, assembly and intracellular transport of the T cell receptor for antigen. *Semin. Immunol.* 3, 283-297.

Exley, M., Varticovski, L., Peter, M., Sancho, J. and Terhorst, C. (1994) Association of Phosphatidylinositol 3-kinase with a specific sequence of the T cell receptor  $\zeta$  chain is dependent on T cell activation. *J. Biol. Chem.* 269, 15140-15146.

Exley, M., Wileman, T., Mueller, B. and Terhorst, C. (1995) Evidence for multivalent structure of T-cell antigen receptor complex. *Mol. Immunol.* 32, 829-839.

Fisher, K. D., Zmuldzinas, A., Gardner, S., Barbacid, M., Bernstein, A. and Guidos, C. (1995) Defective T-cell receptor signalling and positive selection of Vav-deficient CD4+CD8+ thymocytes. *Nature* 374, 474-477.

Fournel, M., Davidson, D., Weil, R. and Veillette, A. (1996) Association of tyrosine protein kinase ZAP-70 with the protooncogene product p120 c-cbl in T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 183, 301-306.

Fraser, J. D. and Weiss, A. (1992) Regulation of T-cell lymphokine gene transcription by the accessory molecule CD28. *Mol. Cell. Biol.* 12, 4357-4363.

Fusaki, N., Matsuda, S., Nishizumi, H., Umemori, H. and Yamamoto, T. (1996) Physical and functional interactions of protein tyrosine kinases, p59fyn and ZAP-70, in T cell signaling. *J. Immunol.* 156, 1369-1377.

Galisteo, M. L., Dikic, I., Batzer, A. G., Langon, W. Y. and Schlessinger, J. (1995) Tyrosine phosphorylation of the c-cbl proto-oncogene protein product and association with epidermal growth factor (EGF) receptor upon EGF stimulation. *J. Biol. Chem.* 270, 20242-20245.

Gao, G. F., Tormo, J., Gerth, U. C., Wyer, J. R., McMichael, A. J., Stuart, D. I., Bell, J. I., Jones, E. Y. and Jakobsen, B. K. (1997) Crystal structure of the complex between human CD8  $\alpha\alpha$  and HLA-A2. *Nature* 387, 630-634.

---

Garboczi, D. N., Ghosh, P., Utz, U., Fan, Q. R., Biddison, W. E. and Wiley, D. C. (1996) Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2. *Nature* 384, 134-141.

Garcia, K. C., Degano, M., Stanfield, R. L., Brunmark, A., Jackson, M. R., Peterson, P. A., Teyton, L. and Wilson, I. A. (1996) An alphabeta T cell receptor structure at 2.5 Å and its orientation in the TCR-MHC complex. *Science*. 274, 209-219.

Gassmann, M., Amrein, K. E., Flint, N. A., Schraeven, B. and Burn, P. (1994) Identification of a signaling complex involving CD2,  $\zeta$  chain and p59fyn in T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 24, 139-144.

Ghiotto-Ragueneau, M., Battifora, M., Truneh, A., Waterfield, M. D. and Olive, D. (1996) Comparison of CD28-B7.1 and B7.2 functional interaction in resting human T cells: phosphatidylinositol 3-kinase association to CD28 and cytokine production. *Eur. J. Immunol.* 26, 34-41.

Gibson, S., August, A., Branch, D., Dupont, B. and Mills, G. B. (1996) Functional Lck is required for optimal CD28-mediated activation of the TEC family tyrosine kinase EMT/ITK. *J. Biol. Chem.* 271, 7079-7083.

Glaichenhaus, N., Shastri, N., Littman, D. R. and Turner, J. M. (1991) Requirement for the association of p56lck with CD4 in antigen-specific signal transduction in T cells. *Cell* 64, 511-520.

Gold, D. P., Clevers, H., Alarcon, B., Dunlap, S., Novotny, J., Williams, A. F. and Terhorst, C. (1987) Evolutionary relationship between the T3 chains of the T-cell receptor complex and the immunoglobulin supergene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 7649-7653.

Greene, J. L., Leytze, G. M., Emswiler, J., Peach, R., Bajorath, J., Cosand, W. and Linsley, P. S. (1996) Covalent dimerization of CD28/CTLA-4 and oligomerization of CD80/CD86 regulate T cell costimulatory interactions. *J. Biol. Chem.* 271, 26762-26771.

Gregoire, C., Malissen, B. and Mazza, G. (1997) Characterization of T cell receptor single-chain Fv fragments secreted by myeloma cells. *Eur. J. Immunol.* 26, 2410-2416.

---

Hall, C. G., Sancho, J. and Terhorst, C. (1993) Reconstitution of T cell receptor  $\zeta$ -mediated calcium mobilization in nonlymphoid cells. *Science*. 261, 915-917.

Hall, C., Berkhout, B., Alarcon, B., Sancho, J., Wileman, T. and Terhorst, C. (1991) Requirements for cell surface expression of the human TCR/CD3 complex in non-T cells. *Int. Immunol.* 3, 359-368.

Harrison-Findik, D., Susa, M. and Varticovski, L. (1995) Association of phosphatidylinositol 3-kinase with SHC in chronic myelogenous leukemia cells. *Oncogene*. 10, 1385-1391.

Hartley, D., Meisner, H. and Corvera, S. (1995) Specific association of the beta isoform of the p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase with the proto-oncogene c-cbl. *J. Biol. Chem.* 270, 18260-18263.

Haughn, L., Gratton, S., Caron, L., Sekaly, R.-P., Veillette, A. and Julius, M. (1992) Association of tyrosine kinase p56lck with CD4 inhibits the induction of growth through the  $\alpha\beta$  T-cell receptor. *Nature* 358, 328-331.

Hayashi, H., Kamohara, S., Nishioka, Y., Kanai, F., Miyake, N., Fukui, Y., Shibasaki, F., Takenawa, T. and Ebina, Y. (1992) Insulin treatment stimulates the tyrosine phosphorylation of the  $\alpha$ -type 85-kDa subunit of phosphatidylinositol 3-kinase *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 267, 22575-22580.

Hoeveler, A. and Malissen, B. (1993) The cysteine residues in the cytoplasmic tail of CD8  $\alpha$  are required for its coreceptor function. *Mol. Immunol.* 30, 755-764.

Howard, F. D., Moingeon, P., Moebius, U., McConkey, D. J., Yandava, B., Gennert, T. E. and Reinherz, E. L. (1992) The CD3 $\zeta$  cytoplasmic domain mediates CD2-induced T cell activation. *J. Exp. Med.* 176, 139-145.

Hu, Q., Klippel, A., Muslin, A. J., Fantl, W. J. and Williams, L. T. (1995) Ras-dependent induction of cellular respond by constitutively active phosphatidylinositol-3 kinase. *Science* 268, 100-102.

Huber, L. A., Ulrich, O., Takai, Y., Lütcke, A., Dupree, P., Olkkonen, V., Virta, H., de Hoop, M. J., Alexandrov, K., Peter, M., Zerial, M. and Simons, K. (1994) Mapping of

---

Ras-related GTP-binding proteins by GTP-overlay following two-dimensional gel electrophoresis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91, 7874-7878.

Huby, R. D. J., Carlile, G. W. and Ley, S. C. (1995) Interactions between the protein-tyrosine kinase ZAP-70, the proto-oncoprotein Vav, and tubulin in Jurkat T cells. *J. Biol. Chem.* 270, 30241-30244.

Hurley, T. R., Hyman, R. and Sefton, B. M. (1993) Differential effects of expression of the CD45 tyrosine protein phosphatase on the tyrosine phosphorylation of the lck, fyn, and c-src tyrosine protein kinases. *Mol. Cell. Biol.* 13, 1651-1656.

Hutchcroft, J. E., Franklin, D. P., Tsai, B., Harrison-Findik, D., Varticovski, L. and Bierer, B. E. (1995) Phorbol ester treatment inhibits phosphatidylinositol 3-kinase activation by, and association with, CD28, a T-lymphocyte surface receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 8808-8812.

Irving, B. A. and Weiss, A. (1991) The cytoplasmic domain of the T cell receptor  $\zeta$  chain is sufficient to couple to receptor-associated signal transduction pathways. *Cell.* 64, 891-901.

Isakov, N., Wange, R. L., Burgess, W. H., Watts, J. D., Aebersold, R. and Samelson, L. E. (1995) ZAP-70 binding specificity to T cell receptor tyrosine-based activation motifs: the tandem SH2 domains of ZAP-70 bind distinct tyrosine-based activation motifs with varying affinity. *J. Exp. Med.* 181, 375-380.

Itohara, S., Nakanishi, N., Kanagawa, O., Kubo, R. and Tonegawa, S. (1989) Monoclonal antibodies specific to native murine T cell receptor  $\gamma\delta$ : analysis of  $\gamma\delta$  T cells during thymic ontogeny and in peripheral lymphoid organs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 5094-5098.

Iwashima, M., Irving, B. A., van Oers, N. S. C., Chan, A. and Weiss, A. (1994) Sequential interactions of the TCR with two distinct cytoplasmic tyrosine kinases. *Science.* 263, 1136-1139.

Izquierdo, M. and Cantrell, D. A. (1992) T-cell activation. *Trends Cell Biol.* 2, 268-271.

Jain, S. K., Langdon, W. Y. and Varticovsky, L. (1997) Tyrosine phosphorylation of p120cbl in BCR/abl transformed hematopoietic cells mediates enhanced association with phosphatidylinositol 3-kinase. *Oncogene* In press,

Janeway, C. (1992) The T cell receptor as a multicomponent signalling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T cell activation. *Annu. Rev. Immunol.* 11, 191.

Jin, Y.-L., Clayton, L., Howard, F., Koyasu, S., Sieh, M. and Steinbrich, R. (1990) Molecular cloning of the CD3  $\eta$  subunit identifies a CD3- $\zeta$  related product in thymus-derived cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 3319-3323.

Jin, Y. J., Koyasu, S., Moingeon, P., Steinbrich, R., Tarr, G. E. and Reinherz, E. L. (1990) A fraction of CD3 epsilon subunits exists as disulfide-linked dimers in both human and murine T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 265, 15850-15853.

June, C. H., Fletcher, M. C., Ledbetter, J. A., Schieven, G. L., Siegel, J. N., Phillips, A. F. and Samelson, L. E. (1990) Inhibition of tyrosine phosphorylation prevents T-cell receptor-mediated signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 7722-7726.

Kashishian, A., Kazlauskas, A. and Cooper, J. A. (1992) Phosphorylation sites in the PDGF receptor with different specificities for binding GAP and PI3 kinase in vivo. *EMBO J.* 11, 1373-1382.

Kapeller, R., Prasad, K. V., Janssen, O., Hou, W., Schaffhausen, B. S., Rudd, C. E. and Cantley, L. C. (1994) Identification of two SH3-binding motifs in the regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biol. Chem.* 269, 1927-1933.

Kappes, D. and Tonegawa, S. (1991) Surface expression of alternative forms of the TCR/CD3 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 337-348.

Kappes, D. J., Alarcon, B. and Rgueiro, J. R. (1995) T lymphocyte receptor deficiencies. *Curr. Opinion Immunol.* 7, 441-447.

Karnitz, L. M., Sutor, S. L. and Abraham, R. T. (1994) The Src-family kinase, fyn, regulates the activation of phosphatidylinositol 3-kinase in an interleukin 2-responsive T cell line. *J. Exp. Med.* 176, 1799-1808.

---

Katzan, S., Sutherland, M., Packham, G., Yi, T. and Weiss, A. (1994) The protein tyrosine kinase ZAP-70 can associate with the SH2 domain of proto-Vav. *J. Biol. Chem.* 269, 32579-32585.

Kavanaugh, W. M. and Williams, L. T. (1994) An alternative to SH2 domains for binding tyrosine-phosphorylated proteins. *Science.* 266, 1862-1865.

Kazlauskas, A. and Cooper, J. A. (1990) Phosphorylation of the PDGF receptor beta subunit creates a tight binding site for phosphatidylinositol 3-kinase. *EMBO J.* 9, 3279-3286.

Kelly, J. D., Haldeman, B. A., Grant, F. J., Murray, M. J., Seifert, R. A., Bowen-Pope, D. F., Cooper, J. A. and Kazlauskas, A. (1991) Platelet-derived growth factor (PDGF) stimulates PDGF receptor subunit dimerization and intersubunit trans-phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 266, 8987-8992.

Kim, T. J., Kim, Y. T. and Pillai, S. (1995) Association of activated phosphatidylinositol 3-kinase with p120cbl in antigen receptor-ligated B cells. *J. Biol. Chem.* 270, 27504-27509.

Kolanus, W., Romeo, C. and Seed, B. (1993) T cell activation by clustered tyrosine kinases. *Cell.* 74, 171-183.

Koyasu, S., Tse, A. G. D., Moingeon, P., Hussey, R. E., Mildonian, A., Hannisian, J., Clayton, L. K. and Reinherz, E. (1994) Delineation of a T-cell activation motif required for binding of protein tyrosine kinases containing tandem SH2 domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91, 6693-6697.

Krummel, M. F. and Allison, J. P. (1995) CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J. Exp. Med.* 182, 459-465.

Kumar, G., Wang, S., Gupta, S. and Nel, A. (1995) The membrane immunoglobulin receptor utilizes a Shc/Grb-2/hSos complex for activation of the mitogen-activated protein kinase cascade in a B-cell line. *Biochem. J.* 307, 215-223.

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

---

Ledbetter, J. A., Deans, J. P., Aruffo, A., Grosmaire, L. S., Kanner, S. B., Bolen, J. B. and Schieven, G. L. (1993) CD4, CD8 and the role of CD45 in T-cell activation. *Curr. Opin. Immunol.* 5, 334-340.

Letourneur, F. and Klausner, R. D. (1992) Activation of T cells by a tyrosine kinase activation domain in the cytoplasmic tail of CD3  $\epsilon$ . *Science.* 255, 79-82.

Ley, S. C., Tan, K. N., Kubo, R., Sy, M. S. and Terhorst, C. (1989) Surface expression of CD3 in the absence of T cell receptor (TCR): evidence for sorting of partial TCR/CD3 complexes in a post-endoplasmic reticulum compartment. *Eur. J. Immunol.* 19, 2309-2317.

Ley, S. C., Verbi, W., Pappin, D. J., Druker, B., Davies, A. S. and Crumpton, M. J. (1994) Tyrosine phosphorylation of a tubulin in human T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 24, 99-106.

Li, N., Batzer, A., Daly, R., Yajnik, V., Skolnik, E., Chardin, P., Bar-Sagi, D., Margolis, B. and Schlessinger, J. (1993) Guanine-nucleotide-releasing factor hSos1 binds to Grb2 and links receptor tyrosine kinases to Ras signalling. *Nature* 363, 85-88.

Li, W., Nishimura, R., Kashishian, A., Batzer, A. G., Kim, W. J., Cooper, J. A. and Schlessinger, J. (1994) A new function for a phosphotyrosine phosphatase: linking Grb-2-Sos to a receptor tyrosine kinase. *Mol. Cell. Biol.* 14, 509-517.

Lin, S.-Y., Ardouin, L., Gillet, A., Malissen, M. and Malissen, B. (1997) The single positive T cells found in CD3- $\zeta$ / $\eta$ -/- mice overly react with self-major histocompatibility complex molecules upon restoration of normal surface density of T cell receptor-CD3 complex. *J. Exp. Med.* 185, 707-715.

Linsley, P. and Ledbetter, J. (1993) The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. *Annu. Rev. Immunol.* 11, 191.

Liu, C.-P., Ueda, R., She, J., Sancho, J., Wang, B., Weddell, G., Loring, J., Kurahara, C., Dudley, E. C., Hayday, A., Terhorst, A. and Huang, M. (1993) Abnormal T cell development in CD3- $\zeta$  -/- mutant mice and identification of a novel T cell population in the intestine. *EMBO J.* 12, 4863-4875.

---

Love, P. E., Shores, E. W., Johnson, M. D., Tremblay, M. L., Lee, E. J., Grinberg, A., Huang, S. P., Singer, A. and Westphal, H. (1993) T cell development in mice that lack the  $\zeta$  chain of the T cell antigen receptor complex. *Science* 261, 918-921.

Luescher, I. F., Vivier, E., Layer, A., Mahiou, J., Godeau, F., Malissen, B. and Romero, P. (1995) CD8 modulation of T-cell antigen receptor-ligand interactions on living cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 373, 353-356.

Madrenas, J., Wange, R. L., Wang, J. L., Isakov, N., Samelson, L. E. and Germain, R. N. (1995)  $\zeta$  phosphorylation without ZAP-70 activation induced by TCR antagonists or partial agonists. *Science*. 267, 515-518.

Malissen, M., Gillet, A., Rocha, B., Trucy, J., Vivier, E., Boyer, C., Köntgen, F., Brun, N., Mazza, G., Spanopoulou, E., Guy-Grand, D. and Malissen, B. (1993) T cell development in mice lacking the CD3- $\zeta/\mu$  gene. *EMBO J.* 12, 4347-4355.

Mandiyan, V., O'Brien, R., Zhou, M., Margolis, B., Lemmon, M. A., Sturtevant, J. M. and Schlessinger, J. (1996) Thermodynamic studies of Shc phosphotyrosine interaction domain recognition of the NPXpY motif. *J. Biol. Chem.* 271, 4770-4775.

Manolios, N., Collier, S., Taylor, J., Pollard, J., Harrison, L. C. and Bender, V. (1997) T-cell antigen receptor transmembrane peptides modulate T-cell function and T cell-mediated disease. *Nature Med.* 3, 84-88.

Manolios, N., Kemp, O. and Li, Z. G. (1994) The T cell antigen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  chains interact via distinct regions with CD3 chains. *Eur. J. Immunol.* 24, 84-92.

Manolios, N., Letourneur, F., Bonifacino, J. S. and Klausner, R. D. (1991) Pairwise, cooperative and inhibitory interactions describe the assembly and probable structure of the T-cell antigen receptor. *EMBO J.* 10, 1643-1651.

Marengere, L. E. M., Waterhouse, P., Duncan, G. S., Mittrücker, H.-W., Feng, G.-S. and Mak, T. W. (1996) Regulation of T cell receptor signaling by tyrosine phosphatase SYP association with CTLA-4. *Science* 272, 1170-1176.

Mege, D., Di Bartolo, V., Germain, V., Tuosto, L., Michel, F. and Acuto, O. (1996) Mutation of tyrosines 492/493 in the kinase domain of ZAP-70 affects multiple T-cell receptor signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 271, 32644-32652.



---

Meisner, H., Conway, B. R., Hartley, D. and Czech, M. P. (1995) Interactions of Cbl with Grb-2 and phosphatidylinositol 3'-kinase in activated Jurkat cells. *Mol. Cell. Biol.* 15, 3571-3578.

Miceli, M. and Parnes, J. (1993) Role of CD4 and CD8 in T cell activation and differentiation. *Adv. Immunol.* 53, 59.

Moarefi, I., LaFevre-Bernt, M., Sicheri, F., Huse, M., Lee, C.-H., Kuriyan, J. and Miller, W. T. (1997) Activation of the Src-family tyrosine kinase Hck by SH3 domain displacement. *Nature* 385, 650-653.

Mustelin, T. and Burn, P. (1993) Regulation of Src family tyrosine kinases in lymphocytes. *TIBS* 13, 215-220.

Mustelin, T., Pessa-Morikawa, T., Autero, M., Gassmann, M., Andersson, L. C., Gahmberg, C. G. and Burn, P. (1992) Regulation of the p59 fyn protein tyrosine kinase by the CD45 phosphotyrosine phosphatase. *Eur. J. Immunol.* 22, 1173-1178.

Mustelin, T., Williams, S., Tailor, P., Couture, C., Zenner, G., Burn, P., Ashwell, J. D. and Altman, A. (1995) Regulation of the p70ZAP tyrosine protein kinase in T cells by the CD45 phosphotyrosine phosphatase. *Eur. J. Immunol.* 25, 942-946.

Nakanishi, S., Catt, K. and Balla, T. (1995) A wortmannin sensitive PI 4-kinase that regulates hormone-sensitive pools of inositolphospholipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 5317-5321.

Nel, A. E., Gupta, S., Lee, L., Ledbetter, J. A. and Kanner, S. B. (1995) Ligation of the T-cell antigen receptor (TCR) induces association of hSos1, ZAP-70, phospholipase C- $\gamma$ 1, and other phosphoproteins with Grb-2 and the  $\zeta$ -chain of the TCR. *J. Biol. Chem.* 270, 18428-18436.

Neumeinster, E. N., Zhu, Y., Richard, S., Terhorst, C., Chan, A. C. and Shaw, A. S. (1995) Binding of ZAP-70 to phosphorylated T-cell receptor  $\zeta$  and  $\eta$  enhances its autophosphorylation and generates specific binding sites for SH2 domain-containing proteins. *Mol. Cell. Biol.* 15, 3171-3178.

---

O'Rourke, A. M. and Mescher, M. F. (1993) The roles of CD8 in cytotoxic T lymphocytes function. *Immunol. Today*. 14, 183-187.

O'Shea, J. J., McVicar, D. W., Bailey, T. L., Burns, C. and Smyth, M. J. (1992) Activation of human peripheral blood T lymphocytes by pharmacological induction of protein-tyrosine phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 10306-10310.

Odai, H., Sasaki, K., Iwamatsu, A., Hanazono, Y., Tanaka, T., Mitani, K., Yazaki, Y. and Hirai, H. (1995) The proto-oncogene product c-Cbl becomes tyrosine phosphorylated by stimulation with GM-CSF or Epo and constitutively binds to the SH3 domains of Grb2/Ash in human hematopoietic cells. *J. Biol. Chem.* 270, 10800-10805.

Okada, S., Yamauchi, K. and Pessin, J. E. (1995) Shc isoform-specific tyrosine phosphorylation by the insulin and epidermal growth factor receptors. *J. Biol. Chem.* 270, 20737-20741.

Orloff, D. G., Ra, C., Frank, S. J., Klausner, R. D. and Kinet, J.-P. (1990) Family of disulphide-linked dimers containing the  $\zeta$  and  $\eta$  chains of the T-cell receptor and the  $\gamma$  chain of Fc receptors. *Nature* 347, 189-191.

Osman, N., Lucas, S. C., Turner, H. and Cantrell, D. A. (1995) A comparison of the interaction of Shc and the tyrosine kinase ZAP-70 with the T cell antigen receptor  $\zeta$ -chain tyrosine based activation motif. *J. Biol. Chem.* 270, 13981-13986.

Osman, N., turner, H., Lucas, S., Reif, K. and Cantrell, D. A. (1996) The protein interactions of the immunoglobulin receptor family tyrosine-based activation motifs present in the T cell receptor  $\zeta$  subunits and the CD3 $\gamma$ ,  $\delta$  and  $\epsilon$  chains. *Eur. J. Immunol.* 26, 1063-1068.

Ostergaard, H. L., Schakelford, D. A., Hurley, T. R., Johnson, P., Hyman, R., Sefton, B. M. and Trowbridge, I. S. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 8959-8963.

Panayotou, G. and Waterfield, M. D. (1992) Phosphatidylinositol 3-kinase a key enzyme in diverse signalling processes. *Trends Cell. Biol.* 2, 358-360.

Panchamoorthy, G., Fukazawa, T., Miyake, S., Soltoff, S., Reedquist, K., Druker, B., Shoelson, S., Cantley, L. C. and Band, H. (1996) p120cbl is a major substrate of

---

tyrosine phosphorylation upon B cell antigen receptor stimulation and interacts *in vivo* with fyn and syk tyrosine kinases, Grb-2 and Shc adaptors, and the p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biol. Chem.* 271, 3187-3194.

Pawson, T. (1997) New impressions of Src and Hck. *Nature* 385, 582-585.

Pawson, T. and Gish, G. D. (1992) SH2 and SH3 domains: from structure to function. *Cell* 71, 359-362.

Peter, M. E., Hall, C., Rühlmann, A., Sancho, J. and Terhorst, C. (1992) The T-cell receptor  $\zeta$  chain contains a GTP/GDP binding site. *EMBO J* 11, 933-941.

Peter, M. E., Wileman, T. and Terhorst, C. (1993) Covalent binding of guanine nucleotides to the CD3- $\gamma$  chain of the T cell receptor/CD3 complex. *Eur. J. Immunol.* 23, 461-466.

Pingel, J. and Thomas, M. (1989) Evidence that the leukocyte-common antigen is required for antigen-induced T lymphocyte proliferation. *Cell* 58, 1055.

Plas, D. R., Johnson, R., Pingel, J. T., Matthews, R. J., Dalton, M., Roy, G., Chan, A. C. and Thomas, M. L. (1996) Direct regulation of ZAP-70 by SHP-1 in T cell antigen receptor signaling. *Science* 272, 1173-1176.

Pleiman, C. M., Hertz, W. M. and Cambier, J. C. (1994.) Activation of phosphatidylinositol-3 kinase by src-family kinase SH3 binding to the p85 subunit. *Science.* 263., 1609-1612.

Prasad, K. V. S., Janssen, O., Kapeller, R., Raab, M., Cantley, L. C. and Rudd, C. E. (1993) Src-homology 3 domain of protein kinase p59fyn mediates binding to phosphatidylinositol 3-kinase in T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, 7366-7370.

Qian, D., Griswold-Prenner, I., Rasner, M. R. and Fitch, F. (1993) Multiple components of the T cell antigen receptor complex become tyrosine-phosphorylated upon activation. *J. Biol. Chem* 268, 4488-4493.

Raab, M., Cai, Y.-C., Bunnell, S. C., Heyeck, S. D., Berg, L. J. and Rudd, C. E. (1995) p56lck and p59fyn regulate CD28 binding to phosphatidylinositol 3-kinase, growth

---

factor receptor-bound protein Grb-2, and T cell-specific protein-tyrosine kinase ITK: Implications for T-cell costimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92, 8891-8895.

Raab, M., Yamamoto, M. and Rudd, C. E. (1994) The T-cell antigen CD5 acts as a receptor and substrate for the protein-tyrosine kinase p56lck. *Mol. Cell. Biol.* 14, 2862-2870.

Ravichandran, K. S. and Burakoff, S. J. (1994.) The adapter protein Shc interacts with the interleukin-2 (IL-2) receptor upon IL-2 stimulation. *J. Biol. Chem.* 269., 1599-1602.

Ravichandran, K. S., Lee, K. K., Songyang, Z., Cantley, L. C., Burn, P. and Burakoff, S. J. (1993) Interaction of Shc with the  $\zeta$  chain of the T cell receptor upon T cell activation. *Science.* 262, 902-905.

Reedquist, K. A., Fukazawa, T., Druker, B., Panchamoorthy, G., Shoelson, S. E. and Band, H. (1994) Rapid T-cell receptor-mediated tyrosine phosphorylation of p120, an Fyn/Lck Src homology 3 domain-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 4135-4139.

Reedquist, K. A., Fukazawa, T., Panchamoorthy, G., Langdon, W. Y., Shoelson, S. E., Druker, B. J. and Band, H. (1996) Stimulation through the T cell receptor induces Cbl association with Crk proteins and the guanine nucleotide exchange protein C3G. *J. Biol. Chem.* 271, 8435-8442.

Reif, K., Gout, I., Waterfield, M. D. and Cantrell, D. A. (1993) Divergent regulation of phosphatidylinositol 3-kinase P85 $\alpha$  and P85  $\beta$  isoforms upon T cell activation. *J. Biol. Chem.* 268, 10780-10788.

Renard, V., Romero, P., Vivier, E., Malissen, B. and Luescher, I. F. (1996) CD8 beta increases CD8 coreceptor function and participation in TCR-ligand binding. *J. Exp. Med.* 184, 2439-2444.

Reth, M. (1989) Antigen receptor tail clue. *Nature* 338, 383-384.

Rozdzial, M. M., Malissen, B. and Finkel, T. H. (1995) Tyrosine phosphorylated T cell receptor- $\zeta$  chain associates with the actin cytoskeleton upon activation of mature T lymphocytes. *Immunity* 3, 823-833.

Rordorf-Nikolic, T., van Horn, D. J., Chen, D., White, M. F. and Backer, J. M. (1995) Regulation of phosphatidylinositol 3'-kinase by tyrosyl phosphoproteins. Full activation requires occupancy of both SH2 domains in the 85-kDa regulatory subunit. *J. Biol. Chem.* 270, 3662-3666.

Rodriguez-Viciano, P., Warne, P. H., Vanhaesebroeck, B., Waterfield, M. D. and Downward, J. (1996) Activation of phosphoinositide 3-kinase by interaction with Ras and by point mutation. *EMBO. J.* 15, 2442-2451.

Rudd, C. E. (1990) CD4, CD8 and the TCR-CD3 complex: a novel class of protein-tyrosine kinase receptor. *Immunol. Today* 11, 400-406.

Rudd, C. E. (1996) Upstream-Downstream: CD28 cosignaling pathways and T cell function. *Immunity* 4, 527-534.

Rudd, C. E., Janssen, O., Cai, Y.-C., da Silva, A. J., Raab, M. and Prasad, K. V. S. (1994) Two-step TCR $\zeta$ /CD3-CD4 and CD28 signaling in T cells: SH2/SH3 domains, protein-tyrosine and lipid kinases. *Immunol. Today* 15, 225-234.

Saito, H., Koyama, T., Georgopoulos, K., Clevers, H., Haser, W. G., LeBien, T., Tonegawa, S. and Terhorst, C. (1987) Close linkage of the mouse and human CD3- $\gamma$  and  $\delta$ -chains suggest that their transcription is controlled by common regulatory elements. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 9131-9134.

Samelson, L. E., Phillips, A. F., Luong, E. T. and Klausner, R. D. (1990) Association of the fyn protein-tyrosine kinase with the T cell antigen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 4358-4362.

Sancho, J., Chatila, T., Wong, R. C., Hall, C., Blumberg, R., Alarcon, B., Geha, R. S. and Terhorst, C. (1989) T-cell antigen receptor (TCR)-alpha/beta heterodimer formation is a prerequisite for association of CD3-zeta 2 into functionally competent TCR.CD3 complexes. *J. Biol. Chem.* 264, 20760-20769.

Sancho, J., Peter, M. E., Franco, R., Danielian, S., Kang, J. S., Fagard, R., Woods, J., Reed, J. C., Kaoun, M. and Terhorst, C. (1993) Coupling of GTP-binding to the cell receptor (TCR)  $\zeta$ -chain with TCR-mediated signal transduction. *J. Immunol.* 150, 3230-3242.

Sancho, J., Franco, R., Chatila, T., Hall, C. and Terhorst, C. (1993) The T cell receptor associated CD3- $\epsilon$  protein is phosphorylated upon T cell activation in the two tyrosine residues of a conserved signal transduction motif. *Eur. J. Immunol.* 23, 1636-1642.

Sancho, J., Ledbetter, J. A., Choi, M.-S., Kanner, S. B., Deans, J. P. and Terhorst, C. (1992) CD3- $\zeta$  surface expression is required for CD4-p56 lck-mediated up-regulation of T cell antigen receptor-CD3 signaling in T cells. *J. Biol. Chem.* 267, 7871-7879.

Sawadkosal, S., Chang, J. H., Pratt, J. C., Wolf, G., Shoelson, S. E. and Burakoff, S. J. (1996) Tyrosine-phosphorylated Cbl binds to Crk after T cell activation. *J. Immunol.* 157, 110-116.

Sawadkosal, S., Ravichandran, K. S., Lee, K. K., Chang, J. H. and Burakoff, S. J. (1995) Crk interacts with tyrosine-phosphorylated p116 upon T cell activation. *J. Biol. Chem.* 270, 2893-2896.

Schwartz, R. H. (1996) Models of T cell anergy: is there a common molecular mechanism?. *J. Exp. Med.* 184, 1-8.

Secrist, J. P., Burns, L. A., Karnitz, L., Koretzky, G. A. and Abraham, R. T. (1993) Stimulatory effects of the protein tyrosine phosphatase inhibitor, pervanadate, on T-cell activation events. *J. Biol. Chem.* 268, 5886-5893.

Shi, J., Cinek, T., Truitt, K. E. and Imboden, J. B. Wortmannin, a phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, blocks antigen-mediated, but not CD3 monoclonal antibody-induced, activation of murine CD4<sup>+</sup> T cells.

Shinkai, Y. '., Ma, A., Cheng, H.-L. and Alt, F. W. (1995) CD3 $\epsilon$  and CD3 $\zeta$  cytoplasmic domains can independently generate signals for T cell development and function. *Immunity* 2, 401-411.

Shoelson, S. E., Sivaraja, M., Williams, K. P., Hu, P., Schlessinger, J. and Weiss, A. (1993) Specific phosphopeptide binding regulates a conformational change in the PI 3-kinase SH2 domain associated with enzyme activation. *EMBO J.* 12, 795-802.

---

Shores, E. W., Huang, K., Tran, T., Lee, E., Grinberg, A. and Love, P. E. (1994) Role of TCR  $\zeta$  chain in T cell development and selection. *Science* 266, 1047-1050.

Shores, E. W., Tran, T., Grinberg, A., Sommers, C. L., Shen, H. and Love, P. E. (1997) Role of the multiple T cell receptor (TCR)- $\zeta$  chain signaling motifs in selection of the T cell repertoire. *J. Exp. Med.* 185, 893-900.

Shores, E. W. and Love, P. E. (1996) Insights into T cell development and signal transduction provided by TCR- $\zeta$  chain deficient mice. *Intern. Rev. Immunol.* 13, 301-315.

Shores, E. W. and Love, P. E. (1997) TCR  $\zeta$  chain in T cell development and selection. *Curr. Opinion. Immunol.* 9, 380-389.

Sicheri, F., Moarefi, I. and Kuriyan, J. (1997) Crystal structure of the Src family tyrosine kinase Hck. *Nature* 385, 602-609.

Sieh, M., Bolen, J. B. and Weiss, A. (1993) CD45 specifically modulates binding of Lck to a phosphopeptide encompassing the negative regulatory tyrosine of Lck. *EMBO J.* 12, 315-321.

Sloan-Lancaster, J., Shaw, A. S., Rothbard, J. B. and Allen, P. M. (1994) Partial T cell signaling: altered phospho- $\zeta$  and lack of ZAP-70 recruitment in APL-induced T cell anergy. *Cell.* 79, 913-922.

Soltoff, S. P. and Cantley, L. C. (1996) p120cbl is a cytosolic adapter protein that associates with phosphoinositide 3-kinase in response to epidermal growth factor in PC12 and other cells. *J. Biol. Chem.* 271, 563-567.

Songyang, Z., Shoelson, S. E., McGlade, J., Olivier, P., Pawson, T., Bustello, X. R., Barbacid, M., Sabe, H., Hanafusa, H., Yi, T., Ren, R., Baltimore, D., Ratnofsky, S., Feldman, R. A. and Cantley, L. C. (1994) Specific motifs recognized by the SH2 domains of Csk, 3BP2, fps/fes, GRB-2, HCP, SHC, Syk and Vav. *Mol. Cell. Biol.* 2777-2785.

Songyang, Z., Shoelson, S. E., Chaudhuri, M., Gish, G., Pawson, T., Haser, W. G., King, F., Roberts, T., Ratnofsky, S., Lechleider, R. J., Neel, B. G., Birge, R. B., Fajardo, J. E., Chou, M. M., Hanafusa, H., Schaffhausen, B. and Cantley, L. C. (1993) SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell.* 72, 767-778.

Sperling, A. I., Auger, J. A., Ehst, B. D., Rulifson, I. C., Thompson, C. B. and Bluestone, J. A. (1996) CD28/B7 interactions deliver a unique signal to naive T cells that regulates cell survival but not early proliferation. *J. Immunol.* 157, 3909-3917.

Stanners, J., Kabouridis, P. S., McGuire, K. L. and Tsoukas, C. D. (1995) Interaction between G proteins and tyrosine kinases upon T cell receptor-CD3-mediated signaling. *J. Biol. Chem.* 270, 30635-30642.

Stein, P. H., Fraser, J. D. and Weiss, A. (1994) The cytoplasmic domain of CD28 is both necessary and sufficient for costimulation of interleukin-2 secretion and association with phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol. Cell. Biol.* 14, 3392-3402.

Straus, D. B., Chan, A. C., Patai, B. and Weiss, A. (1996) SH2 domain function is essential for the role of the Lck tyrosine kinase in T cell receptor signal transduction. *J. Biol. Chem.* 271, 9976-9981.

Straus, D. B. and Weiss, A. (1992) Genetic evidence for the involvement of the lck tyrosine kinase in signal transduction through the T cell antigen receptor. *Cell.* 70, 585-593.

Straus, D. B. and Weiss, A. (1993) The CD3 chains of the T cell antigen receptor associate with the ZAP-70 tyrosine kinase and are tyrosine phosphorylated after receptor stimulation. *J. Exp. Med.* 178, 1523-1530.

Streuli, M., Krueger, N. X., Thai, T., Tang, M. and Saito, H. (1990) Distinct functional roles of the two intracellular phosphatase like domains of the receptor linked protein tyrosine phosphatases LCA and LAR. *EMBO. J.* 9, 2399-2407.

Susa, M., Keeler, M. and Varticovski, L. (1992) Platelet-derived growth factor activates membrane-associated phosphatidylinositol 3-kinase and mediates its translocation from the cytosol. *J. Biol. Chem.* 267, 22951-22956.

Sunder-Plassmann, R., Lialios, F., Madsen, M., Koyasu, S. and Reinherz, E. L. (1997) Functional analysis of immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM)-mediated signal transduction: the two YxxL segments within a single CD3 $\zeta$ -ITAM are functionally distinct. *Eur. J. Immunol.* 27, 2001-2009.



---

Tanaka, S., Neff, L., Baron, R. and Levy, J. B. (1995) Tyrosine phosphorylation and translocation of the c-cbl protein after activation of tyrosine kinase signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 270, 14347-14351.

Thomas, S. M., Soriano, P. and Imamoto, A. (1995) Specific and redundant roles of Src and Fyn in organizing the cytoskeleton. *Nature* 376, 267-271.

Thompson, P. A., Gutkind, J. S., Robbins, K. C., Ledbetter, J. A. and Bolen, J. B. (1992) Identification of distinct populations of PI-3 kinase activity following T-cell activation. *Oncogene*. 7, 719-725.

Thompson, P. A., Gutkind, J. S., Robbins, K. C., Ledbetter, J. A. and Bolen, J. B. (1992) Identification of distinct populations of PI-3 kinase activity following T-cell activation. *Oncogene*. 7, 719-725.

Timson-Gauen, L. K., Kong, A. N., Samelson, L. E. and Shaw, A. S. (1992) p59fyn tyrosine kinase associates with multiple T-cell receptor subunits through its unique amino-terminal domain. *Mol. Cell. Biol.* 12, 5438-5446.

Timson-Gauen, L. K., Zhu, Y., Letourneur, F., Hu, Q., Bolen, J. B., Matis, L. A., Klausner, R. D. and Shaw, A. S. (1994) Interactions of p59fyn and ZAP-70 with T-cell receptor activation motifs: defining the nature of a signalling motif. *Mol. Cell. Biol.* 14, 3729-3741.

Toker, A., Meyer, M. and Reddy, K. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 32358-32367.

Truitt, K. E., Hicks, C. M. and Imboden, J. B. (1994) Stimulation of CD28 triggers an association between CD28 and phosphatidylinositol 3-kinase in Jurkat T cells. *J. Exp. Med.* 179, 1071-1076.

Turner, J., Brodsky, M., Irving, B., Levin, S., Perlmutter, R. and Littman, D. (1990) Interaction of the unique N-terminal region of tyrosine kinase p56lck with cytoplasmic domains of CD4 and CD8 is mediated by cysteine motifs. *Cell* 60, 755-765.

van Oers, N. S. C., Killeen, N. and A., W. (1994) ZAP-70 is constitutively associated with tyrosine-phosphorylated TCR $\zeta$  in murine thymocytes and lymph node T cells. 1, 675-685.

---

Vanhaesebroeck, B., Leever, S. J., Panayotou, G. and Waterfield, M. D. (1997) Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *TIBS* 22, 267-272.

Veillette, A., Bookman, M. A., Horak, E. M. and Bolen, J. B. (1988) The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck. *Cell* 55, 301-308.

Veillette, A., Caron, L., Fournel, M. and Pawson, T. (1992) Regulation of the enzymatic function of the lymphocyte-specific tyrosine protein kinase p56lck by the non-catalytic SH2 and SH3 domains. *Oncogene* 7, 971-980.

Veillette, A., Zúñiga-Pflücker, J. C., Bolen, J. B. and Kruisbeek, A. (1989) Engagement of CD4 and CD8 expressed on immature thymocytes induces activation of intracellular tyrosine phosphorylation pathways. *J. Exp. Med.* 170, 1671-1680.

von Willebrand, M., Baier, G., Couture, C., Burn, P. and Mustelin, T. (1994) Activation of phosphatidylinositol-3-kinase in Jurkat T cells depend on the presence of the p56lck tyrosine kinase. *Eur. J. Immunol.* 24, 234-238.

Waksman, G., Shoelson, S. E., Pant, N., Cowburn, D. and Kuriyan, J. (1993) Binding of a high affinity phosphotyrosyl peptide to the Src SH2 domain: Crystal structures of the complexed and peptide-free forms. *Cell* 72, 779-790.

Wang, J., Yan, Y., Garrett, T., Liu, J., Rodgers, D., Garlick, R. and al., e. (1990) Atomic structure of a fragment of human CD4 containing two immunoglobulin-like domains. *Nature.* 348, 411-418.

Wang, Y. and Pallen, C. J. (1991) The receptor like protein tyrosine phosphatase HPTP  $\alpha$  has two active catalytic domains with distinct substrate specificities. *J. Biol. Chem.* 268, 6835-6838.

Wange, R. L., Guitian, R., Isakov, N., Watts, J. D., Aebersold, R. and Samelson, L. E. (1995) Activating and inhibitory mutations in adjacent tyrosines in the kinase domain of ZAP-70. *J. Biol. Chem.* 270, 18730-18733.

Wange, R. L., Kong, A. N. and Samelson, L. E. (1992) A tyrosine-phosphorylated 70-kDa protein binds a photoaffinity analogue of ATP and associates with both the  $\zeta$

---

chain and CD3 components of the activated T cell antigen receptor. *J. Biol. Chem.* 267, 11685-11688.

Wange, R. L., Malek, S. N., Desiderio, S. and Samelson, L. E. (1993) Tandem SH2 domains of ZAP-70 bind to T cell antigen receptor  $\zeta$  and CD3  $\epsilon$  from activated Jurkat T cells. *J. Biol. Chem.* 268, 19797-19801.

Wange, R. L. and Samelson, L. E. (1996) Complex complexes: Signaling at the TCR. *Immunity* 5, 197-205.

Ward, S. G., June, C. H. and Olive, D. (1996) PI 3-kinase: a pivotal pathway in T-cell activation? *Immunol. Today.* 17, 187-197.

Ward, S. G., Reif, K., Ley, S., Fry, M. J., Waterfield, M. D. and Cantrell, D. A. (1992) Regulation of phosphoinositide kinases in T cells. *J. Biol. Chem.* 267, 23862-23869.

Waterhaouse, P., Marengere, L. E. M., Mittrücker, H.-W. and Mak, T. W. (1996) CTLA-4, a negative regulator of T-lymphocyte activation. *Immunol. Rev.* 153, 183-207.

Wegener, A.-M. K., Letourneur, F., Hoeveler, A., Brocker, T., Luton, F. and Malissen, B. (1992) The T cell receptor/CD3 complex is composed of at least two autonomous transduction modules. *Cell* 68, 83-95.

Weiss, A. (1991) Molecular and genetic insights into T cell antigen receptor structure and function. *Annu. Re. Genet.* 25, 487.

Weiss, A. (1993) T cell antigen receptor signal transduction: a tale of tails and cytoplasmic protein-tyrosine kinase. *Cell.* 73, 209-212.

Weiss, A. and Littman, D. R. (1994) Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. 76, 263-274.

Weissman, A., Hou, D., Orloff, D., Modi, W., Seuanez, H. and O'Brien, S. (1988) Molecular cloning and chromosomal localization of the human T-cell receptor  $\zeta$  chain: Distinction from the molecular CD3 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 9709-9713.

---

Weng, Z., Rickles, R. J., Feng, S., Richard, S., Shaw, A. S., Schreiber, S. L. and Brugge, J. S. (1995) Structure-function analysis of the SH3 domains: SH3 binding specificity altered by single amino acid substitutions. *Mol. Cell. Biol.* 15, 5627-5634.

Wiest, D. L., Ashe, J. M., Abe, R., Bolen, J. B. and Siger, A. (1996) TCR activation of ZAP70 is impaired in CD4+CD8+ thymocytes as a consequence of intrathymic interactions that diminish available p56lck. *Immunity.* 4, 495-504.

Wileman, T., Kane, L., Young, J., Carson, G. and Terhorst, C. (1993) Associations between subunit ectodomains promote T cell antigen receptor assembly and protect against degradation in the ER. *J. Cell. Biol.* 122, 67-78.

Wu, J., Zhao, Q., Kurosaki, T. and Weiss, A. (1997) The Vav binding site (Y315) in ZAP-70 is critical for antigen receptor-mediated signal transduction. *J. Exp. Med.* 185, 1877-1882.

Wymann, M. P., Bulgarelli-Leva, G., Zvelebil, M. J., Pirola, L., Vanhaesebroeck, B., Waterfield, M. D. and Panayotou, G. (1996) Wortmannin inactivates phosphoinositide 3-kinase by covalent modification of Lys-802, a residue involved in the phosphate transfer reaction. *Mol. Cell. Biol.* 16, 1722-1733.

Xu, W., Harrison, S. C. and Eck, M. J. (1997) Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-src. *Nature* 385, 595-602.

Yamaguchi, H. and Hendrickson, W. A. (1996) Structural basis for activation of human lymphocyte kinase Lck upon tyrosine phosphorylation. *nature* 384, 484-489.

Yamasaki, S., Takamatsu, M. and Iwashima, M. (1996) The kinase, SH3, and SH2 domains of lck play critical roles in T-cell activation after ZAP-70 membrane localization. *Mol. Cell. Biol.* 16, 7151-7160.

Yoakim, M., Hou, W., Songyang, Z., Liu, Y., Cantley, L. C. and Schaffhausen, B. (1994) Genetic analysis of a phosphatidylinositol 3-kinase SH2 domain reveals determinants of specificity. *Mol. Cell. Biol.* 14, 5929-5938.

Zhou, M.-M., Ravichandran, K. S., Olejniczak, E. T., Petros, A. M., Meadows, R. P., Sattler, M., Harlan, J. E., Wade, W. S., Burakoff, S. J. and Fesik, S. W. (1995)

Structure and ligand recognition of the phosphotyrosine binding domain of Shc. *Nature* 378, 584-592.

Anel, A., Buferne, M., Boyer, C., Schmitt-Verhulst, A.-M. and Golstein, P. (1994) T cell receptor-induced Fas ligand expression in cytotoxic T lymphocyte clones is blocked by protein tyrosine kinase inhibitors and cyclosporin A. *Eur. J. Immunol.* 24, 2469-2476.