

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I**



**SEÑALIZACIÓN DIFERENCIAL EN CÉLULAS T  
MUTANTES EN TCR $\beta$  RESISTENTES A APOPTOSIS:  
ESTUDIO DE INTERMEDIARIOS TEMPRANOS Y  
TARDÍOS**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

Emma Teixeira Pernas

Bajo la dirección del doctor

Rafael Bragado Herrero

**Madrid, 2002**

**ISBN: 84-669-1848-5**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE C.C. QUÍMICAS**

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I**

**SEÑALIZACIÓN DIFERENCIAL EN CÉLULAS T  
MUTANTES EN TCR $\beta$  RESISTENTES A  
APOPTOSIS: ESTUDIO DE INTERMEDIARIOS  
TEMPRANOS Y TARDIOS**

Memoria presentada para optar al grado de Doctora por :  
**EMMA TEIXEIRO PERNAS**

DIRECTOR

**Dr. Rafael Bragado Herrero**  
Jefe Asociado del Departamento de Inmunología  
Fundación Jiménez Díaz

**MADRID 2001**

*Y si tuviera toda la Ciencia,  
pero no tuviera Caridad...  
No sería nada.*

San Pablo

A mi queridísimo Padre,  
que me dio la vida y  
me enseñó cómo lucharla.

## Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer al Dr. Rafael Bragado la oportunidad de asomarme al mundo de la Ciencia, la confianza que puso en mí, su sinceridad, rigor científico y sentido crítico.

Gracias al Dr. Balbino Alarcón por su interés en todo el proyecto, por sus comentarios científicos.

También quiero agradecer al Dr. Fernando Vivanco su generosidad en los momentos críticos.

Por supuesto, doy las gracias a los laboratorios allende las fronteras españolas que tan bien me acogieron y de los que aprendí no sólo Ciencia sino también mucha humanidad. Especialmente al Dr. Amnon Altman y al Dr. Tony Magee.

Gracias a todos los laboratorios que en España nos han echado más de una mano, confirmándome que la única forma de avanzar en la Ciencia es el diálogo y la interacción. Especialmente, quiero mencionar los laboratorios del Dr. Balbino Alarcón, Dr. J.M. Redondo, Dr. JA. López de Castro, Dra. Marisa Toribio en el C.B.M.; laboratorios de Dr. Martínez Landazuri, Dr. López Cabrera, Dr. Lopez Botet en el Hospital de la Princesa y más que mi pobre memoria no logra recordar ahora.

Agradezco también los comentarios críticos y la ayuda del Dr. Manolo Izquierdo, Dr. MA Vega y Dr. Xosé Bustelo.

Asimismo, agradezco al Dr. Martín Villalba su hospitalidad, generosidad, humildad y su sabiduría científica en la tierra donde siempre brilla el sol y los trajes de neopreno de los surfers.

Como no, a mi buen amigo el Dr. Norberto Serpente y su familia que me descubrió de nuevo la filosofía de la Ciencia. Gracias por no cejar en la lucha y enseñarme que aunque el Sistema Científico falle no se debe perder la fé en lo que uno cree.

Gracias a la Fundación Jiménez Díaz, Universidad Complutense de Madrid y Comunidad de Madrid por ofrecerme todos los medios para el desarrollo de esta Tesis.

No quiero olvidarme de toda la gente que ha estado a mi lado en el laboratorio. Sin duda vosotros me habéis enseñado más de mí y de la vida que lo que se pueda aprender en cualquier Tesis.

Agradezco con mucho cariño a mi amigo Rafa nuestros "bombardeos" científicos, su apoyo incondicional y su perseverancia. Me obligaron muchas veces a reflotar y a contemplar la verdad pura y libre de todo autoengaño.

Gracias a mi amiga Almudena. Dentro y fuera de la Ciencia has tenido siempre la palabra oportuna, aquella que no sale de la conveniencia sino del más puro corazón.

A mi familia les doy las gracias por ser siempre el buen refugio. Sin vosotros no hubiera resistido. Gracias Quique porque aunque me cueste, me muestras siempre cuál es el valor justo de las cosas y tu buen humor y paciencia siempre me consuela.  
A mi madre porque gracias a ella y por ella, continuo luchando y a mi padre que aún lejos sigue guardándome.

# ÍNDICE

# INDICE

<b>ABREVIATURAS</b>	7-9
<b>INTRODUCCIÓN</b>	11-42
<b>1. El receptor de la célula T o complejo TCR/CD3.</b>	14-18
1.1 Estructura del complejo TCR/CD3	14
1.1 Función de los ITAM de CD3 y $\zeta$ en la transmisión de la señal.	16
<b>2. La transmisión de la señal inducida por la estimulación del complejo TCR/CD3</b>	18-28
2.1 Señalización parcial	18
2.2 Contribución de los diferentes dominios del TCR $\alpha\beta$ a la transducción de señales.	19
2.3 Importancia de los Rafts de membrana como soporte para la formación de complejos de señalización	21
2.4 Regulación de la transducción de la señal por protein tirosin quinasas (PTKs).	22
2.5 Moléculas adaptadoras o “linkers”.	23
<b>3. Principales rutas de transducción de señales</b>	28-38
3.1 La Ruta de Ras/MAPKs	28
3.1.1. Ruta de Ras/RafK/ERK.	28
3.1.2. Ruta de activación de jun quinasa (JNK)	29
3.1.3. Ruta de activación de p38 MAPK.	30
3.1.4. La interacción o “cross-talk” entre las distintas rutas de MAPKs.	30
3.1.5. Familia de factores de transcripción Fos/Jun inducidos, via TCR, por la activación de la cascada de MAPKs	32
3.2 Ruta de activación de NF-kB	33
3.2.1. Familia de NF-kB/ Rel e I $\kappa$ B.	35
3.3 Ruta de PLC $\gamma$ 1 y vía del Ca $^{2+}$	36

3.3.1. Familia de proteínas NF-AT.	37
3.4 Influencia de las proteina quinasas c ( PKC) en las principales rutas de señalización.	38
<b>4. Apoptosis: Muerte celular inducida por activación (AICD)</b>	40-42
4.1 La apoptosis en la célula T: Muerte celular inducida por activación	40
4.2 Sistema Fas-FasL.	40
4.3 Regulación de la expresión de FasL.	41
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	44-46
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	48-59
1. <b>Materiales</b>	48-51
2. <b>Métodos</b>	52-59
<b>RESULTADOS</b>	61-107
1. <b>Estudio de los fenómenos de señalización tempranos</b>	61-69
Discusión de los resultados	70-72
2. <b>Estudio de los fenómenos de señalización intermedios</b>	73-83
3. <b>Estudio de las funciones efectoras</b>	84-86
Discusión de resultados	87-90
4. <b>Estudio de la regulación transcrpcional de FasL en la muerte celular inducida por activación del complejo TCR/CD3</b>	91-104
Discusión de resultados	105-107
<b>DISCUSIÓN GENERAL</b>	109-113
<b>CONCLUSIONES</b>	115
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	117-133
<b>ANEXO</b>	135



## **ABREVIATURAS**

<b>Ac</b>	Anticuerpo
<b>AICD</b>	Muerte celular inducida por activación
<b>APC</b>	Célula presentadora de antígeno
<b>APL</b>	Ligando peptídico alterado
<b><math>\alpha</math>-PTyr</b>	Anticuerpo anti fosfotirosina
<b>Cross-linking</b>	Entrecruzamiento
<b>Cross-talk</b>	Referente a la interacción o comunicación cruzada entre rutas de señalización
<b>CART</b>	Motivo transmembrana conservado de receptores de antígeno
<b>cDNA</b>	Ácido desoxirribonucleico complementario del ARN mensajero
<b>DAG</b>	Diacilglicerol
<b>DIGs</b>	Dominios enriquecidos en glicolípidos insolubles en detergentes
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>Downstream</b>	Referente a los sucesos o intermediarios de la señal situados por debajo de aquel al que se hace referencia.
<b>ECL</b>	Método de quimioluminiscencia incrementada
<b>EMSA</b>	Ensayo de retardo de movilidad electroforética
<b>ERK</b>	Quinasa reguladora temprana
<b>FasL</b>	Ligando de Fas
<b>FITC</b>	Isocianato de fluoresceína
<b>GEMs</b>	Membranas enriquecidas en glicoesfingolípidos
<b>GM1</b>	Gangliósido considerado como marcador de Rafts lipídicos de membrana
<b>F.T.</b>	Factor de transcripción
<b>IB</b>	Inmunoblotting o Inmunodetección
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	Interferon $\gamma$

<b>IL-2</b>	Interleuquina 2
<b>IP</b>	Inmunoprecipitación
<b>IP<sub>3</sub></b>	Inositol trifosfato
<b>ITAM</b>	Motivo de activación de inmunorreceptores basado en tirosina
<b>JNK</b>	Quinasa reguladora de c-Jun
<b>Kd</b>	Kilodaltons
<b>LAT</b>	Linker para la activación de la célula T
<b>Leu</b>	Leucina
<b>LINKERS</b>	Referido a moléculas adaptadoras
<b>MAPKs</b>	Quinasas proteicas activadas por mitógenos
<b>MHC</b>	Complejo principal de inmunohistocompatibilidad
<b>MUT</b>	Mutante
<b>NF-AT</b>	Factor nuclear de células T activadas
<b>NF-κB</b>	Factor nuclear kappa B
<b>PATCHING</b>	Dícese de la formación de agregados inducidos en la membrana de células activadas
<b>PAGE-SDS</b>	Electroforesis en geles de poliacrilamida en SDS
<b>pb</b>	par de bases
<b>PBS</b>	Tampón salino de fosfatos
<b>PCR</b>	Reacción de cadena de la polimerasa
<b>PIP2</b>	Fosfatidil inositol bifosfato
<b>PI3-K</b>	Fosfatidil inositol 3- quinasa
<b>PKC</b>	Proteína quinasa C
<b>PLCγ1</b>	Fosfolipasa C gamma 1

<b>PMA</b>	Phorbol 12-myristate 13- acetate
<b>PTK</b>	Proteína tirosin quinasa
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RNA<sub>m</sub></b>	Ácido ribonucleico mensaero
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato sódico
<b>SEB</b>	Enterotoxina B de <i>Staphylococcus aureus</i>
<b>SLP-76</b>	Proteína leucocitaria con dominios SH2 de 76 Kd
<b>TCR</b>	Receptor de la célula T
<b>TCR<math>\beta</math></b>	Cadena $\beta$ del TCR
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral $\alpha$
<b>Triggering</b>	Estimulación. Alude al proceso de estimulación del TCR e inmediato disparo de la señal
<b>Tyr</b>	Tirosina
<b>Rafts</b>	GEMs o DIGs
<b>Reporter</b>	Vectores que portan el gen reportero de luciferasa
<b>Shift</b>	Alude al cambio de movilidad electroforética que se produce cuando una proteína o complejo proteico cambia su peso molecular o tamaño.
<b>SMAC</b>	Agregados de activación supramolecular
<b>Supershift</b>	Dícese del shift que se produce en los complejos formados por un oligonucleótido, el factor de transcripción que se le une y el anticuerpo específico de dicho F.T. que se muestran con un tamaño mayor en los EMSAs
<b>Upstream</b>	Referente a los sucesos o intermediarios de la señal situados por encima de aquel al que se hace referencia.
<b>WB</b>	Western Blot
<b>WT</b>	Wild type o salvaje
<b>ZAP-70</b>	Proteína asociada a $\zeta$ de 70 Kd
<b><math>\zeta</math></b>	Cadena zeta

# INTRODUCCIÓN

---

## UNA VISIÓN MUY GENERAL DE LA ACTIVACIÓN DE LA CÉLULA T

Como consecuencia del reconocimiento antigénico que lleva a cabo el receptor de antígeno, la célula T experimenta una serie de procesos bioquímicos intracelulares que en su conjunto se conocen como **activación de la célula T**. Para el desarrollo de la misma, se requiere de la activación de diversas rutas de señalización que se integran a nivel nuclear para dar lugar a respuestas efectoras específicas (proliferación, secreción de citoquinas, apoptosis, diferenciación, etc.).

A modo de resumen y teniendo en cuenta lo que se expondrá en capítulos posteriores, en la **señalización del linfocito T** se pueden distinguir las siguientes etapas ( Figura 1):

Sucesos o pasos tempranos de la señalización. En esta etapa se incluyen la fosforilación de los ITAMs del complejo TCR/CD3, la activación de proteintirosinquinasa (PTKs) y el reclutamiento a los Rafts de membrana de estas PTKs y de moléculas adaptadoras para formar complejos de señalización que activen rutas de señalización específicas.

Activación de rutas de señalización específicas basadas en cascadas enzimáticas de quinasa.

Inducción de factores de transcripción y su translocación al núcleo.

Activación de la expresión génica.

Fase efectora de la respuesta a la activación en la que se incluyen secreción de citoquinas ( en el caso de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y en menor medida CD8<sup>+</sup>) que conducirán a proliferación (IL-2) o muerte ( ligando de Fas o factor de necrosis tumoral), diferenciación ( IL-3), anergia, etc.

En los últimos años, diversos estudios han demostrado que en la activación de la célula T la transducción de la señal viene acompañada, de forma “quasi” paralela y simbiótica, por un conjunto de cambios morfológicos, que suceden en el linfocito T como consecuencia de su interacción con la célula presentadora de antígeno, y culminan en lo que se ha dado en llamar la **sinapsis inmunológica**<sup>1</sup>. Tres pasos fundamentales sustentan este tipo de fenómenos en la célula T:

- (1) En primer lugar, la célula T interacciona físicamente con la célula presentadora (APC) a través de una zona específica de contacto que se mantiene gracias a cambios en el citoesqueleto promovidos fundamentalmente por la unión de las moléculas coestimuladoras, presentes en la membrana de la célula T, con sus ligandos correspondientes en la superficie de las APCs.
- (2) La segunda fase es dependiente de antígeno y se caracteriza por un ensanchamiento de la zona de contacto, hasta convertirse en una protuberancia masiva de la membrana que abarca desde la célula T a la APC. En esta fase, se

inician señales (en ausencia de liberación de  $Ca^{2+}$ ), reguladas tanto por el TCR como por las moléculas coestimuladoras, en las que también participa el citoesqueleto ( hasta la fecha se ha descrito un solo complejo de señalización en esta fase que está constituido por SLP-76-Vav-PAK-1) y en ella, la célula T en ausencia de antígeno o a una baja concentración de él, “ rueda ” sobre la superficie de la APC hasta alcanzar la interacción óptima.

- (3) Por último, en una tercera etapa se consigue una estabilización de la interacción célula T-APC. Esta estabilización parece estar controlada por un aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular que “ordenaría” a la célula T que parase de “rodar” sobre la superficie de la APC. En torno a esta zona de contacto estable denominada **SMAC**, se produce una distribución organizada de receptores y moléculas de señalización: en una zona más interna se localizan TCR, CD4, Lck, Fyn y PKC $\theta$  y en una más externa, integrinas y componentes del citoesqueleto. Se especula además con que los Rafts podrían ser los responsables de la organización espacial de las moléculas de señalización claves en el SMAC.

A pesar de que estos dos tipos de fenómenos, los bioquímicos y los morfológicos, son importantes para que se produzca una activación total de la célula T parece que los sucesos de señalización temprana no dependen de la formación del SMAC. Se tiende a pensar que las rutas de señalización que disparan las moléculas coestimuladoras y el TCR son las que organizan el SMAC. Es decir, son los cambios morfológicos, de adhesión y de motilidad los que hacen posible la formación del SMAC y aseguran que, una vez que el linfocito T encuentre el ligando apropiado y específico en la superficie de la APC, la señal se mantenga, de forma estable, durante el tiempo que sea necesario.

En esta Tesis nos hemos centrado fundamentalmente en los fenómenos de tipo bioquímico, que regulan la activación de la célula T a través de rutas de transducción de señales específicas, aunque fisiológicamente no deben aislarse de los de tipo morfológico que no han sido objeto de estudio.

## ACTIVACIÓN DE LA CÉLULA T

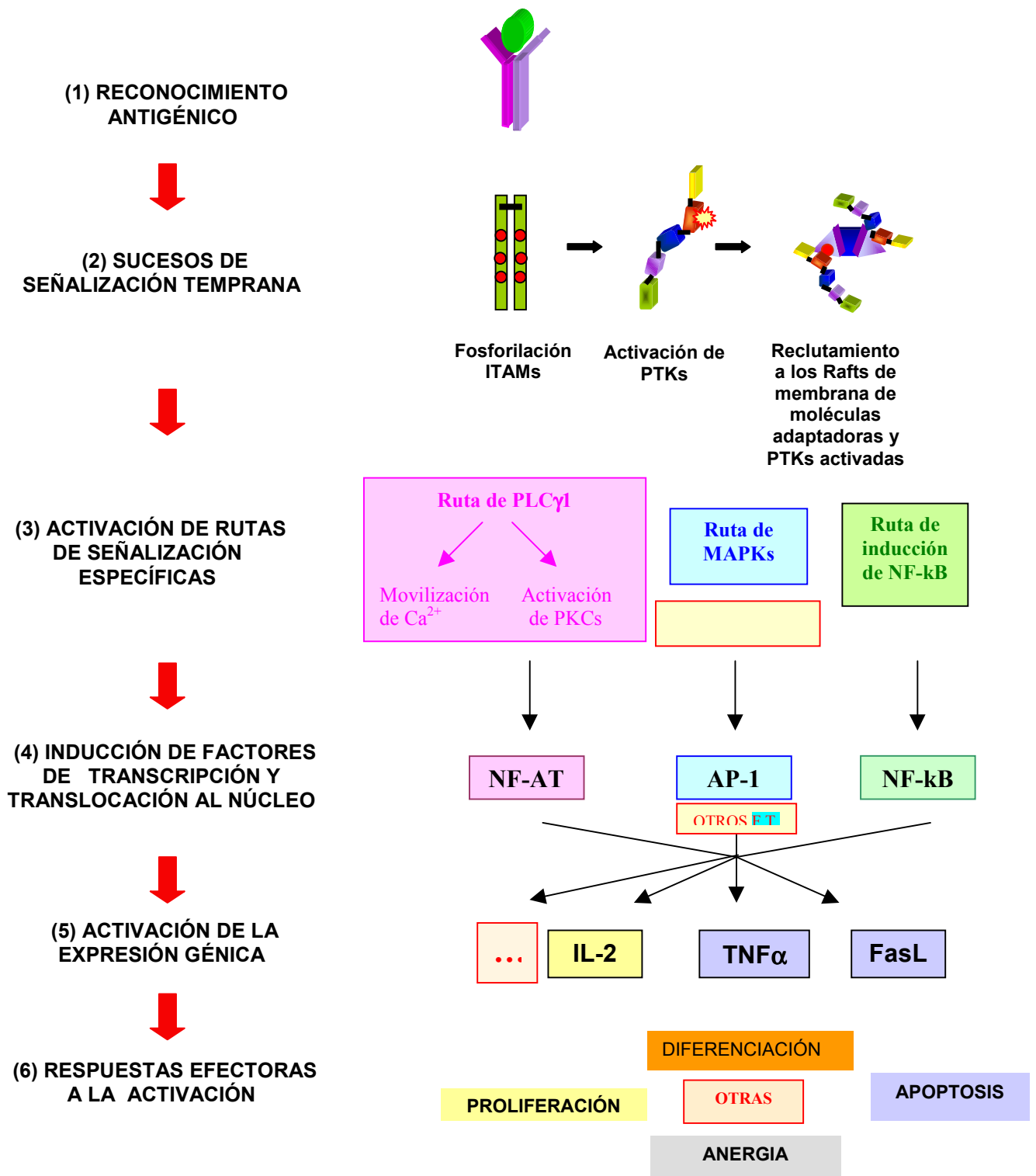


Figura 1. Representación esquemática de las fases que conducen a la activación de la célula T.



## I. EL RECEPTOR DE LA CÉLULA T O COMPLEJO TCR/CD3

El linfocito T se caracteriza por el reconocimiento de péptidos procedentes del procesamiento de antígenos proteicos, físicamente asociados a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), en la superficie de las células presentadoras de antígeno (APCs). El reconocimiento del antígeno se realiza, en el caso de la célula T, a través de su receptor de superficie o TCR y es unido con la formación del SMAC, uno de los pasos esenciales y primeros para que tenga lugar la activación del linfocito.

### 1.1 ESTRUCTURA DEL COMPLEJO TCR/CD3.

El **receptor de la célula T** es un heterodímero constituido por dos cadenas polipeptídicas conocidas con  $\alpha$  y  $\beta$ . Estas cadenas permanecen unidas covalentemente por puentes disulfuro y presentan una gran similitud estructural con la familia de las inmunoglobulinas. Ambas cadenas poseen regiones variables (V) y constantes (C) unidas entre sí, en el caso de la cadena  $\alpha$ , por un fragmento de unión (J) y en el caso de la cadena  $\beta$ , además, por un fragmento que le confiere gran diversidad (D). Las regiones V, D y J son, debido a su gran variabilidad, las responsables de la alta especificidad del TCR. Las cadenas del TCR se organizan en tres dominios estructurales: un dominio extracelular responsable de la alta especificidad del TCR, una región transmembrana, y un corto tallo intracelular carente de actividad enzimática.

Debido a que el TCR, como tal, no posee una actividad enzimática intrínseca se vale de otras estructuras proteicas, que asociadas de forma no covalente al heterodímero  $\alpha\beta$ , transmiten la señal al interior celular tras el reconocimiento antigénico. A estas cadenas proteicas se las conoce como proteínas del complejo CD3- $\zeta$  y junto con el heterodímero  $\alpha\beta$  dan lugar al complejo TCR/CD3.

Se conocen como proteínas del **COMPLEJO CD3** a las cadenas  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$ . Además, el 90% de los complejos TCR/CD3 contienen el homodímero de cadenas no glicosiladas  $\zeta$  y el 10%, el heterodímero de cadenas  $\zeta$  y  $\eta$ , unidos por puentes disulfuro.

Las **cadenas  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$**  guardan una gran homología de secuencia entre sí. Estructuralmente, están constituidas por un dominio extracelular del tipo inmunoglobulina invariante, un corto péptido de conexión, un dominio transmembrana, que contribuye a mantener la interacción con las cadenas del TCR $\alpha\beta$ ,

y, por último, un largo tallo citoplasmático. Es en este tallo donde radica la capacidad de transducción de la señal, debido a la existencia de un motivo altamente conservado en proteínas de membrana transductoras de señal. Este motivo, conocido como ITAM (motivo de activación de inmunorreceptores basado en tirosinas) se identifica con la secuencia YXXL X<sub>6-9</sub> YXXL, siendo X cualquier aminoácido. Este motivo aparece una sola vez en los dominios citoplasmáticos de las cadenas  $\delta$ ,  $\gamma$  y  $\epsilon$ .

Las **cadena  $\zeta$  y  $\eta$**  poseen los mismos dominios extracelular y transmembrana pero difieren en el intracelular. Los dominios extracelulares son cortos, los transmembrana poseen un residuo de Asp cargado negativamente, al igual que el resto de las cadenas del CD3, y el citoplasmático, en el caso de la cadena  $\zeta$ , es largo y contiene tres motivos ITAM.

En cuanto a la **estequiometría del complejo TCR/CD3** hasta hace poco tiempo se mantenía un modelo monodimérico en TCR $\alpha\beta$ , es decir un solo heterodímero  $\alpha\beta$  asociado a las cadenas del CD3 (dos heterodímeros,  $\gamma\epsilon$  y  $\delta\epsilon$ ) y al homodímero  $\zeta$  (Figura 2). En los últimos años, diversos estudios han empezado a dar más valor a un modelo dimérico del complejo que consistiría en dos heterodímeros  $\alpha\beta$  cuya interacción estaría mediada por el homodímero  $\zeta$  y a su vez, cada cadena  $\alpha$  y  $\beta$  del TCR asociadas no covalentemente e indistintamente con los dímeros CD3 $\epsilon$ /CD3 $\gamma$  o CD3 $\epsilon$ /CD3 $\delta$ . Este modelo estequiométrico se hace más que razonable frente al clásico porque, favorece el equilibrio de cargas en la región transmembrana necesario para mantener la estabilidad del complejo. <sup>2,3,4,5</sup>.

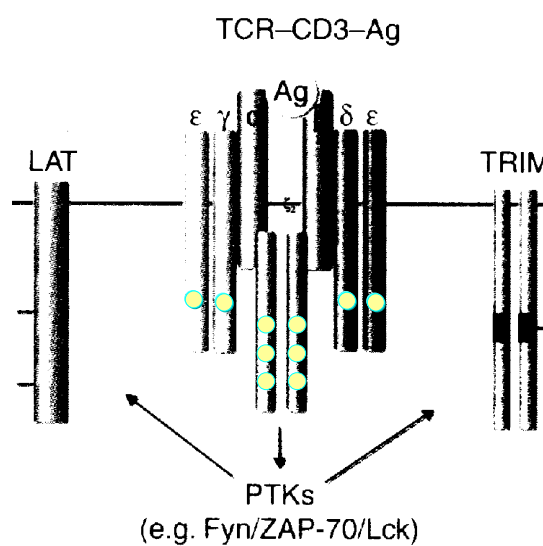


Figura 2. Estructura del complejo TCR/CD3- $\zeta$

## 1.2 FUNCIÓN DE LOS ITAM de CD3 y $\zeta$ EN LA TRANSMISIÓN DE LA SEÑAL.

La importancia de las cadenas del CD3 en la transmisión de la señal se ha puesto de manifiesto en los experimentos realizados con quimeras resultantes de la fusión de dominios extracelulares y transmembrana de moléculas como CD8, CD16 o CD25 con las colas citosólicas de las cadenas del CD3 y  $\zeta$ . La estimulación de linfocitos T, en los que se habían expresado estas quimeras, con anticuerpos que reconocían la porción extracelular, mimetizaba por completo las señales desencadenadas tras la estimulación del complejo TCR/CD3 completo <sup>6,7,8, 9</sup>.

Puesto que  $\zeta$  posee tres ITAMs conocidos, con seis sitios potencialmente fosforilables en tirosina, puede dar lugar a distintas especies fosforiladas. Las potenciales formas fosforiladas de  $\zeta$  adquieren máxima importancia en el contexto de los trabajos que se realizan con péptidos alterados. Estos estudios, defienden la posibilidad de que en la célula T tengan cabida señalizaciones parciales y diferenciadas dependiendo de si el ligando que interacciona con el TCR es agonista, agonista parcial o antagonista. La singularidad de  $\zeta$ , al ser la única cadena con tres motivos ITAMs, le confiere la posibilidad de funcionar como una molécula capaz de modular selectivamente la transmisión de la señal según la avidéz de la interacción del TCR con el ligando (agonistas, antagonistas o agonistas parciales). Esta interacción se traduce en distintos estados de fosforilación de la cadena  $\zeta$ , lo cual redundará en respuestas diferenciadas en función, a su vez, del número o el tipo de moléculas adaptadoras con dominios SH2 reclutadas por los  $\zeta$  ITAMs <sup>10,11</sup>.

Otra cuestión importante es la posible redundancia de los ITAMs, es decir, el significado fisiológico de la existencia de diferentes ITAMs, en un mismo complejo TCR/CD3. Fundamentalmente se han venido manejando dos teorías: Por un lado, la teoría de la calidad de la señal defiende que a través de ITAMs específicos se dirijan señales diferentes <sup>8,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21</sup>. Por otro lado, la teoría que aboga por una función amplificadora más que diversificadora de la señal, que podría explicar cómo a partir del bajo número de interacciones TCR-ligando que se producen es posible generar una señal óptima de activación <sup>22,23</sup>. Los trabajos más recientes en torno a los ITAMs de la cadena  $\zeta$  parecen validar la coexistencia de las dos hipótesis. Se ha sugerido que los ITAMs de la cadena  $\zeta$  no son esenciales ni para el desarrollo, ni para la activación, ni para la respuesta efectora de las células T. De hecho, células T maduras de ratones transgénicos que carecen de ITAMs funcionales de  $\zeta$  pero mantienen los del resto de las cadenas del CD3, no muestran reducción ni en los sucesos de activación, ni en las funciones efectoras<sup>24</sup>. Pero también, se ha demostrado claramente que los ITAMs de la cadena  $\zeta$  contribuyen a la selección de algunos TCRs. Así, en células T de ratones transgénicos que expresan cadenas  $\zeta$  con diferente

número de ITAMs, se ha demostrado una relación entre el número de ITAMs de  $\zeta$  y la eficacia de los procesos de selección positiva y negativa<sup>25</sup>. Todo ello parece sugerir que, aunque los ITAMs de CD3 y  $\zeta$  se complementan de forma cuantitativa para amplificar la señal, de algún modo también influyen de forma cualitativa en la generación de respuestas efectoras.

## II. LA TRANSMISIÓN DE LA SEÑAL INDUCIDA POR LA ESTIMULACIÓN DEL COMPLEJO TCR/CD3

La transmisión de una señal eficaz en el linfocito T depende de toda una serie de fenómenos que se relacionan con la interacción entre el TCR y los complejos péptido-MHC, y su duración en el tiempo, en el contexto de la sinapsis inmunológica. Fundamentalmente se trata de formación de microdominios de membrana (SMACs y Rafts), polarización de la célula T, “triggering” del TCR, iniciación y sostenimiento de la señal.

Varios modelos intentan explicar cómo la estimulación del TCR desencadena la señalización. Los modelos tradicionales de *multimerización del TCR* que posibilita la concentración de moléculas de señalización o *cambio conformacional del TCR* que se transmite a las cadenas del CD3 han perdido mucha validez frente a los nuevos modelos que abogan por la *heterodimerización del TCR* con correceptores, la *asociación del TCR con los Rafts lipídicos* o la ubicación del TCR en zonas de las que se excluyen fosfatasa tirocinicas (modelo de *segregación cionética*). Sin embargo, éstos últimos tampoco han sido estudiados con el rigor suficiente y suscitan bastantes controversias <sup>26</sup>.

La teoría más consistente explica el triggering en términos de una interacción TCR/MHC-pep con una vida media adecuada como para que de forma seriada diferentes TCRs interaccionen con el ligando <sup>27</sup> disparen la señal, se internalicen y degraden. Para que la señal sea sostenida, y por tanto eficaz, nuevos TCRs se van ubicando en la zona de la sinapsis inmunológica e interaccionando con los ligandos libres que presenta la APC. Según esta teoría, los ligandos eficientes serán los de baja afinidad y alta tasa de disociación, que faciliten la disponibilidad de complejos MHC-péptidos libres para interaccionar con nuevos TCRs.

Una vez que el TCR ha decodificado la señal que se deriva de la naturaleza y la cantidad de ligando presentado, y ha iniciado la transducción de la misma, la señal se amplifica gracias a la intervención de los Rafts lipídicos que, junto con las quinasas y moléculas adaptadoras que aglutina, se encargan de integrar las señales que fluyen del TCR hacia las diferentes cascadas de señalización.

### 2.1. SEÑALIZACIÓN PARCIAL.

Fisiológicamente, el TCR ha de encontrarse con péptidos de afinidades muy diferentes (agonistas, agonistas parciales y antagonistas) y con cantidades de antígeno presentado variables. Ambos fenómenos limitan la estabilidad en el tiempo de la

interacción, de modo que a mayor cantidad de antígeno presentado, siendo éste de la afinidad adecuada (baja) se potencia el triggering de un mayor número de TCRs y por tanto la señal se amplifica, dando lugar a una activación óptima. Los trabajos realizados con péptidos alterados apoyan esta idea <sup>28</sup>. Los péptidos alterados son variantes estructurales de ligandos agonistas del TCR, cuya interacción con el TCR suele cursar con patrones alterados de las formas fosforiladas de  $\zeta$  y ausencia de fosforilación y actividad quinasa de ZAP-70 y generar señales incompletas que se manifiestan por la selección de determinadas respuestas manteniendo otras funcionalmente inactivas. Así, en el caso de ligandos agonistas parciales (con afinidades muy altas o muy bajas) la interacción con el TCR puede ser tan alta como para que el antígeno no quede libre para interactuar con el siguiente TCR o tan baja como para que la interacción no sea estable. Ambas situaciones desembocarían en activaciones de tipo parcial, en las que se disparan de forma selectiva ciertas rutas de señalización mientras que otras permanecen intactas. Por otro lado, se considera que los péptidos antagonistas actúan inhibiendo el triggering de los agonistas, su afinidad por el TCR es tan débil que anulan la agregación de las moléculas de MHC/TCR<sup>29,30,31,32</sup>.

La idea de señalización parcial, condicionada por el modo en que la interacción TCR-ligando modula la transducción de señales adquiere especial importancia en el proceso de selección tímica.

## **2.2. CONTRIBUCIÓN DE LOS DIFERENTES DOMINIOS DEL TCR $\alpha\beta$ A LA TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES**

Diversos grupos se han esforzado en demostrar que cada uno de los dominios estructurales, y aparentemente anodinos, de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del TCR son imprescindibles para los mecanismos de activación de la célula T. Los trabajos de Ed Palmer, se han centrado en el estudio del dominio CP de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  y citosólico de la cadena  $\beta$ . Mediante la generación de TCRs quiméricos, en los que se substituyen residuos de estos dominios por los de las cadenas  $\delta$  y  $\gamma$  del TCR $\gamma\delta$  alternativamente, manteniendo la otra cadena salvaje del TCR $\alpha\beta$ , se ha demostrado que estos dominios son capaces de controlar la eficacia o calidad de la transducción de señales al contribuir a mantener la estabilidad de la interacción con las cadenas del CD3 y con  $\zeta$ . Alternativamente, la importancia de dicha interacción en la transducción de señales se ha puesto de manifiesto en estudios efectuados en la cadena  $\zeta$ . La mutación de ciertos residuos claves de la región extracelular de  $\zeta$  y de las Cys que mantienen el puente disulfuro dificulta la expresión en membrana del complejo TCR/CD3 <sup>33,34</sup>, el reclutamiento de ZAP-70 y la fosforilación de LAT <sup>33</sup>.

En el caso del dominio CP de la cadena  $\alpha$ , los estudios en hibridomas que expresan el TCR quimérico han demostrado que este dominio es importante para sostener la interacción del TCR con las cadenas del CD3  $\zeta$  y  $\delta$ , para la fosforilación de  $\zeta$ , para la correcta activación de la vía del  $\text{Ca}^{2+}$  y para la secreción de IL-2<sup>35</sup>. Asimismo, los ratones que expresan TCRs que carecen o son mutantes en un motivo conservado de este dominio CP tienen bloqueada la selección positiva pero no la negativa<sup>36,37</sup> debido a deficiencias en el reclutamiento de Lck y ZAP-70 y el reclutamiento a los GEMs de fosfo- $\zeta$  y LAT que redundan en una inhibición de la activación de ERK<sup>37</sup>. El CP de la cadena  $\beta$  en cambio, no parece clave para mantener la interacción con el resto de las cadenas del CD3 y  $\zeta$ , ni para el reclutamiento de ZAP-70 pero si, para la transducción eficaz de señales, como por ejemplo la activación de la vía del  $\text{Ca}^{2+}$ <sup>38</sup>. Las colas citosólicas de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  tampoco resultan necesarias para la expresión del TCR en la membrana, ni para la señalización. Únicamente la cola citosólica de la cadena  $\alpha$  parece importante para la modulación negativa del TCR/CD3 mediada por la fosforilación PKC- dependiente de CD3 $\gamma$ <sup>39</sup>.

En cuanto a los **dominios transmembrana** de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del TCR, se sabía que los residuos cargados contenidos en ellos eran imprescindibles para la asociación con el resto de las cadenas del CD3 durante el ensamblaje y posterior expresión estable en la membrana aunque, en el caso de TCR $\beta$ , su asociación con las cadenas del CD3 está mediada por los dominios extracelulares y no por los transmembrana<sup>40</sup>.

En el año 1993 nuestro grupo detectó la existencia de un motivo de tipo ITAM (responsables directos de la transmisión de señales) en la región transmembrana de la cadena  $\beta$  del TCR. Dicho motivo está conservado evolutivamente y aparece también en la cadena homóloga  $\gamma$  del TCR $\gamma\delta$  pero no en las cadenas clonotípicas  $\alpha$  y  $\delta$ . Se llevaron a cabo estudios estructurales y funcionales en clones, derivados de la línea T Jurkat, mutantes en el motivo ITAM de la cadena  $\beta$ , en concreto en el residuo de Tyr C-terminal para determinar la implicación de dicho motivo en el ensamblaje y transporte a la membrana del complejo TCR/CD3 y en la transducción de la señal ( Tesis Doctoral de D<sup>a</sup> Almudena García Sahuquillo.1999). Asimismo, estudios posteriores de tipo teórico, en los que era denominado como CART (conserved antigen receptor transmembrane motif), le atribuían potenciales implicaciones en la señalización del linfocito<sup>41</sup>.

Los estudios estructurales demostraron que el dominio transmembrana de TCR $\beta$  es importante para mantener la asociación de  $\zeta$  al resto del complejo TCR/CD3 y para el reclutamiento de ZAP-70 y su localización en la región perimembranal. Las células mutantes no mostraron diferencias significativas en la expresión del complejo TCR/CD3 en membrana, ni en la asociación de éste al resto de las cadenas del CD3<sup>42,43</sup>.

Además, los estudios funcionales determinaron la implicación de este motivo en la transducción de señales. Mientras que en las células mutantes estimuladas, no se apreciaron alteraciones en el patrón de fosforilación total en residuos de tirosina, ni en la fosforilación y actividad quinasa ( frente a un subbstrato exógeno) de ZAP-70, la fosforilación de la cadena  $\zeta$  estaba seriamente disminuida ( no así, la relación entre las distintas formas fosforiladas de  $\zeta$  ). Tampoco se apreciaron diferencias en la inducción de la expresión de marcadores de activación tempranos (medida a 24h): CD25 y CD69, ni en la modulación negativa del complejo TCR/CD3<sup>42;43</sup>.

De modo contrario a lo que sucedía con el dominio CP de la cadena  $\alpha$ , la secreción de IL-2 y la vía del  $\text{Ca}^{2+}$  no se veían afectadas por la estimulación del TCR mutado. Sin embargo, las células mutantes mostraban una importante deficiencia en la apoptosis inducida via TCR, debido a un bloqueo en la expresión de FasL <sup>42</sup>. Asimismo, es de especial importancia resaltar que, **todas las diferencias funcionales observadas desaparecían con estímulos inespecíficos del tipo esteroides de forbol y iónoforos de  $\text{Ca}^{2+}$  que mimetizan la señal del TCR.**

Resultados análogos se obtuvieron en trabajos posteriores efectuados en hibridomas de ratón que expresaban TCRs con la misma mutación. Sin embargo, cuando el mismo residuo de Tyr era mutado a Phe también se bloqueaba la secreción de IL-2. Los autores explican las diferencias en función del tipo celular en el que se trabaja, ya que incluso el mismo TCR mutado cuando se expresa en hibridomas diferentes, proporciona resultados distintos <sup>44,45</sup>.

### **2.3. IMPORTANCIA DE LOS RAFTS DE MEMBRANA COMO SOPORTE PARA LA FORMACIÓN DE COMPLEJOS DE SEÑALIZACIÓN.**

Los Rafts de membrana, también conocidos como GEMs, DRMs, DIGs o DIMs, son fracciones de membrana con un alto contenido en esfingolípidos, glicoesfingolípidos,  $\text{PIP}_2$  y colesterol cuyas propiedades biofísicas ayudan a mantener la estabilidad de la estructura. Se caracterizan por su insolubilidad en presencia de ciertos detergentes no iónicos a bajas temperaturas ( 1% Triton X-100 a 4°C) y se cree podrían ser representativos de microdominios lipídicos y proteicos que se mantienen íntegros y aislados del resto de la membrana plasmática.

Diversos estudios han logrado determinar la importancia de los Rafts de membrana en la transmisión de la señal tras el reconocimiento antigénico. Por ejemplo la disgregación de los rafts lipídicos que se produce tras deplecionar el colesterol de la membrana produce una considerable disminución de la fosforilación en tirosinas y la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$ , tras estimulación del TCR <sup>46</sup>. En otros estudios realizados a tiempos más tempranos de depleción, lo que se produce es un aumento transitorio en



la fosforilación basal en Tyr de TCR $\zeta$ , ZAP-70, LAT y PLC $\gamma$ 1 que redundan en una intensificación transitoria de la actividad de ERK <sup>47</sup>. En células T no estimuladas no existe apenas asociación del TCR a los Rafts, sin embargo, tras la estimulación antigénica la asociación aumenta considerablemente y en concreto los Rafts se enriquecen en la forma hiperfosforilada p23 de  $\zeta$  <sup>46,48</sup> y consiguientemente, se aumenta el nivel de ZAP-70 reclutada y activada. Parece por tanto, que la función de los Rafts podría ser doble: (1) En ausencia del estímulo, los Rafts serían de un tamaño muy pequeño y apenas contendrían moléculas de señalización. En esta fase su misión consistiría en mantener aislados los diferentes componentes de la señalización con el fin de impedir una activación espontánea de las diferentes rutas. (2) Tras estimulación, se produciría la agregación de los diferentes Rafts con el consiguiente reclutamiento de moléculas de señalización y exclusión de fosfatasas. Esto aumentaría la concentración local de estas moléculas de señalización y permitiría la combinación específica de algunas haciendo más rápida, eficaz y selectiva la transducción de la señal.

#### **2.4. REGULACIÓN DE LA TRANSDUCCIÓN DE LA SEÑAL POR PROTEIN TIROSIN QUINASAS (PTKs).**

Uno de los primeros pasos que se producen en la célula T, tras la estimulación del TCR, es la activación de una pléyade de protein tirosin quinasas que se asocian con los correceptores CD4 y CD8 y con las cadenas del CD3 y  $\zeta$  para reclutar y fosforilar en Tyr enzimas del tipo de la PLC $\gamma$ 1 así como moléculas adaptadoras como LAT, Vav, SLP-76 o Cbl. <sup>49</sup>.

Entre las PTKs más importantes se encuentran miembros de las familias de Src (Lck y Fyn), Syk (ZAP-70), Tec y Csk. Estructuralmente se caracterizan por poseer dominios SH2 y SH3 a través de los cuales se asocian con otras proteínas portadoras de residuos de Tyr fosforilados y regiones ricas en Pro, respectivamente

##### **Miembros de la familia de Src y Syk**

**Lck** es responsable de la fosforilación de los residuos tirosínicos de los ITAM de las cadenas del CD3 y  $\zeta$  <sup>50,51</sup> y también se encarga de fosforilar y contribuir a la activación de ZAP-70 <sup>52,53</sup>. Una PTK (Csk) y una fosfatasa (CD45) constitutivamente activas son las responsables de modular la actividad catalítica de Lck <sup>54</sup>. La importancia de Lck se pone de manifiesto en los estudios realizados con ratones y líneas celulares deficientes en esta PTK <sup>55,56,57</sup> que demuestran su importancia en el desarrollo tímico y en la transducción de la señal. Sus diferentes dominios parecen contribuir a la disección de vías de señalización. Así, células deficientes en Lck reconstituidas con un mutante de

Lck en el que está inactivado el dominio SH3, recuperan la señalización en la vía del  $Ca^{2+}$ , pero mantienen el defecto en la vía de Ras/MAPKs.<sup>58</sup> En cuanto a **Fyn** también parece tener un papel en la señalización de la célula T aunque de menor importancia. Los ratones deficientes en Fyn no muestran ninguna alteración en el desarrollo tímico pero si alteraciones en la población T madura<sup>59</sup>. Todavía se desconoce si Lck y Fyn tienen sustratos distintos o si su función es redundante en la célula T.

**ZAP-70** es un miembro de la familia de Syk que se expresa en células T y NK. Después de que ZAP-70 haya sido reclutado a los ITAMs fosforilados, lck se encarga de fosforilar ZAP-70 en su Tyr 493 y permite que tenga lugar un fenómeno de transfosforilación o autofosforilación de la propia ZAP-70 con el fin de que se induzca por completo su actividad catalítica. En gran medida, la actividad de ZAP-70 viene determinada por la fosforilación de las tirosinas presentes en los diferentes dominios que conforman su estructura. A estas tirosinas se les ha atribuido tanto papeles positivos como negativos en la regulación de la actividad de la quinasa<sup>49</sup>.

Estudios realizados con ratones knock-out para ZAP-70<sup>60,61</sup> y con células de pacientes deficientes en ZAP-70<sup>62,63</sup> confirman la función esencial que esta PTK ejerce en la transducción de la señal. La ausencia de ZAP-70 provoca, tras la estimulación del TCR, defectos en el patrón de fosforilación tirosínica, la movilización de calcio, la secreción de IL-2, la expresión de CD69 y proliferación. También ZAP-70 resulta importante en el desarrollo tímico. Su ausencia produce un bloqueo en el estadio  $CD4^+CD8^+$ . Asimismo, los trabajos llevados a cabo con la línea celular deficiente en ZAP-70, P116 han demostrado que es importante para (1) la fosforilación de PLC $\gamma$ 1, SLP-76 y LAT<sup>64-66</sup> y (2) para la movilización de  $Ca^{2+}$ , la inducción de NF-AT y la expresión del gen de la IL-2<sup>67</sup>.

## 2.5. MOLÉCULAS ADAPTADORAS O “LINKERS”.

En los últimos años han sido caracterizadas una serie de proteínas carentes de una actividad enzimática intrínseca pero capaces de dirigir interacciones moleculares del tipo proteína-proteína, y proteína-lípido. A estas moléculas se las conoce como **proteínas adaptadoras o “linkers”** y se las considera críticas a la hora de conectar las señales procedentes de las quinasas anteriormente mencionadas y las rutas de señalización “downstream” en el interior celular. Las proteínas adaptadoras se distinguen por poseer una estructura dividida en dominios modulares y/o por poseer residuos específicos que dirigen interacciones constitutivas e inducibles con otras moléculas regulando así, la formación de complejos de señalización específicos que, tras la estimulación antigénica, dispararán las diferentes rutas de señalización.

En la Figura 3 se muestra la estructura de las moléculas adaptadoras más importantes.

**LAT** es la abreviatura de “linker for activation of T cells”. Su expresión es específica del sistema hematopoyético y se limita a células T, células NK, plaquetas y mastocitos<sup>64</sup>. LAT es una proteína integral de membrana ligada constitutivamente a subdominios especializados o GEMs debido a la palmitoilación de dos residuos de Cys (Cys26 y Cys29) del dominio transmembrana. Estos residuos son fundamentales para que LAT desarrolle su función. De hecho, mutantes en los residuos susceptibles de palmitoilación, son incapaces de reconstituir las señales vía TCR, ya que impiden que LAT se reclute a los GEMs y se fosforile en Tyr<sup>68,69</sup>.

Tras el “triggering” del TCR, los residuos de Tyr de su larga cola citosólica son fosforilados por ZAP-70, permitiendo de esta forma el reclutamiento de moléculas de señalización portadoras de dominios SH2, entre las que se incluyen Grb-2, Grap, PLC $\gamma$ 1, la subunidad reguladora p85 de PI3-K, SLP-76, Vav, Cbl y Gads/Grf40/GrpL. Tres líneas de experimentación confirman que la función de LAT es fundamental para el reclutamiento a la membrana de moléculas de señalización después del triggering del TCR. En primer lugar, la sobre-expresión de una variante de LAT con residuos de Tyr mutados produce una inhibición de la actividad transcripcional del gen de la IL-2 a través del bloqueo en la inducción de NF-AT y AP-1<sup>64</sup>. En segundo lugar, dos líneas Jurkat deficientes en la expresión de LAT (J.CaM2 y ANJ3) muestran un defecto importante en la fosforilación de otras moléculas de señalización como PLC $\gamma$ 1, en el flujo de Ca<sup>2+</sup> y en la activación de ERK. En cambio, otros sucesos upstream como la fosforilación de ZAP-70 permanecen inalterados<sup>70,71</sup>. Por último, ratones deficientes en LAT se caracterizan por la ausencia de células T periféricas maduras debido a un severo defecto en el desarrollo tímico (bloqueado en el estadio CD4-CD8<sup>-</sup> mientras que las poblaciones de células NK y plaquetas no están alteradas<sup>72</sup>).

**SLP-76** se divide estructuralmente en un dominio N-terminal, una región ácida con residuos de Tyr claves para el desarrollo de su función (YESP, YESP y YEPP) que interaccionan con los dominios SH2 de moléculas de señalización como Vav, e Itk; una región rica en residuos de Pro, a través de la cual, interacciona con el dominio SH3 de Grb-2 y se asocia constitutivamente a Gads, y un dominio SH2 en la región C-terminal que se une a SLP-130/FYB y a una fosfoproteína aún no identificada de 62kDa.

La importante función de SLP-76 en la regulación de la transducción de la señal vía complejo TCR/CD3 se ha puesto de manifiesto en: (1) estudios en los que la sobre-expresión de esta molécula adaptadora producía un aumento en la inducción del factor de transcripción NFAT y en la expresión del gen de IL-2<sup>73</sup>, (2) ensayos en líneas

celulares Jurkat deficientes en SLP-76, en los que se demuestra un grave defecto en la fosforilación de PLC $\gamma$ 1, movilización de Ca<sup>2+</sup>, activación de ERK e inducción de la expresión del gen de IL-2 <sup>74</sup> y en que (3) ratones deficientes en SLP-76 muestran un serio bloqueo en el desarrollo tímico, concretamente en el estadio CD4-CD8-, probablemente debido a un defecto en la señal del pre-TCR <sup>75,76</sup>.

Aunque SLP-76 es una proteína citosólica, sus funciones están íntimamente conectadas con LAT. Se ha demostrado recientemente que, en la línea celular T Jurkat, una de las tareas fundamentales de LAT es reclutar SLP-76 a los GEMs para que pueda ser fosforilada y asociarse así a otras PTKs necesarias para la vía de Ca<sup>2+</sup> y la activación de ERK<sup>77</sup>.

SLP-76, junto con LAT, está también implicada en la activación de p21Ras. Para que Ras se active es necesario el reclutamiento a la membrana de Grb-2 asociada a Sos. Dado que LAT posee múltiples motivos de unión para Grb-2 se la ha relacionado con la activación de la vía Ras/MAPKs. No obstante, el hecho de que las células deficientes en SLP-76 muestren también un grave defecto en la activación de Ras, a pesar de presentar unos niveles de Grb-2 asociada a LAT normales, hace pensar que Ras debe ser también activada de una forma independiente de Sos. Se ha sugerido que el complejo de señalización formado por los Gads que interaccionan con SLP-76 podría también ejercer esa función<sup>78</sup>. Otra posibilidad, no dependiente de LAT, es la que tiene en cuenta al complejo trimolecular SLP-76-Vav-Nck que además de contribuir a la polimerización de actina inducida a través del TCR<sup>79</sup>, podría contribuir a la inducción de NFAT y la activación de ERK <sup>80</sup>.

**Cbl** es una de las pocas proteínas adaptadoras que funciona regulando negativamente la transducción de la señal. Su estructura, esquematizada en la Figura 3, posee una serie de residuos de Tyr susceptibles de fosforilación, tras la estimulación via TCR, que le permiten asociarse con proteínas con dominios SH2. Así, se han descrito asociaciones con Vav, Crk, PI3K, Fyn y ZAP-70 (en este caso a través del dominio PTB).

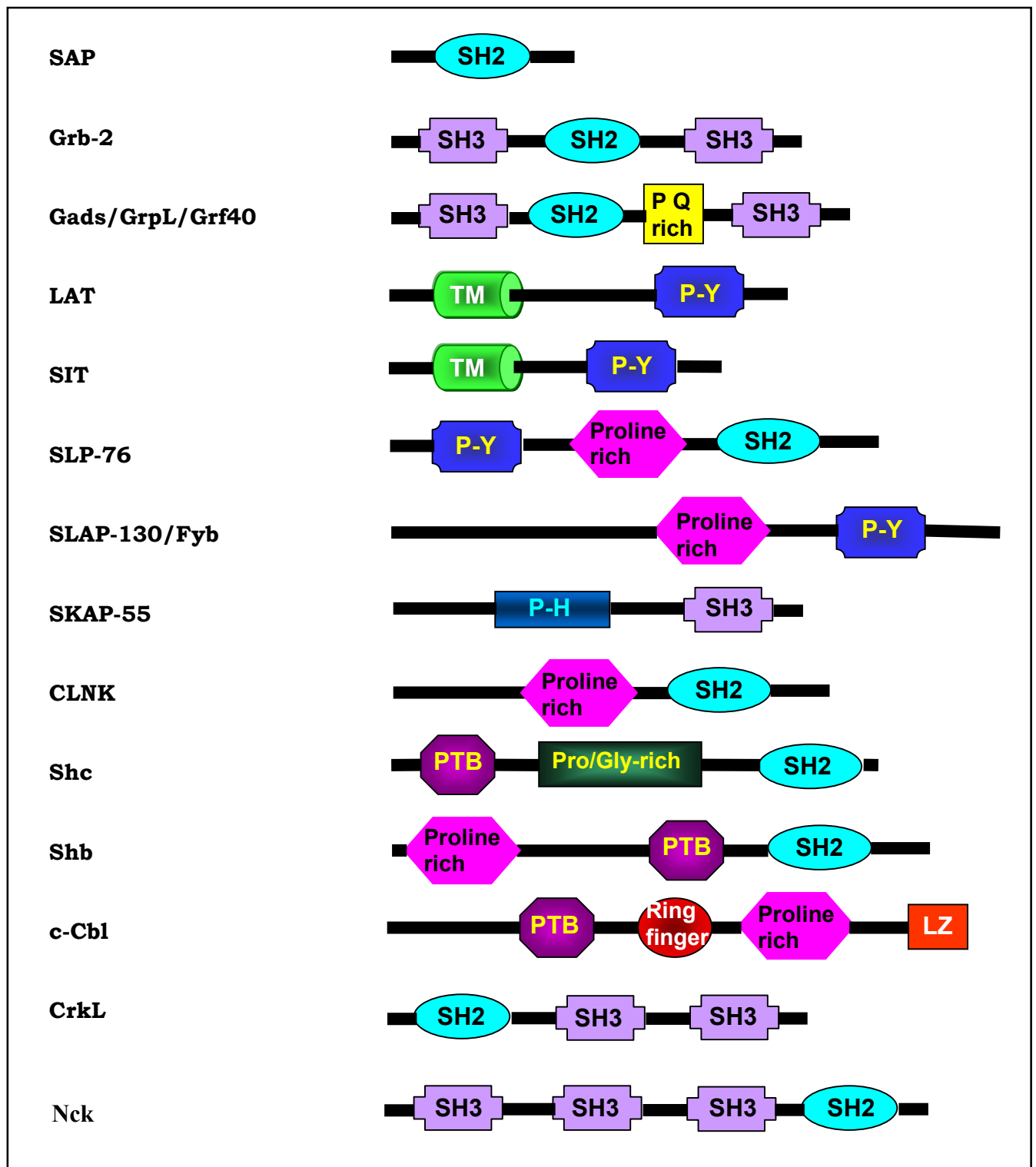
La sobreexpresión de Cbl en la línea T Jurkat supone una grave alteración en la inducción de AP-1 via TCR. Asimismo, en ratones deficientes en Cbl, ZAP-70, SLP-76 y LAT están hiperfosforilados lo cual indica claramente que Cbl regula de forma negativa la actividad de ZAP-70 y por consiguiente de sus sustratos<sup>81</sup>. También se ha descrito la asociación de Cbl con Grb-2 y se cree que la asociación Cbl-Crkl permitiría activar a la proteína G Rap-1, que a su vez, bloquearía la función de Ras <sup>82</sup>.

**Vav** es un miembro de la familia Dbl y se expresa exclusivamente en células del sistema hematopoyético y en trofoblastos. Su estructura consiste en un dominio DH que le confiere su actividad GEF ( factor intercambiador de nucleótidos de guanina)

sobre las GTPasas Rac, Rho y Cdc42, seguido por uno PH que le permite anclarse en la membrana. Además, posee un dominio rico en Cisteína, un dominio SH2 y dos dominios SH3. Los trabajos realizados en ratones deficientes en Vav han puesto de manifiesto la importancia de Vav en los procesos de selección tímica <sup>83</sup> y en la activación de la célula T <sup>84,85</sup>, en la reorganización del citoesqueleto <sup>86</sup> y en la agregación del TCR <sup>87,88</sup>.

Vav resulta rápidamente fosforilada en residuos de Tyr tras la estimulación del TCR en un proceso en el que es requerida su interacción con ZAP-70 <sup>89</sup>. Recientemente, se ha sugerido que ZAP-70 estaría encargada de traspasar los complejos Grb-2-Vav a la molécula adaptadora LAT <sup>90</sup>, facilitando así la traslocación de Vav a la membrana y su fosforilación <sup>71</sup>. La interacción de Vav con el receptor CD28 también contribuye a dicha translocación e inicia una vía de señalización caracterizada por la activación de PI3-K que sinergiza con la desencadenada por la estimulación del TCR <sup>91</sup>. Tras el triggering del TCR, Vav participa, mediante la activación de las proteínas Rho/Rac, en la activación de múltiples vías de señalización gracias a la sinergia que mantiene con otras vías, fundamentalmente las de Ras y SLP-76. Se ha relacionado a Vav con la activación de JNK, PAK y PIP5-K. Estas quinasas a su vez, contribuirían a la activación de la ruta de Ras al estimular a Raf o MEK/ERK (caso de PAK), a la movilización de calcio y a la reorganización del citoesqueleto de la actina (caso de PIP5-K)<sup>92</sup>. A nivel transcripcional se ha vinculado a Vav con la inducción de NF-AT, SRF y NF-κB <sup>92</sup>.

Se ha demostrado también que, Vav interacciona con SLP-76 a través de los residuos fosforilados en Tyr de esta última. Sin embargo, esta asociación no parece ser esencial para que se produzca el sinergismo entre SLP-76 y Vav necesario para la inducción de NF-AT y AP-1<sup>93</sup>. No está claro cual podría ser el significado de dicha interacción, aunque algunos trabajos indican que estaría favorecida por la coestimulación de CD28 y que SLP-76 podría, de esa forma, actuar como reclutador del complejo Vav-Rac<sup>92</sup>.



**Figura. 3** Representación esquemática de las estructuras de las moléculas adaptadoras más relevantes en la señalización en célula T. Se dividen en dominios del tipo: SH2, que reconocen Tyr fosforiladas; PTB, que reconocen residuos de tirosina fosforilados adyacentes a otros residuos determinados en la zona carboxi- o amino terminal; SH3, que reconocen secuencias ricas en residuos de Pro; PH, que se unen a fosfolípidos; PQ rich, ricos en Pro y Gln; PY, ricos en Pro y Ty; TM, localizados en la región transmembrana

### III. PRINCIPALES RUTAS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES ACTIVADAS TRAS LA ESTIMULACIÓN DEL TCR/CD3

#### 3.1. RUTA DE Ras/MAPKs

La cascada de las MAPKs (proteínas quinasas activadas por mitógenos) es fundamental para la regulación de la expresión de toda una serie de genes que controlan procesos vitales para la función celular como son, diferenciación, motilidad, división y muerte. Las MAPKs constituyen un grupo de serin/treonin quinasas que resultan activadas en respuesta al estímulo por fosforilación en dos residuos del motivo Thr-X-Tyr, correspondiendo X a Glu para ERK, Pro para JNK y Gly para p38.

Cada una de las cascadas de las MAPKs se organiza a través de complejos enzimáticos formados por tres quinasas: una MAPK, un activador de la MAPK (MEK, MKK o MAPKK) y un activador de MEK (MEKK o MAPKKK). La transducción de la señal en estos complejos discurre por medio de fosforilaciones consecutivas, es decir, activación secuencial de los componentes específicos de cada cascada. La activación de las rutas de MAPKs transcurre en tres fases: la primera fase se desarrolla en la membrana y proximidades, la segunda en el citosol y la tercera y última, en el núcleo. Los componentes enzimáticos específicos que secuencialmente configuran cada una de las vías aparecen reflejados en la figura 4.

En mamíferos se han identificado hasta la fecha cinco cascadas de MAPKs entre las que se incluyen como fundamentales:

1. Ruta de Ras/RafK/ERK1,2 relacionada, fundamentalmente, con proliferación y la diferenciación celular.
2. Ruta de Rac/MEKK1/JNK
3. Ruta de p38MAPK que junto con la de JNK, participa en respuestas al stress celular ( inflamación y apoptosis).

En general, cada uno de estos módulos de MAPKs inicia una señal que es independiente del resto de los módulos y, además, da lugar a respuestas fisiológicas específicas. Sin embargo en mamíferos, la función específica de una cascada de MAPKs parece ser dependiente de la estirpe celular y estar regulada no sólo por la cascada específica que la activa.

##### 3.1.1 Ruta de Ras/Rafk/ERK

Las MAPKs que dan nombre a esta vía, ERK1 y 2 ejercen su función regulando la expresión génica en una **fase nuclear**. Se translocan al núcleo y allí fosforilan diversos

factores de transcripción promoviendo su unión al promotor de diversos genes. Entre ellos se encuentran Elk-1, c-jun o c-Myc. Una de las consecuencias más relevantes de la activación de estos factores de transcripción, y más concretamente en el caso de Elk-1, es la inducción de la expresión de c-Fos, el cual, después de unirse a c-Jun y fosforilarse formará parte del heterodímero AP-1, uno de los factores de transcripción esenciales en la regulación de la respuesta inmune. ERK cuenta además, con todo un espectro de sustratos citosólicos: quinasas de la propia ruta (Raf-1, MEK, etc), proteínas del citoesqueleto (MAP-1,2,4, etc) u otras enzimas como PLC $\gamma$  o PLA $_2$ .

La activación de la vía se inicia con la activación de la GTPasa Ras a través de su intercambiador Sos en la membrana. A continuación, Ras recluta RafK a la membrana y facilita así, su activación. RafK se encarga de activar a la siguiente MAPK, MEK-1 y ésta por último, activa a ERK <sup>94</sup>. Se ha sugerido que ZAP-70 podría ser la responsable de trasladar los complejos Grb-2-Sos a LAT para permitir así la activación de Ras en células T<sup>90</sup>. Por supuesto, esta vía de señalización está finamente regulada en sus diferentes niveles. Muchos de los mecanismos de regulación se desconocen, aunque se sabe de la existencia de fosfatasa específicas (PAC-1) y del mecanismo citado anteriormente, en el que se activaría Rap-1 bloqueando así la vía.

Por otra parte, también se sospecha de otras vías alternativas de activación de Ras independientes de Sos en las que intervendría una PKC <sup>95</sup>. En esta línea, se le ha atribuido al proto-oncogen Vav <sup>96,97</sup>, recientemente vinculado a la activación de PKC $\theta$  <sup>98</sup>, la capacidad de activar la vía de Ras/ERK contribuyendo así a la inducción de AP-1 y a la expresión inducible de CD69, un fenómeno aparentemente exclusivo de Ras/ERK<sup>96</sup>.

### **3.1.2. Ruta de activación de jun quinasa (JNK)**

A diferencia de la ruta de Ras/Raf/ERK, JNK requiere, para su óptima, activación de la confluencia de las señales que se derivan de la estimulación del TCR y de la molécula coestimuladora CD28<sup>99</sup>. También parece necesario el sinergismo con la vía del Calcio <sup>100</sup>. Además de con estímulos del TCR, esta ruta se puede activar por stress celular, citoquinas inflamatorias, receptores acoplados a proteínas G, factores de crecimiento y oncogenes citosólicos <sup>101</sup>.

Aunque los primeros pasos de esta vía de señalización no están del todo claros, parece que análogamente a lo que sucedía para ERK, una GTPasa de la familia de Ras, posiblemente Rac, es la encargada de activar la vía. Rac utiliza como GEF a Vav <sup>102,103</sup> que por otra parte, es un sustrato común a las vías del TCR y de CD28. Una vez activada, JNK se transloca al núcleo para fosforilar diversos factores de transcripción, entre ellos ATF-2 y c-jun. El más conocido es c-Jun que junto con c-Fos forma el heterodímero activo AP-1. Diversos estudios apoyan la idea de que Ras <sup>104</sup> y otras



quinasas como PAK-1 <sup>105</sup> también contribuyen a la activación total de JNK aunque sin duda de forma menos importante.

La importancia de JNK, en la señalización mediada por el TCR, se ha puesto de manifiesto en los estudios con ratones Knock-out para las isoformas JNK-1 y JNK2<sup>106</sup>. El defecto en JNK-1, no afecta a la secreción de IL-2 o IFN $\gamma$  pero parece ser esencial para el desarrollo de las células Th2. En cambio el defecto en JNK2, produce una alteración de la secreción de IFN $\gamma$  y las células T periféricas de los ratones deficientes en JNK2 son resistentes a la activación vía TCR <sup>107</sup>.

### **3.1.3 Ruta de activación de p38 MAPK**

Es la ruta más desconocida debido al descubrimiento reciente de esta MAPK <sup>108</sup>. Resulta activada por los mismos factores que JNK y presenta distintas isoformas p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\gamma$  y p38 $\delta$  que desarrollan su función en diversos tejidos. Recientemente se ha conocido que la isoforma que resulta activada en células T tras estimulación del TCR y de CD28 es p38 $\alpha$ <sup>109, 110</sup>. La activación de p38 redundante en secreción de citoquinas, respuestas a stress y apoptosis.

La cascada de MAPKs que conduce a la activación de p38 transcurre como se indica en la Fig. 4. Una vez en el núcleo, p38 activada fosforila a los factores de transcripción ATF-2, CREB, ATF-1 y Elk-1.

Los trabajos realizados en ratones knock out de MKK3, demuestran que p38 también tiene una función importante en el desarrollo de las células Th1 <sup>111</sup>.

### **3.1.4. La interacción o “cross-talk” entre las distintas rutas de MAPKs.**

Como se ilustra en la Figura 4, los distintos módulos de MAPKs no son del todo independientes. De hecho, una misma MKKK o MKK puede activar distintas vías ( es el caso de MEKK1 que aunque activa principalmente la ruta de JNK también es capaz de activar a MEK1 o a MKK4 la cual a su vez, puede activar a p38 además de a JNK).

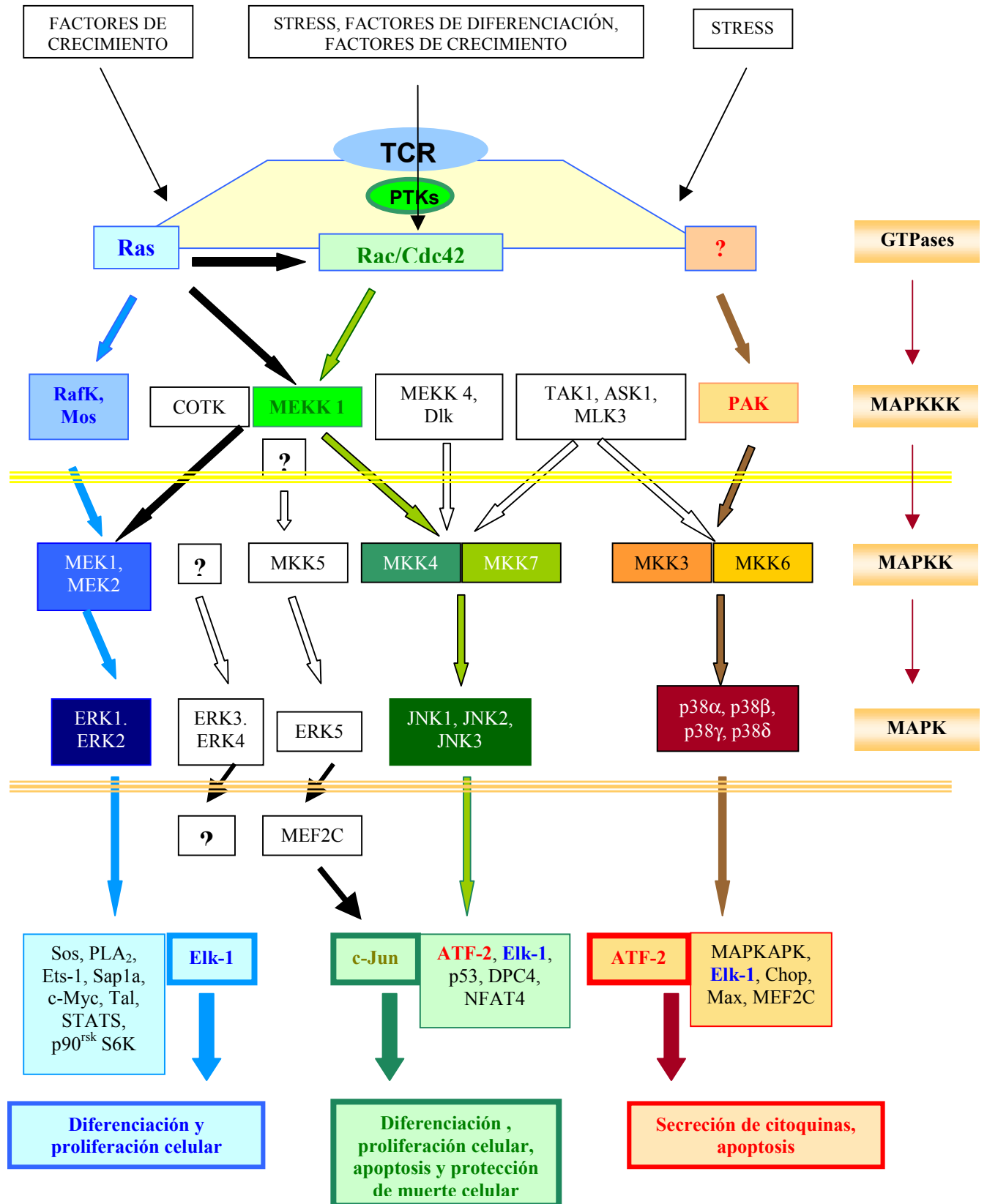


Figura 4. Rutas de activación de MAPKs

Del mismo modo, las distintas cascadas de MAPKs también parecen integrarse a nivel nuclear, pues es fácil comprobar que algunos factores de transcripción como Elk-1 o ATF-2 son sustrato común de MAPKs diferentes. Sin duda, se hace difícil explicar para que son necesarias vías de señalización tan específicas si al final van a dar lugar a la misma respuesta. Contestar a esta pregunta supone reconsiderar estas señales aparentemente redundantes. En primer lugar, puede que un módulo de MAPKs señalice de forma diferente, interaccionando incluso con MAPKs que no son específicas de su cascada, en función de la estirpe celular en la que actúe. También puede suceder que estas señales redundantes solo funcionen en el caso de que se necesite una cooperación para inducir una respuesta coordinada en funciones generales de la célula <sup>112, 113</sup>.

Asimismo, parece difícil interpretar la especificidad de las distintas cascadas de MAPKs cuando es patente esta interrelación entre los distintos módulos. Para entenderlo se hace necesario eliminar la clásica idea lineal de ruta de transducción de señales. Así, la especificidad de los módulos de MAPKs se basa en: (1) el número limitado de combinaciones MKK-MAPK (según la posición de la Pro en el sustrato, la MAPK elegida será ERK o JNK; (2) los motivos reguladores de las MKKs haciéndolas susceptibles de señales “upstream” que marcan específicamente la MKK que es necesario activar; (3) moléculas de anclaje o scaffolds que permiten por un lado, aglutinar proteínas haciendo más estable su interacción y por otro, secuestrarlas para que no sea posible la interacción que transmite la señal; (4) localización de los módulos de MAPKs en compartimentos subcelulares específicos; (5) de la duración de la señal de la MAPK <sup>113</sup>.

### **3.1.5. Familia de factores de transcripción Fos/Jun inducidos, via TCR, por la activación de la cascada de MAPKs**

Uno de los factores de transcripción claves para regular la expresión génica en la activación del linfocito T es AP-1. Se trata de un factor de transcripción, específico de secuencia, compuesto por dímeros de miembros de las familias Jun y Fos. Su activación viene condicionada por diferentes estímulos: PMA, factores de crecimiento, estímulos que activan a las células T, neurotransmisores y radiación ultravioleta. En la inducción de este factor de transcripción son fundamentales dos mecanismos: (1) el que regula la expresión génica de los propios componentes de AP-1, es decir, media el aumento de los niveles de las proteínas Fos y Jun que es llevado a cabo por ERK y JNK respectivamente y (2) el que controla la activación o fosforilación de los componentes Fos y Jun, realizado por ERK y JNK respectivamente. Este mecanismo tiene como objetivo aumentar la capacidad de transactivación de AP-1, sin que afecte a sus propiedades para unirse al ADN<sup>104</sup>.

Las diferentes MAPKs: ERKs, JNKs y FRKs son extremadamente específicas y están implicadas en la activación de AP-1 a través de la fosforilación de diferentes sustratos. ERK fosforila Elk-1 y promueve la síntesis de c-Fos pero no fosforila ni a c-Jun, ni a c-Fos, ni a ATF-2 en los sitios que aumentan su actividad transcripcional. JNK fosforila a c-Jun y a ATF-2 pero no a c-Fos, aunque en algunas ocasiones pueden fosforilar también a Elk-1 y parece que FRK sólo es capaz de fosforilar a c-Fos<sup>114</sup>.

La importancia de AP-1 en la activación de la célula T radica en que regula transcripcionalmente muchos de los genes que dan cuenta de las funciones efectoras. Es el caso, por ejemplo de los genes de IL-2, FasL o CD69. A nivel del promotor de muchos de estos genes, AP-1 se caracteriza por cooperar con otros factores de transcripción, aumentando su capacidad transactivadora al favorecer interacciones F.T.-ADN más estables. Así, AP-1 colabora con NF-AT a nivel del promotor de IL-2 mientras que a nivel del promotor de FasL parece actuar independientemente de NF-AT.

### **3.2 RUTA DE ACTIVACIÓN DE NF-KB.**

NF-kB participa en la regulación de la expresión de numerosos genes como respuesta a estímulos entre los que se incluyen además de los del TCR, citoquinas proinflamatorias como TNF $\alpha$  e IL-1, LPS, bacterias, virus, proteínas virales, ARNds, estímulos de stress mecánico y químico y mitógenos B<sup>115</sup>.

Así pues, hasta donde se conoce, la ruta de señalización de NF-kB transcurre del siguiente modo: NF-kB en células no estimuladas está secuestrado en el citosol por una familia de proteínas inhibitoras llamadas I $\kappa$ Bs (I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\gamma$ , I $\kappa$ B $\epsilon$  y Bcl-3, NF-kB1 -p105- y NF-kB2-p100-). Así se mantiene enmascarada la secuencia NLS de NF-KB que le permite translocarse al núcleo. Tras la estimulación de la célula, I $\kappa$ B $\alpha$  debe degradarse para dejar libre a NF-kB. Para ello, el complejo IKK (quinasa de I $\kappa$ B) constituido por las subunidades catalíticas IKK $\alpha$  (IKK1) , IKK $\beta$  (IKK2) e IKK $\gamma$ , debe fosforilar a I $\kappa$ B $\alpha$  en las serinas 32 y 36. Este hecho posibilita la unión de polipéptidos de ubiquitina a los residuos de Lys 21 y 22 ( Figura 5). Esta cadena de ubiquitinas funciona como un marcador de reconocimiento para el proteosoma 26S, donde I $\kappa$ B $\alpha$  resulta degradado, dejando expuesta la secuencia NLS de NF-kB que puede, de este modo, translocarse al núcleo.

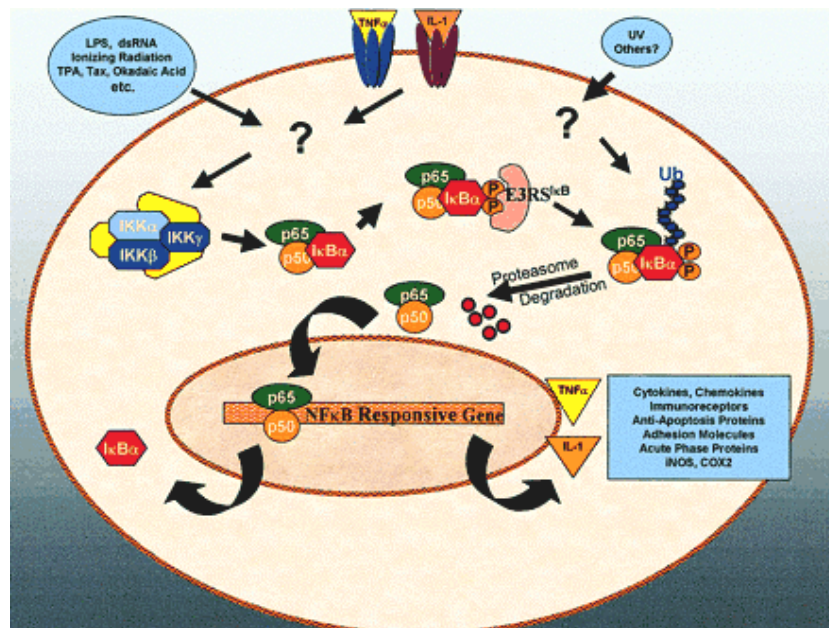


Figura 5. Ruta de activación de NF-κB

Las quinasas IKK $\alpha$  e IKK $\beta$  son Ser/Thr quinasas y es más que probable que, para que se activen necesiten ser fosforiladas, a su vez, por otra quinasa. Desafortunadamente, no se conoce todavía qué quinasa podría estar participando en este proceso aunque se barajan varios candidatos: algunas isoenzimas de la proteína quinasa C (PKC), miembros de la familia de MAPKKK, NIK, AKT/PKB, MEKK1/2/3, COT/TPL-2 y TAK1. Se ha relacionado a MEKK-1, con la inducción de NF-κB por tres razones principalmente: En primer lugar, existe una correlación entre la regulación de la actividad de NF-κB y la de JNK, y esta última está, en gran medida, bajo el control de MEKK-1. Por otra parte, experimentos de expresión de dominantes negativos de MEKK-1 han evidenciado una importante inhibición en la inducción de NF-κB<sup>116</sup>. Por último, MEKK-1 también resulta activada tras la estimulación por TNF $\alpha$ <sup>117</sup>.

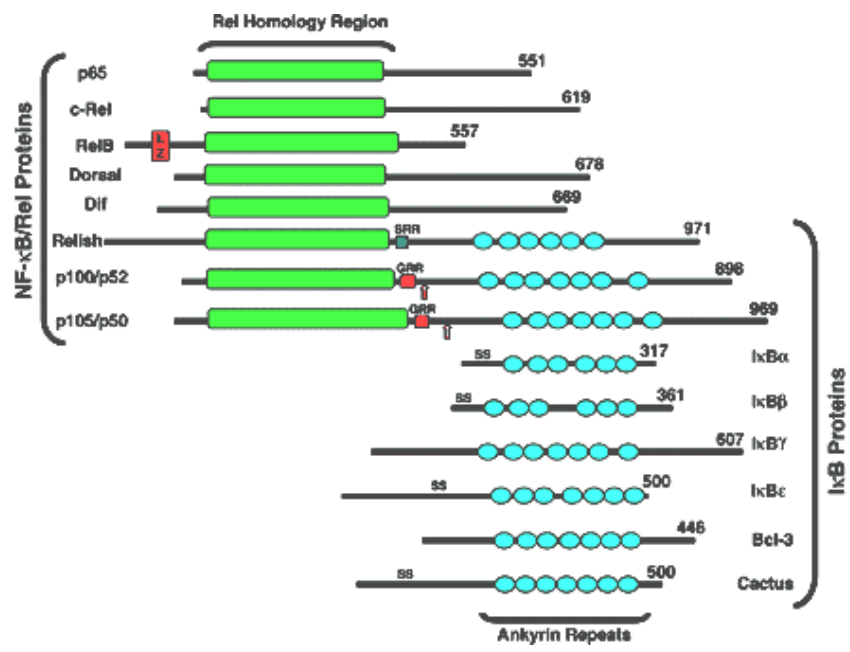
La ruta de señalización de NF-κB resulta activada tras la estimulación antigénica del complejo TCR/CD3 pero la señal a través del TCR es muy débil, aunque detectable, y requiere de la coestimulación via CD28 para una mejor observación del fenómeno. En este sentido, recientemente se ha descrito la participación de dos quinasas, COT y PKC $\theta$  en la activación del complejo IKK tras la coestimulación TCR/CD3-CD28

118,118,119

La activación de esta ruta de transducción de la señal tiene fundamentalmente dos puntos de control: la actividad quinasa del complejo IKK y a nivel transcripcional, el nivel de NF-κB en el núcleo regulado por IκB, que actúa secuestrándolo y exportándolo al citosol

**3.2.1. Familia de NF-kB/ Rel e IκB.**

La forma activa de NF-kB que se une al ADN consiste en un dímero producto de la combinación de los miembros de esta familia, hasta la fecha, caracterizados en mamíferos ( Figura 6): c-Rel, NF-kB1 (p50/p105), NF-kB2 (p52/p100), Rel A (p65) y Rel B. Todas estas proteínas comparten el dominio de homología Rel o RHD que les confiere la capacidad de dimerización, unión al ADN e interacción con la molécula inhibidora IκB. NF-kB1 y NF-kB2 además, cuentan con una región C-terminal con múltiples copias de motivos anquirina típicos de las proteínas IκB. Esta es una de las razones por las cuales actúan como moléculas represoras. Por otra parte, el procesamiento de estas dos proteínas rinde las subunidades p50 y p52, respectivamente, las cuales al combinarse con las otras proteínas Rel dan lugar a dímeros transcripcionalmente activos. No todas las combinaciones son posibles; por ejemplo Rel B sólo dimeriza con p50 y p52 y no todas las subunidades son igualmente potentes transcripcionalmente. Los dímeros más activos son p50-p65 y p50-c-Rel



**Figura 6. Proteínas de la familia Rel**

NF-kB se une en los promotores de los genes a sitios kB cuya secuencia consenso es GGGRMMYYCC, donde R es una base purica, Y pirimidinica y M cualquier base. Dado que cada una de las subunidades que forman el complejo NF-kB interacciona con una de las mitades del sitio de unión a ADN, ligeras variaciones en los diez pares de bases en la secuencia consenso hacen que no todos los dímeros de NF-kB se unan con igual

afinidad a estos sitios. De hecho, es la capacidad de los distintos dímeros para reconocer pequeñas diferencias en los sitios kB de los promotores la que marca en gran medida la regulación génica. En la regulación transcripcional también intervienen la participación diferencial de los dímeros según la estirpe celular, la localización subcelular, la activación y sus interacciones con las proteínas I $\kappa$ B<sup>115</sup>.

Las proteínas Rel forman parte de una familia de factores de transcripción más extensa de lo que en principio se ha descrito. Curiosamente existen muchas similitudes entre las proteínas que componen NF- $\kappa$ B y la familia de proteínas NF-AT: Ambos factores de transcripción se translocan al núcleo tras la activación de la célula T y su inducción resulta bloqueada por ciclosporina A. Tanto NF-AT como NF- $\kappa$ B interaccionan con miembros de la familia de Fos/Jun. Además, la secuencia consenso para NF-AT (GGAAA) muestra gran analogía con la mitad de la secuencia consenso de NF- $\kappa$ B. De hecho, estructuralmente, NF-AT muestra un dominio de homología Rel<sup>115</sup>.

### **3.3. RUTA DE PLC $\gamma$ 1 O VÍA DEL CALCIO**

Esta ruta es una de las vías clásicas en señalización intracelular. La secuencia de procesos bioquímicos se muestra en la figura 7. Brevemente, tras la estimulación del TCR, se induce la activación de PLC $\gamma$ 1 en un proceso, todavía por determinar, en el que resultan importantes LAT, SLP-76, e I $\kappa$ k. PLC $\gamma$ 1 lleva a cabo, entonces, la hidrólisis de fosfatidilinositoles (PIP<sub>2</sub>) que genera como segundos mensajeros diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>). El primero, favorece la activación de protein quinasas C (PKC) y el segundo, induce la liberación de los depósitos de Ca<sup>2+</sup> intracelular. El Ca<sup>2+</sup>, a su vez, favorece la activación de la fosfatasa calcineurina, que se encarga de defosforilar al factor de transcripción NF-AT y permitir su translocación al núcleo.

En la estimulación vía TCR, esta ruta coopera o sinergiza con otras para optimizar la señal. Es el caso de las rutas de activación de Ras, JNK, p38MAPK, e incluso NF- $\kappa$ B. Se ha sugerido que para la máxima inducción de NF-AT se requiere de la vía de Ras<sup>122</sup> probablemente porque la interacción con AP-1 en el heterodímero NF-AT:AP-1 aumenta la capacidad transactivadora de NF-AT.

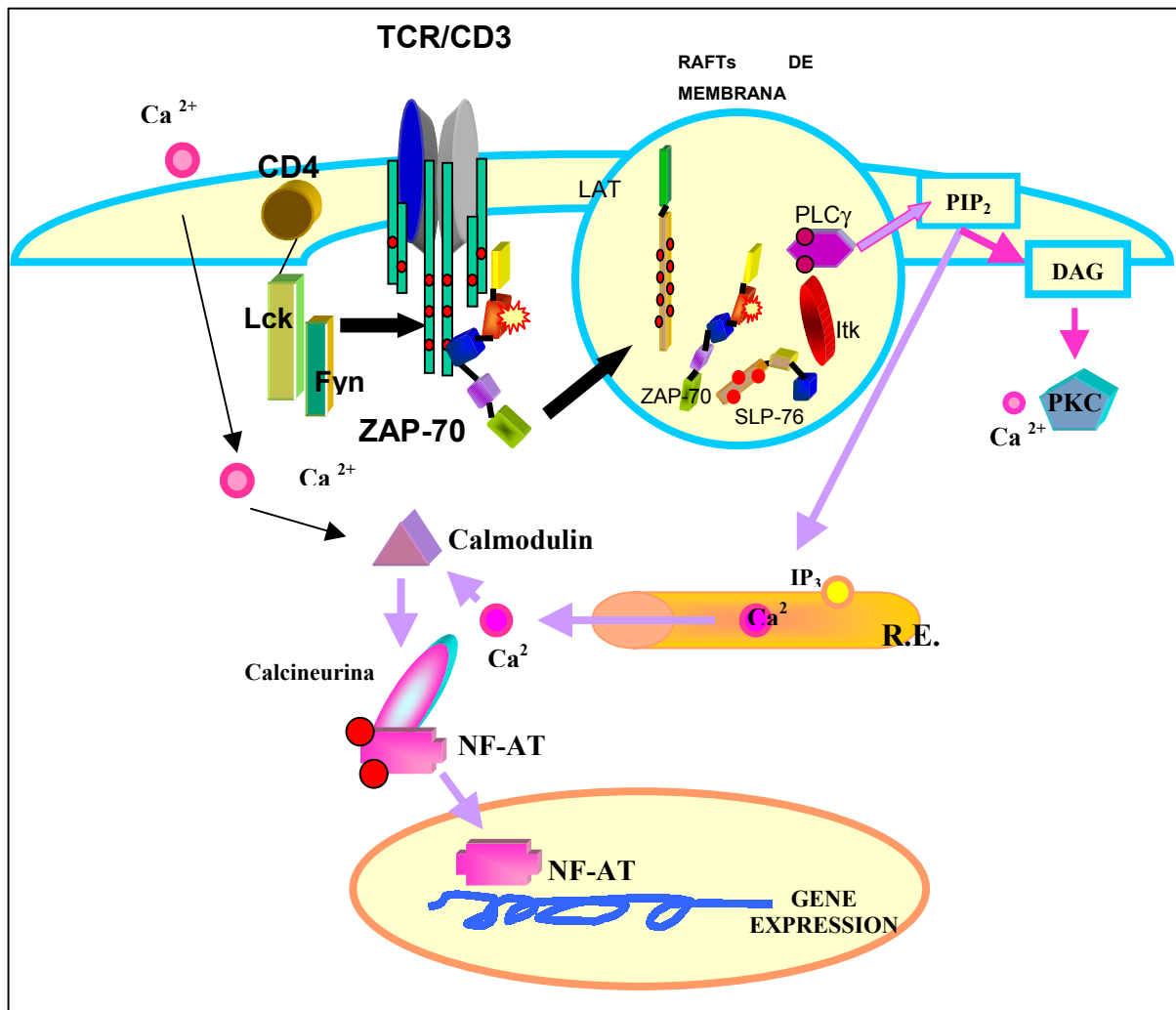


Figura 7. Vía del calcio

### 3.3.1. Familia de proteínas NF-AT.

Los miembros de esta familia deben su nombre, factor nuclear de células T activadas, a la importante función que ejercen en la regulación génica durante la respuesta inmune. Se trata de una familia con numerosos miembros, entre los que destacan NFATc y NFATp<sup>123</sup>. Su activación se bloquea por las drogas inmunosupresoras ciclosporina A (CsA) y FK506. Su secuencia consenso de unión es GGAAAAT aunque los sitios de unión contenidos en los promotores de genes tan importantes como la IL-2, FasL, CD69 o TNF $\alpha$  suelen diferir de la consenso en alguna base. Esta característica, es precisamente lo que determina que miembro de la familia va a actuar, dependiendo de la afinidad que muestre por la secuencia.

Ya se ha comentado anteriormente que NF-AT no suele actuar en solitario sino que forma un complejo activo con un componente nuclear de la familia Fos/Jun (AP-1). Sin embargo y aunque sea menos frecuente, NF-AT puede cooperar con otros factores de transcripción, como las proteínas Rel. De hecho, la región mínima DBD (dominio



de unión a ADN) de NFAT es casi exacta al dominio N-terminal de p50 (NF-kB). La diferencia entre ambos tipos de factores de transcripción es que, a pesar de que NF-AT es capaz de unirse a ciertos sitios kB ( existen en los promotores de genes como el TNF $\alpha$ , IL-8, E-selectina, etc.), lo hace siempre de forma monomérica a diferencia de los obligados dímeros de NF-kB. No se han descrito hasta la fecha, dímeros NF-AT:NF-KB y se considera que a los sitios kB se une o NF-kB o NF-AT de forma competitiva. En este sentido se ha descrito la competición entre ambos factores por la secuencia P del promotor humano del gen de la IL-4 que une tanto a NF-AT como a NF-kB <sup>124</sup>.

Alternativamente, NF-AT puede llevar a cabo la regulación transcripcional de una forma indirecta. Así se ha descrito recientemente para el gen de FasL<sup>125</sup> donde NF-AT actúa a dos niveles. Por un lado es inducido, via TCR, para regular la expresión del factor de transcripción Egr-3 que, posteriormente se une al promotor de FasL y por otra parte, NF-AT por sí sólo también se puede unir al mismo promotor en otro sitio diferente al descrito para Egr-3 <sup>126</sup>.

### **3.4. INFLUENCIA DE LAS PROTEINA QUINASAS C ( PKC) EN LAS PRINCIPALES RUTAS DE SEÑALIZACIÓN.**

Las proteína quinasas C son una familia de serina/treonina quinasas implicadas en la regulación de los procesos de diferenciación y proliferación celular en respuesta a una gran diversidad de estímulos. La estimulación mitogénica de la célula T requiere una activación prolongada de la PKC y las células deficientes en PKC muestran un grave defecto en la proliferación mediada por la estimulación del TCR. Todas las PKCs han sido relacionadas con procesos de proliferación, diferenciación y tumorigénesis y más recientemente se las ha vinculado a los procesos apoptóticos en unos casos protegiendo PKC $\alpha$  y en otros casos promoviendo ( PKC $\zeta$  y PKC $\theta$  que induce la expresión de FasL via TCR). **PKC $\theta$**  es sin duda la PKC que participa de modo más significativo en la estimulación antigénica del linfocito T. Esta isoenzima, a diferencia de sus homólogas que se expresan en muchas estirpes celulares, es específica de las células del sistema hematopoyético y lo que es más relevante para la activación antigénica, es la única PKC que tras la estimulación del complejo TCR/CD3 se localiza en la zona estable de contacto entre la célula T y la célula presentadora (APC), más concretamente en lo que se conoce como SMAC <sup>127</sup>. Es también, la única isoenzima que en células T coopera con la vía del Ca<sup>2+</sup> en la activación de JNK<sup>128</sup>, tras la estimulación del TCR y además, colabora junto con PKC $\alpha$  y  $\epsilon$  en la activación de ERK <sup>129</sup>. Por otra parte, a PKC $\theta$  se la ha relacionado de forma notable con la ruta de inducción de NF-kB tras la coestimulación del complejo TCR/CD3 y CD28<sup>118,119</sup>. En esta vía bastante desconocida en la actualidad, PKC $\theta$  actuaría como un eslabón de

señalización independiente aparentemente de Cot quinasa (también relacionado recientemente con esta ruta de inducción de NF- $\kappa$ B) y de NIK, provocando a diferencia de las otras dos quinasas la activación selectiva de la IKK $\beta$ . Bien podría ser también que PKC $\theta$  estuviera situada más arriba en la vía, activando MEKK1 o CotK. Esto podría explicar el cross-talk que diversos trabajos sugieren entre la vía de las MAPKs y la de las IKKs, ya que tanto MEKK1, como CotK activan a JNK y a NF- $\kappa$ B<sup>130</sup>.

## **IV. APOPTOSIS : MUERTE CELULAR INDUCIDA POR ACTIVACIÓN (A.I.C.D.)**

### **4.1. LA APOPTOSIS EN LA CÉLULA T: MUERTE CELULAR INDUCIDA POR ACTIVACIÓN.**

Una de las respuestas a la activación de la célula T, tras la estimulación del complejo TCR/CD3, es la inducción de muerte o apoptosis. A este fenómeno se le conoce como MUERTE CELULAR INDUCIDA POR ACTIVACIÓN O **AICD** <sup>131, 132</sup>.

La muerte celular programada es un proceso fundamental para mantener la homeostasis linfocitaria. Se puede decir que, en gran medida, es el mecanismo clave a la hora de configurar el repertorio de los linfocitos maduros periféricos y lo hace gobernando, desde los procesos de selección positiva y negativa que se llevan a cabo en el timo, hasta los procesos de eliminación de todas aquellas células T maduras que en la periferia pueden resultar nocivas para el organismo (las que reconocen autoantígenos periféricos, las células T activadas cuando ha finalizado la respuesta inmune y las que han sufrido un daño irreversible en su ADN). Cualquier desequilibrio en la regulación apoptótica se traduce en graves patologías para el organismo. Una frecuencia baja en la apoptosis forma parte de la base de las enfermedades autoinmunes y el cáncer. Al contrario, un exceso en la apoptosis favorece la leucopenia y ciertas inmunodeficiencias<sup>133</sup>.

### **4.2. SISTEMA FAS-FASL.**

Diversas rutas de señalización pueden participar en el proceso apoptótico dependiendo fundamentalmente de la estirpe celular. En general, se necesita de la interacción de una citoquina de muerte con su receptor de membrana, lo que produce la activación de unas cisteína proteasas llamadas caspasas. Entre los receptores de muerte mejor conocidos que activan a las caspasas se encuentran los de la familia del receptor de TNF (distinguiéndolos de los de la misma familia que no promueven muerte): CD95 o Fas, TNFR-I, DR3, DR4 y DR5 <sup>133</sup>. El sistema Fas y su ligando FasL está implicado en la AICD de hibridomas T, líneas celulares leucémicas y células T maduras <sup>134,135,136</sup> y en concreto, es el mecanismo fundamental en células T CD4<sup>+</sup> <sup>137</sup>. Fas y FasL pueden interactuar en la misma célula <sup>138</sup> o en células distintas (Vignaux and Golstein, 1994). Además el FasL soluble secretado por células citotóxicas también puede interactuar con las moléculas de Fas de la célula diana <sup>135</sup>.

La importancia de la apoptosis mediada por Fas se refleja en los estudios realizados en ratones *lpr* y *gld*, en los que los genes de Fas y FasL están respectivamente inactivados<sup>139,140</sup>. Estos ratones sufren un desorden linfoproliferativo severo y mueren por un exceso de linfocitos y por enfermedades autoinmunes.

### **4.3. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE FASL.**

Fas se expresa constitutivamente en la mayoría de las líneas celulares y en las células T de sangre periférica previamente activadas<sup>141</sup>). Dado que Fas se expresa constitutivamente en una gran mayoría de tejidos, es la expresión inducible de FasL el factor clave para la regulación de la AICD.

Durante los últimos años se ha realizado un gran esfuerzo en el estudio de la regulación de la expresión del gen de FasL. Su inducción se ha investigado sobre todo en célula T, bajo estímulos tan diferentes como UV, stress, anticuerpos frente al TCR/CD3, superantígenos y PMA e iónoforo.

Los primeros trabajos tomaron como base la descripción del gen humano de FasL<sup>142</sup>. En la secuencia del promotor del gen se podían reconocer potenciales secuencias consenso de unión para factores de transcripción como SP-1, NF-κB e IRF-1. Parece ser que la zona de mayor inducibilidad del promotor se encuentra contenida en 500pb “upstream” el sitio de inicio de la transcripción. Se han descrito sitios de unión para factores de transcripción que curiosamente participan en procesos tan opuestos a la muerte como la expresión del gen de IL-2. Destacan como los más importantes NF-AT, AP-1, Egr-3, Egr-2, Sp-1, c-myc, c-Jun, ATF-2 y NF-κB<sup>125,143,126,144, 145,146,147,148;149</sup> y su importancia relativa en la regulación de FasL depende fundamentalmente del tipo de estímulo inductor de apoptosis ( stress, PMA/Ionóforo, TCR). Por otra parte aunque algunos estudios han tratado de conceder mayor importancia a NF-κB en la regulación transcripcional de FasL<sup>150</sup> no existen evidencias de tipo genético. De hecho, los ratones deficientes en NF-κB señalan una función anti-apoptótica por parte de este factor de transcripción<sup>151,152,153,154</sup>. En la misma línea, en células Jurkat deficientes en IKKγ se induce perfectamente la expresión de FasL pero no la de IL-2, estimulando con PMA/Ionóforo y la deficiencia en la inducción de NF-κB las hace más resistentes a apoptosis inducida por mitógenos y anticuerpos anti-Fas<sup>155</sup>.

Desde hace tiempo se ha intentado relacionar a las MAPKs con el proceso apoptótico. Sin embargo, la información obtenida no ha sido concluyente. A ERK y a JNK se les ha atribuido tanto funciones proapoptóticas<sup>156,157,158,159,160,161,107</sup> como antiapoptóticas<sup>159,162,163</sup>) mientras que a p38MAPK sólo se le han asignado funciones proapoptóticas<sup>110,164</sup>. Las tres MAPKs han sido relacionadas con la regulación transcripcional de FasL<sup>158, 110, 164, 165, 143</sup>, modulando positivamente la actividad del

promotor. Así, se ha descrito que, p38MAPK (p38 $\alpha$  en células T) interviene promoviendo a tiempos cortos la expresión de FasL y que posteriormente la unión de FasL a su receptor Fas, induce la activación de JNK, en un mecanismo dependiente de la activación de caspasas. Esta JNK activada, a su vez, se encarga en una segunda fase, de promover la inducción de FasL a tiempos tardíos conduciendo así a una apoptosis completa <sup>164</sup>. Paralelamente, se ha descrito un sitio dependiente de MEKK-1 en el promotor de FasL, al que se unen c-Jun y ATF-2<sup>143</sup>. Sin embargo, parece que este sitio no tiene mucha relevancia en estímulos apoptóticos vía TCR. En cuanto a ERK, su activación induce la expresión de FasL aunque se ignora sobre que elemento del promotor puede estar actuando. Algunos trabajos sugieren que podría estar regulando la inducción del factor de transcripción Nur77<sup>158</sup>.

Por otra parte, también se ha demostrado que JNK y p38MAPK son activadas como resultado de la activación de las caspasas, <sup>166,167,168</sup> sin que este fenómeno se relacione con la inducción de apoptosis. Además, la activación de ERK tras estimulación del TCR, es también capaz de inhibir la apoptosis vía Fas en un mecanismo que impide que la célula T pueda ser inducida a apoptosis antes de que haya recibido toda la información que la dirige a muerte <sup>169</sup>.

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

La complejidad estructural del complejo TCR/CD3, en comparación con otras familias de receptores (interleucinas y factores de crecimiento) podría explicar su singular capacidad para disparar, específicamente, señales tan diferentes como la apoptosis, la proliferación celular, la secreción de citoquinas o la anergia. Sin embargo, continuamos sin entender la forma en que el receptor clonotípico (TCR $\alpha\beta$ ), carente de actividad enzimática intrínseca alguna, es capaz de transducir la señal al interior celular y qué elementos estructurales del propio heterodímero son responsables de modular la señalización.

Diversos grupos han intentado demostrar que los diversos dominios estructurales, de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del TCR son imprescindibles para los mecanismos de señalización de la célula T. Los trabajos de Ed Palmer y colaboradores, en los dominios CP de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ , en la cola citosólica de la cadena  $\beta$ , y en la región extracelular de  $\zeta$ , han puesto de manifiesto que estos dominios no sólo contribuyen a mantener la estabilidad estructural del complejo TCR/CD3 sino que también, participan en la transducción eficaz de señales. Principalmente, la mutación de estos dominios afecta a la secreción de IL-2, vía del Ca<sup>2+</sup> y activación de ERK<sup>35, 38, 34; 39</sup>. Asimismo, nuestro grupo junto con el de Lisa Spain ha mostrado que también los dominios transmembrana de la cadena TCR $\beta$  contribuyen tanto al sostenimiento de la estructura del complejo TCR/CD3, a través de la asociación con la cadena  $\zeta$ , como a la generación de señales completas que resultan en el amplio espectro de respuestas efectoras características de la célula T. En este caso, mutaciones en este dominio afectan selectivamente a la apoptosis pero no, a la secreción de IL-2<sup>42;43,44,45</sup>.

Por otra parte, los estudios realizados con péptidos alterados apuntan a que la célula T es capaz de “sentir” la calidad e intensidad de las interacciones TCR-ligando y responder generando funciones efectoras individuales y específicas. Esto, unido al hecho de que las mutaciones en los diferentes dominios estructurales del TCR no afectan por igual a todas las respuestas efectoras, sugiere que los dominios del TCR podrían desempeñar un papel importante en la selección de señales y respuestas efectoras como parte integrante de la interacción que mantienen con el ligando.

Estos trabajos nos sirven de base para establecer la primera hipótesis de trabajo:

- 1. El dominio transmembrana de TCR $\beta$ , como estabilizador de la interacción TCR- $\zeta$ , podría estar modulando la transducción de señales selectivamente y en el contexto del resto de los dominios del TCR, contribuir a la generación de señales completas.**

Nuestra segunda hipótesis de trabajo parte del desconocimiento existente en torno a la regulación transcripcional de FasL. En el momento en el que se abordó esta etapa del proyecto se habían descrito en el promotor de FasL humano sitios NF-kB y Sp-1 teóricos pero se carecía de datos que demostrasen su funcionalidad<sup>142</sup>. Posteriormente, se determinó también la existencia de un sitio NF-AT que solapaba con los dos anteriores<sup>170</sup>. Además, se ignoraba qué rutas de señalización podrían estar implicadas en los procesos apoptóticos inducidos via TCR en linfocitos T, ya que los datos relacionados con la apoptosis, varían en función del tipo de estímulo apoptótico y de la estirpe celular utilizada para el estudio. De hecho, la mayoría de las rutas de señalización han sido relacionadas tanto en procesos apoptóticos como anti-apoptóticos <sup>155;158;171,169</sup>. Por tanto:

**2. Dado que las células mutantes muestran una grave deficiencia en la expresión de FasL inducida a través del TCR, el sistema podría ser valioso como modelo para el estudio de la ruta que conduce a la expresión inducible de FasL, tras estimulación antigénica del TCR/CD3, en los procesos de AICD.**

La unión de estas dos ideas, el estudio de la integración y diversificación de señales y el estudio de la ruta apoptótica, hace que se hayan planteado objetivos muy diversos, ya que en todo momento se han tratado de buscar, a través de los distintos eslabones de las señales que se derivan del TCR, datos que explicarían la resistencia apoptótica de las células mutantes. Como OBJETIVO GENERAL, pues, esta Tesis trata de profundizar en el estudio de los mecanismos de activación de la célula T contemplados éstos, como los fenómenos de señalización tempranos, intermedios y tardíos que el receptor clonotípico TCR $\alpha\beta$  modula con el fin de generar respuestas específicas tan diferenciadas como la apoptosis o la secreción de IL-2. Este objetivo general se concreta en diferentes subobjetivos:

OBJETIVO 1: Estudio de los fenómenos de señalización tempranos que pudieran resultar alterados por la mutación en el dominio transmembrana del TCR $\beta$ : se estudiará cómo la mutación en la transmembrana de TCR $\beta$  afecta a los primeros pasos de la señal que se desarrollan en el entorno de los Rafts lipídicos y a las posibles deficiencias en moléculas adaptadoras claves en la integración y diferenciación de la señal.

OBJETIVO 2: Estudio de los fenómenos de señalización intermedios. Comprende la investigación de algunas de las rutas de señalización más relevantes que intervienen en los procesos de activación de la célula T que podrían estar afectadas por la mutación en el dominio transmembrana TCR $\beta$  y justificar así, la selección de funciones efectoras.



OBJETIVO 3: Profundización en el estudio de la influencia del dominio transmembrana de TCR $\beta$  en las respuestas efectoras de la célula T. Fundamentalmente, expresión de marcadores tempranos de activación, secreción de citoquinas (IL-2, IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$ ) y apoptosis.

OBJETIVO 4: Se aprovechará la ventaja que proporciona el sistema de células mutantes resistentes a apoptosis mediada por FasL para el estudio de la regulación transcripcional de FasL en los procesos de AICD tras estimulación antigénica del complejo TCR/CD3.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

# MATERIALES

## 1. LÍNEAS CELULARES

Los clones celulares salvaje (o wild type , WT) y mutante (MUT) se obtuvieron mediante reconstitución de la línea celular variante de Jurkat 31.13 (generosamente cedida por el Dr. A. Alcover, Instituto Pasteur, Paris, Francia), deficiente en TCR $\beta$ . En el caso de las células salvajes, la reconstitución se realizó por transfección estable del cDNA que codifica para una cadena V $\beta$ 3 sobre las células 31.13 . En las células mutantes se operó de forma análoga, pero empleándose para la reconstitución el cDNA de la misma cadena que había sido mutagenizado en la región transmembrana, en la que se había sustituido el residuo de Tyr C-terminosal por uno de Leu ( Figura 8).

### MOTIVO ITAM DE LA REGIÓN TRANSMEMBRANA DE TCR $\beta$ MUTADO

Tyr-Glu-Ile-Leu-Leu-Gly-Lys-Ala-Thr-Leu-Tyr-Ala-Val-Leu



Tyr-Glu-Ile-Leu-Leu-Gly-Lys-Ala-Thr-Leu-Leu-Ala-Val-Leu

Figura 8. Motivo ITAM de la región transmembrana de TCR $\beta$  mutado

De ambas transfecciones estables, se aislaron por dilución límite y resistencia al antibiótico G418 diversos clones y entre ellos se seleccionaron por tinción con anticuerpo anti-CD3 y citometría de flujo, aquellos con alta y similar expresión del complejo TCR/CD3 en membrana.

Clones con las mismas características fueron obtenidos de transfecciones independientes y fueron indistintamente utilizados en la mayoría de los ensayos.

## 2. MEDIOS DE CULTIVO

Las células se crecen en medio RPMI con glutaminosa suplementado con un 10% de suero de ternera fetal (Life Technologies. Gibco BRL) y gentamicina.

### 3. REACTIVOS PARA LA ESTIMULACIÓN

En la tabla I se enumeran los reactivos utilizados en esta Tesis para estimulación celular:

TablaI. Reactivos de estimulación celular.

ESTÍMULO	FUENTE	CONCENTRACIÓN	ESPECIFICIDAD	USO
<b>Enterotoxina B de S. aureus (SEB)</b>	Toxin Technologies	10µg/mL	Vβ3	Mitógeno e inductor de apoptosis
<b>PMA</b>	Sigma	20-50ng/mL	Activador de PKCs	Mitógeno. En combinación con ionóforo es inductor de apoptosis
<b>IONÓFORO A23187</b>	Sigma	1µM	Liberador de los canales de Ca <sup>2+</sup>	En combinación con PMA es inductor de apoptosis
<b>Anti-CD28</b>	Pharminutosgen	1 µg/mL	CD28	Actúa como coestimulador de la vía del TCR/CD3
<b>Anti-CD3</b>	Immunokontakt	10 µg/mL	CD3-ε	Fijado a plástico es inductor de apoptosis
<b>Goat-anti-mouse</b>	Pierce	10 µg/mL	Igs de ratón	Soluble actúa como mitógeno Actúa potenciando la interacción de anti-CD3 y anti-CD28 mediante entrecruzamiento

### 4. ANTICUERPOS

Los anticuerpos empleados en la parte experimental de esta Tesis se detallan en la tabla siguiente:

TablaII. Anticuerpos empleados en la parte experimental de la Tesis.

NOMBRE	ESPECIFICIDAD	ORIGEN	USO	FUENTE
<b>Anti- CD3-ε (UCHT-1)</b>	CD3-ε humano	Ratón	Estimulación	Immunokontakt
<b>Anti- CD3-ε -FITC</b>	CD3-ε humano	Ratón	Citometría	Caltag
<b>Anti- CD69 -FITC</b>	CD69 humano	Ratón	Citometría	Cultek
<b>Goat-anti-mouse ( entrecruzante)</b>	IgGs de ratón	Cabra	Estimulación	Pierce
<b>Anti-Fas (CH11)</b>	Fas humano	Ratón	Estimulación	U.B.I.
<b>Anti- IFNγ ( 43.11)</b>	IFNγ humano	Ratón	ELISA	Dr. S. Alkan <sup>172</sup>
<b>Anti- IFNγ (45.11)</b>	IFNγ humano	Ratón	ELISA	Dr. S. Alkan <sup>172</sup>
<b>Anti-TNFα ( B13.2)</b>	TNFα	Ratón	Bloqueante de citotoxicidad de TNFα	Dr. Manuel Fresno <sup>173</sup>
<b>Anti-IκBα</b>	IκBα humano	Conejo	WB*	Santa Cruz
<b>Anti-α-tubulin(B-5-1-2)</b>	Tubulinaα humano	Ratón	WB	Sigma
<b>Anti-CD28 (CD28.2)</b>	CD28 humano	Ratón	Estimulación	Pharminutosgen
<b>Anti-Raf1-K</b>	Raf-1 humano	Conejo	WB	Santa Cruz

<b>Anti-Ras (Ras-10)</b>	Ras humano	Ratón	WB	U.B.I.
<b>Anti-ZAP-70 (ZAP-4)</b>	ZAP-70 humano	Conejo	WB	Dr. S. Ley
<b>Anti-ZAP-70 (702)</b>	ZAP-70 humano	Conejo	IP y WB	Dr. B. Alarcón
<b>Anti-PTyr (4G10)</b>	fosfo-Tyr humano	Ratón	WB	U.B.I.
<b>Anti-LAT</b>	LAT humano	Conejo	IP y WB	U.B.I.
<b>Anti-Vav</b>	Vav humano	Conejo	IP*	U.B.I.
<b>Anti-Vav</b>	Vav humano	Ratón	WB	Transduction Laboratories.
<b>Anti-SLP-76</b>	SLP-76	Oveja	IP y WB	Dr.G.Koretzky <sup>170</sup>
<b>Anti-Phospho-p44/42MAPK</b>	Fosfo-ERK1/2	Conejo	WB	New England Biolabs
<b>Anti-MAPK(ERK-7D8)</b>	ERK1/2	Ratón	IP y WB	Zymed
<b>Anti-Phospho-p38MAPK</b>	Fosfo-p38MAPK	Conejo	WB	New England Biolabs
<b>Anti-p38MAPK</b>	p38MAPK	Conejo	WB	Sta. Cruz
<b>Anti-JNK2</b>	JNK2 humano	Conejo	WB	Sta. Cruz
<b>Anti-PKCθ (27)</b>	PKCθ humano	Ratón	WB	Transduction Laboratories.
<b>Anti-PLCγ1(10)</b>	PLCγ1 humano	Ratón	WB	Transduction Laboratories.
<b>Anti-c-Cbl</b>	c-Cbl humano	Conejo	WB	Sta. Cruz
<b>Anti-p65 (#1207)</b>	p65 (NF-kB)	Conejo	Supershift (EMSA)	Dr. N. Rice ( NCI Frederick Cancer Research and Dev. Centre)
<b>Anti-p50 (#1141)</b>	p50 (NF-kB)	Conejo	Supershift (EMSA)	Dr. N. Rice ( NCI Frederick Cancer Research and Dev. Centre)
<b>Anti-c-Rel (#1136)</b>	c-Rel (NF-kB)	Conejo	Supershift (EMSA)	Dr. N. Rice ( NCI Frederick Cancer Research and Dev. Centre)
<b>Anti-mouse-peroxidase</b>	IgGs de ratón	Cabra	WB	Sigma
<b>Anti-rabbit peroxidase</b>	IgGs de conejo	Cabra	WB	Nordic Immunological Labs.
<b>Anti-sheep- peroxidase</b>	IgGs de oveja	Cabra	WB	Nordic Immunological Labs.
<b>Anti-Cholera-toxin</b>	Toxina del cólera		Estimulación	List Biological Lab.
<b>Anti-mouse Texas Red</b>	IgGs de ratón	Cabra	Microscopía Confocal	Amersham
<b>Anti -mouse FITC</b>	IgGs de ratón	Cabra	Microscopía Confocal	Amersham
<b>Anti -rabbit FITC</b>	IgGs de conejo	Cabra	Microscopía Confocal	Sigma

\*Las abreviaturas WB e IP se refieren a las técnicas bioquímicas western blot e inmunoprecipitación, respectivamente.

## 5. OTROS REACTIVOS

Los reactivos utilizados en los diferentes ensayos de inhibición de esta Tesis se agrupan en la siguiente tabla:

TablaIII. Inhibidores de la actividad de diferentes rutas de señalización .

INHIBIDOR	ESPECIFICIDAD	FUENTE	INDICACIONES	DÓSI S
<b>CsA</b>	calcineurina	Novartis	1/2h preincubación	200ng/mL
<b>Sanguinarine</b>	NF-kB	Sigma	1/2h preincubación	1µM
<b>PD98059</b>	MEK-1	Sigma	En toda la estim.	10 - 50µM
<b>SB203580</b>	p38MAPK	Sigma	En toda la estim.	10 – 30 µM

A continuación, se enumeran en la Tabla IV el resto de los reactivos, de usos varios, empleados en esta Tesis que no han podido ser agrupados según las clasificaciones anteriores:

TablaIV. Otros reactivos empleados en la parte experimental de la Tesis.

REACTIVO	FUENTE	USO
Toxina colérica-Rodamina	List Biological Lab	Detección del lípido GM1 por
Toxina colérica -Peroxidase	Sigma	Microscopía confocal y WB
Ioduro de propidio	Sigma	Medida ciclo celular por citometría
AnexinaV –Biotina	Boehringer Mannheim	Medida de apoptosis por citometría
Avidina-PE	Caltag	Unión a biotina
IL-2 recombinante humana	Hoffman – La Roche	ELISA
IFN $\gamma$ recombinante humana	Genzyme Corp.	ELISA

## 6. CONSTRUCCIONES DE ADN

En la siguiente tabla se han reunido todos los nombres de los diferentes plásmidos utilizados como vectores de expresión o genes reporteros de luciferasa:

TablaV. Vectores empleados en la parte experimental de la Tesis.

Nombre del VECTOR	CLASE	FUENTE	CARACTERÍSTICAS
p3NF-kB CONALuc	Reporter luciferasa	Dr. F. Arenzana (Inst. Pasteur, Paris)	Medida de Inducción de NF-kB
pCDNAIII-IkB $\alpha$	Vector de expresión	Dr. F. Arenzana (Inst. Pasteur, Paris)	Inhibidor de inducción NF-kB
NF-ATluc	Reporter luciferasa	Dr. G. Crabtree (Standford CA)	Medida de Inducción de NF-AT
DN-NF-AT (pSH102cD418)	Vector de expresión	Dr. G. Crabtree (Standford CA)	Inhibe inducción de NF-AT endógena
pRL-CMV	Reporter de Renilla	Promega (Madison, WI)	
FasL-486-Luclink	Reporter luciferasa	Dr. G. Koretzky ( Un. Pennsylvania)	Promotor de FasL humano
DN-MEKK-1	Vector de expresión	Dr. M. Karin ( Un. California)	Inhibe activación de MEKK1 endógena
DK-JNK	Vector de expresión	Dr. S. Gutkind (GeorgetownUniversity med. Centre)	Inhibe activación de JNK endógena
AP-1luc (+-73Col)	Reporter luciferasa	Dr. M. Karin ( Un. California)	Contiene sitios AP-1 del promotor de colagenasa
FLRE ( Egr-3FasLsite)	Reporter luciferasa	Dr.P.R. Mittelstadt ( National Institute of Health. Bethesda)	Sito Egr-3 triplicado en el promotor de FasL humano
pGEX-c-Jun	Vector de expresión	Dr. R. Davis	Proteína de fusión de c-Jun, GST-c-Jun
pGEX-RBD <sub>1-149</sub>	Vector de expresión	Dr. Doreen Cantrell ( Imperial Cancer Research Fund. Londres)	Proteína de fusión del dominotiosio de unión de Raf-1 a Ras, GST-RBD

## MÉTODOS

### 1. ESTIMULACIÓN CELULAR

Las condiciones en las que se desarrolló la estimulación dependieron fundamentalmente del fenómeno bioquímico o respuesta efectora que se quería observar. Se diferencian esencialmente en la concentración celular y el tiempo de estimulación. La dosis de estimulación se ha especificado anteriormente en el capítulo de materiales y la concentración celular y tiempo de estimulación se detallan individualmente en cada experimento. Todos los ensayos de estimulación llevan su correspondiente punto control de no estimulación y a veces según corresponda, como control positivo PMA/Ionóforo o PMA. Previo a la estimulación se ha comprobado por tinción con un anticuerpo anti-CD3-FITC y citometría de flujo que la expresión en la membrana del complejo TCR/CD3 es superior al 75 % y semejante en las células salvajes y mutantes.

- 1.1. **Estimulación apoptótica:** Las células resuspendidas en medio completo, a una concentración de  $2-5 \times 10^5$  células/mL, se estimularon a 37°C en un incubador de CO<sub>2</sub>, con SEB soluble, durante 48h para las medidas de ciclo celular y 16h en el caso de los ensayos de medida de anexina-V. Alternativamente, se utilizó como estimulador  $\alpha$ -CD3 fijado previamente a plástico, tras incubación del anticuerpo UCHT-1 en PBS pH 8 esteril, durante toda la noche a 37°C y posterior conservación a 4°C, en placas de 24 pocillos. Como control de estimulación apoptótica se empleó una combinación de PMA y Ionóforo
- 1.2. **Estimulación para la medida de activación de intermediarios tempranos de señales.** Las células ( el número se indica en cada experimento) se incubaron con anti-CD3 sólo o junto con anti-CD28, a 4°C, durante 15 minutos en RPMI/Hepes 15mM. Tras retirar los anticuerpos no unidos, las células se resuspendieron en RPMI/Hepes 15mM a 37°C y se estimularon con un segundo anticuerpo entrecruzante, goat anti-mouse durante los tiempos que se indican en los diversos ensayos.

## **2. TÉCNICAS PARA LA MEDIDA DE APOPTOSIS CELULAR**

**2.1. Análisis por citometría de flujo de degradación del ADN.**  $10^5 - 10^6$  células estimuladas o sin estimular se permeabilizaron con 500  $\mu$ L de un tampón que contenía: ioduro de propidio 100 $\mu$ g/mL, Nonidet P-40 al 0.05% y RNasa 10  $\mu$ g/mL en PBS. Se mezclan las muestras en el vortex y se incubaron a 4°C, en oscuridad, durante al menos 1h antes de ser analizadas. El análisis de la fluorescencia emitida por el ioduro de propidio se realizó en un citómetro de flujo (EPICS-XL MCL, Coulter) y sirvió para determinar el % de células apoptóticas a partir del pico subG<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> del ciclo celular.

**2.2. Análisis por citometría de flujo de la unión de anexina-V.**  $0.5-1 \times 10^6$  células estimuladas o sin estimular se recogieron del cultivo y lavaron una vez con PBS. A continuación, se incubaron con anexinaV-biotina y posteriormente, con avidina-PE según se recoge en las instrucciones de la casa comercial (Boehringer Mannheim). Por último, se analizaron por citometría de flujo y se determinó el % de células apoptóticas a partir de la fluorescencia de las células vivas que son positivas para la anexina-V.

## **3. MEDIDA DE SECRECIÓN DE CITOQUINAS**

El nivel de IL-2 secretado por las células se determinó a partir de cultivos de células estimuladas o no estimuladas, mediante un ELISA comercial, siguiendo las instrucciones del fabricante (Genzyme Corp., Boston, MA). Los mismos sobrenadantes se utilizaron para detectar el nivel de TNF $\alpha$  mediante un ELISA comercial equivalente para la medida de esta citoquina.

El hIFN $\gamma$  se determinó en los sobrenadantes de cultivos análogos, por ELISA de tipo sandwich diseñado en nuestro laboratorio, utilizando dos anticuerpos monoclonales específicos de hIFN $\gamma$  (generosamente cedidos por Dr. S. Alkan. Ciba-Geigy Ltd, Basel Switzerland) : 43.11 para ser fijado a los pocillos de la placa de ELISA y 45.11 acoplado a biotina, siguiendo el procedimiento que ha sido previamente descrito <sup>172</sup>.

En todos los casos, se efectuaron las medidas por duplicado y los valores de absorbancia se hicieron corresponder con valores de unidades/mL, tras interpolar en la curva standard hallada a partir de valores conocidos de IL-2, TNF $\alpha$  o IFN $\gamma$  recombinantes humanos.



#### **4. TRANSFECCIONES TRANSITORIAS Y ENSAYOS DE LUCIFERASA**

20x10<sup>6</sup> células se transfectaron con lipofectina (Life Technologies, Inc) según las instrucciones de la casa comercial. Brevemente, las células se lavaron dos veces con PBS, se resuspendieron en 1mL de medio Opti-MEM (Life Technologies, Inc) y se incubaron durante 8h en un incubador de CO<sub>2</sub> a 37°C junto con una mezcla de 20µg de lipofectina y 30-75 µg del vector correspondiente en un volumen total de 2mL de Opti-MEM. Las células se lavaron y se resuspendieron en medio completo dejándolas recuperarse durante 24h más. Con objeto de disponer de un elemento de normalización de la eficiencia de transfección, los vectores del ensayo se cotransfectaban con 5 µg del vector “reporter” de Renilla.

A continuación, las células se estimularon en placa de 24 pocillos. A las cinco horas se recogieron y centrifugaron. Las correspondientes alícuotas de células se lisaron según las instrucciones del Kit Luciferase Assay y Dual luciferase Assay de Promega (Madison, WI). Para cada condición experimental, las actividades lumínicas de la luciferasa y de la renilla se determinaron por duplicado en un luminómetro LUMAT LB9506 (Berthold, Germany).

En el caso de cotransfecciones con vectores de expresión se siguió el mismo protocolo, si bien las relaciones molares del vector de expresión: “reporter” del promotor de FasL variaban en función del tipo de vector de expresión. Así, en el caso de la construcción Ikbα (o del correspondiente vector vacío pcDNAIII) la relación fue de 1.5 y para el caso del dominosante negativo de NFAT, de 3. Las construcciones de dominosantes negativos de MEKK1 y DK-JNK, se cotransfectaron en una relación de 1.5 - 3 y 1.5, respectivamente.

Los valores se representaron como unidades relativas de luz (R.L.U.) y corresponden a las medidas de luciferasa relativizadas a las de Renilla.

#### **5. AISLAMIENTO DE RAFTs LIPÍDICOS POR ULTRACENTRIFUGACIÓN EN GRADIENTE DE SACAROSA.**

50-100x10<sup>6</sup> células se estimularon con anti-CD3 sólo o junto con anti-CD28. Las células se lisaron en 1 mL del tampón: Tris /HCl pH 7.6 25mM, NaCl 150mM, Triton 0.5% , aprotinina 10µg/mL, leupeptina 10µg/mL, pepstatina A 10µg/mL, PMSF 1mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1mM, NaF 20mM, tras lo cual, los lisados se pasaron por aguja de 21G. Los lisados se mezclaron con 1mL de sacarosa al 80% (preparada en el mismo tampón) y se depositaron en el fondo de los tubos de la ultracentrífuga. Sobre esta suspensión del 40%, se depositaron 2mL de sacarosa al 30% y a continuación, 1mL

de sacarosa al 5%, ambas disoluciones preparadas en el mismo tampón de lisis. Tras ultracentrifugación a 50000rpm, sin freno, en un rotor SW50.1 (Beckman), a 4°C durante 18h, se colectaron fracciones de 400µL empezando desde fondo del tubo y se examinó el contenido en el marcador lipídico de Rafts, GM1 por medio de western blot con toxina colérica acoplada a peroxidasa. Las alícuotas que resultan positivas para GM1 se juntaron en una sola fracción que se denominó FRACCIÓN INSOLUBLE. Asimismo, las negativas para GM1, se agrupan como FRACCIÓN SOLUBLE. Alternativamente, los Rafts se aislaron por recolección directa de la fracción flotante situada aproximadamente en la interfase 5%-30% . En este caso la comparación se realizó con la fracción soluble correspondiente a los 2mL del fondo del gradiente, previa normalización de los volúmenes.

## **6. MEDIDA DE Ras-GTP**

5-10x10<sup>6</sup> células se estimularon con anti-CD3 y anti-CD28 y se lisaron en un tampón que contenía Tris/HCl pH 7.8 20mM, NaCl 150mM, Brij 96 1%, aprotinina 1µg/mL, leupeptina 1µg/mL, pepstatina A 1µg/mL, PMSF 1mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1mM y NaF 20mM. Los lisados se incubaron durante 2h, en agitación circular, a 4°C, con 5-10µg de GST-RBD, una proteína de fusión que contenía el dominio de unión de Raf-1 a Ras. Previamente, esta proteína había sido aislada tras lisis de un cultivo de E. Coli, en el que había sido inducida su expresión, y posterior incubación de los extractos con glutation acoplado a bolas de agarosa ( Amersham). El lecho de agarosa que contenía la Ras activa unida, se lavó varias veces en el tampón de lisis y se resuspendió en tampón de muestra. Ras activa se detectó tras haber sometido las muestras a PAGE-SDS, western blot e inmunodetección con un anticuerpo anti-Ras.

## **7. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DE c-JUN QUINASA EN FASE SÓLIDA**

5x10<sup>6</sup> de células no estimuladas o estimuladas con anti-CD3 y anti-CD28 se lisaron en 200µL de un tampón de lisis ( HEPES 25mM pH 7.5, NaCl 30mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5mM, EDTA 0.2mM, DTT 0.5mM, beta glicerofosfato 20mM, ortovanadato sódico 0.1mM Triton X-100 0.1%, leupeptina 2µg/mL, PMSF 100µg/mL). Tras centrifugación, los sobrenadantes se reconstituyeron adecuadamente para hallarse resuspendidos en HEPES 20mM pH 7.5, NaCl 75mM, MgCl<sub>2</sub> 2.5mM, EDTA 0.1mM, Triton X-100 0.05%, DTT 0.5mM, β-glicerofosfato 20mM, ortovanadato 0.1mM, leupeptina 2µg/mL y PMSF 100µg/mL , y se incubaron durante 3h, en agitación circular a 4°C, con 10µg de GST-Jun o del control GST, acoplados a bolas glutation-Sepharose ( Pharmacia). Los lechos

se lavaron 5 veces en un tampón de lavado (HEPES 20mM pH7.7, NaCl 50mM, MgCl<sub>2</sub> 2.5mM, EDTA 0.1mM, Triton X-100 0.05%) y finalmente se resuspendieron en 30μL de tampón quinasa ( HEPES 20mM pH 7.6, MgCl<sub>2</sub> 20mM, β-glicerofosfato 20mM, PMSF 20mM, ortovanadato 0.1mM, DTT 2mM) que contenía 20μM de ATP frío y 5μCi de [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP. La reacción se efectuó durante 20 minutos a 30°C y se paró con tampón de lavado. Las proteínas fosforiladas se eluyeron en tampón de muestra y se sometieron a PAGE-SDS. Las bandas correspondientes al GST-Jun fosforilado que se obtuvieron a partir de autorradiografías, se densitometraron y relativizaron a los niveles de JNK presentes en alícuotas de los precipitados antes de realizar el ensayo quinasa.

## **8. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD DE RafK, ERK Y p38MAPK**

1-5x10<sup>6</sup> células fueron estimuladas con anti-CD3 sólo o con anti-CD28 y lisadas en tampón de lisis ( HEPES 20mM, EGTA 10mM, MgCl<sub>2</sub> 2.5mM, beta glicerofosfato 40mM, DTT 1mM, ortovanadato sódico 2mM, NP-40 1%, aprotinina 1μg/mL, leupeptina 1μg/mL, pepstatina A 1μg/mL, PMSF 1mM, NaF 20mM). La estimación de las actividades inducidas de ERK y p38MAPK se realizó por inmunodetección sobre membranas, utilizando anticuerpos específicos que reconocían las formas fosforiladas de las correspondientes MAPKs, y que se asume son una medida de su actividad.

Para la detección de RafK activa se procedió de forma análoga pero los correspondientes lisados de células estimuladas se sometieron a PAGE-SDS al 8% a partir de una disolución de acrilamida: bisacrilamida 26:0.4 que aportaba mayor resolución en la separación de las bandas proteicas. Las proteínas se transfirieron a membrana de nitrocelulosa y tras inmunodetección con anticuerpos anti-RafK, se evaluó la actividad de la quinasa por la presencia de bandas de mayor peso molecular, reconocidas por los anticuerpos anti-RafK, que se corresponden con las formas fosforiladas de RafK.

El control de carga se realizó para ERK y p38MAPK tras “stripping” de la membrana y posterior inmunodetección con anticuerpos anti-ERK y anti-p38MAPK respectivamente. En el caso de la RafK, y de forma paralela también para ERK y p38, se empleó como control de carga la α-tubulina, una proteína del citoesqueleto cuya expresión no varía con la estimulación.

## **9. SUBFRACCIONAMIENTO CELULAR**

20-30x10<sup>6</sup> células estimuladas con anti-CD3 y anti-CD28 o sin estimular se resuspendieron en un tampón hipotónico (HEPES 10mM pH 7.4, KCl 42mM, MgCl<sub>2</sub> 5mM, aprotinina 10<sup>□</sup>g/mL, leupeptina 10<sup>μ</sup>g/mL, pepstatina A 10<sup>μ</sup>g/mL), se incubaron a 4°C durante 15 minutos y se pasaron 10 veces a través de una aguja de 30G. Los lisados se centrifugaron a 200 x g durante 10 minutos para separar los núcleos y el “debris” celular y el sobrenadante se recogió y centrifugó a 13000 x g durante 1h, a 4°C. A continuación, el sobrenadante (fracción citosólica) se recogió y el precipitado se resuspendió en tampón de lisis (Tris/HCl pH 7.5 20mM, NaCl 150mM, NP-40 1%, aprotinina 10<sup>μ</sup>g/mL, leupeptina 10<sup>μ</sup>g/mL, pepstatina A 10<sup>μ</sup>g/mL), se agitó en vortex durante 5 minutos, a 4°C y se centrifugó de nuevo a 13000 x g durante 1h, a 4°C. El sobrenadante que correspondía a la fracción de membrana se retiró y la fracción insoluble en el detergente (citoesqueleto) se resuspendió en SDS 1% en agua. Cada fracción se diluyó en tampón de muestra, se sometieron a PAGE-SDS 10% cantidades equivalentes de cada fracción en geles individuales y tras western blot e inmunodetección con un anticuerpo específico anti-PKC $\theta$  se determinó la cantidad de PKC $\theta$  translocada desde la fracción citosólica a las fracciones de membrana y citoesqueleto.

## **10. INMUNOPRECIPITACIONES**

20-30x10<sup>6</sup> células no estimuladas o estimuladas con anti-CD3 y anti-CD28 se lisaron con un tampón TNE (Tris /HCl pH 7.6 25mM, NaCl 150mM, EDTA 5mM ) que contenía Brij 96 1% e inhibidores de proteasas y fosfatasas ( aprotinina 1<sup>μ</sup>g/mL, leupeptina 1<sup>μ</sup>g/mL, pepstatina A 1<sup>μ</sup>g/mL, PMSF 1mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1mM) , durante 30 minutos, a 4°C. Tras centrifugación, los sobrenadantes se sometieron a dos preaclearados, uno con bolas de proteína G o proteína A-Sepharose ( Pharmacia), en función de la especie o del isotipo del anticuerpo utilizado para inmunoprecipitar, y otro, con suero normal de la especie precipitante acoplado a bolas de proteína G/proteína A-Sepharose. Ambos se realizaron durante 2h, a 4°C y en agitación circular. Por último, se llevó a cabo la inmunoprecipitación durante toda la noche con el anticuerpo específico, en agitación circular, a 4°C y posterior incubación de 1h con proteína G/proteína A-Sepharose, en las mismas condiciones. Tras lavar los inmunoprecipitados con TNE- Brij96 al 0.5%, y eluir en tampón de muestra, las muestras se resolvieron en geles de poli(acrilamida)-SDS al 12% en condiciones reductoras. A continuación, se realizó western blot e inmunodetección con anticuerpos específicos frente a las proteínas de interés o frente a proteínas fosforiladas en Tyr.

## **11. EXTRACCIÓN NUCLEAR Y EMSAs**

Las células fueron estimuladas con PMA/Ionóforo o  $\alpha$ -CD3 fijado a plástico. Los núcleos se obtuvieron por tratamiento de las células con un tampón hipotónico ( HEPES 10mM pH 7.9, Mg Cl<sub>2</sub> 1.5mM, EDTA 0.1mM, EGTA 0.1mM, DTT 1mM , PMSF 0.5mM, leupeptina 2.5 $\mu$ g/mL, aprotinina 2.5 $\mu$ g/mL y pepstatina A 2.5 $\mu$ g/mL, espermidina 1M y espermina 0.5M) y lisis con NP-40 10%. Se separaron los extractos citosólicos por centrifugación y los núcleos se resuspendieron en un tampón hipertónico (HEPES 20mM pH 7.9, EGTA 1mM, EDTA 1mM, DTT 1mM , NaCl 400mM, PMSF 1mM, leupeptina 2.5 $\mu$ g/mL, aprotinina 2.5 $\mu$ g/mL y pepstatina A 2.5  $\mu$ g/mL ) y se incubaron en agitación circular, durante 45 minutos, a 4°C. A continuación, se separaron las proteínas nucleares por centrifugación a 12000x g , 5 minutos, a 4°C y los extractos nucleares se conservaron a -80°C.

Los oligonucleótidos que se emplearon como sondas: NF-kB consenso (Promega) y NF-kB FasL site ( [AGAGGTGTTTCCCTTA](#)) se marcaron radiactivamente con T4 polinucleótido quinasa. La reacción de unión se realizó en una mezcla que contenía: la sonda marcada radiactivamente ( 0.2-0.4ng), 1-3  $\mu$ g de proteínas nucleares, polydI:dC (0.05-1mg/mL ), 4% glicerol, MgCl<sub>2</sub> 1mM, EDTA 0.5mM, DTT 0.5mM, NaCl 50mM, Tris/HCl pH7.5 10mM en un volumen final de 15  $\mu$ L. La mezcla de reacción se incubó a 4°C durante 15 minutos.y se sometió a electroforesis en geles de poliacrilamida 4 % en condiciones no desnaturizantes. Los geles se secaron y se expusieron para obtener las correspondientes autorradiografías. Los análisis de supershift se llevaron a cabo añadiendo 1 $\mu$ L de los anticuerpos policlonales específicos o de los anticuerpos policlonales de conejo control (SCN) a la mezcla de reacción anterior y se incubaron a 4°C durante 45minutos más. Para los ensayos de competición se añadió de 10 a 100 veces en exceso de la sonda fría : oligo específico o un oligo irrelevante( en nuestro caso Oct-1) en la mezcla de reacción y se procedió de forma análoga a lo descrito anteriormente.

## **12. RT-PCR y Southern Blot**

Las células fueron estimuladas apoptóticamente y se extrajo su ARN total. Tras obtención del cDNA por transcripción inversa se realizó PCR con dos pares de oligonucleótidos ( ver tabla) para amplificar un fragmento de 288pb de FasL y un fragmento de 800pb de la  $\beta$ -actina. Esta última, se utilizó como control de carga. Ambas PCRs se efectúan en el mismo tubo en un programa de 24 ciclos de 2minutos./95°C; 1minutos./55°C;1minutos/72°C seguido por una elongación terminotal de 7 minutos/72°C.

cDNA	sentido 5' → 3'	sentido 3' ← 5'
FasL □-actina	TCTGGAATGGGAAGACAC ATCTGGCACCACACCTTCT ACAATGAGCTGCG	CAATCTTACCAGTGCTGA CGTCATACTCCTGCTTGC TGATCCACATCTGC

Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1.5% , se transfirieron a membrana Zetaprobe ( Biorad) e hibridaron con oligonucleótidos específicos de FasL (5'-GAGGA~~ACTCTAAGTATCC~~) y β-actina (5'-CTTCCTGGGCATGGAGTCGTG) e internos respecto de la secuencia de los oligonucleótidos empleados para las PCRs, marcados radiactivamente con [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP. Las bandas correspondientes a los fragmentos de cDNA hibridados se obtuvieron por autorradiografía.

## 12. MICROSCOPIA CONFOCAL

2X10<sup>5</sup> células se incubaron con anti-CD3 durante 10 minutos a 4°C y se estimularon con un anticuerpo secundario anti-mouse-FITC durante 1 minutos a 37°C. Pposteriormente, se depositaron durante 30 minutos, a 4°C en cubreobjetos, previamente tratados. En el caso del “patching” inducido a través de GM1 las células se depositaron en cubreobjetos y después, se incubaron con toxina colérica acoplada a Rhodaminutosa durante 30 minutos , a 4°C. Posteriormente, se estimularon durante 10 minutos, a 37°C con anti-toxina colérica. A continuación, las células se fijaron en PBS/paraformaldehido 4% durante 90 minutos, a 4°C y después, se procedió a bloquear con PBS/BSA 2% durante 30 minutos.

Para la detección de LAT, las células se permeabilizaron con PBS/NP-40 0.1% durante 5 minutos, a 4°C y se incubaron con anticuerpos anti-LAT en el tampón de bloqueo durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizó una incubación, de 30 minutos a Temperatura ambiente, con un anticuerpo secundario anti-rabbit acoplado a Texas Red, en el caso del “patching” inducido a través del CD3 y anti-rabbit acoplado a FITC, en el caso del “patching” inducido a través de GM1. Por último los cubreobjetos se montaron sobre los portaobjetos y se inmovilizaron. Las preparaciones se analizaron en un microscopio confocal de fluorescencia Leyca.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

**ESTUDIO DE LOS FENÓMENOS DE SEÑALIZACIÓN TEMPRANOS**

Una de las consecuencias bioquímicas más importantes que se producen al mutar el residuo Tyr C-terminal de la región transmembrana de la cadena  $\beta$  del TCR, una vez que el complejo intacto se ha expresado correctamente en la membrana celular, es la disociación de la cadena  $\zeta$  del resto del complejo TCR/CD3. Dado que los ITAMs fosforilados de  $\zeta$  son claves en el reclutamiento de la quinasa ZAP-70 a la membrana celular, la baja asociación de TCR/CD3-  $\zeta$  en las células mutantes impide que, tras la estimulación, ZAP-70 se ubique con normalidad en la región perimembranal, donde debe encontrarse con alguno de sus substratos, o a donde debe transportar los diferentes “linkers” responsables de continuar la transmisión de la señal. Sin embargo, el defecto en la asociación de  $\zeta$ , no parece alterar la actividad quinasa “in vitro” de ZAP-70 frente a un substrato exógeno <sup>43</sup>.

Parece razonable pensar que para una apropiada transmisión de la señal no sólo se requiera de una actividad enzimática correcta sino que también sea necesario una localización adecuada de la quinasa en el correspondiente compartimento celular donde se hallan sus substratos. Por tanto, la deslocalización de ZAP-70, podría estar afectando no sólo a su asociación con otras moléculas de señalización sino también a la fosforilación de sus substratos. Con este objetivo, se estudió la actividad quinasa “in vivo” de ZAP-70 frente a sus substratos LAT y SLP-76 y moléculas como Vav, cuya fosforilación depende de la actividad de esta quinasa

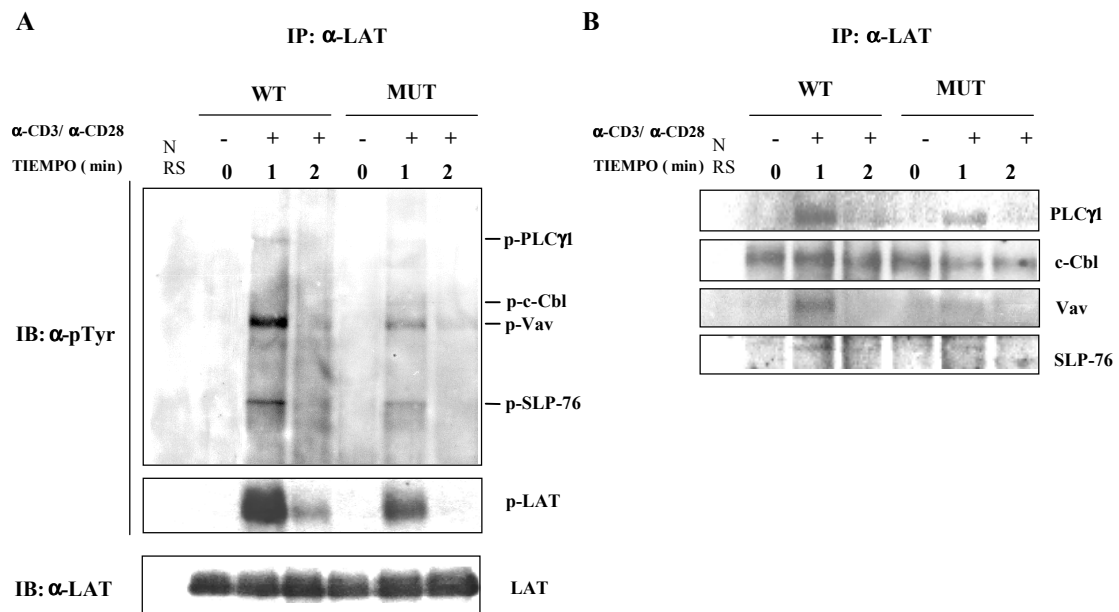
**1. LA FOSFORILACIÓN INDUCIDA “IN VIVO” DE LAT ESTÁ SERIAMENTE DISMINUIDA EN LAS CÉLULAS MUTANTES.**

Uno de los substratos más importantes de ZAP-70, es la proteína adaptadora LAT que se localiza específicamente en la membrana celular y es responsable del reclutamiento de multitud de moléculas de señalización una vez ha sido fosforilada por ZAP-70.

Ensayos de inmunoprecipitación con anticuerpos específicos anti-LAT, sobre lisados de células salvajes y mutantes previamente coestimuladas con anticuerpos  $\alpha$ -CD3+ $\alpha$ -CD28, seguidos por inmunodetección con un anticuerpo anti-fosfotirosina, “stripping” y nueva inmunodetección con anticuerpos-anti LAT indican que, si bien la cinética de fosforilación de LAT, es similar a la descrita en la literatura <sup>64</sup>, la inducción de la fosforilación de LAT está gravemente disminuida respecto a las células salvajes (Figura 9, panel A).



En una exposición mayor ( panel superior de la Figura 9, panel A), se pueden apreciar importantes diferencias en la fosforilación de las proteínas que se han descrito asociadas a LAT. Así, estas proteínas fueron identificadas como PLC $\gamma$ 1, Cbl, Vav y SLP-76, tras “stripping” de la membrana e inmunodetección con anticuerpos específicos. No se pudo detectar ZAP-70, hecho por otra parte que había sido constatado en trabajos anteriores <sup>64</sup>.



**Figura 9. La estimulación del TCR $\beta$  mutado induce pobremente la fosforilación de LAT.**

(A). Células WT y MUT fueron estimuladas con anticuerpos  $\alpha$ -CD3+  $\alpha$ -CD28 en los tiempos que se indican y lisadas con un tampón que contenía Brij 96 1% . Los lisados se sometieron a inmunoprecipitación con anticuerpos anti-LAT y los inmunoprecipitados se resolvieron en gels de poliacrilamida-SDS al 12% en condiciones reductoras. Las proteínas se transfirieron a membrana de nitrocelulosa y tras bloqueo, se realizó inmunodetección con un anticuerpo  $\alpha$ -PTyr. (B) Posteriormente, se realizó “stripping” de la membrana e inmunodetección con anticuerpos específicos para la identificación de las proteínas asociadas a LAT ( $\alpha$ -PLC $\gamma$ 1, -Cbl, -Vav, -SLP-76) y con anticuerpos  $\alpha$ -LAT para la determinación de la cantidad de LAT inmunoprecipitada. El experimento es respesentativo de dos ensayos independientes realizados en las mismas condiciones.

Tanto PLC $\gamma$ 1 como SLP-76 y, sobre todo, Vav aparecen pobremente fosforiladas en las células mutantes, en comparación con las células salvajes. Teniendo en cuenta que todas estas moléculas se asocian a LAT directa o indirectamente a través de los residuos fosforilados en Tyr de LAT, la débil fosforilación inducida de estos “linkers” bien podría ser consecuencia de la pobre asociación a una LAT débilmente fosforilada. De hecho, en las inmunodetecciones con anticuerpos específicos frente a estas

proteínas se confirma que todas ellas se asocian pobremente a LAT en las células mutantes (Figura 9, panel B).

Cbl por el contrario, se encuentra más fosforilada en las células mutantes que en las salvajes. En este sentido, se ha descrito que en células deficientes en LAT, Cbl se encuentra hiperfosforilado <sup>70</sup> y por otra parte, parece que los patrones de inducción de fosforilación de LAT y Cbl son opuestos, ya que ratones deficientes en Cbl muestran un LAT hiperfosforilado <sup>174</sup>.



**Figura 10.** La estimulación de las células mutantes en  $\text{TCR}\beta$  no afecta a la fosforilación de ZAP-70 pero induce una menor fosforilación de LAT asociada a ZAP-70. Células WT y MUT fueron estimuladas, con anticuerpos  $\alpha$ -CD3+  $\alpha$ -CD28 y se lisadas con un tampón que contenía Brij 96 1% . Los lisados se sometieron a inmunoprecipitación con anticuerpos  $\alpha$ -ZAP-70 y los inmunoprecipitados se resolvieron en geles de poliacrilamida-SDS al 12% en condiciones reductoras. Las proteínas se transfirieron a membrana de nitrocelulosa y tras bloqueo, se realizó inmunodetección con un anticuerpo  $\alpha$ -PTyr. Posteriormente, mediante stripping e inmunodetección con anticuerpos  $\alpha$ -ZAP-70 y  $\alpha$ -LAT se identificaron las proteínas asociadas a ZAP-70. El experimento es respesentativo de dos ensayos independientes realizados en las mismas condiciones.

Dado que fue imposible detectar ZAP-70 asociada a LAT, se realizó la inmunoprecipitación inversa para determinar si: (1) la mutación afectaba a la asociación de ZAP-70 con LAT y (2) para comprobar si la fosforilación de ZAP-70 “in vivo”, que es una medida indirecta de su activación, era igual en ambos tipos celulares. La inmunoprecipitación con anticuerpos específicos anti-ZAP-70 sobre lisados de células salvajes y mutantes coestimuladas, seguida por inmunodetección con anticuerpos anti-fosfotirosina, confirmó que la fosforilación de ZAP-70 “in vivo” era igual en células salvajes y mutantes. Además, se observaron bajos niveles de fosforilación en la LAT coprecipitada con ZAP-70 en las células mutantes para niveles muy semejantes de ZAP-70 inmunoprecipitado en ambos tipos celulares (determinado tras “stripping” e inmunodetección con anticuerpo anti- ZAP-70) (Figura 10).

## 2. LAT SE DESLOCALIZA DE LOS RAFTS LIPÍDICOS DE LAS CÉLULAS MUT.

Considerando la importancia que se está confiriendo a los rafts lipídicos de membrana en la señalización y habiéndose descrito que es necesario que LAT se ubique en ellos, para ejercer su función, tras la estimulación celular, <sup>68</sup>, se investigó el nivel de fosforilación y localización de LAT y otras moléculas de señalización en los Rafts aislados a partir de lisados de células WT y MUT estimulados con anticuerpos  $\alpha$ -CD3 y coestimulados con anticuerpos  $\alpha$ -CD3+  $\alpha$ -CD28. En las 12 fracciones que se recogieron por cada muestra, se evaluó el contenido de GM1 ( marcador de Rafts), se juntaron las fracciones GM1 positivas por un lado, en una denominada como FRACCIÓN INSOLUBLE y las fracciones GM1 negativas por otro, como FRACCIÓN SOLUBLE. Ambas fracciones se compararon, evaluando en cada una los contenidos de LAT, Lck, Vav y  $\zeta$ .

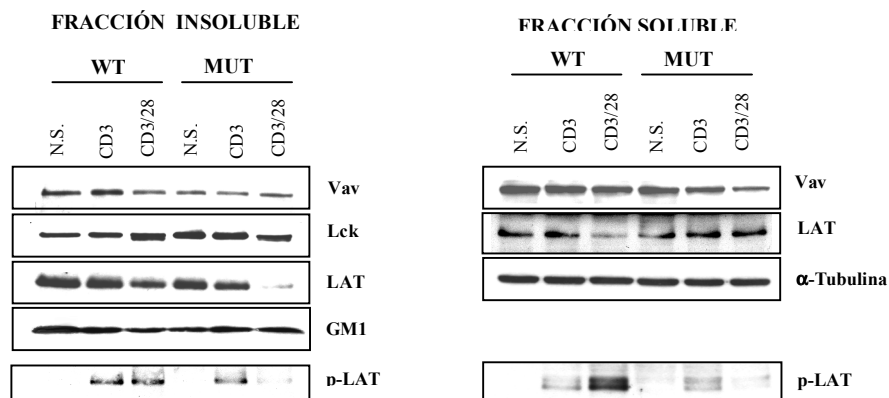


Figura 11. LAT se deslocaliza de los Rafts lipídicos en las células mutantes, en la región transmembrana de TCR $\beta$ , estimuladas. Células WT y MUT se estimularon durante 1 minuto con medio (N.S.),  $\alpha$ - o  $\alpha$ -CD3 y  $\alpha$ -CD28, se lisaron en un tampón que contenía 0.5% de Triton X-100 y se sometieron a ultracentrifugación en gradiente de sacarosa. El gradiente se recogió en doce fracciones que se agruparon en FRACCIÓN INSOLUBLE O FRACCIÓN SOLUBLE en función de su contenido en GM1 como se describe en Materiales y Métodos. Las proteínas de ambas fracciones se separaron por PAGE-SDS y se detectaron por inmunodetección con anticuerpos específicos. El experimento que se muestra es representativo de otros tres ensayos independientes.

Los datos sugieren que en las células mutantes, LAT se deslocaliza de los Rafts cuando las células se estimulan, sobre todo si existe coestimulación. Este fenómeno parece relacionarse con el nivel de fosforilación de LAT ya que, cuanto menor es el nivel de fosforilación de LAT, menos LAT se encuentra en la fracción insoluble y más en la soluble ( Figura 11). Así, en las células salvajes coestimuladas y con un nivel de fosfo-LAT apreciable, LAT se recluta de la fracción soluble a la insoluble o Rafts. En

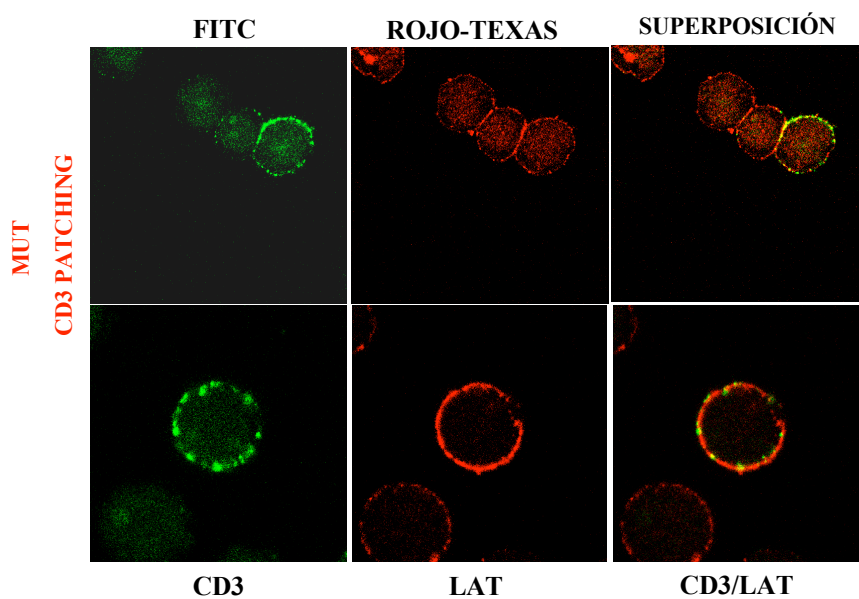
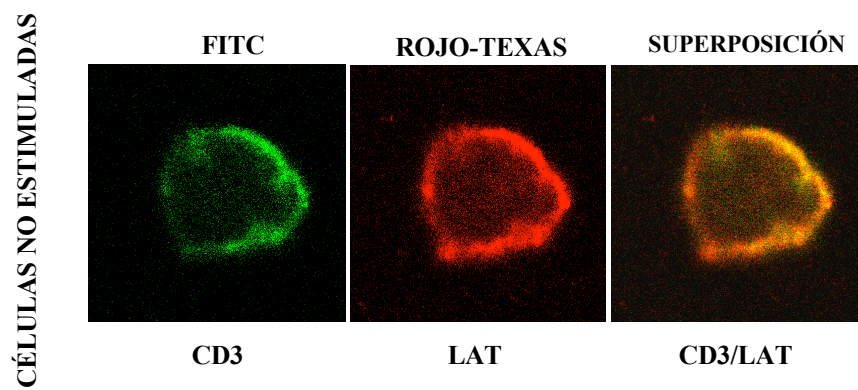
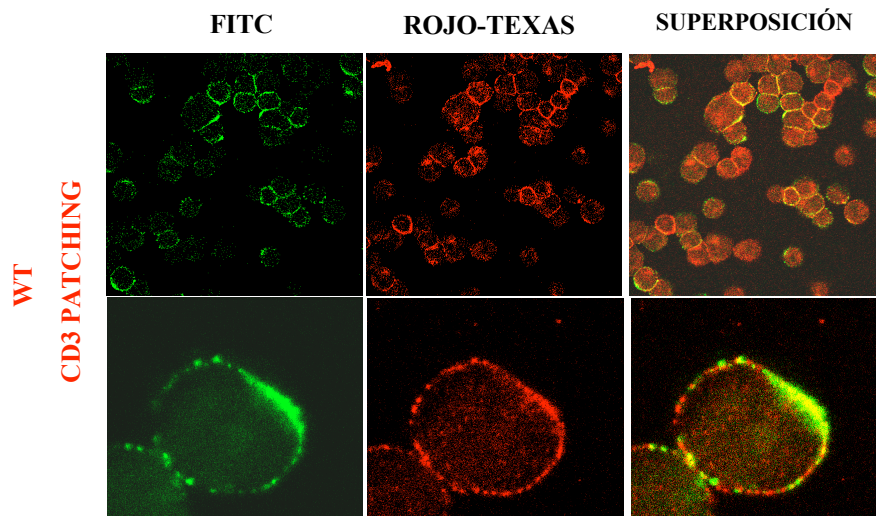
cambio, en las células mutantes coestimuladas, donde se induce menor fosforilación de LAT, ésta parece quedarse, en su mayor parte, retenida en la fracción soluble, sin que, de esta forma, llegue a situarse en los niveles normales en los Rafts (bien se excluye o bien no se recluta). Nótese que este fenómeno parece afectar sólo a LAT. De hecho, Lck y Vav no parecen alterar sus niveles en los Rafts en función de la estimulación. Los mismos resultados respecto a LAT se obtuvieron en experimentos en los que se aislaba separadamente la fracción flotante correspondiente a los Rafts y se comparaba con la fracción soluble (datos no mostrados).

Alternativamente, se abordó el estudio de este fenómeno de deslocalización de LAT por medio de microscopía confocal, con el fin de detectar las localizaciones exactas de LAT, del complejo TCR/CD3, y de GM1 en la membrana celular y verificar si existía colocalización de LAT con el TCR y con GM1 en los Rafts que se agregaban (patching), tras estimulación en las células mutantes. Se han llevado a cabo una serie de experimentos preliminares en los que se inducía la agregación de los Rafts con anti-CD3 o con anti-toxina colérica (previa incubación con toxina colérica marcada con Rodamina, que se une a GM1). Posteriormente, las células se incubaron con anticuerpos secundarios  $\alpha$ -ratón -FITC o -Texas Red y anticuerpos anti-LAT para detectar TCR y LAT respectivamente, en los Rafts de la membrana. Los datos sugieren que en las células mutantes estimuladas a través del TCR/CD3 (CD3 patching): (1) existe una menor reorganización de LAT en agregados o "patches" de membrana, en comparación con las células salvajes estimuladas y (2) LAT no colocaliza con el TCR al inducirse la agregación de los Rafts en los que se sitúa el TCR/CD3 (Figura 12, panel A). Sin embargo, la colocalización de LAT y GM1 es total en ambos tipos celulares cuando la agregación de los Rafts es inducida con anti-toxina colérica (Figura 12, panel B). Esto podría sugerir que la deslocalización de LAT es consecuencia de la pobre interacción que LAT tiene con el TCR/CD3 mutado en el dominio transmembrana de la cadena TCR $\beta$  y que le impide ser reclutada a los Rafts lipídicos.

***Por tanto, estos resultados sugieren que, aún cuando los niveles de fosforilación de ZAP-70, y presumiblemente su actividad quinasa, sea semejante en células salvajes y mutantes, la deslocalización de ZAP-70 parece afectar a la fosforilación de uno de sus principales substratos (LAT), ocasionando consiguientemente un defecto en el reclutamiento a las proximidades de la membrana celular, de otras moléculas de señalización.***

***Además, la deficiente fosforilación inducida de LAT en las células mutantes estimuladas, podría provocar un defecto en la ubicación de LAT en los Rafts de membrana. Experimentos preliminares de microscopía confocal indican que en las células mutantes, LAT no se localiza en los Rafts en los que se halla el TCR/CD3.***

A



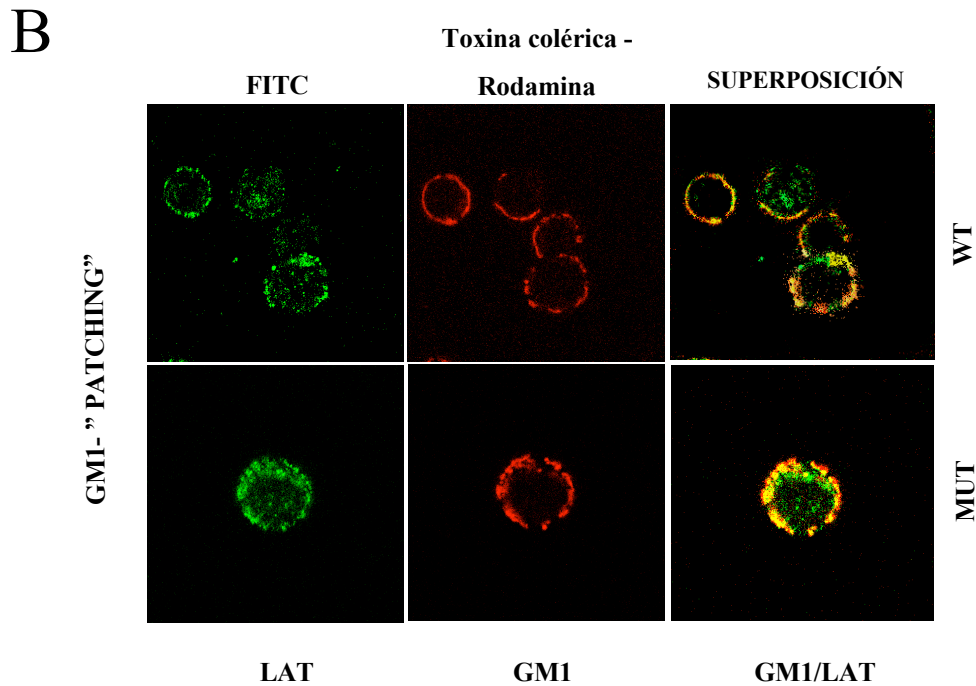


Figura 12. **Colocalización alterada de LAT y el complejo TCR/CD3 en las células mutantes en el dominio transmembrana de TCR $\beta$  estimuladas a través del TCR.** (A) Células WT y MUT se estimularon durante 1 minuto, a 37°C, con un anticuerpo entrecruzante acoplado a FITC, previa incubación a 4°C con un anticuerpo  $\alpha$ -CD3. Tras haber sido fijadas e impermeabilizadas, se incubaron con anticuerpos  $\alpha$ -LAT, seguido de un anticuerpo secundario  $\alpha$ -conejo acoplado a Texas Red, se inmovilizaron y fueron analizadas por microscopía confocal. (B) Como control de la localización de LAT en los Rafts, se evaluó la colocalización de LAT con el marcador de Rafts GM1. Células WT y MUT se estimularon con  $\alpha$ -toxina colérica durante 10 minutos a 37°C, previa incubación con toxina colérica-Rodamina a 4°C. Después se procedió de la misma forma que en (A), marcando con un anticuerpo secundario  $\alpha$ -conejo-FITC la presencia de LAT.

### **3. LA FOSFORILACIÓN DE SLP-76 INDUCIDA TRAS ESTIMULACIÓN, NO SE VE SERIAMENTE AFECTADA POR LA DEFICIENTE FOSFORILACIÓN DE LAT.**

SLP-76 es junto con LAT uno de los principales sustratos de ZAP-70. A diferencia de LAT, es una proteína citosólica pero mantiene en común con ella la capacidad de reclutar otras moléculas de señalización una vez ha sido fosforilada por ZAP-70.

Puesto que la fosforilación de LAT se veía seriamente dañada en las células mutantes, se estudió si el defecto en ZAP-70 podría afectar también a la fosforilación “in vivo” de SLP-76. Los experimentos de inmunoprecipitación con anticuerpos específicos anti-SLP-76, seguidos de inmunodetección con anti-fosfotirosina muestran que, los niveles de inducción de la fosforilación de SLP-76 son muy similares en ambos clones, lo cual era previsible considerando que la actividad quinasa de ZAP-70 no está alterada en las células mutantes.

Entre las proteínas fosforiladas que coprecipitan con SLP-76 y se identifican tras stripping e inmunodetección con anticuerpos específicos destacamos: LAT y Vav. La fosforilación de LAT en las células mutantes parece inducirse ligeramente en menor medida que en las células salvajes, aunque el defecto en la asociación SLP-76-LAT resulta mayor en la inmunoprecipitación inversa con anticuerpos anti-LAT (Figura 11, panel B).

Sin embargo, Vav asociada a SLP-76 está más fosforilada en las células mutantes, al contrario de lo que ocurría en la inmunoprecipitación con anticuerpos específicos anti-LAT, donde la asociación y fosforilación de Vav y LAT estaban disminuidas.

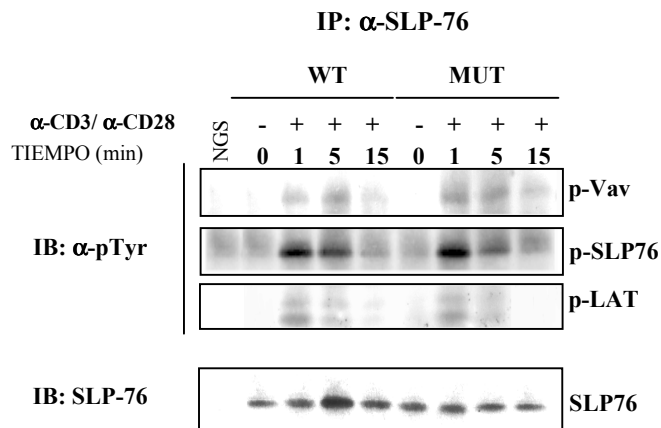


Figura 13. La mutación en la región transmembrana de TCR $\beta$  induce una mayor fosforilación de Vav asociado a SLP-76. Células WT y MUT fueron estimuladas con anticuerpos  $\alpha$ -CD3+  $\alpha$ -CD28 en los tiempos que se indican y lisadas con un tampón que contenía Brij 96 1% . Los lisados se sometieron a inmunoprecipitación con anticuerpos anti-SLP-76 y los inmunoprecipitados se resolvieron en geles de poliacrilamida-SDS al 12% en condiciones reductoras. Las proteínas se transfirieron a membrana de nitrocelulosa y tras bloqueo, se realizó inmunodetección con un anticuerpo  $\alpha$ -PTyr Posteriormente, se realizó “stripping” de la membrana e inmunodetección con anticuerpos específicos para la identificación de las proteínas asociadas a SLP-76 ( $\alpha$ -Vav, -LAT ) y con anticuerpos  $\alpha$ -SLP-76 para la determinación de la cantidad de SLP-76 inmunoprecipitada. El experimento es representativo de dos ensayos independientes realizados en las mismas condiciones. anti-Vav, -SLP-76 y LAT.

***En conclusión , estos resultados sugieren que la deslocalización de ZAP-70 no afecta a la fosforilación inducida de SLP-76, que es igual en ambos tipos celulares. Puede que no sea necesaria la presencia en la membrana de ZAP-70 para que pueda fosforilar a SLP-76, que por otra parte es un sustrato citosólico.***

***Además, Vav asociada a SLP-76 está más fosforilada en las células mutantes. Puesto que la asociación Vav-SLP-76 depende de la fosforilación de SLP-76 mediada por ZAP-70 y del dominio SH2 de Vav, no cabe esperar una alteración en la interacción SLP-76-Vav. La fosforilación de Vav debe depender de mecanismos independientes de la actividad quinasa de ZAP-70 y de la fosforilación de SLP-76.***



#### 4. LA FOSFORILACIÓN INDUCIDA DE Vav ES MAYOR EN LAS CÉLULAS MUTANTES Y SE SOSTIENE EN EL TIEMPO.

Vav no está considerado estrictamente como un sustrato de ZAP-70, pero está ampliamente aceptado que para que se induzca la fosforilación de Vav, tras la estimulación del TCR, se requiere de la quinasa ZAP-70 <sup>89,175</sup>.

Los datos que se obtienen a partir de las inmunoprecipitaciones de LAT y SLP-76 parecen sugerir que el nivel de fosforilación de Vav, tras estimular el TCR $\beta$  mutado, depende de la molécula adaptadora a la que se asocie: cuando Vav se encuentra asociado a LAT, está débilmente fosforilado y lo contrario ocurre cuando está asociado a SLP-76. Con estas premisas se hacía difícil deducir si la fosforilación de la población total de Vav podía verse afectada por el defecto en ZAP-70 de las células mutantes.

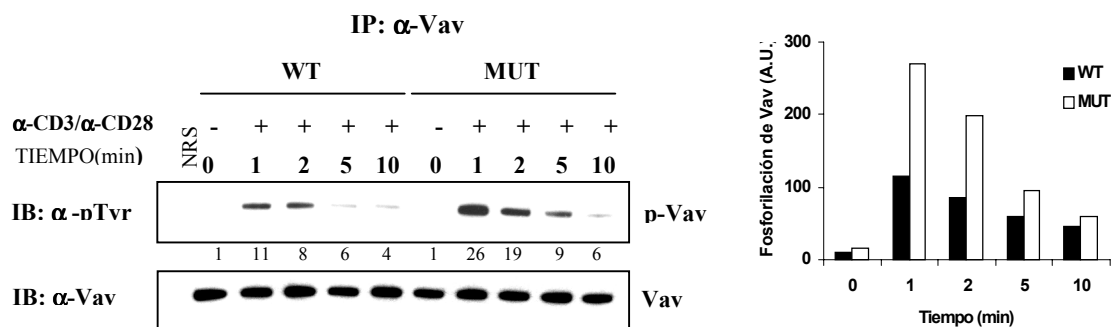


Figura 14. La mutación en la región transmembrana de TCR $\beta$  induce un aumento en la fosforilación total de Vav. Células WT y MUT fueron estimuladas con anticuerpos  $\alpha$ -CD3+  $\alpha$ -CD28 en los tiempos que se indican y lisadas con un tampón que contenía NP-40 1%. Los lisados se sometieron a inmunoprecipitación con anticuerpos anti-Vav y las inmunoprecipitados se resuelven en geles de poliacrilamida-SDS al 10% en condiciones reductoras. Las proteínas se transfirieron a membrana de nitrocelulosa y tras bloqueo, se realizó inmunodetección con un anticuerpo  $\alpha$ -PTyr Posteriormente, se realizó "stripping" de la membrana y se determinó la cantidad de Vav inmunoprecipitada por inmunodetección con anticuerpos específicos anti-Vav. La gráfica de barras respresenta en unidades arbitrarias la fosforilación de Vav normalizada a la cantidad de Vav inmunoprecipitada, en cada tiempo de estimulación.

Para averiguarlo, se realizaron inmunoprecipitaciones con anticuerpos específicos anti-Vav, seguidos por inmunodetección con anticuerpo anti-fosfotirosina y anti-Vav. El revelado con anti-fosfotirosina muestra una cinética de fosforilación de Vav semejante en ambos tipos celulares. Sin embargo, la inducción de la fosforilación de Vav es mucho mayor en las células mutantes y se prolonga más en el tiempo como se

observa en el diagrama de barras que representa (en unidades arbitrarias de densitometría óptica) la fosforilación de Vav relativizada a la cantidad de Vav precipitada en cada punto.

***Estos datos indican que la estimulación del TCR mutado en la cadena  $\beta$ , induce una mayor fosforilación de Vav, que además se prolonga en el tiempo. Este fenómeno no parece depender de la actividad quinasa de ZAP-70 ( igual en ambos tipos celulares) aunque si podría ser consecuencia de la deslocalización de ZAP-70.***

## **DISCUSIÓN**

En este estudio, se ha mostrado que la dualidad funcional de ZAP-70, dependiente de su actividad enzimática por un lado, y de su ubicación en diferentes compartimentos celulares por otro, repercute de forma muy diferente en sus substratos y en moléculas cuya fosforilación depende de ella. Así, en el caso de substratos de localización claramente membranal como LAT, tanto la asociación a ZAP-70 como su fosforilación está disminuida cuando se estimula el TCR $\beta$  mutado. El menor grado de inducción de la fosforilación de LAT, supone a su vez, un defecto en el reclutamiento de otras moléculas claves para mantener la señal, como es el caso de PLC $\gamma$ 1, Vav y SLP-76. Esto supone además, una menor fosforilación de estas moléculas en el entorno de la membrana. Todas ellas parecen tener una función muy importante en el contexto de los Rafts de membrana<sup>(176,177)</sup> y su función, que está relacionada con el reclutamiento y formación de complejos de señalización por medio de dominios SH2 depende en gran medida de su grado de fosforilación en Tyr.

Además la mutación en la región transmembrana también afecta a la localización de LAT en los Rafts lipídicos tras la estimulación del TCR. El bajo nivel de LAT y LAT fosforilado que se encuentra en los Rafts de las células mutantes en TCR $\beta$  estimuladas, podría estar ligado al grado de fosforilación de LAT o a su asociación con otras moléculas que marcasen su entrada o salida de los Rafts. Parece muy poco probable que sea consecuencia de alteraciones en la degradación de LAT, puesto que en la inmunoprecipitación total de LAT no se aprecian diferencias en los niveles totales de LAT entre células mutantes y salvajes. Y tampoco parece derivarse de defectos en la palmitoilación puesto que entonces no podríamos hallarla a nivel basal en los Rafts ni las imágenes de confocal de las células mutantes nos darían un patrón de tinción membranal. Algunos estudios apuntan a que la localización de LAT en los Rafts es dependiente de su nivel de fosforilación y de su ensamblaje con el TCR para servir así de imán para otras moléculas. Curiosamente esta característica no es atribuible a otras moléculas como Lck o GM1<sup>176</sup> y parece cumplirse en nuestro sistema a juzgar por los resultados. Otro aspecto no desdeñable es la posibilidad de que existan Rafts heterogéneos y GM1 no sirva como un buen marcador para su aislamiento. De hecho, recientemente se ha descrito que GM1 se puede encontrar en otras localizaciones en la célula distintas de la membrana y que la estimulación del TCR induce su reclutamiento a esta localización<sup>177</sup>. Puede que LAT se sitúe en las células no estimuladas en los Rafts que contienen GM1 y tras la estimulación y fosforilación de LAT se requiera de la colocalización de LAT y el complejo TCR/CD3- $\zeta$  en estos Rafts para que LAT permanezca. En caso contrario, LAT tendría que ser excluida y pasar a situarse en otro tipo de Rafts, que no contuvieran GM1 u otras localizaciones de la membrana. Los datos que se obtienen a partir de los ensayos

preliminares de microscopía confocal apuntan a que en las células mutantes en las que se induce el patching por estimulación vía TCR, éste no colocaliza con LAT en los “patches” de la misma forma que sucede en las células salvajes. Otra opción, consistiría en atribuir a los Rafts un papel regulador de la señal, secuestrando moléculas adaptadoras. En esta línea, podrían reconsiderarse los resultados e interpretar el bajo nivel de LAT en los Rafts como un secuestro defectuoso de LAT en las células mutantes estimuladas. De este modo se justificaría la sobreactivación de ERK, puesto que al no ser secuestrada LAT permanecería activa por más tiempo SLP-76, en cambio, como substrato citosólico de ZAP-70, no parece requerir del reclutamiento de esta quinasa a la membrana, ni de la fosforilación total de LAT para activarse, puesto que en las células mutantes, la fosforilación de SLP-76 se induce normalmente (Figura 4R). Este hecho, por otra parte, era razonable puesto que la actividad quinasa de ZAP-70 no se ve afectada por la mutación. Puede que la activación de ZAP-70 sea tan rápida que no necesite permanecer asociada mucho tiempo a  $\zeta$  para ser activada<sup>43</sup>. La única alteración reseñable como consecuencia exclusiva de la mayor fosforilación de Vav, es que en las células mutantes, el Vav que se encuentra asociado a SLP-76 está más fosforilado (Figura 4R). Se desconoce la trascendencia de este fenómeno pues si bien se sabe que la asociación Vav-SLP-76 es inducible tras estimulación del TCR y de CD28<sup>178</sup>, se ignora cuál podría ser su función exacta. De hecho, esta interacción no es requerida en la mayoría de las respuestas como inducción de AP-1, NF-AT, IL-2 que precisan del sinergismo de las vías en las que participan las dos moléculas<sup>84</sup>

Por otra parte, aunque no se ha demostrado que ZAP-70 sea la quinasa responsable de fosforilar a Vav, si parece imprescindible para que se realice dicha fosforilación<sup>92</sup> y también parece participar en el transporte de los complejos Grb-2-Vav a la molécula LAT<sup>90</sup>. La mayor fosforilación de Vav en las células mutantes, podría ser consecuencia de la deslocalización de ZAP-70 o de algún defecto en la activación de la quinasa encargada de fosforilar a Vav. Además, aún cuando la fosforilación de Vav total es mayor en las células mutantes, ésta varía dependiendo a la molécula a la que se asocie. Cuando permanece asociada a LAT está pobremente fosforilada y lo contrario sucede cuando se asocia a SLP-76. En este último caso es un fenómeno que no depende de la interacción puesto que la fosforilación de SLP-76 no se altera. El hecho de que Vav se fosfore y sea reclutado de forma distinta a dos moléculas adaptadoras tan importantes como LAT y SLP-76 podría ser indicativo de funciones de Vav diferenciadas según la molécula a la que se reclute y podría suponer además, importantes diferencias en las rutas de señalización.

En cuanto a la repercusión de todos estos defectos en la transducción de señales, se ha demostrado que LAT resulta fundamental para la activación de la vía del  $Ca^{2+}$ , la ruta de Ras/RafK/ERK<sup>71</sup>, pero también se ha relacionado a SLP-76 con estas dos vías<sup>74;80</sup> y con la de NF-kB<sup>179</sup>. Vav resulta importante para la activación de JNK<sup>102</sup>, la

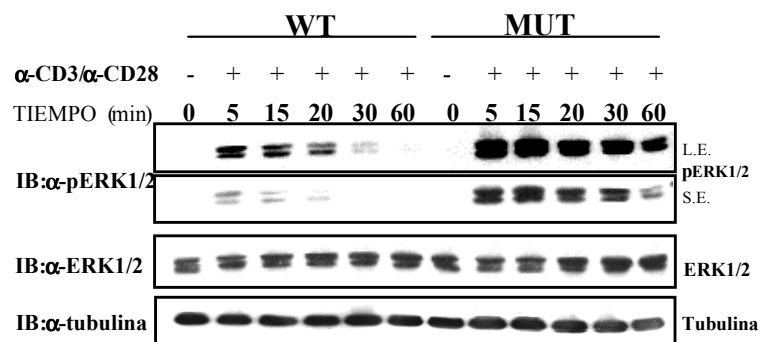
activación de la vía del Ca<sup>2+</sup>, la inducción de NF-κB y de la activación de ERK<sup>85</sup>. La fosforilación de Vav es necesaria también para la translocación de PKCθ a la membrana y su colocación con el TCR en el SMAC <sup>98</sup>. De hecho, experimentos preliminares demuestran que en las células mutantes, PKCθ se transloca en mayor cantidad y permanece más tiempo en la membrana.

Por tanto, a priori se hace imposible predecir como los defectos en los primeros pasos de la señal que se han encontrado van a influir en las rutas de señalización, pero podemos suponer que los datos obtenidos revelaran la importancia no sólo de que se activen las moléculas de señalización sino también de la correcta localización en el momento apropiado. Este aspecto podría explicar la promiscuidad funcional de muchas de estas moléculas.

## ESTUDIO DE LOS FENÓMENOS DE SEÑALIZACIÓN INTERMEDIOS

### 1. LA ESTIMULACIÓN DEL TCR DE LAS CÉLULAS MUTANTES INDUCE UNA SOBRE-ACTIVACIÓN DE LA VÍA Ras/RafK/ERK.

Está ampliamente descrito que las células deficientes en LAT responden débilmente a estímulos a través del TCR/CD3. Una de las rutas más seriamente afectada es la que conduce a la activación de ERK <sup>70</sup>. Por otra parte, a SLP-76 <sup>74;85</sup> y Vav <sup>96;180</sup> se les han atribuido también papeles importantes en la activación de ERK. Por tanto, y ante los diferentes efectos que ejerce la mutación TCR $\beta$  en la inducción de la fosforilación de LAT, SLP-76 y Vav, cabía preguntarse cuales podrian ser las repercusiones sobre la activación de la vía de Ras/Raf/ERK.

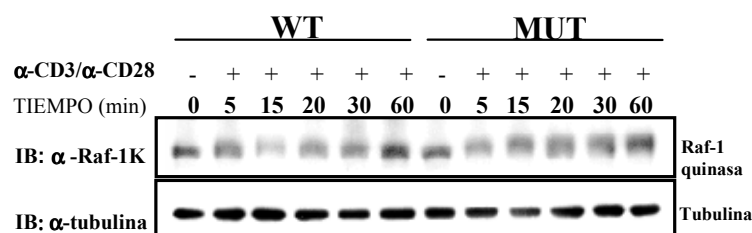


**Figura 15.** Las células mutantes en la región transmembrana de TCR $\beta$  manifiestan una activación mayor y más sostenida de ERK, tras estimulación del TCR. Células WT y MUT se estimularon con  $\alpha$ -CD3+  $\alpha$ -CD28 a los tiempos indicados y lisaron con un tampón que contenía NP-40 1%. Los lisados se sometieron a PAGE-SDS al 10% en condiciones reductoras. Las proteínas se transfirieron a membrana de nitrocelulosa y tras bloqueo, se realizó inmunodetección con anticuerpos  $\alpha$ -fosfoERK1/2 y  $\alpha$ -tubulina (empleado como control de carga). Posteriormente, se realizó "stripping" de la membrana e inmunodetección con un anticuerpo específicos para la identificación de los niveles de ERK1/2. Se muestran exposiciones de la inmunodetección de ERK fosforilada de dos intensidades (indicado por H.E.-alta- y S.E.-baja- en los paneles superiores). Los resultados son representativos de tres experimentos independientes

Para contestar a esta pregunta, en primer lugar se determinó la **actividad de ERK** mediante inmunoblot con anticuerpos que reconocían la forma fosforilada o activa de

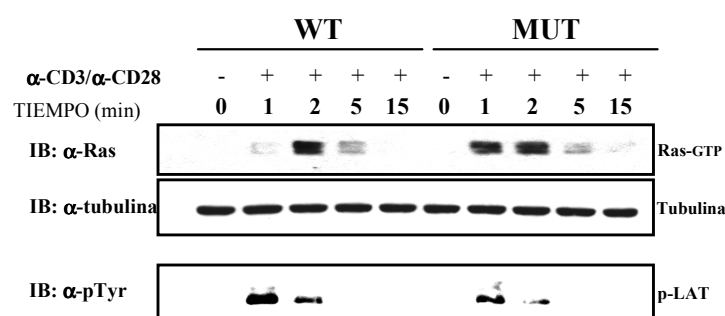
ERK. En la Figura 15 ( panel superior) se aprecia claramente como, en las células mutantes, ERK fué induciblemente más activada que en las células salvajes y además, cómo esta inducción era más sostenida en el tiempo. Así, mientras que en ambos tipos celulares la activación de ERK alcanzaba un máximo a los 5 minutos y en las células mutantes se seguía manteniendo una alta actividad hasta los 60 minutos, en las células salvajes la actividad fue casi indetectable a partir de los 20 minutos. Como se observa en la Figura 15 ( tercer panel), la expresión de ERK1/2 no se vio afectada por la estimulación. Aunque no se muestran, se realizaron los pertinentes controles de activación usando como estímulos PMA o PMA/ionóforo ( datos no mostrados). Ambos estímulos indujeron cinéticas de activación similares en ambos tipos celulares, indicando que la alteración en la actividad de ERK sólo se deriva de la estimulación del TCR $\beta$  mutado.

A continuación, se verificó si esta actividad sostenida de ERK se correlacionaba con alteraciones en la actividad de otros mensajeros “upstream” en la cascada, midiéndose la actividad de **Raf quinasa**. En este caso, los cambios de movilidad electroforética que se correspondían con las formas fosforiladas de la quinasa tras la estimulación, se asumieron como medida de su activación. Como se aprecia en la Figura 16, la inducción de la actividad de RafK en los dos tipos celulares seguía cinéticas semejantes a las descritas para ERK en el clon salvaje y mutante. Rafk comenzó a activarse a los cinco minutos. En el clon salvaje, su actividad decayó aproximadamente a partir de los 30 minutos mientras que en el mutante, la forma activa o fosforilada de RafK permaneció al menos hasta los sesenta minutos en los que seguía existiendo una actividad notable de ERK ( Figura 15).



**Figura 16.** La actividad de RafK es mayor y más sostenida en el tiempo en las células mutantes en el TCR $\beta$  mutado. Para medir la actividad de RafK, alícuotas de los mismos lisados en los que se midió la actividad de ERK ( Figura 15) se sometieron a PAGE-SDS al 8% en condiciones reductoras a partir de una solución de acrilamida:bisacrilamida (26:0.4). Las proteínas se transfirieron a membrana de nitrocelulosa y tras bloqueo, se realizó inmunodetección con anticuerpos  $\alpha$ -Raf1K y  $\alpha$ -tubulina. Esta última se utiliza como control de carga. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

Se estudió también la **actividad de Ras** como primer mensajero de la cascada de activación. Los niveles de la forma activa de Ras o Ras-GTP se midieron por ensayos de precipitación con la proteína de fusión GST-RBD, que contenía el dominio de RafK al que se une Ras-GTP. La perfil de activación de Ras en las células mutantes se correlacionaba con el observado para ERK ( Figura 15). La inmunodetección de la Figura 17 muestra para las células mutantes una actividad significativa de Ras que se mantenía durante los dos primeros minutos después de la estimulación del TCR/CD3 y que todavía fue detectable a los 15 minutos. Sin embargo en las células salvajes, la actividad de Ras fue máxima a los dos minutos de estimulación y desaparecía entre los 5 y 15 minutos de estimulación.



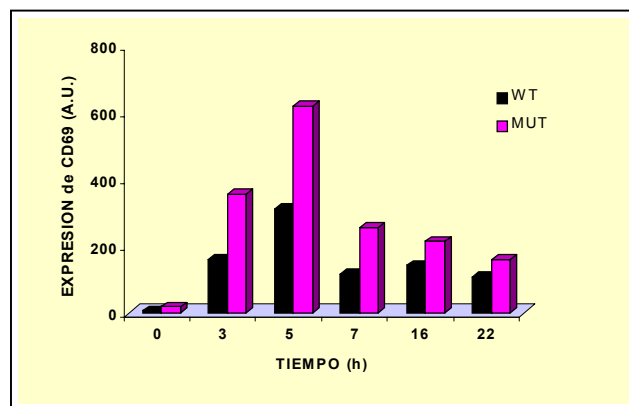
**Figura 17.** La actividad de Ras se induce por más tiempo en las células mutantes. Células WT y MUT se estimularon con  $\alpha$ -CD3+  $\alpha$ -CD28 a los tiempos indicados, se lisaron y de los extractos celulares, una alícuota se separó para el control de carga y el resto se incubó con la proteína de fusión GST-RBD - Sepharose . Las proteínas unidas a las bolas se eluyeron en Tampón de muestra y se sometieron, al igual que las proteínas de las alícuotas separadas, a PAGE-SDS al 12% en condiciones reductoras en geles independientes. Las proteínas se transfirieron a membrana de nitrocelulosa y tras bloqueo, se realizó inmunodetección con anticuerpos  $\alpha$ -Ras, para indentificar la forma activa de Ras ( panel superior),  $\alpha$ -tubulina como control de carga ( panel intermedio) y  $\alpha$ - PTyr para identificar la forma fosforilada de LAT ( panel inferior) . Los resultados son representativos de dos experimentos independientes.

Como control adicional de que la mutación en TCR $\beta$  seguía un patrón opuesto para la activación de Ras y para la inducción de la fosforilación de LAT, se realizó un western blot con anticuerpo anti-fosfotirosina sobre una alícuota de los lisados en los que se efectuó el ensayo de actividad de Ras. En el panel inferior de la Figura 17 se puede apreciar como en las células mutantes la fosforilación inducida de LAT estaba disminuida a pesar de poseer una activación mayor de Ras.

Para confirmar la transcendencia funcional, de la sobre-activación de la vía de Ras/Rafk/ERK y la mayor inducción de la fosforilación de Vav en las células



mutantes, se midió la **expresión en membrana del marcador de activación temprano CD69**. Dicha expresión se considera como una respuesta “down-stream” dependiente de Ras, Rafk y ERK <sup>181,182</sup> y en menor medida también de Vav <sup>96</sup>. Se realizó una cinética de la expresión de CD69 tras estimulación del TCR y coestimulación con CD28 desde 3h a 24h. Como se observa en el diagrama de barras, en las células mutantes se inducía en mayor medida la expresión de CD69, llegándose a igualar con la expresión en las células salvajes a las 24h ( Figura 18). Los mismos resultados se obtuvieron estimulando con  $\alpha$ -CD3 y con SEB y en ausencia de coestimulación.



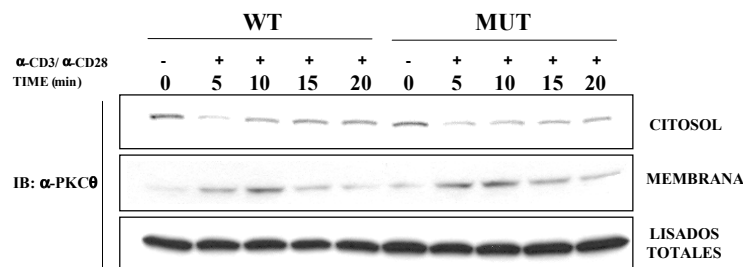
**Figura 18.** Las estimulación de las células mutantes resulta en una mayor expresión de CD69. Células WT y MUT se estimularon con  $\alpha$ -CD3+  $\alpha$ -CD28 durante los tiempos indicados. Se analizó la expresión de CD69 en la membrana por citometría de flujo, tras tinción con un anticuerpo anti-CD69-FITC. El % de expresión de CD69 representa el producto de los valores medios de fluorescencia y el porcentaje de células CD69 positivas. Los resultados son representativos de cuatro experimentos independientes

***En conclusión, la estimulación del TCR $\beta$  mutado en las células mutantes se traduce en una sobreactivación de la vía de Ras/RafK/ERK que funcionalmente se manifiesta a través de una mayor inducción de la expresión de CD69, a pesar del severo defecto en la inducción en la fosforilación de LAT. Estos resultados sugieren que existen formas o vías de señalización independientes de LAT que también contribuyen a la activación de Ras/RafK/ERK y que podrían estar mediadas por otras moléculas de señalización, por ejemplo Vav.***

## **2. PKC $\theta$ PERMANECE MÁS TIEMPO TRANSLOCADA EN LA MEMBRANA DE LAS CÉLULAS MUTANTES.**

Una de las PKCs más importantes en la activación de la célula T es PKC $\theta$ . Recientemente se ha descrito que para su translocación a la membrana,

colocalización con el TCR en el SMAC y activación enzimática se requiere de la fosforilación inducida de Vav, tras la estimulación del TCR. Además, Vav independientemente de la función anterior, puede inducir la expresión de CD69 en una ruta dependiente de PKC $\theta$ <sup>98</sup>. Con estas premisas se decidió estudiar la translocación de PKC $\theta$  con objeto de determinar si se correlacionaba con los resultados obtenidos para la fosforilación de Vav y la expresión de CD69 en las células mutantes. Para ello, células salvajes y mutantes fueron estimuladas con  $\alpha$ -CD3+ $\alpha$ -CD28 y sometidas a subfraccionamiento celular. La comparación de las fracciones de membrana y citosol mostró que PKC $\theta$  empezaba a translocarse desde los 5 minutos de estimulación. Sin embargo, en las células mutantes PKC $\theta$  permanecía translocada en la membrana por más tiempo que en las células salvajes, siendo apreciable su nivel incluso a los 20 minutos.



**Figura 19.** PKC $\theta$  permanece translocada en la membrana de las células mutantes estimuladas por más tiempo que en las células salvajes. Células WT y MUT se estimularon con  $\alpha$ -CD3+  $\alpha$ -CD28 durante los tiempos indicados. Las fracciones citosólicas y de membrana se obtuvieron por subfraccionamiento celular como se indica en Materiales y Métodos. Alícuotas equivalentes de cada fracción y de extractos celulares totales se sometieron a PAGE-SDS 10% en condiciones reductoras y en geles independientes. Las proteínas se transfirieron a membrana de nitrocelulosa y tras bloqueo, se realizó inmunodetección con un anticuerpo  $\alpha$ - PKC $\theta$ . Los niveles de PKC $\theta$  en los lisados totales sirvieron como control de carga. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

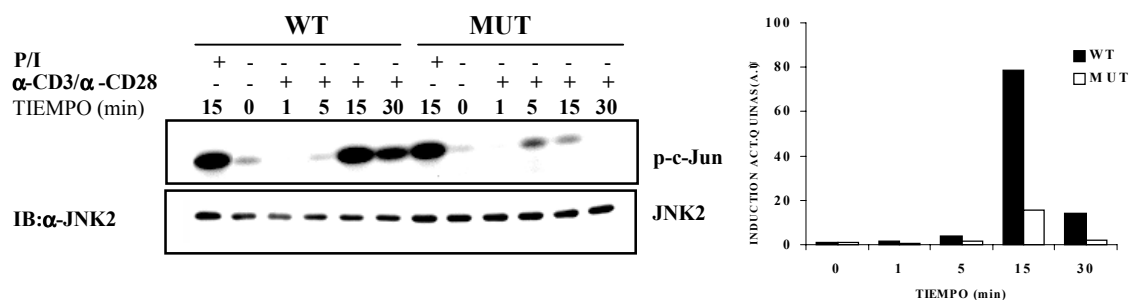
**Por tanto, los resultados sugieren que:**

- **PKC $\theta$  permanece más tiempo translocada en la membrana de las células mutantes estimuladas.**
- **La translocación mantenida de PKC $\theta$  podría ser consecuencia de la mayor y más sostenida fosforilación de Vav en las células estimuladas a través de su TCR mutado.**

- *La mayor fosforilación inducida de Vav y la translocación mantenida de PKC $\theta$  podrían estar implicadas en la expresión aumentada de CD69 en las células mutantes estimuladas.*

### 3. LAS ACTIVIDADES DE JNK Y p38MAPK ESTÁN NOTABLEMENTE REDUCIDAS EN LAS CÉLULAS MUTANTES.

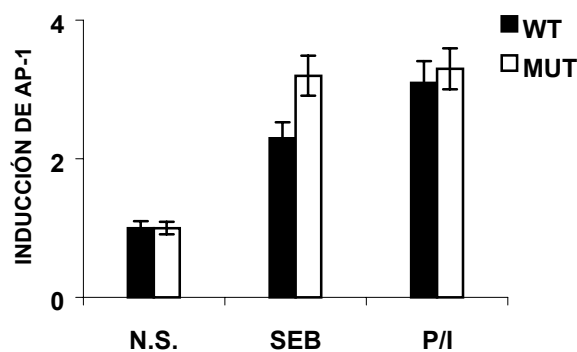
Con el propósito de estudiar si la mutación, vía alguna de las moléculas adaptadoras cuya fosforilación estaba alterada (LAT o Vav), repercutía en la correcta activación de JNK, se efectuaron ensayos quinasa en fase sólida o de “pull-down” con el sustrato GST-Jun-Sepharose para medir la actividad de la quinasa. Comparando células salvajes y mutantes coestimuladas se observó como la actividad de JNK en las células salvajes alcanzaba un máximo a los 15 minutos y se mantenía a un nivel alto hasta los 30 minutos. Sin embargo en las células mutantes, la activación de JNK se inducía débilmente en todos los tiempos del ensayo (Figura 20). Estas medidas se efectuaron también en ausencia de coestimulación y los resultados fueron semejantes como ya se ha descrito <sup>100, 1</sup> aunque la activación era mucho más débil.



**Figura 20. La actividad de JNK está seriamente disminuida en las células mutantes.** Células WT y MUT se estimularon con  $\alpha$ -CD3+  $\alpha$ -CD28 durante los tiempos indicados, se lisaron e incubaron con el sustrato GST-Jun. Sobre los precipitados se realizó un ensayo quinasa (vease Materiales y Métodos. Los valores de densitometría correspondientes a c-Jun fosforilado se relativizaron a los del control de carga (JNK2) se ilustran en la gráfica en términos de inducción de la actividad quinasa de JNK.. El ensayo es representativo de cuatro experimentos independientes.

Como se observa en la Figura 20, la actividad de JNK en respuesta a PMA/Ionóforo fue similar en ambos tipos celulares, lo cual indica que la actividad quinasa no se encontraba alterada a nivel basal en las células mutantes y que el defecto sólo era consecuencia de la estimulación del TCR mutado.

ERK y JNK sinergizan para inducir la expresión y **activación del factor de transcripción AP-1**. Para medir la inducción de AP-1 se transfectaron células salvajes y mutantes con un reportero de luciferasa que contenía sitios AP-1 procedentes del promotor de la colagenasa y se estimularon con PMA y ionóforo y con anti-CD3 o SEB sólo o en combinación con CD28. Como se observa en la Figura 21, la inducción de AP-1 era ligeramente mayor en las células mutantes cuando resultaban estimuladas via su TCR e igual a la inducción de AP-1 de las células salvajes cuando se utilizaba como estímulo PMA/Ionóforo.



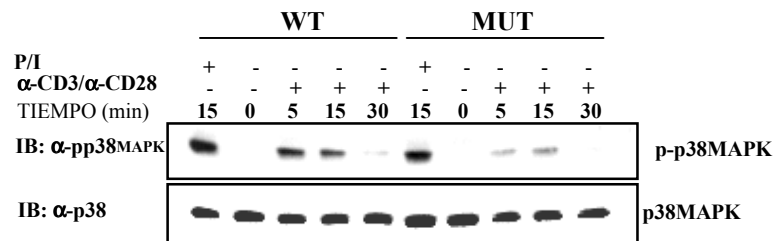
**Figura 21. Inducción de AP-1.** Células WT y MUT se transfectaron con el reportero AP-1luc (+73Col). Las células no estimuladas (N.S.) o estimuladas con SEB/CD28 y PMA/Ion durante 8h, se lisaron y se midió la actividad de luciferasa. Los valores se relativizaron según la eficacia de la transfección que proporciona un reportero de Renilla cotransfectado y se muestran en la gráfica normalizadas al nivel basal. Los datos son representativos de tres experimentos independientes con muestras triplicadas. SD se indica en cada punto a través de las barras de error.

Habida cuenta de que p38 es otra de las MAPK que resulta de forma importante activada mediante estimulación del TCR, se evaluó la posibilidad de que en las células mutantes la **activación de p38MAPK** estuviera alterada. La actividad de p38 se midió sobre extractos celulares de células salvajes y mutantes coestimuladas con  $\alpha$ -CD3/ $\alpha$ -CD28, seguido de inmunodetección con anticuerpos que reconocían la forma activa fosforilada de p38MAPK.

Como se ilustra en la Figura 22 y al igual que sucedía con la actividad de JNK, las células mutantes mostraban un defecto en la actividad de p38MAPK cuando eran estimuladas a través de su TCR. Este defecto se manifestaba cuando se utilizaba como estimulador PMA /Ionóforo.

***Estos resultados indican que la mutación en la región transmembrana del TCR $\beta$  afecta diferencialmente a las MAPKs, provocando un defecto en la activación de JNK y p38MAPK opuesto a la sobre-activación de ERK. Sin***

*embargo, las alteraciones en la activación de las MAPKs no llegan a influir gravemente a nivel transcripcional ya que la inducción de AP-1 en las células mutantes sólo es ligeramente superior a la de las células salvajes.*



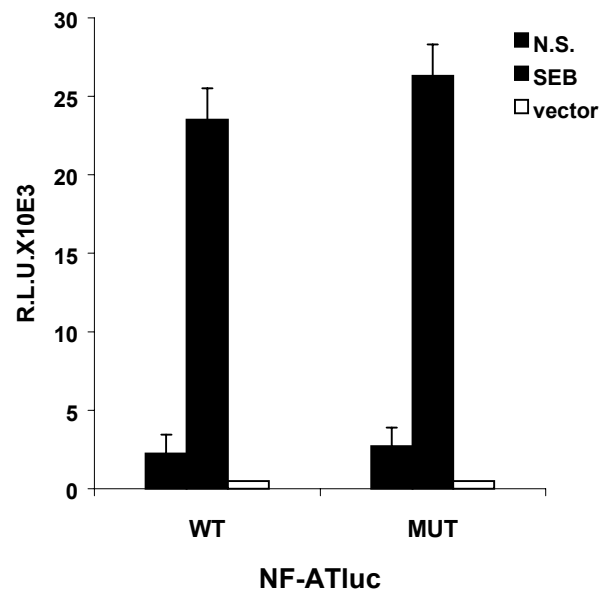
**Figura 22.** La actividad de p38MAPK está disminuida en las células mutantes. Células WT y MUT se estimularon con  $\alpha$ -CD3+  $\alpha$ -CD28 a los tiempos indicados y lisaron con un tampón que contenía NP-40 1%. Los lisados se sometieron a PAGE-SDS al 10% en condiciones reductoras. Las proteínas se transfirieron a membrana de nitrocelulosa y tras bloqueo, se realizó inmunodetección con anticuerpos  $\alpha$ -fosfop38MAPK. Posteriormente, se realizó "stripping" de la membrana e inmunodetección con un anticuerpos específicos para la identificación de los niveles de p38. El ensayo es representativo de tres experimentos independientes.

#### 4. ESTUDIO DE LA INDUCCIÓN DE NF-AT COMO EFECTOR DE LA VÍA DEL $\text{Ca}^{2+}$

En trabajos anteriores se había observado que, la liberación del calcio intracelular en las células salvajes y mutantes era similar <sup>43</sup>. Por otro lado, en extractos celulares totales la fosforilación en tirosina de PLC $\gamma$ 1, fenómeno previo y necesario para su activación tampoco habían mostrado diferencia alguna entre ambos tipos celulares. Con el propósito de evaluar si la aparente normalidad de la activación de la vía del  $\text{Ca}^{2+}$  en las células mutantes se traducían en una similitud funcional de la vía, se estudió a nivel transcripcional la eficiencia en la inducción de NF-AT. Para ello, células mutantes y salvajes fueron transfectadas con reporteros de luciferasa que contenían un promotor con sitios consenso para NF-AT. Como se aprecia en la Figura 23, no existía diferencia significativa en la inducción de NF-AT entre las células salvajes y mutantes tanto si se estimulaba con PMA/ionóforo (datos no mostrados) como a través del TCR.

*Por tanto, los datos sugieren que la mutación en la región transmembrana de TCR $\beta$  no afecta a la vía de transducción de señales del  $\text{Ca}^{2+}$  a pesar de que,*

*como ya se ha comentado antes, PLC $\gamma$ 1 fosforilada se asocia débilmente a LAT en las células mutantes.*



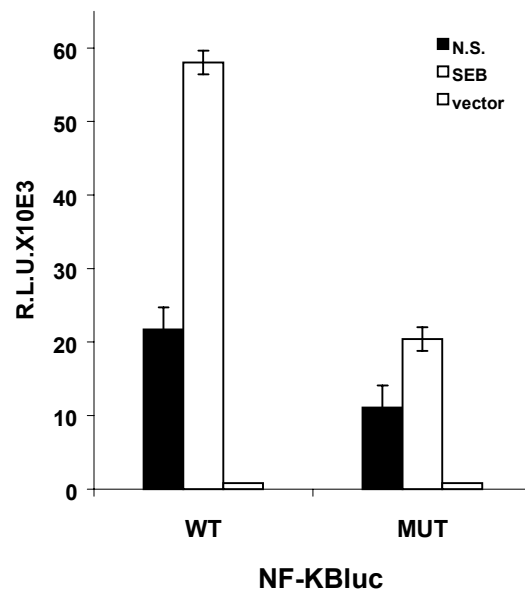
**Figura 23.** La inducción de NF-AT es igual en células salvajes y mutantes. Células WT y MUT se transfectaron con el reportero NF-AT-luc o con el correspondiente vector vacío (denominado vector en la figura). Las células transfectadas no estimuladas (N.S.) o estimuladas con SEB o PMA/Ion durante 5h, se lisaron y se midió la actividad luciferasa. Los valores se relativizaron según la eficacia de la transfección que proporciona un reportero de Renilla cotransfectado y se muestran en la gráfica normalizadas al nivel basal. Los datos son representativos de tres experimentos independientes con muestras triplicadas. La SD se indica en cada punto a través de las barras de error.

## 5. ESTUDIO DE LA RUTA DE ACTIVACIÓN DE NF-KB

A pesar de los muchos estudios que se han dedicado a caracterizar los diferentes intermediarios de la vía de inducción de NF- $\kappa$ B todavía se desconocen cuáles son los primeros mensajeros. A priori, pues, ninguno de los defectos que ocasiona la estimulación del TCR mutado, permitían hacerse una idea de los efectos que podría tener en la inducción de este factor de transcripción.

De forma análoga a los ensayos para NF-AT, se transfectaron células mutantes y salvajes con reporteros de luciferasa que contenían sitios consenso de unión para NF- $\kappa$ B. No se observaron diferencias celulares en la inducción de NF- $\kappa$ B entre ambos tipos celulares cuando se empleaba como estímulo PMA/Ionóforo (datos no

mostrados), sin embargo y como se aprecia en la Figura 24 existía una notable deficiencia en la inducción de NF- $\kappa$ B tras la estimulación del TCR en las células mutantes .

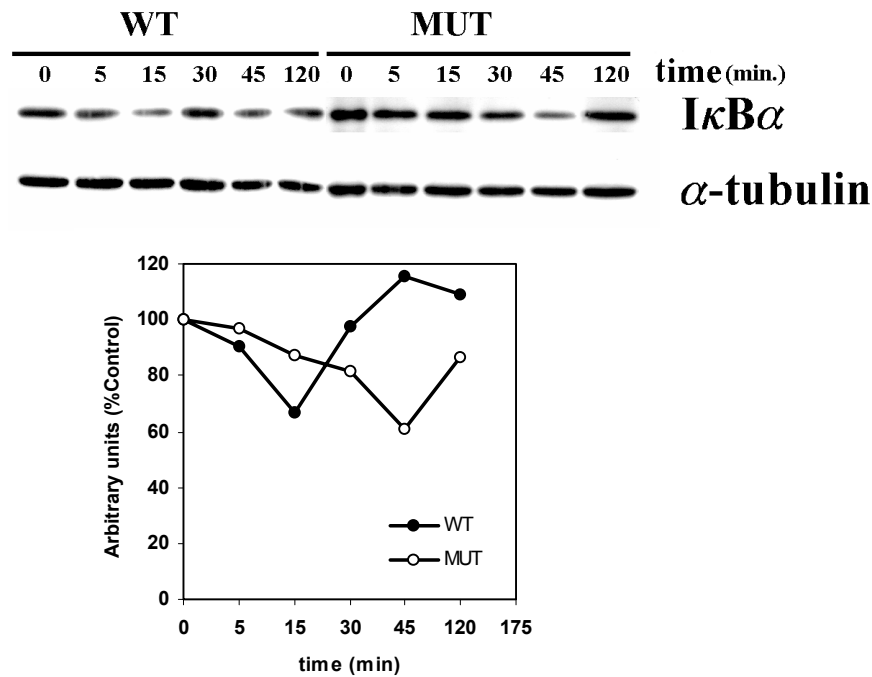


**Figura 24.** NF- $\kappa$ B se induce pobremente en las células mutadas en la región transmembrana de TCR $\beta$ .

Células WT y MUT se transfectaron con el reportero NF- $\kappa$ Bluc o con el correspondiente vector vacío (denominado vector en la figura). Las células transfectadas no estimuladas (N.S.) o estimuladas con SEB o PMA/Ion durante 5h, se lisaron y se midió la actividad luciferasa. Los valores se relativizaron según la eficacia de la transfección que proporciona un reportero de Renilla cotransfectado y se muestran en la gráfica normalizadas al nivel basal. Los datos son representativos de tres experimentos independientes con muestras triplicadas. La SD se indica en cada punto a través de las barras de error.

Continuando en la cascada enzimática, el intermediario inmediatamente “upstream” de NF- $\kappa$ B es la molécula I $\kappa$ B $\alpha$ . Para correlacionar la deficiencia en la inducción de NF- $\kappa$ B con I $\kappa$ B $\alpha$ , se midió la degradación de este último por inmunodetección con un anticuerpo específico frente a I $\kappa$ B $\alpha$ , sobre lisados totales de células salvajes y mutantes estimuladas (Figura 25). Los datos se evaluaron por densitometría y se normalizaron al control de carga que proporciona la inmunodetección con un anticuerpo  $\alpha$ -tubulina.

En la Figura 25 se observa cómo la máxima degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  en el mutante sucedía a los 45 minutos mientras que en el WT ocurría mucho antes, a los 15 minutos. Es decir, el clon mutante mostraba una cinética de degradación bastante retrasada lo cual podría justificar una menor inducción de NF- $\kappa$ B.



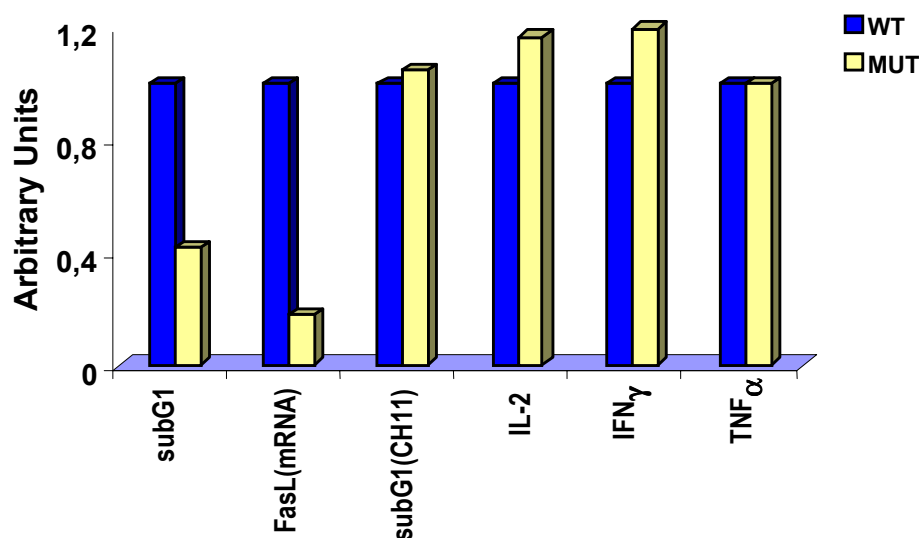
**Figura 25.** La degradación de IκBα está retrasada en las células mutantes.  $5 \times 10^6$  células son estimuladas en los distintos tiempos con SEB. Las células se lisan y  $10 \mu\text{g}$  de extractos citosólicos se someten a western blot e inmunodetección con anticuerpos específicos frente a IκBα y tubulina. La gráfica representa los valores densitométricos de los niveles de IκBα en cada punto relativizados a su control de carga y referidos al nivel de las muestras no estimuladas. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

***En conclusión, la ruta de inducción de NF-κB se ve afectada por la mutación de TCRβ cuando las células mutantes son estimuladas a través de su TCR. Los datos sugieren que el defecto puede derivarse de una cinética retrasada de degradación de IκBα, la cual impediría el acceso de NF-κB al núcleo en el tiempo concreto en que se produce translocación en las células salvajes estimuladas. Esta demora podría tener consecuencias en la regulación transcripcional de algún gen.***



## ESTUDIO DE LAS FUNCIONES EFECTORAS

Con objeto de conocer si la mutación en el dominio transmembrana de TCR $\beta$  producía una alteración significativa de las funciones propias del linfocito desencadenadas por estimulación del TCR, se estudió la secreción de citoquinas fundamentales ( IL-2,IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$ ) y su relación con la inducción de apoptosis. La mayoría de las medidas de secreción de citoquinas se realizan mediante el uso combinado de estímulos del TCR y PMA, fundamentalmente porque se considera que intensifican las señales que proceden del TCR. Aunque en los ensayos anteriores se habían efectuado medidas de secreción de IL-2 con este tipo de estímulo y no se habían encontrado diferencias, cabía la posibilidad de que el PMA, al ser un potente activador de PKC, pudiese estar enmascarando la señal propia del TCR o que discurriese por rutas diferentes. Por esta razón, en todas las medidas se decidió emplear como estímulos SEB o anti-CD3 para valorar la contribución pura del TCR.

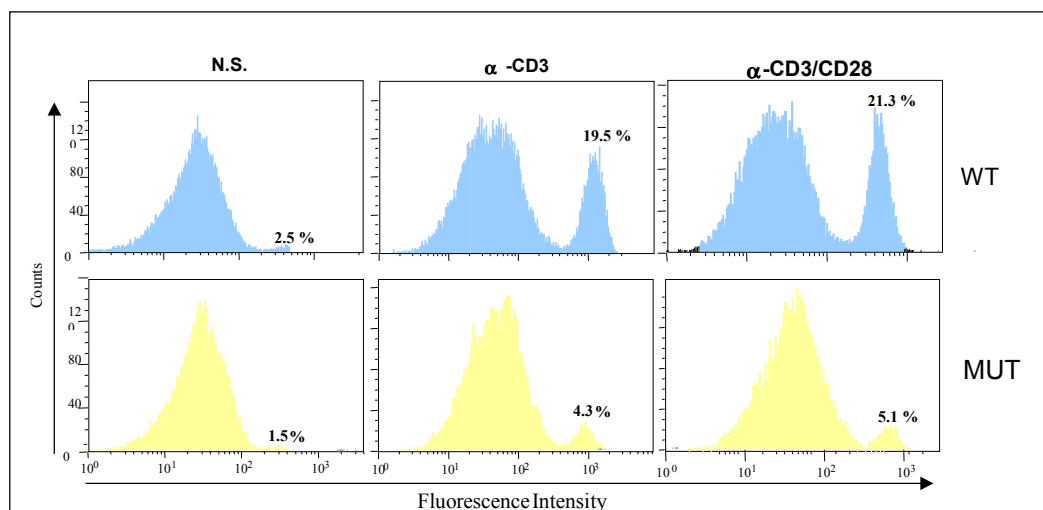


**Figura 26.** La secreción de citoquinas no está afectada por la mutación en la región transmembrana de TCR $\beta$  a pesar del defecto en la inducción de la expresión de FasL. Células WT y MUT se estimularon con SEBo con el anticuerpo anti-Fas CH11. El % de células con cantidades de ADN sub-G1 se cuantificaron por citometría de flujo después de teñir las células con yoduro de propidio. La secreción de IL-2, IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  se midió por ELISA en los sobrenadantes de las células estimuladas durante 48h. La expresión del mRNA de FasL en células estimuladas durante 3h se determinó por Northern Blot y se cuantificó por densitometría. Los valores se expresan en unidades arbitrarias como resultado de la normalización de los valores del WT a 1.

A fin de simplificar y facilitar la comparación de los resultados, se han representado conjuntamente los datos de secreción de citoquinas y la apoptosis.

Cómo se puede observar en la Figura 26, las células mutantes secretaban niveles de IL-2, IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  comparables a los secretados por las células salvajes, a pesar de mostrarse resistentes a apoptosis. De hecho, las células mutantes eran deficientes en la expresión inducida de FasL (ligando de Fas) aunque su maquinaria apoptótica se mantuviera intacta por estimulación directa con el anticuerpo anti-Fas, CH11.

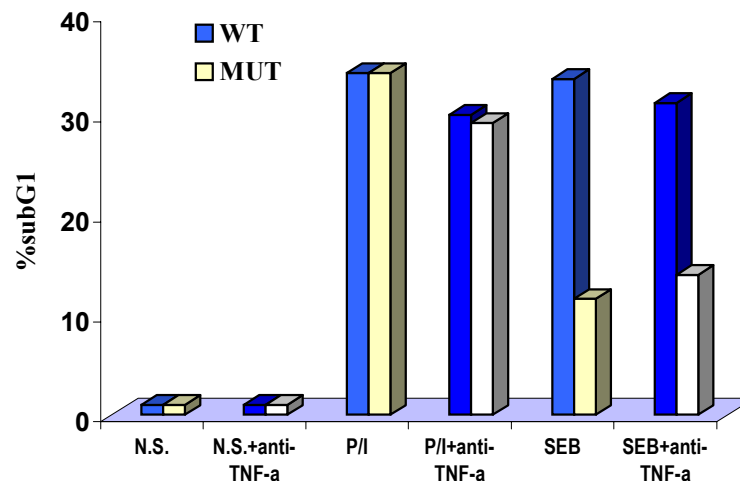
Por otro lado, para comprobar que la resistencia a apoptosis en las células mutantes se mantenía en condiciones de coestimulación, células salvajes y mutantes fueron estimuladas por una combinación de SEB+ $\alpha$ -CD28 durante 48h y se evaluó por citometría de flujo la apoptosis inducida en ambos tipos celulares. En la Figura 27 se observa que en nuestro sistema, la coestimulación no alteraba las diferencias apoptóticas que existen entre las células salvajes y mutantes.



**Figura 27.** Las diferencias en la inducción de apoptosis entre células salvajes y mutantes no varían en condiciones de coestimulación con CD28. Células WT y MUT se estimularon con medio sólo (N.S.), SEB o SEB +  $\alpha$ -CD28. Tras 16h se recogieron y se analizó por citometría de flujo el porcentaje de células anexina-V positivas, como se indica en Materiales y Métodos. Experimento representativo de tres ensayos independientes.

El hecho de que las células de ratones deficientes en Fas o FasL sigan manifestando un nivel apreciable de apoptosis inducida via TCR debido a la secreción de TNF $\alpha$ <sup>183</sup>, dejaba abierta la posibilidad de que el nivel residual de apoptosis de las células mutantes fuera debido a la secreción de TNF alpha. Para evaluar la posible

contribución de  $\text{TNF}\alpha$  en la inducción de apoptosis de células salvajes y mutantes se realizaron ensayos de apoptosis, estimulando con PMA/ Ionóforo y SEB durante 48h, en presencia y ausencia de anticuerpos bloqueantes de  $\text{TNF}\alpha$ . Los datos representados en la Figura 28 sugieren que el bloqueo del  $\text{TNF}\alpha$  no reduce la apoptosis, ni varía las diferencias apoptóticas entre ambos tipos celulares.



**Figura 28.** El  $\text{TNF}\alpha$  no contribuye al fenómeno apoptótico. Células WT y MUT se incubaron durante 48h con PMA /Ionóforo o con SEB (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), en presencia o ausencia del anticuerpo B13.2  $\alpha\text{-TNF}\alpha$  (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (173). Posteriormente, se midió la degradación del DNA por tinción con ioduro de propidio. En el eje de ordenadas se representa el % de células con DNA en subG1.

***En conclusión, estos datos sugieren que la región transmembrana de la cadena  $\beta$  del TCR está implicada en la activación del linfocito hacia respuestas específicas puesto que es requerida para la apoptosis mediada por la inducción de FasL pero no para la secreción de citoquinas como la IL-2, IFN $\gamma$  o el TNF $\alpha$ . Además, esta resistencia a apoptosis parece ser independiente de la señal coestimuladora de CD28 y se debe exclusivamente al defecto en la expresión de FasL.***

## **DISCUSIÓN**

Tras el estudio de las rutas de transducción de la señal que tras estimulación del TCR/CD3, son más importantes para que tenga lugar la activación del linfocito T, los datos sugieren que, El dominio transmembrana de TCR $\beta$  parece influir en la inducción de NF- $\kappa$ B y singularmente en la activación de ERK, JNK y p38MAPK pero no, en la vía del Ca<sup>2+</sup>. Así:

Se ha descrito que en las células deficientes en LAT no se producen aumentos inducibles del calcio intracelular, posiblemente debido a que PLC $\gamma$ 1 no se asocia con LAT fosforilada <sup>71</sup>. Sin embargo y a pesar de que, tras la estimulación del TCR, en las células mutantes existe menos fosfo-PLC $\gamma$ 1 asociada a LAT, no se han encontrado diferencias en la activación de la vía del Ca<sup>2+</sup>. Las células mutantes estimuladas se comportan como las salvajes en términos de movilización de Ca<sup>2+</sup> intracelular, fosforilación de PLC $\gamma$ 1 <sup>43</sup> e inducción del factor de transcripción NF-AT. Existe la posibilidad de que de algún modo, SLP-76, cuya fosforilación es normal y que también resulta importante para la inducción de NF-AT <sup>184,185</sup> compense el defecto de LAT. Otra alternativa es que, el umbral de activación de esta vía no requiera de una fosforilación total de PLC $\gamma$ 1 y LAT de modo que baste la que se induce en las células mutantes. Tampoco se puede descartar la potencial implicación de Vav en la vía del Ca<sup>2+</sup>, la cual resulta bloqueada en los ratones deficientes en Vav <sup>85</sup> y que podría estar compensando el defecto de LAT.

Además, tras la estimulación del TCR, la inducción de NF- $\kappa$ B es deficiente en las células mutantes. Este defecto parece tener relación con una degradación retrasada en el tiempo de I $\kappa$ B $\alpha$  con respecto a una cinética normal de degradación en las células salvajes. Supuestamente, esto conduciría a una translocación tardía de NF- $\kappa$ B al núcleo celular. Las medidas de inducción de NF- $\kappa$ B son débiles, en parte porque el estímulo vía TCR es débil y en parte, porque se han medido a cinco horas con el fin de poderlas correlacionar con la expresión de FasL temprana. No desterramos pues, la posibilidad de que a tiempos más largos la inducción de NF- $\kappa$ B entre células salvajes y mutantes se iguale. Si esto fuera así, y dando valor a la idea de que uno de los elementos importantes en la regulación transcripcional es la coincidencia en el tiempo de determinados factores de transcripción <sup>186</sup>, el hecho de que en las células mutantes la deficiencia en NF- $\kappa$ B pueda afectar al defecto en FasL, pero no influya en la secreción normal de IL-2, podría atribuirse a una activación del promotor de FasL que se produce en un tiempo más temprano que la de IL-2, en el que existe un defecto en los niveles de NF- $\kappa$ B en el núcleo. Alternativamente, los umbrales de activación y niveles de factores de transcripción en el núcleo pudieran ser menos limitantes para la secreción de IL-2 que para FasL, de forma que los niveles de activación inducidos en

las células mutantes fueran suficientes para activar la secreción de IL-2 pero no para la expresión de FasL.

Desafortunadamente, no está muy claro cuales son los intermediarios que en los primeros pasos de la señal contribuyen a la activación de la ruta de NF- $\kappa$ B tras la estimulación del TCR. Se ha descrito que los ratones deficientes en Vav muestran un bloqueo en la inducción de NF- $\kappa$ B<sup>85</sup> y también que ZAP-70 y SLP-76 participan en dicha inducción puesto que en las células deficientes en cada una de las moléculas no se induce NF- $\kappa$ B ni la asociación Vav-SLP-76<sup>179</sup>. A partir de nuestros resultados, la única justificación razonable se adscribiría a la pobre asociación de fosfo-Vav-LAT en la inducción de NF- $\kappa$ B. La posibilidad de que este complejo participe en la inducción de NF- $\kappa$ B, adquiere más valor si consideramos que: (1) ya se han relacionado a estos complejos con la activación de Rac  $\rightarrow$  MEKK-1  $\rightarrow$  JNK<sup>103</sup>; y que MEKK-1 está involucrado también en la activación del complejo IKK<sup>116;187</sup> y (2) en las células mutantes estimuladas, la vía MEKK-1  $\rightarrow$  JNK también está bloqueada puesto que la activación de JNK es deficiente. Sin embargo no hay constancia de que LAT esté relacionada con esta ruta de NF- $\kappa$ B. Otro candidato al que se le ha relacionado con la inducción de NF- $\kappa$ B es PKC $\theta$ , cuya activación está relacionada con la fosforilación de Vav<sup>98</sup> y recientemente con SLP-76 y ZAP-70<sup>179</sup>. Dado que PKC $\theta$  permanece por más tiempo translocada en la membrana de las células mutantes, o bien PKC $\theta$  no es relevante, frente a otros factores, en la inducción de NF- $\kappa$ B, o bien, el permanecer más tiempo en la membrana favorecería que un intermediario de la ruta de NF- $\kappa$ B que requiriese de la presencia de PKC $\theta$  en el citosol, se activara de forma retrasada y explicara así, una inducción también retrasada de NF- $\kappa$ B.

La activación de las MAPKs está alterada diferencialmente en las células mutantes en el dominio transmembrana TCR $\beta$ : mientras que ERK se activa más y permanece más activa en el tiempo, las activaciones de JNK y p38MAPK están disminuidas. La actividad sostenida de ERK correlaciona con las actividades de sus intermediarios anteriores en la vía, RafK y Ras. Incluso la sobreactivación de la vía está de acuerdo con los datos de la inducción de la expresión de CD69 que es una respuesta efectora dependiente de Ras, Rafk y ERK<sup>182,181</sup>. Diversos estudios han demostrado que para la activación de la vía de Ras es imprescindible la participación de LAT y de las moléculas que recluta<sup>71</sup>. Sin embargo, las células mutantes inducen deficientemente la fosforilación de LAT, así como el reclutamiento de PLC $\gamma$ 1 y SLP-76, ambas moléculas también involucradas en la activación de ERK<sup>74</sup>. Hay constancia de que deben existir formas de activar a Ras independientes de los complejos Grb-2-Sos que son reclutados a la membrana por LAT<sup>71</sup> puesto que en las células deficientes en SLP-76, la activación de ERK está bloqueada aunque la función de LAT esté intacta<sup>74</sup>. En el caso de las células mutantes, SLP-76 no podría explicar la sobreactivación de la

ruta de Ras, porque no existen diferencias en su fosforilación, pero podría ocurrir que otra molécula que interaccionase con SLP-76, y estuviera funcionalmente alterada fuese la responsable. Este podría ser el caso de Vav, que en las células mutantes está más fosforilada, incluso cuando interacciona con SLP-76, aunque para ello, habría que invocar la participación de otra molécula adaptadora diferente de LAT para reclutar Vav a la membrana ( por ejemplo TRIM<sup>188</sup>). Además, la cinética de fosforilación de Vav en las células mutantes correlaciona bastante bien con la de activación de Ras y con el patrón de inducción de la expresión de CD69. Esto estaría de acuerdo con la demostración reciente de la importancia de la participación de Vav en la activación de ERK y en la inducción de CD69, en una ruta independiente de Rac<sup>96</sup>. Otro intermediario diferente de SLP-76, que en su relación con Vav podría ajustarse a este modelo, es nuevamente PKC $\theta$ . La activación de esta PKC es capaz de sinergizar con Vav para inducir la expresión de CD69 y su propia translocación a la membrana es dependiente de Vav ( <sup>98</sup> También se ha sugerido que podría estar involucrada en la activación de AP-1 dependiente de Ras<sup>129</sup>. De hecho, los experimentos de subfraccionamiento celular muestran que PKC $\theta$  se localiza por más tiempo en la membrana de las células mutantes en TCR $\beta$  estimuladas que de las salvajes estimuladas confirmando que podría ser uno de los intermediarios que participasen en la sobreactivación de la vía de Ras/Rafk/ERK/CD69.

Todo lo contrario sucede con las activaciones de JNK y p38MAPK que están seriamente deprimidas en las células mutantes en el dominio transmembrana de TCR $\beta$ . Diversos trabajos han relacionado a Vav con la activación de ambas **quinásas**<sup>189,103,102</sup>. En concreto para p38MAPK se ha descrito recientemente que su activación via Rac, es dependiente del complejo ZAP-70-LAT-Vav<sup>189</sup>. De acuerdo con esto, la baja fosfo-Vav asociada a LAT en las células mutantes podría explicar la pobre activación de p38MAPK. La misma explicación podría corresponder a JNK, teniendo en cuenta que su activación depende también de Vav y de Rac<sup>103,102</sup>.

De acuerdo con nuestros datos, podría pensarse que una dualidad funcional de Vav dependiendo de los linkers que la recluten disecionando vías de señalización. De esta forma, la menor fosforilación del Vav asociado a LAT en la membrana podría explicar los déficits de activación de JNK y p38MAPK y al contrario, la mayor fosforilación de Vav asociado a SLP-76, o a otras moléculas que promueven la reorganización del citoesqueleto y posterior activación de PKC $\theta$ , podría justificar la sobre-activación de la ruta de Ras/RafK/ERK.

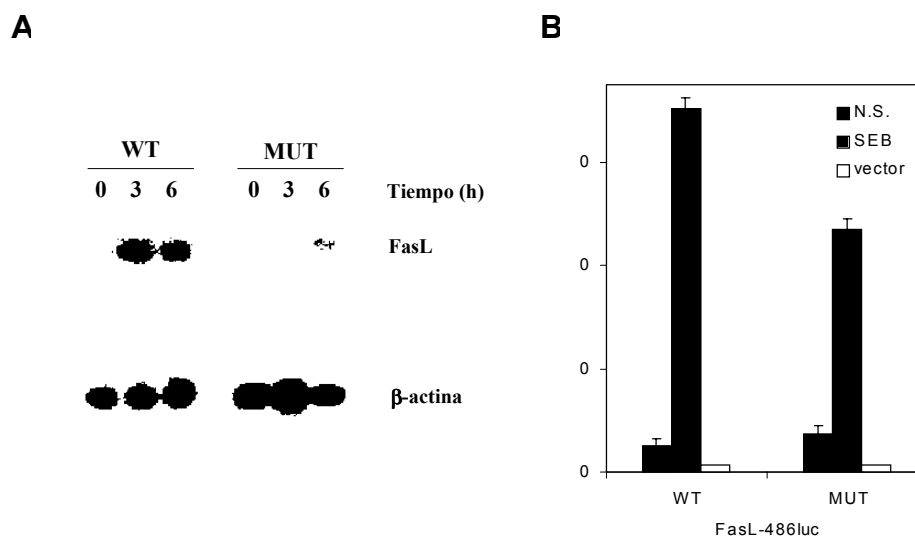
Quedaría por considerar la posible interacción que existe entre las tres vías de MAPKs. Así, se ha descrito que MEKK1 puede actuar sobre la ruta de ERK (<sup>190</sup> y que ERK es capaz de activar a c-Jun<sup>191</sup>. Por esta razón, cabría la posibilidad de que en el caso de que MEKK1 mantuviera intacta su actividad en las células mutantes, pudiera contribuir a la activación de ERK, al no poder dedicarse su actividad íntegramente a la

activación de JNK. Sin embargo, esto es poco probable ya que la sobre-activación de la vía se manifiesta ya a nivel de la actividad de Ras, luego parece tener su origen en los pasos tempranos de la señal. Por el mismo motivo, también desechamos la posibilidad de un fallo en la activación de las fosfatasa encargadas de inactivar a ERK.

Por último, a nivel funcional, parece que el defecto en la activación de JNK no pueda ser compensado por la sobreactivación de ERK. Teniendo en cuenta que los niveles de Jun en la célula son siempre mayores que los de c-Fos<sup>101</sup> es razonable pensar que el nivel de c-Fos, o lo que es lo mismo la actividad de ERK, es la condición limitante a la hora de posibilitar la formación del heterodímero AP-1. Ahora bien, como la actividad del mismo viene condicionada exclusivamente por la actividad de JNK y FRK, el detrimento en la actividad de JNK en las células MUT debe influir para que la sobre-activación de ERK no afecte de forma tan acusada como cabría esperar a la inducción de AP-1.

## ESTUDIO DE LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE FasL EN LA MUERTE CELULAR INDUCIDA POR ACTIVACIÓN DEL COMPLEJO TCR/CD3

De todas las respuestas linfocitarias estudiadas, la mutación en la región transmembrana de TCR $\beta$  sólo parece estar afectando a la apoptosis. Dado que esta alteración se materializa debido al déficit en la expresión de FasL en las células mutantes estimuladas a través del TCR <sup>42</sup>, era razonable que se abordaran algunos aspectos de la regulación transcripcional de FasL inducida via estimulación del TCR, a fin de poder explicar dicho defecto.



**Figura 29.** El promotor de FasL se induce pobremente en las células resistentes a apoptosis. (A) Células WT y MUT se estimularon con SEB durante los tiempos indicados. Tras aislar el RNA total, se realizó RT-PCR con dos oligonucleótidos específicos de FasL. Como control de carga, cada PCR incluía un par de oligonucleótidos para una secuencia del gen de  $\beta$ -actina. Los productos amplificados se sometieron a southern blot con una sonda específica de FasL y  $\beta$ -actina marcada radiactivamente con <sup>32</sup>P- $\gamma$ -ATP. (B) Células WT y MUT se transfectaron con un reportero de FasL (486luc) o con el vector vacío (luc-link). Las células transfectadas se estimularon con SEB durante 5h, se lisaron y se midió la actividad de la luciferasa. La gráfica representa las unidades de luz (RLU) normalizadas a la eficacia de transfección del reportero interno de Renilla (pRL-CMV). Los datos son representativos de cinco experimentos realizados por duplicado. La SD aparece representada en cada punto por las barras de error.

En primer lugar, se estudió la inducción de un reportero de luciferasa que portaba un fragmento de 486pb “upstream” del sitio de iniciación de la transcripción del promotor



de FasL y paralelamente, se evaluó por RT-PCR la expresión de FasL. La actividad del promotor fue sensiblemente menor en las células mutantes (Figura 29, panel B), de acuerdo con los datos de la RT-PCR que también reflejan el defecto en la expresión de FasL.(Figura 29, panel A).

En el momento en el que se afrontó este estudio se conocía muy poco acerca del promotor de FasL y de las rutas de activación necesarias para activar su expresión. Se había descrito el promotor de FasL humano y un estudio superficial arrojaba datos de posibles secuencias de unión para NFkB y Sp1 <sup>142</sup>. Asimismo, Latinis et al. habían demostrado por medio de ensayos de sobre-expresión de NF-AT y de inhibición con CsA, que para la inducción de FasL se requería de forma importante la participación de NF-AT, identificando además, dos sitios de unión en el promotor de FasL funcionalmente activos<sup>170</sup>.

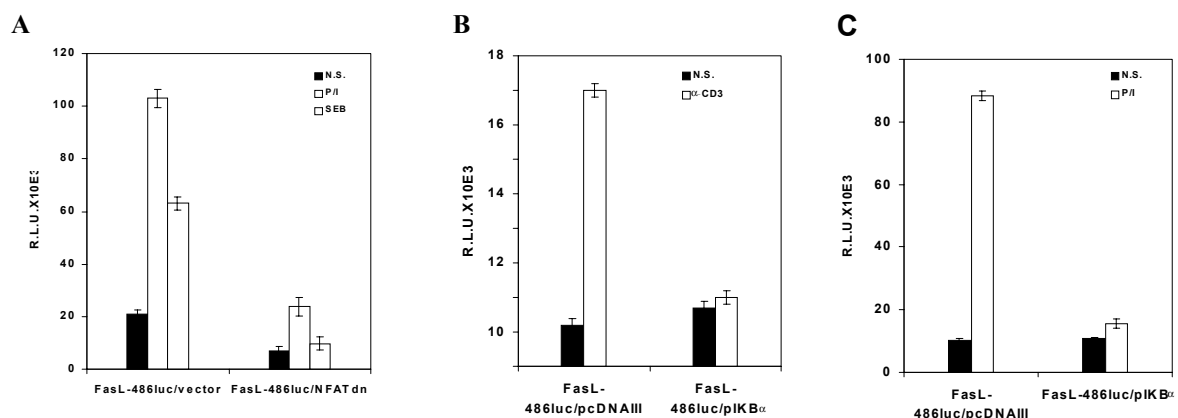
Nuestros datos, a partir del estudio de la inducción de NF-AT ( Figura 23) y NF-kB ( Figura 24) sugerían que otros factores de transcripción, además de NF-AT, debían estar involucrados en la regulación de FasL, puesto que las células resistentes a apoptosis no manifestaban diferencia alguna para la inducción de NF-AT. Tres puntos hicieron que se plantease la posible participación de NF-kB en el proceso de inducción de la expresión de FasL: (1) Las células MUT inducían débilmente NF-kB tras estimulación del TCR. (2) Los experimentos realizados con inhibidores de la calcineurina no excluían la posibilidad de que NF-kB pudiera verse afectado, ya que también es inhibido por CsA. (3) En el estudio inicial del promotor de FasL se había descrito un potencial sitio de unión para el factor NF-kB entre las posiciones -277 y -267 para las que curiosamente se había determinado uno de los sitios de unión para NF-AT ( el sitio NF-AT solapa con el de NF-kB). Dada la homología que mantiene NFAT con los miembros de la familia Rel, la mutación que en el trabajo de Latinis et al. se realizaba en el sitio NFAT podía anular, del mismo modo, el sitio NF-kB, sin distinguir por tanto, cual de los dos factores podía verse afectado.

Se comenzó realizando ensayos de retardo (EMSAs) utilizando como sonda el sitio descrito anteriormente para NF-kB en el promotor de FasL y se compararon con la sonda consenso NF-kB como control. Los ensayos de “supershift” con anticuerpos específicos frente a NFAT y las subunidades de NF-kB, nos informaron de que, mientras que existía unión de NFAT a ese sitio del promotor de FasL, NF-kB no parecía unirse, aunque sí lo hacía eficazmente a la sonda consenso (datos no mostrados).

## 1. LA INDUCCION DE NF-KB ES NECESARIA PARA LA EXPRESION DE FasL TRAS ESTIMULACION DEL TCR.

Existía la posibilidad de que NF- $\kappa$ B se pudiera unir a otro sitio distinto en el promotor de FasL, o que no se uniera, pero indirectamente, pudiera estar regulando la expresión de FasL. Por tanto, se evaluó la potencial participación de NF- $\kappa$ B en la regulación de la actividad del promotor de FasL por medio de ensayos de inducción de un reportero de FasL en presencia de inhibidores de NF- $\kappa$ B.

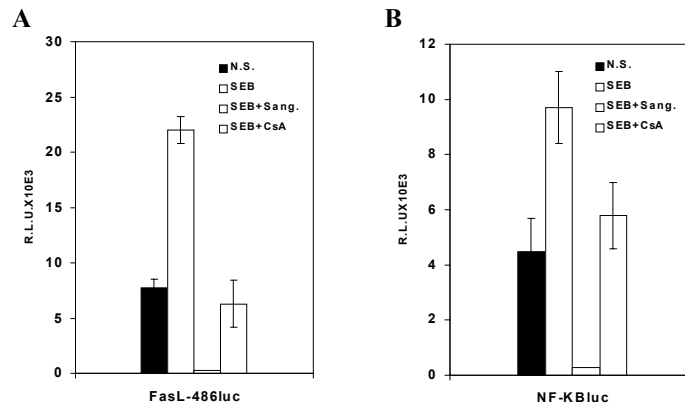
Ensayos de cotransfección de un dominante negativo de NF-AT (NF-ATdn) y de un vector de expresión de I $\kappa$ B $\alpha$ , junto con el reportero de FasL en células salvajes, nos permitieron valorar paralelamente la importancia de NF-AT y NF- $\kappa$ B sobre el promotor de FasL. Como se aprecia en la Figura 30 (panel A) el dominante negativo de NF-ATc anulaba casi por completo la actividad del promotor de FasL, tanto con estímulos vía TCR, como con PMA/Ionóforo. Sin embargo, también se bloqueaba la actividad del promotor cuando se inhibía NF- $\kappa$ B por medio de la sobre-expresión de I $\kappa$ B $\alpha$  (Figura 30, paneles B y C). Estos resultados sugieren que no sólo NF-AT, sino también NF- $\kappa$ B es necesario para la regulación de FasL.



**Figura 30.** La inhibición de la inducción de NF-AT y NF- $\kappa$ B inhibe la actividad del promotor de FasL.

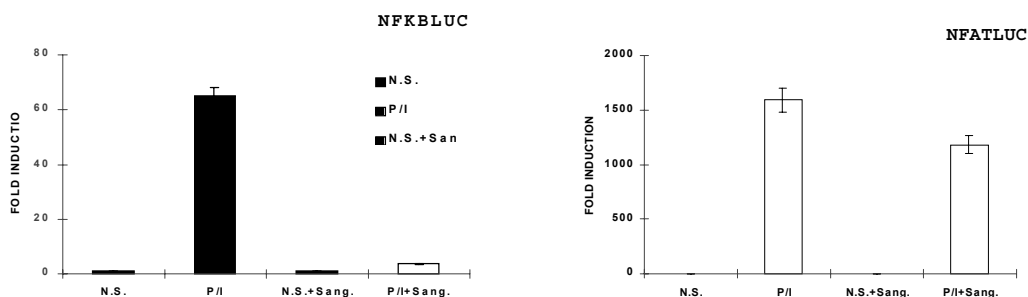
(A) Células WT se cotransfectaron con el reportero de FasL, 486Luc y con el vector de expresión que codifica para el dominante negativo de NFATc (NFATdn) en relación molar 1: 3 o el vector vacío pBJ5. (B y C). Células WT se cotransfectaron con el reportero de FasL, 486luc y con el vector de expresión que codifica para I $\kappa$ B $\alpha$ , (pIKB $\alpha$ ) en relación molar 1:1.5 o el vector vacío pCDNAIII. Las células transfectadas se estimularon con PMA/Ionóforo o SEB durante 5h (A) o con  $\alpha$ -CD3 fijado a plástico y PMA/Ionóforo (B y C), se lisaron y se midió la actividad de la luciferasa. Los valores de luciferasa se normalizaron a Renilla. Los datos son representativos de cuatro experimentos independientes realizados en muestras duplicadas. La SD se representa en cada punto a través de las barras de error.

Estos resultados fueron corroborados mediante ensayos de transfección y estimulación del reportero de FasL en presencia de drogas inhibidoras de NF-AT y NF-kB. Tanto la CsA, como la sanguinarina inhibían por completo la actividad del promotor de FasL, confirmando los resultados anteriores, es decir, ambos factores de transcripción resultan esenciales (Figura 31).



**Figura 31. Inhibición de la actividad del promotor de FasL con las drogas inhibidoras de NF-AT y NF-kB, CsA y sanguinarina.** Células WT se transfectaron con el reportero de luciferasa de FasL, 486luc (A) o con el reportero de luciferasa de NF-kB (B). Las células transfectadas se estimularon con SEB durante 5h en presencia o ausencia de drogas inhibidoras sanguinarina ( $1\mu\text{M}$ ) o CsA ( $200\text{ng}/\text{mL}$ ). Tras lisis, se ensayó la actividad de la luciferasa. Los valores de luciferasa se normalizaron a Renilla. Los datos son representativos de tres experimentos independientes realizados en muestras duplicadas. La SD se representa en cada punto a través de las barras de error.

Como control se comprobó el efecto de las drogas sobre la inducción de NF-kB y NF-AT. Como se esperaba ambas drogas inhibieron el reportero de NF-kB mientras que la sanguinarina no afectó apenas la inducción de NF-AT (Figura 32).



**Figura 32. Efecto específico de la sanguinarina sobre NF-KB.** Células WT se transfectaron con el reportero de luciferasa de NF-kB (A) o NF-AT (B). Las células transfectadas, se estimularon con SEB durante 5h en presencia o ausencia de la droga inhibidora sanguinarina ( $1\mu\text{M}$ ). Tras lisis se ensayó la actividad de la luciferasa. Los valores de luciferasa se normalizaron a Renilla. Los datos son representativos de tres experimentos independientes realizados en muestras duplicadas.

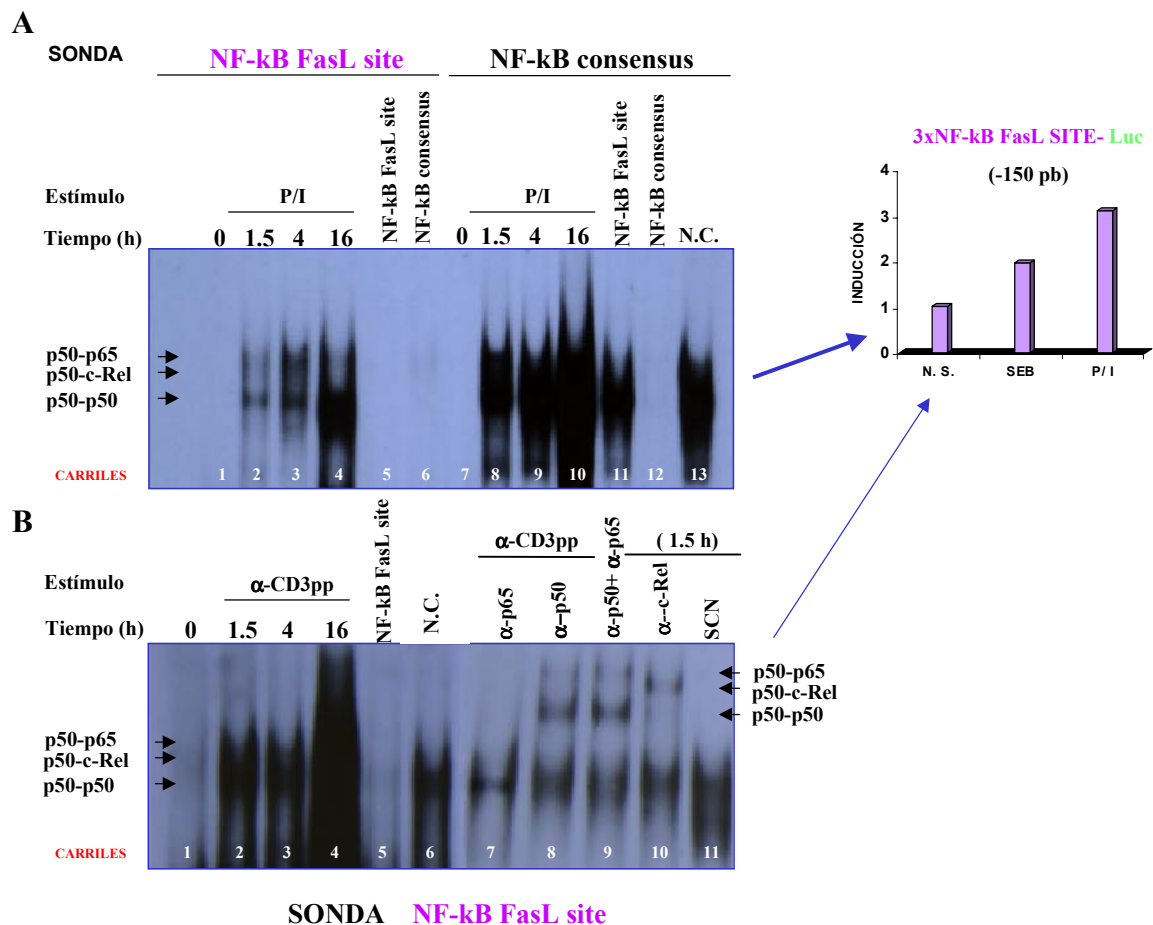
## **2. NF-kB SE UNE DE FORMA FUNCIONALMENTE ACTIVA A LA REGION – 155 PB DEL PROMOTOR DE FASL.**

Una vez demostrada la participación de NF-kB en la inducción de FasL, se decidió estudiar la posibilidad de que en el promotor de FasL existieran sitios de unión NF-kB diferentes del descrito. Paralelamente a nuestros estudios, Kassibathla et al. describieron un sitio para NF-kB en el promotor de FasL situado a 1200pb del sitio de iniciación<sup>171</sup>. Dado que se estaba trabajando con un fragmento más pequeño (de 486 pb, reconocido como el fragmento que era responsable de la mayor parte de inducibilidad del promotor de FasL<sup>170</sup>, se imponía la búsqueda de otro sitio dentro de esta zona del promotor que pudiera justificar nuestros resultados.

Con este propósito, se examinó el promotor de FasL, en busca de una secuencia lo más similar posible a la consenso para NF-kB ( GGGRNNYYCC siendo R una base purina, N cualquier base e Y una base pirimidinica). Se detectó una a -155pb respecto al sitio de iniciación de la transcripción, de secuencia: **GGTGFTCC**. La unión de NF-kB a este sitio se verificó por medio de ensayos de EMSA y supershift utilizando como sonda un oligonucleótido cuya secuencia correspondía al potencial sitio de unión en el promotor de FasL. En la Figura 33, en el panel superior se observa como desde 1.5h de estimulación con PMA/ Ionóforo se inducía la unión de NF-kB al sitio -155pb contenido en el promotor de FasL ( NF-kB FasL site) y parecía persistir hasta las 16h. Dicha unión parecía específica de NF-kB pues no sólo se anulaba la unión por competición con un exceso de la sonda fría sino también con un exceso de la sonda NF-kB consenso fría (carril 5 y 6, respectivamente) y no, cuando compite con una sonda irrelevante fría en la misma concentración ( carril 14). Además, el hecho de que las bandas, correspondientes a los complejos unidos a la secuencia contenida en el promotor de FasL ( izquierda), coincidieran en tamaño con los complejos de unión a la sonda consenso para NF-kB ( derecha) corroboraron que el sitio -155pb era de unión específica a NF-kB. Cabe destacar, sin embargo, que la secuencia del sitio del promotor de FasL (NF-kB FasL site) no muestra tanta afinidad por NF-kB como la secuencia consenso ( NF-kB consensus), puesto que no fue competida por un exceso de la sonda NF-kB FasL fría ( carril 12). Los mismos resultados se obtuvieron en EMSAs realizados sobre extractos nucleares de células estimuladas con  $\alpha$ -CD3 fijado a plástico ( panel inferior) donde además los ensayos de supershift, efectuados con anticuerpos policlonales anti -p65, -p50 y -cRel, identificaron complejos constituidos por los heterodimeros p65-p50 y c-Rel-p50 y por el homodímero p50-p50 ( carriles 8-11). Como control negativo se realizó el ensayo de supershift con un suero de conejo normal ( carril 12).

Además, para comprobar que este sitio NF-kB FasL era funcionalmente activo, se fusionó el sitio a un vector de expresión que contenía el gen reportero de luciferasa. Se transfectaron células con este reportero y se estimularon con SEB durante 5 horas

resultando los valores de inducción del reportero que se representan en la gráfica de la Figura 33. La unión de NF-kB al sitio -155pb del promotor de FasL se inducía tanto con estímulos apoptóticos como el PMA/Ionóforo, como con estímulos apoptóticos específicos del TCR (SEB).

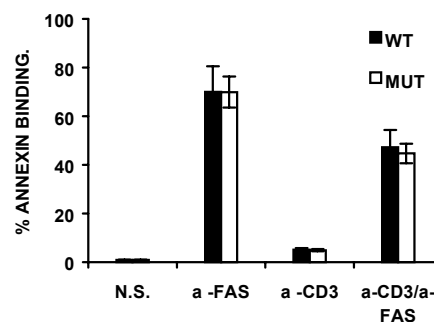


**Figura 33. Unión funcional de NF-kB al sitio -155pb del promotor de FasL (NFkB-FasL site)** . La unión se verificó por EMSA utilizando extractos nucleares (5µg) de células estimuladas con PMA/ION (A) o con anti-CD3 fijado a plástico (B) durante los tiempos indicados. El sitio kB de la región enhancer de la cadena K se usó como sonda control (NF-kB consenso). Las flechas indican la unión de los dímeros p50/p50, p50/p65 o p50/c-Rel. Los ensayos de supershift (B) se realizaron sobre una mezcla que contenía 5µg de extractos nucleares de células estimuladas, la sonda NFkB-FasL marcada con <sup>32</sup>P-ATP (3-4ng) y 1µL de anticuerpos (p50, p65 y c-Rel). Suero de conejo normal (SCN) se utiliza como control negativo. Los ensayos de competición se realizan con un exceso 10 veces molar de la sonda fría que se indica en el carril o con un oligo irrelevante (N.C.). La gráfica representa la inducción de un gen reportero de luciferasa que porta el sitio NF-kB-FasL (-155) triplicado, tras ser transfectado en células WT, posteriormente estimuladas o no con PMA+Ion o SEB durante 5h., lisadas y ensayada la actividad luciferasa. Los valores se normalizaron a Renilla y se dan en términos de inducción respecto al valor basal.

*En conjunto, estos resultados demuestran que NF- $\kappa$ B, es un factor de transcripción esencial para la regulación del gen de FasL, habiéndose identificado además, un sitio funcional de unión para él en la región -155pb del promotor de FasL. Los datos sugieren también que, el defecto en la inducción de NF- $\kappa$ B de las células mutantes estimuladas a través de su TCR podría ser una de las causas por las que la apoptosis se bloquea en dichas células.*

### 3. CONTRIBUCIÓN DE Egr-3 A LA REGULACIÓN DE FasL

Otro de los factores de transcripción que se encuentran regulando la expresión de FasL es Egr-3. De hecho, existe un sitio de unión en el promotor de FasL (región -225/-212) cuya funcionalidad depende de la expresión inducida de Egr-3<sup>125</sup> que a su vez, es función del sinergismo entre la vía del Ca<sup>2+</sup> y otras rutas como las de PKC. Con objeto de evaluar la posibilidad de que las células mutantes en la región transmembrana de TCR $\beta$  manifestaran algún defecto en la expresión y/o unión de Egr-3 al sitio FLRE contenido en el promotor de FasL( FLRE/Egr-3). Células salvajes y mutantes se transfectaron con un reportero que contenía el sitio Egr-3 del promotor de FasL )<sup>125</sup> triplicado y se estimularon con SEB o PMA/Ionóforo. En la Figura 34 se observa como no sólo la actividad de este sitio no es menor en las células mutantes que en las salvajes, sino que parece ligeramente mayor.

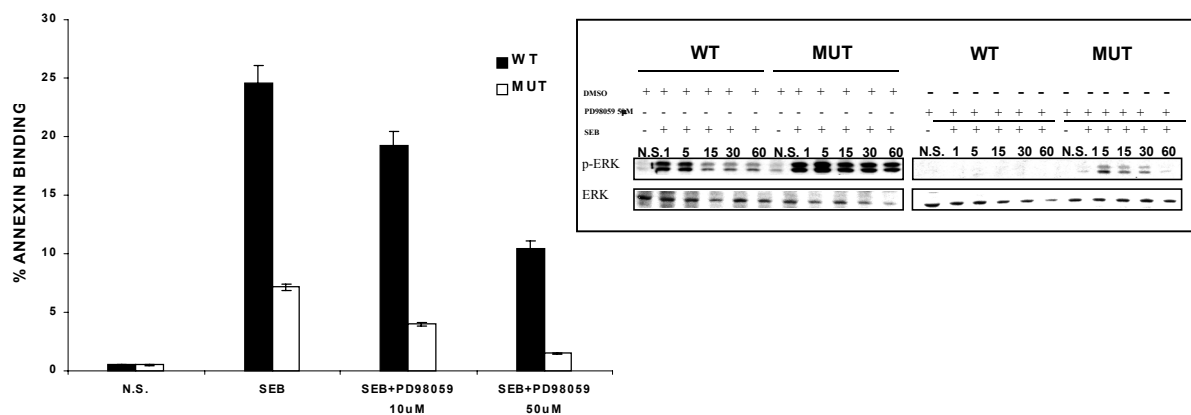


**Figura 34.** Contribución de Egr-3 a la expresión de GfasL en las células mutantes en TCR $\beta$ . Células WT y MUT se transfectaron con el reportero de luciferasa de FLRE/Egr-3<sup>125</sup>. Las células transfectadas se estimularon con SEB o con P/I durante 5h. Tras lisis, se ensayó la actividad de la luciferasa. Los valores de luciferasa se normalizaron a Renilla. Los datos son representativos de tres experimentos independientes realizados en muestras duplicadas. La SD viene representada en cada punto por las barras de error.

*Por tanto, en el defecto en la expresión de FasL inducido por la estimulación del TCR mutado en la región transmembrana, no parece participar el factor de transcripción Egr-3. Además, s como la unión de Egr-3 a este sitio en el promotor de FasL depende de la expresión inducida de este factor mediada por NF-AT, se ratifica que NF-AT tampoco es factor responsable de marcar las diferencias apoptóticas entre ambos tipos celulares.*

### 3. EVALUACIÓN DE LA IMPLICACIÓN DE LAS MAPKs EN LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE FasL.

En los últimos años se ha sugerido la implicación de las MAPKs en el proceso apoptótico. Sin embargo, los datos son demasiado contradictorios y apuntan a que la regulación transcripcional de FasL por parte de los miembros de esta vía de señalización es enormemente compleja. No obstante, se investigó la posibilidad de que las alteraciones en ERK, JNK y p38MAPK pudiesen contribuir, junto con el defecto en la inducción de NF- $\kappa$ B, en el bloqueo apoptótico de las células mutantes estimuladas.

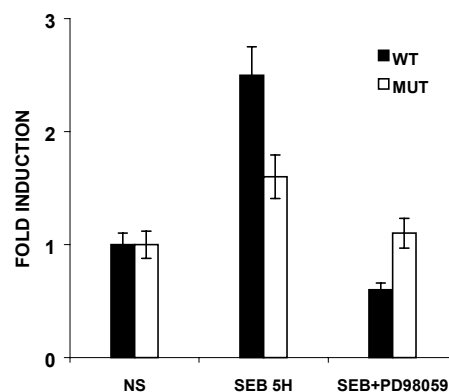


**Figura 35.** El inhibidor de ERK, PD98059 disminuye la apoptosis. Células WT y MUT se preincubaron durante 1/2h con el inhibidor de MEK-1, PD98059 en las dosis indicadas y después se mantuvo en el cultivo durante la estimulación con SEB durante 16h. El nivel de apoptosis se determinó por citometría de flujo utilizando anexina-V. El recuadro muestra ensayos de WB con anticuerpos anti-p-ERK sobre lisados de células WT y MUT estimuladas en ausencia o presencia de PD98059 (50 $\mu$ M). Experimento representativo de tres ensayos independientes. La SD se representa en cada punto por las barrar de error.

#### 3.1. La actividad de ERK no es suficiente para la inducción de FasL.

A priori, era razonable pensar que ERK no podía ser suficiente para el proceso de AICD, ya que en las células mutantes resistentes a apoptosis, ni siquiera la actividad

mayor y sostenida de ERK lograba restaurar el defecto en la inducción de FasL. Sin embargo, se planteaba la posibilidad de que ERK estuviera ejerciendo la función contraria. Con el fin de comprobar si la resistencia a apoptosis de las células mutantes era causada en parte por un efecto protector debido a la actividad sostenida de ERK, se realizaron ensayos de estimulación en presencia de PD98059, droga que inhibe específicamente a MEK-1. Los análisis de muerte celular, medidos como expresión de anexina-V, mostraron que al inhibir la actividad de ERK, se inhibía también la apoptosis en ambos tipos celulares y esta inhibición se incrementaba al subir la dosis de la droga ( Figura 35). Paralelamente a los ensayos de apoptosis se realizaron, sobre lisados totales de células estimuladas, experimentos de western blot ( parte derecha de la Figura 35) con anticuerpos que reconocían la forma fosforilada de ERK para confirmar que el PD9859 estaba inhibiendo la actividad de ERK.

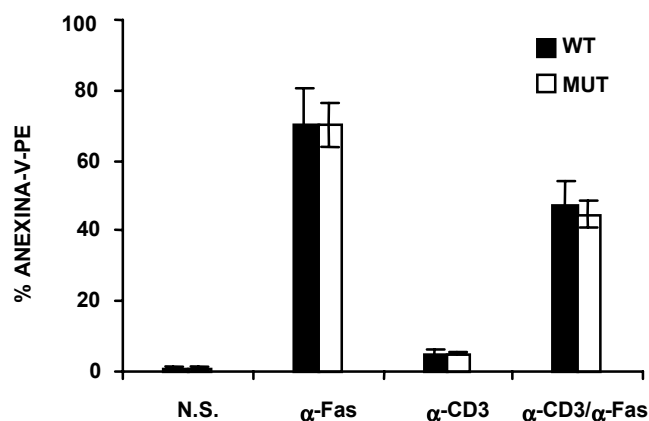


**Figura 36.** El inhibidor de ERK, PD98059, bloquea la actividad del promotor de FasL. Células WT y MUT se transfectaron con el reportero de FasL ( 486-LUC). Las células transfectadas se preincubaron durante 30 min con el inhibidor de MEK-1, PD98059 ( 50 $\mu$ M) y después se mantuvo en el cultivo durante la estimulación con SEB durante 5h. Las células se lisaron y se ensayó su actividad luciferasa. Los valores de luciferasa se normalizaron a Renilla. Los datos son representativos de cuatro experimentos independientes realizados en muestras duplicadas. La SD se representa en cada punto por las barras de error.

A continuación, se estudió si la disminución de la apoptosis causada por el inhibidor PD98059 era consecuencia de un bloqueo en la expresión de FasL. Para comprobarlo, se llevaron a cabo ensayos de luciferasa en los que las células salvajes y mutantes se transfectaron con el reportero de FasL y se estimularon con SEB en presencia o ausencia del inhibidor. Los resultados fueron análogos a los mencionados para las medidas de apoptosis, la actividad del promotor de FasL se bloqueaba en ambos tipos celulares cuando se inhibía la actividad de ERK con el inhibidor PD98059 ( Figura 36). Los mismos resultados se obtuvieron tras estimular las células a apoptosis con PMA/Ionóforo (datos no mostrados) .



A pesar de que ERK parecía estar regulando positivamente la expresión de FasL en ambos tipos celulares, existía la posibilidad de que, en las células mutantes, la actividad de ERK sostenida en el tiempo inhibiese la cascada apoptótica que se desencadena por la estimulación de Fas y de esta forma, ERK protegiera de apoptosis<sup>169</sup>. Con objeto de evaluar esta posibilidad, células salvajes y mutantes fueron estimuladas con  $\alpha$ -CD3 soluble ( que no induce apoptosis) durante media hora con el fin de activar ERK, y posteriormente, se indujeron a apoptosis a través de la estimulación de Fas durante 5 horas. El nivel de apoptosis se midió por citometría en las células anexina-V positivas.



**Figura 37.** ERK protege de apoptosis al inhibir parcialmente la cascada de las caspasas. Células WT y MUT fueron incubadas con medio (N.S.), anti-Fas,  $\alpha$ -CD3 soluble o preincubadas con  $\alpha$ -CD3 soluble durante 30 minutos antes de añadir el anticuerpo anti-Fas (50ng/mL). Después de 3h, se tiñeron con anexina V y se analizaron por citometría de flujo. En la gráfica se muestra un experimento representativo de tres. La SD se representa en cada punto por las barras de error.

Como ilustra la Figura 37, efectivamente existía un componente protector en la activación de ERK, y la apoptosis disminuyó, aproximadamente un 40 %, al activarse previamente la MAPK. Sin embargo, el efecto protector no fue mayor en las células mutantes que en las salvajes, lo cual parecía indicar que la sobre-activación de ERK no participaba en la resistencia apoptótica de las células mutantes estimuladas.

Nuestros datos sugieren en conclusión **que:**

- **ERK contribuye positivamente a la regulación transcripcional de FasL y por tanto, a la inducción de apoptosis.**
- **Además, la estimulación del TCR es capaz, a través de la activación de ERK, de inhibir parcialmente la cascada de activación de las caspasas pero la**

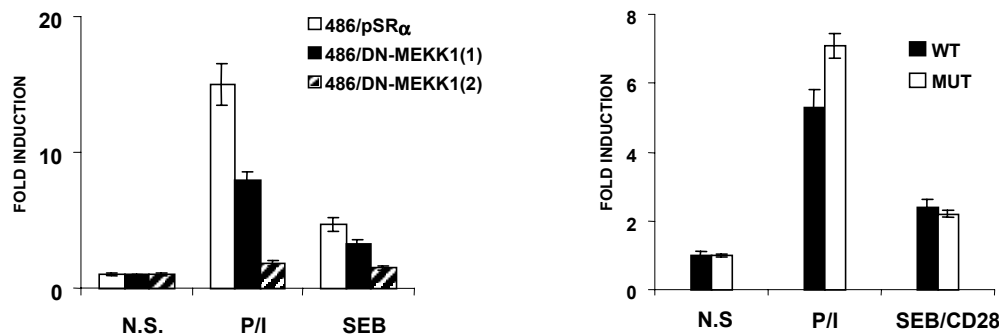
***la estimulación del TCR $\beta$  mutado no supone un aumento en la protección de apoptosis que fisiológicamente tiene lugar por este mecanismo.***

### **3.2. La vía de JNK está implicada en la regulación de FasL.**

Con el propósito de evaluar si la deficiente activación de JNK estaba relacionada con la resistencia a apoptosis de las células mutantes, se estudió, en primer lugar, la participación de la ruta de activación de JNK en la regulación transcripcional de FasL. Para ello, se realizaron experimentos de cotransfección de un dominante negativo de MEKK-1 y el reportero de FasL previamente descrito. Los resultados demostraron que al inhibir la actividad de MEKK-1 (Figura 38, panel A) se deprimía significativamente la inducción de FasL con estímulos apoptóticos, tanto vía TCR como con PMA/Ionóforo, poniendo de manifiesto la importancia de la actividad de MEKK-1, y consecuentemente de JNK, en la regulación de la expresión de FasL.

Paralelamente a nuestros trabajos se había descrito un sitio, en el fragmento de 486pb del promotor de FasL, dependiente de MEKK-1, al que se unían c-Jun y ATF-2 <sup>143</sup>. Se realizaron entonces, experimentos de transfección de una construcción reporter de luciferasa que contenía este sitio triplicado y unido al gen de la luciferasa para valorar si la actividad disminuida de la ruta de JNK, al actuar sobre este sitio, daba cuenta del bloqueo en la expresión de FasL en las células mutantes. Sorprendentemente y tras activación del TCR, no se apreciaron diferencias en la actividad de este sitio cuando se compararon los dos tipos celulares (Figura 38, panel B). Por tanto, parece que este sitio dependiente de la activación de la vía de JNK, no daba cuenta del defecto en la expresión de FasL de las células mutantes.

La idea de que MEKK1 fuera un factor clave en los procesos apoptóticos se había contemplado con anterioridad en trabajos con fibroblastos (Lassignal et al. J.B.C. 1996 271(6):3229-37) y en trabajos que utilizaban estímulos de stress en linfocitos T <sup>165</sup>. Además, se había demostrado que MEKK-1 podía participar en la ruta de inducción de otros factores de transcripción distintos de los afectados por la vía de JNK (c-jun, ATF-2) como c-myc <sup>192</sup> y NF-KB. En este último caso, parece que la activación de MEKK-1 promueve la activación del complejo I $\kappa$ B $\alpha$  quinasa <sup>187</sup>. Dado que en el promotor de FasL se encontraban contenidos sitios para estos factores de transcripción, era posible que MEKK-1 controlase la inducción de FasL precisamente a través de estos factores de transcripción.



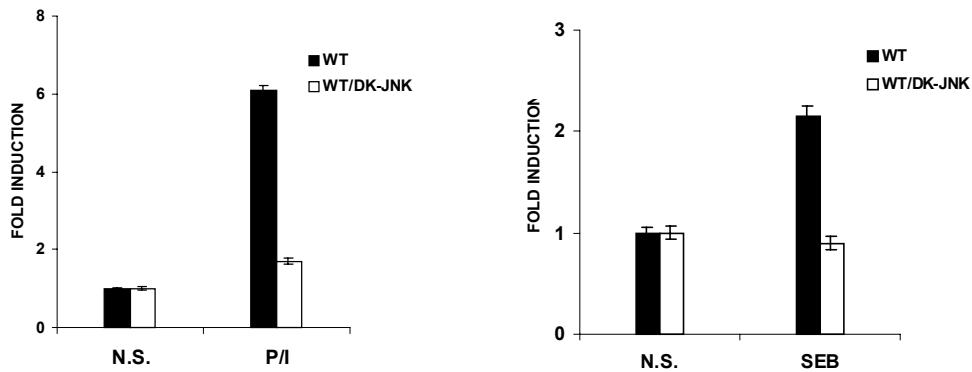
**Figura 38. (A) MEKK regula la expresión de FasL.** Células WT se cotransfectaron con el reportero de FasL y con un vector de expresión que codificaba para un dominante negativo de MEKK1 en una relación molar FasL:DN-MEKK1 (1) 1:3 y (2) 1:1,5. **(B) El sitio dependiente de MEKK-1 induce la misma transactivación en ambos tipos celulares.** Células WT se transfectaron con el reportero que contenía el sitio del promotor de FasL dependiente de MEKK1 triplicado. En ambos casos, las células transfectadas se estimularon con SEB o PMA/Ionóforo, se lisaron y se midió su actividad luciferasa. Los valores se relativizaron al valor control de eficacia de transfección dado por la Renilla. Los datos son representativos de tres experimentos independientes realizados con muestras triplicadas. La SD se indica en cada punto por las barras de error.

Interesaba pues, demostrar que existía una implicación directa de la actividad de JNK sobre el promotor de FasL. Para ello, se cotransfectó un dominante negativo de JNK (death kinase JNK) junto con el reportero del promotor de FasL en las células salvajes y mutantes. Los resultados obtenidos a partir de los ensayos de luciferasa mostraron que, el dominante negativo de JNK inhibía completamente la activación del promotor de FasL, tras estimulación tanto con PMA/Ionóforo como del TCR (Figura 39).

***En conclusión estos resultados demuestran que MEKK-1 juega un papel importante en la regulación de la expresión de FasL en los procesos de AICD. Independientemente de que MEKK-1 actúe activando los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y c-myc, con sitios de unión en el promotor de FasL, los datos demuestran que la actividad de JNK, por sí sola, participa en la regulación de la expresión de FasL .***

***Por tanto, cabe la posibilidad de que el defecto en la activación de JNK de las células mutantes en TCR $\beta$  estimuladas contribuya a inducir su fenotipo resistente a apoptosis. Si es así, el defecto no podría deberse a la actuación de JNK sobre el sitio descrito por Faris et al. en el promotor de FasL y habría que***

*considerar que existen en el promotor de FasL sitios susceptibles a la activación de la vía de JNK diferentes del descrito.*



**Figura 39 . La inhibición de la actividad de JNK bloquea la actividad del promotor de FasL.** Células WT se cotransfectaron con el reporter de FasL y con un vector de expresión que codificaba para un dominante negativo de JNK. Las células transfectadas se estimularon con PMA/Ionóforo o con SEB o con medio sólo (N.S.) , se lisaron y se midió su actividad luciferasa. Los valores se relativizaron al valor control de eficacia de transfección dado por la Renilla. Los datos son representativos de tres experimentos independientes con muestras triplicadas. La SD se indica para cada punto por las barras de error.

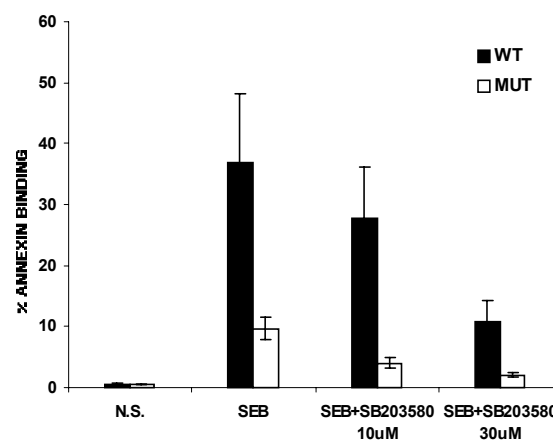
### 3.3. La actividad de p38MAPK está implicada en la expresión de FasL.

Ya que la actividad de p38 estaba severamente disminuida en las células mutantes cuando se estimula su TCR $\beta$  mutado, se decidió estudiar su implicación en la regulación de la expresión de FasL.

En experimentos preliminares en los que se expresaba un constitutivo activo de MKK3b en células salvajes y mutantes se observó, por medio de ensayos de retrotranscripción, que la sobre-activación de p38MAPK no recuperaba el defecto en la expresión de FasL característico de las células mutantes. Sin embargo, ensayos semejantes en los que se expresaba la subunidad p65 de NF-kB mostraban una recuperación total de la expresión de FasL en las células mutantes ( datos no mostrados).

Hasta aquí parecía que NF-kB era un factor clave para la expresión de FasL y más concretamente, parecía ser al menos en parte responsable del defecto apoptótico de las células mutantes. No obstante, no se podía descartar un posible papel de p38MAPK en la regulación de la expresión de FasL, pues la sobreactivación de p38MAPK no tenía porque compensar, por si sola, el defecto en FasL debido al bloqueo en la inducción de NF-kB en las células mutantes.

Para averiguarlo, se estudió si los niveles de apoptosis en los clones salvaje y mutante se veían afectados por la inhibición de la actividad de p38MAPK con la droga SB203580. Esta droga es específica de la isoforma p38 $\alpha$ , que según se ha descrito, es la única que resulta activada tras estimulación del TCR/CD3<sup>110</sup>. Como se aprecia en la Figura 40, la apoptosis resultaba bloqueada en ambos clones cuando se inhibía la actividad quinasa de p38. Los mismos resultados se obtuvieron cuando se estudió la actividad del promotor de FasL en presencia de SB203580 (datos no mostrados).



**Figura 40.** La inhibición de la actividad de p38MAPK con la droga SB203580, disminuye la apoptosis. Células WT y MUT se preincubaron 30 min con SB203580 a las dosis indicadas antes de añadir medio sólo o SEB. Tras 16h se evaluó el porcentaje de células apoptóticas por citometría de flujo de las células anexina -V positivas como se indica en pies de figuras anteriores. Los datos son representativos de tres experimentos independientes. La SD se indica en cada punto por las barras de error.

*En suma, estos datos sugieren que p38MAPK está regulando el proceso apoptótico mediado por la inducción de FasL. Sin embargo, a pesar de que las células mutantes en TCR $\beta$  muestran un defecto en la actividad de p38MAPK cuando son estimuladas, no se puede relacionar este déficit con el defecto en la expresión de FasL, sobre todo cuando se cuenta con un bloqueo en la inducción de NF- $\kappa$ B. En todo caso comparando ambos aspectos, sólo podríamos sugerir que la vía de activación de NF- $\kappa$ B no sólo es necesaria como lo son las vías de las MAPKs, sino que además es suficiente para el desencadenamiento de los procesos de AICD mediados por la expresión inducible de FasL.*

## DISCUSIÓN

El hecho de que la mutación en la región transmembrana de TCR $\beta$  afecte diferencialmente a la apoptosis frente a la secreción de citoquinas, ha permitido también, utilizar este sistema como herramienta para el estudio de las vías de señalización que conducen a la expresión de FasL en los procesos de AICD. La estimulación del TCR $\beta$  mutado no supone defectos en la inducción de NF-AT, AP-1 o Egr-3 que se puedan relacionar con la deficiente expresión de FasL. Sin embargo, el que: (1) las células mutantes muestren un defecto en la inducción de NF- $\kappa$ B (2) la actividad del promotor de FasL se bloquee con la sobre-expresión de I $\kappa$ B $\alpha$ , (3) una potente droga inhibidora de NF- $\kappa$ B, la sanguinarina, inhiba la actividad del promotor de FasL, y (4) la descripción de un sitio de unión funcional a NF- $\kappa$ B en la región -155pb respecto al inicio de la transcripción, sugieren no sólo que NF- $\kappa$ B es importante para la regulación transcripcional de FasL, sino que además, el defecto en la inducción de NF- $\kappa$ B de las células mutantes podría justificar el defecto en la expresión de FasL.

Se han descrito varios sitios de unión a NF- $\kappa$ B en el promotor de FasL. Uno de ellos <sup>171</sup> no está incluido en la región de -486pb del promotor de FasL que ha sido objeto de estudio en esta Tesis y se ha relacionado fundamentalmente con estímulos de stress y vía TCR. El otro sitio, se encuentra entre las posiciones -266 a -288pb respecto del sitio de iniciación de la transcripción y había sido descrito con anterioridad sin que se hubiera demostrado su funcionalidad<sup>150</sup>. A este sitio se unen también NF-AT<sup>170</sup>, Egr-3 y Sp-1. Sp-1 es un factor constitutivo<sup>144</sup> y Egr-3 depende para su inducción de NF-AT<sup>125</sup>. En principio no se podría excluir la posibilidad de que NF- $\kappa$ B cooperase con NF-AT en este sitio (-266/-280), dada la homología Rel que comparten o que, al igual que sucede para NF-AT y Egr-3, estuviera actuando sobre otros factores de transcripción que regulasen la actividad del promotor. Tampoco habría que desestimar la posibilidad de que NF- $\kappa$ B compitiera con los demás factores de transcripción. De hecho, se ha descrito que en el promotor de IL-4, NF-AT y NF- $\kappa$ B compiten por un mismo sitio<sup>124</sup>. Sin embargo, no se ha podido determinar que exista unión de NF- $\kappa$ B a ese sitio (datos no mostrados) y en cambio, se ha demostrado que NF- $\kappa$ B se une al sitio -155pb. Este dato ha sido corroborado con otro trabajo que confirma la funcionalidad de este sitio NF- $\kappa$ B en el promotor de FasL murino <sup>147</sup>.

En contraposición, algunos trabajos han otorgado a NF- $\kappa$ B una función anti-apoptótica. Así parecen demostrarlo los estudios efectuados en ratones deficientes en alguno de los intermediarios de la ruta de NF- $\kappa$ B (en alguna de las subunidades del complejo IKK) y en células Jurkat deficientes en IKK $\gamma$ . Estas células son más sensibles a apoptosis inducida por mitógenos y anti-Fas que las salvajes y son capaces de

inducir con normalidad la expresión de FasL pero no así la de IL-2, cuando se emplea como estímulo PMA/Ionóforo<sup>155</sup>. Las discrepancias frente a lo que sucede en nuestro sistema, podrían explicarse si consideramos que NF- $\kappa$ B actúa de formas muy diferentes dependiendo de la estirpe celular, el estímulo inductor y el tiempo en que se genere la respuesta.

En el estudio de la regulación transcripcional de FasL también se ha tratado de evaluar la relevancia de las diferentes MAPKs. Todas ellas han sido relacionadas positivamente con la inducción de la expresión de FasL, aunque sólo en el caso de MEKK-1 se ha descrito un sitio ( sitio dependiente de MEKK1) en el promotor de FasL al que se unen c-jun y ATF-2 <sup>143</sup>. Los datos aportados por el sistema de células mutantes resistentes a apoptosis demuestran que la inhibición individual de la actividad de ERK, JNK y p38MAPK bloquea la apoptosis mediada por FasL inducida por el TCR. Sin embargo, la actividad de ERK no podría dar cuenta del defecto en FasL, aún cuando promueve la inducción de apoptosis,- porque se encuentra más activada en las células mutantes y, tampoco parece contribuir a la resistencia apoptótica característica de las células mutantes, a pesar de que en otros sistemas celulares se le ha atribuido este papel <sup>159</sup>. En cuanto a los déficits en las activaciones de JNK y p38MAPK, no se puede descartar que contribuyan al defecto en la expresión de FasL de las células mutantes, aunque deberían actuar en un sitio diferente al dependiente de MEKK-1 descrito, pues no hay diferencias entre las células mutantes y salvajes cuando se mide la actividad de un reportero que lo contiene ( Figura 29R). En relación a JNK, hemos mostrado que la inhibición de su actividad bloquea la inducción de la expresión de FasL. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que JNK promovería la expresión de FasL, en una segunda ola, a tiempos largos <sup>164</sup> después de que la cascada de caspasas induzca su activación. Para ello se ha de expresar FasL en una primera ola, y ésta inducción de la expresión estaría regulada por la activación de p38MAPK. Teniendo en cuenta esto, las células mutantes siempre van a tener una menor activación de JNK mediada por las caspasas, ya que el defecto en la expresión de FasL ya se manifiesta en la primera ola. Por tanto, según esto el defecto en la activación de JNK de las células mutantes estimuladas sería irrelevante para la expresión de FasL. La actividad del sitio dependiente de MEKK1 descrito por Faris et al. y la inhibición de la actividad del promotor de FasL en células transfectadas con un dominante negativo de JNK, <sup>143</sup> fue medido a tiempos de 8h, en lo que se considera la primera ola de la expresión de FasL. No obstante, cabe la posibilidad de que existan otros sitios en el promotor de FasL sobre los que actúe JNK distintos del descrito.

Por último, también hemos demostrado que p38MAPK está involucrado en la inducción de apoptosis de acuerdo con trabajos publicados recientemente <sup>110,164</sup>. En relación con esto, no descartamos que la actividad disminuida de p38MAPK en las células mutantes estimuladas contribuya a su fenotipo resistente a apoptosis.

Comparando todos los elementos estudiados, cuya activación se ve afectada por la estimulación del TCR $\beta$  mutante, y que han sido vinculados con la regulación transcripcional de FasL, parece que sólo NF-kB, JNK y p38MAPK podrían justificar el defecto de FasL de las células mutantes. No obstante, es difícil valorarlo cuando todos los defectos son inducidos a la vez. Quizás se requiera de la acción combinada de todos estos elementos para que se active la expresión de FasL, y ninguno de ellos sea suficiente. De hecho, la sobreactivación de ERK no es capaz de compensar los defectos en la activación de NF-kB y p38MAPK.

Aún así, se ha descrito que NF-kB es respecto a NF-AT y AP-1 el factor de transcripción más relevante para la regulación transcripcional de Fas L<sup>150</sup> y en ensayos preliminares de RT-PCR y citometría en nuestro sistema, no se ha logrado revertir el fenotipo resistente a apoptosis de las células mutantes, ni inhibiendo ERK, ni sobreactivando p38MAPK. Sin embargo, el defecto en la expresión de FasL de las células mutantes se recupera cuando se sobreexpresa la subunidad p65-NF-kB (datos no mostrados).



## **DISCUSIÓN GENERAL**

El estudio que abarca esta Tesis se ha desarrollado con el propósito de profundizar en los escasos conocimientos que actualmente se tienen de cómo un único TCR/CD3 es capaz de generar multitud de respuestas diferentes en función del ligando con el que interactúe. En este sentido, los distintos dominios del TCR podrían estar implicados en la generación selectiva de respuestas a través de la activación de cascadas específicas. Esta cuestión ha sido abordada mediante los estudios de señalización parcial de los APLs y más recientemente, se ha contemplado cómo ante un mismo ligando mutaciones en diferentes dominios de TCR $\alpha$  o TCR $\beta$  afectan a la señalización, limitando las funciones efectoras que se generan. Nuestro proyecto ha tratado de estudiar cómo el dominio transmembrana de TCR $\beta$  está implicado en ciertas respuestas celulares mientras que no está involucrado en la inducción de otras. Para ello, se ha contado con un sistema de células T que expresan en membrana un TCR con el dominio transmembrana mutado en un residuo de Tyr del motivo ITAM de TCR $\beta$ , y se ha comparado su comportamiento con células T que expresan el mismo TCR salvaje. Los resultados que se deducen de los distintos ensayos efectuados sobre las células mutantes, salvo potenciales defectos genéticos, no se corresponden con situaciones fisiológicas. Sin embargo, por extrapolación, este sistema nos proporciona información sobre la importancia del dominio transmembrana fisiológico en la transmisión de señales. Con este razonamiento, este sistema se convierte además, en un instrumento ideal para el estudio de las interacciones péptido-TCR “ineficientes” y sus consecuencias en la transducción específica de señales.

Como en cualquier trabajo estructura/función que implique la mutación de algún residuo existe un cierto grado de incertidumbre en cuanto a si los efectos observados son estrictamente atribuibles a la mutación o a los cambios estructurales que se derivan de ella. Así, la débil asociación de  $\zeta$  al resto del complejo TCR/CD3 podría enmascarar el efecto directo de la mutación. Sin embargo, y a pesar de ello, los resultados que se han obtenido han puesto de manifiesto la sensibilidad de este dominio del TCR para modular diferentes señales. En este sentido, el receptor mutante soporta unas funciones y es incapaz de inducir otras. Además, en nuestro caso, la separación de las señales de apoptosis frente a las de proliferación ha supuesto un avance en el conocimiento de la señalización mediada por el TCR.

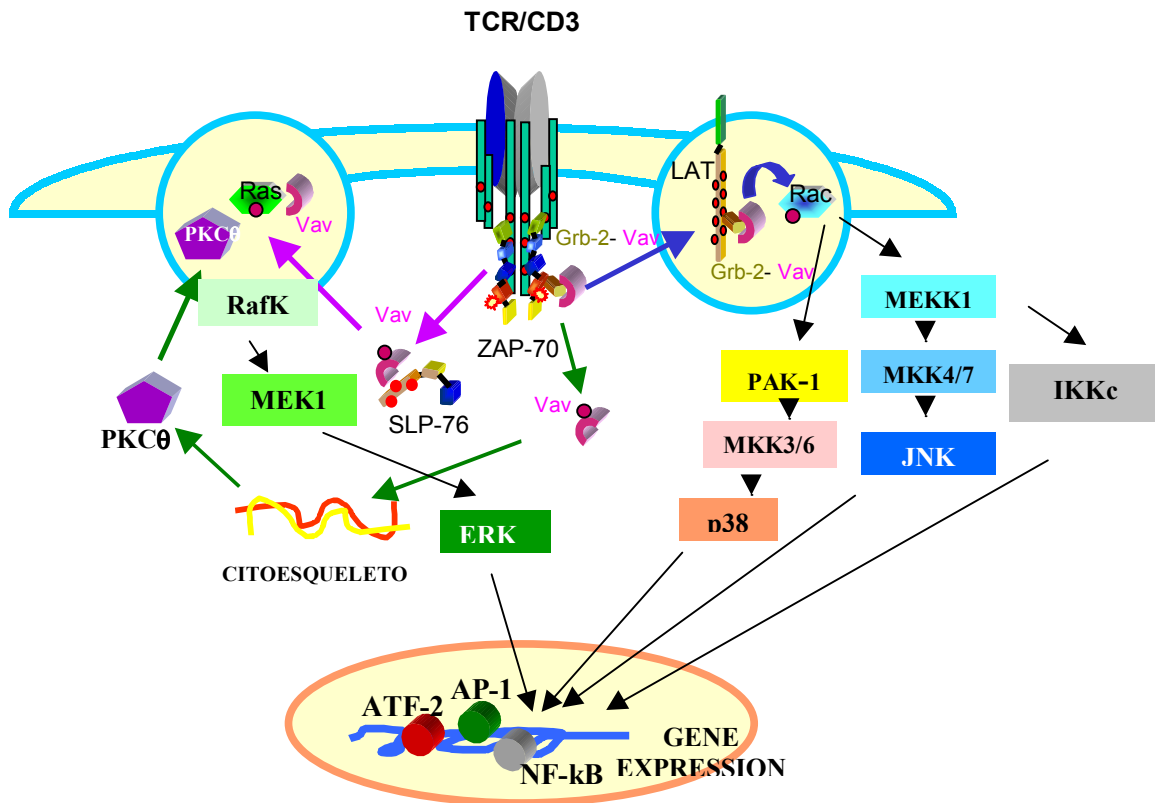
En esta Tesis, se ha continuado con los trabajos anteriores que relacionaban estructuralmente este dominio transmembrana con la estabilidad de la asociación TCR/CD3 con  $\zeta$  y con la regulación selectiva de las respuestas de la célula a la activación. A partir de los resultados anteriores hemos planteado las siguientes cuestiones: (1) ¿cómo afecta la mutación a los primeros pasos de la señal que se

desarrollan en el entorno de los Rafts lipídicos?, (2) ¿qué rutas de señalización que se asumen como principales en la activación de la célula T necesitan del dominio transmembrana para su correcta activación? (3) ¿qué mecanismos de activación son soportados por el TCR mutante para conducir a una señalización diferencial? y concretando en el proceso apoptótico, (4) ¿cómo se conjugan todos los puntos anteriores para definir una ruta que conduce a la expresión de FasL desde el TCR?.

Los resultados demuestran que para el sostenimiento diferencial de señales, el TCR mutante se vale de la diversificación de rutas de señalización desde los eventos más tempranos de la señal y lo hace modulando, tanto la actividad de intermediarios mediante la fosforilación de Tyr como la ubicación de los mismos en distintos compartimentos celulares.

A este respecto, el estudio de los primeros pasos de señalización en las células mutantes sugieren que, debido a la deslocalización de ZAP-70, las moléculas sobre las que actúa esta quinasa se ven afectadas de forma diferente: LAT se fosforila defectuosamente mientras que la fosforilación de SLP-76 permanece intacta y Vav, en cambio, tiene aumentada su fosforilación. Estas tres moléculas, a su vez, se relacionan entre sí, ya que tanto LAT como SLP-76 se encargan de reclutar a Vav, y permiten su localización en los compartimentos celulares donde ejerce su función. Así, el hecho de que LAT esté débilmente fosforilada supone un defecto en el reclutamiento de fosfo-Vav a la membrana con la consiguiente repercusión de las vías que allí active y por otro lado, el hecho de que el nivel de fosfo-Vav asociado a SLP-76 sea mayor también podría tener repercusión en las funciones que Vav desarrolle en el citosol y citoesqueleto.

Habida cuenta de que todas estas moléculas adaptadoras han sido vinculadas con la inducción de rutas de señalización fundamentales en la activación de la célula T, y dado que se desconocen gran parte de los primeros intermediarios de la señal que son responsables de la activación de muchas de estas vías, hemos tratado de relacionar las alteraciones observadas en Vav por un lado, con la sobreactivación de la vía de Ras/Raf/ERK y por otro, con el defecto en la activación de JNK y p38MAPK manifestado por las células mutantes y hemos tratado de ilustrarlo con el modelo que a continuación se presenta.



La dualidad funcional de Vav podría estar supeditado a la molécula adaptadora a la que se asocia. De modo que cuando es reclutada por LAT a la membrana, podría ejercer su función de GEF de Rac y promover la activación de JNK, p38MAPK y NF-κB. Esta función de Vav podría ser compatible a su vez, con la que ejercería, bien en colaboración con PKCθ, bien asociada a SLP-76 en el citosol, en la activación de la vía de Ras/ERK independiente de Rac-1.

Los estudios con péptidos alterados (APLs), han suscitado la idea de que las células T son capaces de sentir la calidad e intensidad de las estimulaciones del TCR, en virtud del tipo de interacciones que los diferentes complejos ligando-MHC establecen con el mismo TCR. De esta forma, el tipo de interacción MHC-Péptido-TCR determina que se seleccionen específicamente unas respuestas efectoras frente a otras, ello normalmente ligado a patrones de fosforilación en Tyr únicos que no se manifiestan en el caso de interacciones con ligandos agonistas <sup>28;193;194</sup>. En la mayoría de los casos estos sucesos atañen a las diversas formas fosforiladas de ζ y a la activación y reclutamiento de ZAP-70 <sup>195;193;196;30;197</sup>. En esta línea, el sistema experimental en el que se ha trabajado se revela como una herramienta para el estudio de esta capacidad de señalización diferencial del TCR, pero contemplando la interacción péptido-TCR desde el punto de vista del TCR y no del ligando. Así, la mutación en el dominio transmembrana del TCRβ afecta diferencialmente a la apoptosis mediada por FasL, al tiempo que permanecen intactas otras funciones efectoras como la proliferación o la secreción de IL-2, IFNγ y TNFα. En este caso, no se encuentra alterada la relación

entre las distintas formas fosforiladas de  $\zeta$ , ni la activación de ZAP-70. En cambio, es la fosforilación total de  $\zeta$ , junto con el reclutamiento de ZAP-70, lo que está disminuido <sup>43</sup>. El paralelismo entre los dos sistemas se hace patente en trabajos con APLs como el de Combadiere B. et al. <sup>198</sup> en el que a partir de variaciones en residuos del mismo ligando agonista, consiguen la inducción selectiva de apoptosis mediada por FasL y TNF $\alpha$ , frente al bloqueo de la secreción de IL-2, IFN $\gamma$  y IL-3. Bioquímicamente, estas respuestas se apoyan en un fuerte bloqueo de la fosforilación de  $\zeta$  y ZAP-70. En general, se han relacionado las repuestas que generan los APLs con la baja afinidad de la interacción con el TCR, de modo que según la teoría de la estimulación secuencial del TCR, se generarían interacciones inestables, con altas constantes de disociación que podrían explicar así, los característicos patrones de fosforilación. Sin embargo, esta teoría no podría explicar cómo péptidos que inducen las mismas respuestas muestran patrones de fosforilación de  $\zeta$  diferentes <sup>198</sup>, ni como se concilia la baja eficacia de la señalización con la idea de que una interacción de baja afinidad potenciaría un aumento en la ocupación de TCRs con la consiguiente estabilización de la señal. Una alternativa más factible y que concuerda con la información que proporciona nuestro sistema, consiste en atribuir esta generación selectiva de respuestas a alteraciones en las propiedades conformacionales de la interacción péptido-TCR y que, en nuestro caso, podrían estar mimetizadas por la mutación de la región transmembrana de TCR $\beta$ . Sin embargo, los datos de cristalografía no apoyan esta idea.

Los conceptos de muerte y supervivencia y la capacidad del TCR para señalar diferencialmente, cobran especial importancia en los procesos de selección tímica. Los mecanismos que la gobiernan están aún por determinar. En gran medida, los procesos de selección positiva y negativa están mediados por la estimulación del TCR $\alpha\beta$  y se cree que, en función de las interacciones acumulativas con el ligando y de la avidez de las mismas, se configuran umbrales de activación diferentes, capaces de activar distintas cascadas responsables de discriminar entre la selección positiva y negativa <sup>199;200,201</sup>. Diversos trabajos han sugerido que la señalización a través de las diferentes cascadas de MAPKs podrían dirigir hacia la selección positiva o negativa. Las actividades de JNK <sup>202</sup> y p38MAPK<sup>203</sup> han sido relacionadas con la selección negativa. En cambio el grado de activación de ERK se ha mostrado como el sensor capaz de discriminar entre la selección positiva y la negativa <sup>204</sup>, de tal modo que el paso de selección nula  $\rightarrow$  selección positiva  $\rightarrow$  selección negativa, se gradúa por medio de una intensificación de la actividad de ERK<sup>205</sup>.

A partir de los datos de activación de MAPKs obtenidos, podríamos sugerir que el dominio transmembrana de TCR $\beta$  se encarga, probablemente junto con el resto de los dominios, de mantener la integridad estructural del TCR adecuada, como para que se

pueda distinguir entre la selección positiva y negativa, y lo podría ejecutar mediante su capacidad para modular la intensidad de la activación de ERK. Así, en el caso de que los TCRs mutantes en el residuo de Tyr de la transmembrana de la cadena  $\beta$ , fueran estimulados por péptidos agonistas inducirían una activación de ERK semejante a la que inducen los péptidos que dirigen a la selección negativa. Del mismo modo la imposibilidad de inducir una activación de ERK menor, bloquearía la selección positiva. Sin embargo, no debe olvidarse que todos los resultados generados en esta Tesis se asemejan a lo que sucede en células maduras, y existe especial controversia en si los mecanismos de señalización que operan en los linfocitos T maduros son compartidos en el timo por los linfocitos inmaduros.

En relación con esto, los trabajos efectuados con otro dominio del TCR, el péptido de conexión de la cadena  $\alpha$ , han demostrado que este dominio es importante para los procesos de selección positiva. Así, los ratones transgénicos que expresan TCRs con este dominio mutado, tienen bloqueada la selección positiva pero no la negativa, debido a un defecto en la activación de ERK. Esto apoya la idea de que los mecanismos de señalización diferencial que soporta el TCR $\beta$  mutado pudieran ser relevantes en procesos como la selección tímica o en la tolerancia periférica. Esto requeriría de la extrapolación del sistema de TCR $\beta$  mutantes a un modelo in vivo que en la actualidad se está empezando a poner en marcha en nuestro laboratorio.

## **CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

El receptor mutante en la transmembrana de TCR $\beta$  es capaz de soportar algunas respuestas de la célula T pero es incapaz de inducir otras.

- A través de la estimulación del TCR $\beta$  mutante se diseccionan las señales que median la apoptosis ( FasL) frente a las que median la proliferación y secreción de citoquinas ( IL-2, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ ) .
- Los mecanismos que soportan el fenotipo funcional de las células mutantes se han podido adscribir a alteraciones bioquímicas seriadas, tanto a nivel de intermediarios tempranos como tardíos.
- El TCR mutante diversifica las rutas de señalización desde los eventos más tempranos de la señal y lo hace modulando tanto la actividad de intermediarios mediante la fosforilación de Tyr como la ubicación de los mismos en distintos compartimentos celulares.
- Tras estimulación del receptor mutante en TCR $\beta$  se ven afectadas las señales que conducen a la activación de NF-kB y de MAPKs, mientras que la inducción de NF-AT permanece intacta.

La mutación en el dominio transmembrana de TCR $\beta$  tiene importantes consecuencias para la biología de la célula T, y en concreto, para el fenómeno apoptótico puesto que las células mutantes son resistentes a la apoptosis inducida a través de su TCR. El sistema experimental ha permitido:

- Demostrar que NF-kB es esencial para la regulación transcripcional de FasL, habiendo sido identificado un sitio funcionalmente activo en el promotor de dicha molécula inductora de muerte.
- Sugerir que JNK podrían estar involucradas en la regulación temprana de la inducción de FasL.
- Las deficiencias en las rutas de activación de NF-kB , JNK y p38MAPK podrían explicar la resistencia apoptótica en las células mutantes.



## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Acuto, O. and D. Cantrell. 2000. T cell activation and the cytoskeleton. *Annu.Rev.Immunol.* 18:165-184.
2. Blumberg, R. S., S. Ley, J. Sancho, N. Lonberg, E. Lacy, F. McDermott, V. Schad, J. L. Greenstein, and C. Terhorst. 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.U.S.A* 87:7220-7224.
3. de la, H. A., U. Muller, C. Olsson, S. Isaaz, and A. Tunnacliffe. 1991. Structure of the T cell antigen receptor (TCR): two CD3 epsilon subunits in a functional TCR/CD3 complex. *J.Exp.Med.* 173:7-17.
4. Fernandez-Miguel, G., B. Alarcon, A. Iglesias, H. Bluethmann, M. Alvarez-Mon, E. Sanz, and H. A. de la. 1999. Multivalent structure of an alphabetaT cell receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96:1547-1552.
5. San Jose, E., A. G. Sahuquillo, R. Bragado, and B. Alarcon. 1998. Assembly of the TCR/CD3 complex: CD3 epsilon/delta and CD3 epsilon/gamma dimers associate indistinctly with both TCR alpha and TCR beta chains. Evidence for a double TCR heterodimer model. *Eur.J.Immunol.* 28:12-21.
6. Romeo, C. and B. Seed. 1991. Cellular immunity to HIV activated by CD4 fused to T cell or Fc receptor polypeptides. *Cell* 64:1037-1046.
7. Irving, B. A. and A. Weiss. 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.
8. Letourneur, F. and R. D. Klausner. 1991. T-cell and basophil activation through the cytoplasmic tail of T-cell-receptor zeta family proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 88:8905-8909.
9. Letourneur, F. and R. D. Klausner. 1992. Activation of T cells by a tyrosine kinase activation domain in the cytoplasmic tail of CD3 epsilon. *Science* 255:79-82.
10. Liu, H. and D. A. Vignali. 1999. Differential CD3 zeta phosphorylation is not required for the induction of T cell antagonism by altered peptide ligands. *J.Immunol.* 163:599-602.
11. Kersh, E. N., G. J. Kersh, and P. M. Allen. 1999. Partially phosphorylated T cell receptor zeta molecules can inhibit T cell activation. *J.Exp.Med.* 190:1627-1636.
12. Jouvin, M. H., M. Adamczewski, R. Numerof, O. Letourneur, A. Valle, and J. P. Kinet. 1994. Differential control of the tyrosine kinases Lyn and Syk by the two signaling chains of the high affinity immunoglobulin E receptor. *J.Biol.Chem.* 269:5918-5925.

13. Johnson, S. A., C. M. Pleiman, L. Pao, J. Schneringer, K. Hippen, and J. C. Cambier. 1995. Phosphorylated immunoreceptor signaling motifs (ITAMs) exhibit unique abilities to bind and activate Lyn and Syk tyrosine kinases. *J.Immunol.* 155:4596-4603.
14. Osman, N., H. Turner, S. Lucas, K. Reif, and D. A. Cantrell. 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.
15. de, A., I, M. H. Metzger, M. Exley, C. E. Dahl, S. Misra, D. Zheng, L. Varticovski, C. Terhorst, and J. Sancho. 1997. Tyrosine phosphorylation of the CD3-epsilon subunit of the T cell antigen receptor mediates enhanced association with phosphatidylinositol 3-kinase in Jurkat T cells. *J.Biol.Chem.* 272:25310-25318.
16. Ottinger, E. A., M. C. Botfield, and S. E. Shoelson. 1998. Tandem SH2 domains confer high specificity in tyrosine kinase signaling. *J.Biol.Chem.* 273:729-735.
17. Moingeon, P., J. L. Lucich, D. J. McConkey, F. Letourneur, B. Malissen, J. Kochan, H. C. Chang, H. R. Rodewald, and E. L. Reinherz. 1992. CD3 zeta dependence of the CD2 pathway of activation in T lymphocytes and natural killer cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89:1492-1496.
18. Jensen, W. A., C. M. Pleiman, P. Beaufils, A. M. Wegener, B. Malissen, and J. C. Cambier. 1997. Qualitatively distinct signaling through T cell antigen receptor subunits. *Eur.J.Immunol.* 27:707-716.
19. Combadiere, B., M. Freedman, L. Chen, E. W. Shores, P. Love, and M. J. Lenardo. 1996. Qualitative and quantitative contributions of the T cell receptor zeta chain to mature T cell apoptosis. *J.Exp.Med.* 183:2109-2117.
20. van Oers, N. S., P. E. Love, E. W. Shores, and A. Weiss. 1998. Regulation of TCR signal transduction in murine thymocytes by multiple TCR zeta-chain signaling motifs. *J.Immunol.* 160:163-170.
21. Shores, E. W., K. Huang, T. Tran, E. Lee, A. Grinberg, and P. E. Love. 1994. Role of TCR zeta chain in T cell development and selection. *Science* 266:1047-1050.
22. Irving, B. A., A. C. Chan, and A. Weiss. 1993. Functional characterization of a signal transducing motif present in the T cell antigen receptor zeta chain. *J.Exp.Med.* 177:1093-1103.
23. Wegener, A. M., F. Letourneur, A. Hoeveler, T. Brocker, F. Luton, and B. Malissen. 1992. The T cell receptor/CD3 complex is composed of at least two autonomous transduction modules. *Cell* 68:83-95.
24. Ardouin, L., C. Boyer, A. Gillet, J. Trucy, A. M. Bernard, J. Nunes, J. Delon, A. Trautmann, H. T. He, B. Malissen, and M. Malissen. 1999. Crippling of CD3-zeta ITAMs does not impair T cell receptor signaling. *Immunity.* 10:409-420.

25. Shores, E. W., T. Tran, A. Grinberg, C. L. Sommers, H. Shen, and P. E. Love. 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.
26. van der Merwe, P. A. 2001. The TCR triggering puzzle. *Immunity.* 14:665-668.
27. Lanzavecchia, A., G. Lezzi, and A. Viola. 1999. From TCR engagement to T cell activation: a kinetic view of T cell behavior. *Cell* 96:1-4.
28. Sloan-Lancaster, J. and P. M. Allen. 1996. Altered peptide ligand-induced partial T cell activation: molecular mechanisms and role in T cell biology. *Annu.Rev.Immunol.* 14:1-27.
29. Madrenas, J. 1999. Differential signalling by variant ligands of the T cell receptor and the kinetic model of T cell activation. *Life Sci.* 64:717-731.
30. Madrenas, J. and R. N. Germain. 1996. Variant TCR ligands: new insights into the molecular basis of antigen-dependent signal transduction and T-cell activation. *Semin.Immunol.* 8:83-101.
31. Jameson, S. C. and M. J. Bevan. 1995. T cell receptor antagonists and partial agonists. *Immunity.* 2:1-11.
32. Lanzavecchia, A. and F. Sallusto. 2001. Antigen decoding by T lymphocytes: from synapses to fate determination. *Nat.Immunol.* 2:487-492.
33. Johansson, B., E. Palmer, and L. Bolliger. 1999. The extracellular domain of the zeta-chain is essential for TCR function. *J.Immunol.* 162:878-885.
34. Bolliger, L., B. Johansson, and E. Palmer. 1997. The short extracellular domain of the T cell receptor zeta chain is involved in assembly and signal transduction. *Mol.Immunol.* 34:819-827.
35. Backstrom, B. T., E. Milia, A. Peter, B. Jaureguiberry, C. T. Baldari, and E. Palmer. 1996. A motif within the T cell receptor alpha chain constant region connecting peptide domain controls antigen responsiveness. *Immunity.* 5:437-447.
36. Backstrom, B. T., U. Muller, B. Hausmann, and E. Palmer. 1998. Positive selection through a motif in the alphabeta T cell receptor. *Science* 281:835-838.
37. Werlen, G., B. Hausmann, and E. Palmer. 2000. A motif in the alphabeta T-cell receptor controls positive selection by modulating ERK activity. *Nature* 406:422-426.
38. Backstrom, B. T., B. T. Hausmann, and E. Palmer. 1997. Signaling efficiency of the T cell receptor controlled by a single amino acid in the beta chain constant region. *J.Exp.Med.* 186:1933-1938.

39. Backstrom, B. T., B. Rubin, A. Peter, G. Tiefenthaler, and E. Palmer. 1997. T cell receptor alpha-chain tail is required for protein kinase C-mediated down-regulation, but not for signaling. *Eur.J.Immunol.* 27:1433-1441.
40. Manolios, N., J. S. Bonifacino, and R. D. Klausner. 1990. Transmembrane helical interactions and the assembly of the T cell receptor complex. *Science* 249:274-277.
41. Campbell, K. S., B. T. Backstrom, G. Tiefenthaler, and E. Palmer. 1994. CART: a conserved antigen receptor transmembrane motif. *Semin.Immunol.* 6:393-410.
42. Rodriguez-Tarduchy, G., A. G. Sahuquillo, B. Alarcon, and R. Bragado. 1996. Apoptosis but not other activation events is inhibited by a mutation in the transmembrane domain of T cell receptor beta that impairs CD3zeta association. *J.Biol.Chem.* 271:30417-30425.
43. Sahuquillo, A. G., A. Roumier, E. Teixeira, R. Bragado, and B. Alarcon. 1998. T cell receptor (TCR) engagement in apoptosis-defective, but interleukin 2 (IL-2)-producing, T cells results in impaired ZAP70/CD3-zeta association. *J.Exp.Med.* 187:1179-1192.
44. Kunjibettu, S., S. Fuller-Espie, G. B. Carey, and L. M. Spain. 2001. Conserved transmembrane tyrosine residues of the TCR beta chain are required for TCR expression and function in primary T cells and hybridomas. *Int.Immunol.* 13:211-222.
45. Fuller-Espie, S., T. P. Hoffman, D. L. Wiest, I. Tietjen, and L. M. Spain. 1998. Transmembrane polar residues of TCR beta chain are required for signal transduction. *Int.Immunol.* 10:923-933.
46. Xavier, R., T. Brennan, Q. Li, C. McCormack, and B. Seed. 1998. Membrane compartmentation is required for efficient T cell activation. *Immunity.* 8:723-732.
47. Kabouridis, P. S., J. Janzen, A. L. Magee, and S. C. Ley. 2000. Cholesterol depletion disrupts lipid rafts and modulates the activity of multiple signaling pathways in T lymphocytes. *Eur.J.Immunol.* 30:954-963.
48. Montixi, C., C. Langlet, A. M. Bernard, J. Thimonier, C. Dubois, M. A. Wurbel, J. P. Chauvin, M. Pierres, and H. T. He. 1998. Engagement of T cell receptor triggers its recruitment to low-density detergent-insoluble membrane domains. *EMBO J.* 17:5334-5348.
49. van Leeuwen, J. E. and L. E. Samelson. 1999. T cell antigen-receptor signal transduction. *Curr.Opin.Immunol.* 11:242-248.
50. Hegedus, Z., V. Chitu, G. K. Toth, C. Finta, G. Varadi, I. Ando, and E. Monostori. 1999. Contribution of kinases and the CD45 phosphatase to the generation of tyrosine phosphorylation patterns in the T-cell receptor complex zeta chain. *Immunol.Lett.* 67:31-39.

51. Lowin-Kropf, B., V. S. Shapiro, and A. Weiss. 1998. Cytoskeletal polarization of T cells is regulated by an immunoreceptor tyrosine-based activation motif-dependent mechanism. *J.Cell Biol.* 140:861-871.
52. Iwashima, M., B. A. Irving, N. S. van Oers, A. C. Chan, and A. Weiss. 1994. Sequential interactions of the TCR with two distinct cytoplasmic tyrosine kinases. *Science* 263:1136-1139.
53. Tsuchihashi, N., S. Matsuda, E. L. Reinherz, and S. Koyasu. 2000. Two YxxL segments of a single immunoreceptor tyrosine-based activation motif in the CD3zeta molecule differentially activate calcium mobilization and mitogen-activated protein kinase family pathways. *Eur.J.Immunol.* 30:1785-1793.
54. Thomas, M. L. 1999. The regulation of antigen-receptor signaling by protein tyrosine phosphatases: a hole in the story. *Curr.Opin.Immunol.* 11:270-276.
55. Levin, S. D., S. J. Anderson, K. A. Forbush, and R. M. Perlmutter. 1993. A dominant-negative transgene defines a role for p56lck in thymopoiesis. *EMBO J.* 12:1671-1680.
56. Molina, T. J., K. Kishihara, D. P. Siderovski, W. van Ewijk, A. Narendran, E. Timms, A. Wakeham, C. J. Paige, K. U. Hartmann, A. Veillette, and . 1992. Profound block in thymocyte development in mice lacking p56lck. *Nature* 357:161-164.
57. Straus, D. B. and A. Weiss. 1992. Genetic evidence for the involvement of the lck tyrosine kinase in signal transduction through the T cell antigen receptor. *Cell* 70:585-593.
58. Denny, M. F., H. C. Kaufman, A. C. Chan, and D. B. Straus. 1999. The lck SH3 domain is required for activation of the mitogen-activated protein kinase pathway but not the initiation of T-cell antigen receptor signaling. *J.Biol.Chem.* 274:5146-5152.
59. Appleby, M. W., J. A. Gross, M. P. Cooke, S. D. Levin, X. Qian, and R. M. Perlmutter. 1992. Defective T cell receptor signaling in mice lacking the thymic isoform of p59fyn. *Cell* 70:751-763.
60. Negishi, I., N. Motoyama, K. Nakayama, K. Nakayama, S. Senju, S. Hatakeyama, Q. Zhang, A. C. Chan, and D. Y. Loh. 1995. Essential role for ZAP-70 in both positive and negative selection of thymocytes. *Nature* 376:435-438.
61. Gong, Q., L. White, R. Johnson, M. White, I. Negishi, M. Thomas, and A. C. Chan. 1997. Restoration of thymocyte development and function in zap-70-/- mice by the Syk protein tyrosine kinase. *Immunity.* 7:369-377.
62. Elder, M. E., D. Lin, J. Clever, A. C. Chan, T. J. Hope, A. Weiss, and T. G. Parslow. 1994. Human severe combined immunodeficiency due to a defect in ZAP-70, a T cell tyrosine kinase. *Science* 264:1596-1599.

63. Arpaia, E., M. Shahar, H. Dadi, A. Cohen, and C. M. Roifman. 1994. Defective T cell receptor signaling and CD8<sup>+</sup> thymic selection in humans lacking zap-70 kinase. *Cell* 76:947-958.
64. Zhang, W., J. Sloan-Lancaster, J. Kitchen, R. P. Tribble, and L. E. Samelson. 1998. LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. *Cell* 92:83-92.
65. Qian, D., M. N. Mollenauer, and A. Weiss. 1996. Dominant-negative zeta-associated protein 70 inhibits T cell antigen receptor signaling. *J.Exp.Med.* 183:611-620.
66. Williams, B. L., B. J. Irvin, S. L. Sutor, C. C. Chini, E. Yacyshyn, W. J. Bubeck, M. Dalton, A. C. Chan, and R. T. Abraham. 1999. Phosphorylation of Tyr319 in ZAP-70 is required for T-cell antigen receptor-dependent phospholipase C-gamma1 and Ras activation. *EMBO J.* 18:1832-1844.
67. Williams, B. L., K. L. Schreiber, W. Zhang, R. L. Wange, L. E. Samelson, P. J. Leibson, and R. T. Abraham. 1998. Genetic evidence for differential coupling of Syk family kinases to the T-cell receptor: reconstitution studies in a ZAP-70-deficient Jurkat T-cell line. *Mol.Cell Biol.* 18:1388-1399.
68. Zhang, W., R. P. Tribble, and L. E. Samelson. 1998. LAT palmitoylation: its essential role in membrane microdomain targeting and tyrosine phosphorylation during T cell activation. *Immunity.* 9:239-246.
69. Lin, J., A. Weiss, and T. S. Finco. 1999. Localization of LAT in glycolipid-enriched microdomains is required for T cell activation. *J.Biol.Chem.* 274:28861-28864.
70. Zhang, W., B. J. Irvin, R. P. Tribble, R. T. Abraham, and L. E. Samelson. 1999. Functional analysis of LAT in TCR-mediated signaling pathways using a LAT-deficient Jurkat cell line. *Int.Immunol.* 11:943-950.
71. Finco, T. S., T. Kadlecsek, W. Zhang, L. E. Samelson, and A. Weiss. 1998. LAT is required for TCR-mediated activation of PLCgamma1 and the Ras pathway. *Immunity.* 9:617-626.
72. Zhang, W., C. L. Sommers, D. N. Burshtyn, C. C. Stebbins, J. B. Dejarnette, R. P. Tribble, A. Grinberg, H. C. Tsay, H. M. Jacobs, C. M. Kessler, E. O. Long, P. E. Love, and L. E. Samelson. 1999. Essential role of LAT in T cell development. *Immunity.* 10:323-332.
73. Motto, D. G., S. E. Ross, J. Wu, L. R. Hendricks-Taylor, and G. A. Koretzky. 1996. Implication of the GRB2-associated phosphoprotein SLP-76 in T cell receptor-mediated interleukin 2 production. *J.Exp.Med.* 183:1937-1943.
74. Yablonski, D., M. R. Kuhne, T. Kadlecsek, and A. Weiss. 1998. Uncoupling of nonreceptor tyrosine kinases from PLC-gamma1 in an SLP-76-deficient T cell. *Science* 281:413-416.
75. Pivniouk, V. I. and R. S. Geha. 2000. The role of SLP-76 and LAT in lymphocyte development. *Curr.Opin.Immunol.* 12:173-178.

76. Clements, J. L., N. J. Boerth, J. R. Lee, and G. A. Koretzky. 1999. Integration of T cell receptor-dependent signaling pathways by adapter proteins. *Annu.Rev.Immunol.* 17:89-108.
77. Boerth, N. J., J. J. Sadler, D. E. Bauer, J. L. Clements, S. M. Gheith, and G. A. Koretzky. 2000. Recruitment of SLP-76 to the membrane and glycolipid-enriched membrane microdomains replaces the requirement for linker for activation of T cells in T cell receptor signaling. *J.Exp.Med.* 192:1047-1058.
78. Kennedy, J. S., M. Raab, and C. E. Rudd. 1999. Signaling scaffolds in immune cells. *Cell Calcium* 26:227-235.
79. Bubeck, W. J., R. Pappu, J. Y. Bu, B. Mayer, J. Chernoff, D. Straus, and A. C. Chan. 1998. Regulation of PAK activation and the T cell cytoskeleton by the linker protein SLP-76. *Immunity.* 9:607-616.
80. Yablonski, D., L. P. Kane, D. Qian, and A. Weiss. 1998. A Nck-Pak1 signaling module is required for T-cell receptor-mediated activation of NFAT, but not of JNK. *EMBO J.* 17:5647-5657.
81. Murphy, M. A., R. G. Schnall, D. J. Venter, L. Barnett, I. Bertoncello, C. B. Thien, W. Y. Langdon, and D. D. Bowtell. 1998. Tissue hyperplasia and enhanced T-cell signalling via ZAP-70 in c-Cbl-deficient mice. *Mol.Cell Biol.* 18:4872-4882.
82. Peterson, E. J., J. L. Clements, N. Fang, and G. A. Koretzky. 1998. Adaptor proteins in lymphocyte antigen-receptor signaling. *Curr.Opin.Immunol.* 10:337-344.
83. Turner, M., P. J. Mee, A. E. Walters, M. E. Quinn, A. L. Mellor, R. Zamoyska, and V. L. Tybulewicz. 1997. A requirement for the Rho-family GTP exchange factor Vav in positive and negative selection of thymocytes. *Immunity.* 7:451-460.
84. Wu, J., D. G. Motto, G. A. Koretzky, and A. Weiss. 1996. Vav and SLP-76 interact and functionally cooperate in IL-2 gene activation. *Immunity.* 4:593-602.
85. Costello, P. S., A. E. Walters, P. J. Mee, M. Turner, L. F. Reynolds, A. Prisco, N. Sarner, R. Zamoyska, and V. L. Tybulewicz. 1999. The Rho-family GTP exchange factor Vav is a critical transducer of T cell receptor signals to the calcium, ERK, and NF-kappaB pathways. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96:3035-3040.
86. Wulfig, C., A. Bauch, G. R. Crabtree, and M. M. Davis. 2000. The vav exchange factor is an essential regulator in actin-dependent receptor translocation to the lymphocyte-antigen-presenting cell interface. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97:10150-10155.
87. Holsinger, L. J., I. A. Graef, W. Swat, T. Chi, D. M. Bautista, L. Davidson, R. S. Lewis, F. W. Alt, and G. R. Crabtree. 1998. Defects in actin-cap formation in Vav-deficient mice implicate an actin requirement for lymphocyte signal transduction. *Curr.Biol.* 8:563-572.



88. Fischer, K. D., Y. Y. Kong, H. Nishina, K. Tedford, L. E. Marengere, I. Kozieradzki, T. Sasaki, M. Starr, G. Chan, S. Gardener, M. P. Nghiem, D. Bouchard, M. Barbacid, A. Bernstein, and J. M. Penninger. 1998. Vav is a regulator of cytoskeletal reorganization mediated by the T-cell receptor. *Curr.Biol.* 8:554-562.
89. Katzav, S., M. Sutherland, G. Packham, T. Yi, and A. Weiss. 1994. The protein tyrosine kinase ZAP-70 can associate with the SH2 domain of proto-Vav. *J.Biol.Chem.* 269:32579-32585.
90. Salojin, K. V., J. Zhang, C. Meagher, and T. L. Delovitch. 2000. ZAP-70 is essential for the T cell antigen receptor-induced plasma membrane targeting of SOS and Vav in T cells. *J.Biol.Chem.* 275:5966-5975.
91. Kim, H. H., M. Tharayil, and C. E. Rudd. 1998. Growth factor receptor-bound protein 2 SH2/SH3 domain binding to CD28 and its role in co-signaling. *J.Biol.Chem.* 273:296-301.
92. Bustelo, X. R. 2000. Regulatory and signaling properties of the Vav family. *Mol.Cell Biol.* 20:1461-1477.
93. Fang, N. and G. A. Koretzky. 1999. SLP-76 and Vav function in separate, but overlapping pathways to augment interleukin-2 promoter activity. *J.Biol.Chem.* 274:16206-16212.
94. Seger, R. and E. G. Krebs. 1995. The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* 9:726-735.
95. Marais, R., Y. Light, C. Mason, H. Paterson, M. F. Olson, and C. J. Marshall. 1998. Requirement of Ras-GTP-Raf complexes for activation of Raf-1 by protein kinase C. *Science* 280:109-112.
96. Villalba, M., J. Hernandez, M. Deckert, Y. Tanaka, and A. Altman. 2000. Vav modulation of the Ras/MEK/ERK signaling pathway plays a role in NFAT activation and CD69 up-regulation. *Eur.J.Immunol.* 30:1587-1596.
97. Cruzalegui, F. H., G. E. Hardingham, and H. Bading. 1999. c-Jun functions as a calcium-regulated transcriptional activator in the absence of JNK/SAPK1 activation. *EMBO J.* 18:1335-1344.
98. Villalba, M., N. Coudronniere, M. Deckert, E. Teixeira, P. Mas, and A. Altman. 2000. A novel functional interaction between Vav and PKCtheta is required for TCR-induced T cell activation. *Immunity.* 12:151-160.
99. Faris, M., N. Kokot, L. Lee, and A. E. Nel. 1996. Regulation of interleukin-2 transcription by inducible stable expression of dominant negative and dominant active mitogen-activated protein kinase kinase kinase in jurkat T cells. Evidence for the importance of Ras in a pathway that is controlled by dual receptor stimulation. *J.Biol.Chem.* 271:27366-27373.
100. Avraham, A., S. Jung, Y. Samuels, R. Seger, and Y. Ben Neriah. 1998. Co-stimulation-dependent activation of a JNK-kinase in T lymphocytes. *Eur.J.Immunol.* 28:2320-2330.

101. Su, B., E. Jacinto, M. Hibi, T. Kallunki, M. Karin, and Y. Ben Neriah. 1994. JNK is involved in signal integration during costimulation of T lymphocytes. *Cell* 77:727-736.
102. Kaminuma, O., M. Deckert, C. Elly, Y. C. Liu, and A. Altman. 2001. Vav-Rac1-Mediated Activation of the c-Jun N-Terminal Kinase/c-Jun/AP-1 Pathway Plays a Major Role in Stimulation of the Distal NFAT Site in the Interleukin-2 Gene Promoter. *Mol.Cell Biol.* 21:3126-3136.
103. Hehner, S. P., T. G. Hofmann, O. Dienz, W. Droge, and M. L. Schmitz. 2000. Tyrosine-phosphorylated Vav1 as a point of integration for T-cell rece. *J.Biol.Chem.* 275:18160-18171.
104. Karin, M. 1995. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J.Biol.Chem.* 270:16483-16486.
105. Bagrodia, S., B. Derijard, R. J. Davis, and R. A. Cerione. 1995. Cdc42 and PAK-mediated signaling leads to Jun kinase and p38 mitogen-activated protein kinase activation. *J.Biol.Chem.* 270:27995-27998.
106. Kane, L. P., J. Lin, and A. Weiss. 2000. Signal transduction by the TCR for antigen. *Curr.Opin.Immunol.* 12:242-249.
107. Sabapathy, K., Y. Hu, T. Kallunki, M. Schreiber, J. P. David, W. Jochum, E. F. Wagner, and M. Karin. 1999. JNK2 is required for efficient T-cell activation and apoptosis but not for normal lymphocyte development. *Curr.Biol.* 9:116-125.
108. Han, J., J. D. Lee, L. Bibbs, and R. J. Ulevitch. 1994. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* 265:808-811.
109. Hale, K. K., D. Trollinger, M. Rihaneck, and C. L. Manthey. 1999. Differential expression and activation of p38 mitogen-activated protein kinase alpha, beta, gamma, and delta in inflammatory cell lineages. *J.Immunol.* 162:4246-4252.
110. Hsu, S. C., M. A. Gavrilin, M. H. Tsai, J. Han, and M. Z. Lai. 1999. p38 mitogen-activated protein kinase is involved in Fas ligand expression. *J.Biol.Chem.* 274:25769-25776.
111. Lu, H. T., D. D. Yang, M. Wysk, E. Gatti, I. Mellman, R. J. Davis, and R. A. Flavell. 1999. Defective IL-12 production in mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase 3 (Mkk3)-deficient mice. *EMBO J.* 18:1845-1857.
112. Garrington, T. P. and G. L. Johnson. 1999. Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr.Opin.Cell Biol.* 11:211-218.
113. Schaeffer, H. J. and M. J. Weber. 1999. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol.Cell Biol.* 19:2435-2444.
114. Su, B. and M. Karin. 1996. Mitogen-activated protein kinase cascades and regulation of gene expression. *Curr.Opin.Immunol.* 8:402-411.

115. Karin, M. and Y. Ben Neria. 2000. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- $\kappa$ B activity. *Annu.Rev.Immunol.* 18:621-663.
116. Lee, F. S., J. Hagler, Z. J. Chen, and T. Maniatis. 1997. Activation of the IkappaB alpha kinase complex by MEKK1, a kinase of the JNK pathway. *Cell* 88:213-222.
117. Baud, V., Z. G. Liu, B. Bennett, N. Suzuki, Y. Xia, and M. Karin. 1999. Signaling by proinflammatory cytokines: oligomerization of TRAF2 and TRAF6 is sufficient for JNK and IKK activation and target gene induction via an amino-terminal effector domain. *Genes Dev.* 13:1297-1308.
118. Lin, X., A. O'Mahony, Y. Mu, R. Geleziunas, and W. C. Greene. 2000. Protein kinase C-theta participates in NF-kappaB activation induced by CD3-CD28 costimulation through selective activation of IkappaB kinase beta. *Mol.Cell Biol.* 20:2933-2940.
119. Coudronniere, N., M. Villalba, N. Englund, and A. Altman. 2000. NF-kappa B activation induced by T cell receptor/CD28 costimulation is mediated by protein kinase C-theta. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97:3394-3399.
120. Ghosh, S., M. J. May, and E. B. Kopp. 1998. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu.Rev.Immunol.* 16:225-260.
121. Baldwin, A. S., Jr. 1996. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu.Rev.Immunol.* 14:649-683.
122. Genot, E., S. Cleverley, S. Henning, and D. Cantrell. 1996. Multiple p21ras effector pathways regulate nuclear factor of activated T cells. *EMBO J.* 15:3923-3933.
123. Rao, A., C. Luo, and P. G. Hogan. 1997. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu.Rev.Immunol.* 15:707-747.
124. Casolaro, V., S. N. Georas, Z. Song, I. D. Zubkoff, S. A. Abdulkadir, D. Thanos, and S. J. Ono. 1995. Inhibition of NF-AT-dependent transcription by NF-kappa B: implications for differential gene expression in T helper cell subsets. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92:11623-11627.
125. Mittelstadt, P. R. and J. D. Ashwell. 1998. Cyclosporin A-sensitive transcription factor Egr-3 regulates Fas ligand expression. *Mol.Cell Biol.* 18:3744-3751.
126. Latinis, K. M., L. A. Norian, S. L. Eliason, and G. A. Koretzky. 1997. Two NFAT transcription factor binding sites participate in the regulation of CD95 (Fas) ligand expression in activated human T cells. *J.Biol.Chem.* 272:31427-31434.
127. Monks, C. R., H. Kupfer, I. Tamir, A. Barlow, and A. Kupfer. 1997. Selective modulation of protein kinase C-theta during T-cell activation. *Nature* 385:83-86.

128. Werlen, G., E. Jacinto, Y. Xia, and M. Karin. 1998. Calcineurin preferentially synergizes with PKC-theta to activate JNK and IL-2 promoter in T lymphocytes. *EMBO J.* 17:3101-3111.
129. Baier-Bitterlich, G., F. Uberall, B. Bauer, F. Fresser, H. Wachter, H. Grunicke, G. Utermann, A. Altman, and G. Baier. 1996. Protein kinase C-theta isoenzyme selective stimulation of the transcription factor complex AP-1 in T lymphocytes. *Mol. Cell Biol.* 16:1842-1850.
130. Sanchez-Gongora, E., C. Lisbona, R. de Gregorio, A. Ballester, V. Calvo, L. Perez-Jurado, and S. Alemany. 2000. COT kinase proto-oncogene expression in T cells: implication of the JNK/SAPK signal transduction pathway in COT promoter activation. *J. Biol. Chem.* 275:31379-31386.
131. Wesselborg, S. and D. Kabelitz. 1993. Activation-driven death of human T cell clones: time course kinetics of the induction of cell shrinkage, DNA fragmentation, and cell death. *Cell Immunol.* 148:234-241.
132. Boehme, S. A. and M. J. Lenardo. 1993. Ligand-induced apoptosis of mature T lymphocytes (propriciodal regulation) occurs at distinct stages of the cell cycle. *Leukemia* 7 Suppl 2:S45-S49.
133. Rathmell, J. C. and C. B. Thompson. 1999. The central effectors of cell death in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 17:781-828.
134. Russell, J. H. 1995. Activation-induced death of mature T cells in the regulation of immune responses. *Curr. Opin. Immunol.* 7:382-388.
135. Dhein, J., H. Walczak, C. Baumler, K. M. Debatin, and P. H. Krammer. 1995. Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). *Nature* 373:438-441.
136. Ju, S. T., D. J. Panka, H. Cui, R. Ettinger, M. el Khatib, D. H. Sherr, B. Z. Stanger, and A. Marshak-Rothstein. 1995. Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. *Nature* 373:444-448.
137. Ettinger, R., D. J. Panka, J. K. Wang, B. Z. Stanger, S. T. Ju, and A. Marshak-Rothstein. 1995. Fas ligand-mediated cytotoxicity is directly responsible for apoptosis of normal CD4+ T cells responding to a bacterial superantigen. *J. Immunol.* 154:4302-4308.
138. Russell, J. H. and R. Wang. 1993. Autoimmune gld mutation uncouples suicide and cytokine/proliferation pathways in activated, mature T cells. *Eur. J. Immunol.* 23:2379-2382.
139. Watanabe-Fukunaga, R., C. I. Brannan, N. G. Copeland, N. A. Jenkins, and S. Nagata. 1992. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 356:314-317.
140. Takahashi, T., M. Tanaka, C. I. Brannan, N. A. Jenkins, N. G. Copeland, T. Suda, and S. Nagata. 1994. Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell* 76:969-976.

141. Miyawaki, T., T. Uehara, R. Nibu, T. Tsuji, A. Yachie, S. Yonehara, and N. Taniguchi. 1992. Differential expression of apoptosis-related Fas antigen on lymphocyte subpopulations in human peripheral blood. *J.Immunol.* 149:3753-3758.
142. Takahashi, T., M. Tanaka, J. Inazawa, T. Abe, T. Suda, and S. Nagata. 1994. Human Fas ligand: gene structure, chromosomal location and species specificity. *Int.Immunol.* 6:1567-1574.
143. Faris, M., K. M. Latinis, S. J. Kempiak, G. A. Koretzky, and A. Nel. 1998. Stress-induced Fas ligand expression in T cells is mediated through a MEK kinase 1-regulated response element in the Fas ligand promoter. *Mol.Cell Biol.* 18:5414-5424.
144. Li-Weber, M., O. Laur, and P. H. Krammer. 1999. Novel Egr/NF-AT composite sites mediate activation of the CD95 (APO-1/Fas) ligand promoter in response to T cell stimulation. *Eur.J.Immunol.* 29:3017-3027.
145. Brunner, T., S. Kasibhatla, M. J. Pinkoski, C. Frutschi, N. J. Yoo, F. Echeverri, A. Mahboubi, and D. R. Green. 2000. Expression of Fas ligand in activated T cells is regulated by c-Myc. *J.Biol.Chem.* 275:9767-9772.
146. Kasibhatla, S., L. Genestier, and D. R. Green. 1999. Regulation of fas-ligand expression during activation-induced cell death in T lymphocytes via nuclear factor kappaB. *J.Biol.Chem.* 274:987-992.
147. Matsui, K., A. Fine, B. Zhu, A. Marshak-Rothstein, and S. T. Ju. 1998. Identification of two NF-kappa B sites in mouse CD95 ligand (Fas ligand) promoter: functional analysis in T cell hybridoma. *J.Immunol.* 161:3469-3473.
148. Teixeira, E., A. Garcia-Sahuquillo, B. Alarcon, and R. Bragado. 1999. Apoptosis-resistant T cells have a deficiency in NF-kappaB-mediated induction of Fas ligand transcription. *Eur.J.Immunol.* 29:745-754.
149. Xiao, S., K. Matsui, A. Fine, B. Zhu, A. Marshak-Rothstein, R. L. Widom, and S. T. Ju. 1999. FasL promoter activation by IL-2 through SP1 and NFAT but not Egr-2 and Egr-3. *Eur.J.Immunol.* 29:3456-3465.
150. Hsu, S. C., M. A. Gavrilin, H. H. Lee, C. C. Wu, S. H. Han, and M. Z. Lai. 1999. NF-kappa B-dependent Fas ligand expression. *Eur.J.Immunol.* 29:2948-2956.
151. Van Antwerp, D. J., S. J. Martin, T. Kafri, D. R. Green, and I. M. Verma. 1996. Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappaB. *Science* 274:787-789.
152. Beg, A. A. and D. Baltimore. 1996. An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science* 274:782-784.
153. Guo, Q., N. Robinson, and M. P. Mattson. 1998. Secreted beta-amyloid precursor protein counteracts the proapoptotic action of mutant presenilin-1 by activation of NF-kappaB and stabilization of calcium homeostasis. *J.Biol.Chem.* 273:12341-12351.

154. Li, Q., D. Van Antwerp, F. Mercurio, K. F. Lee, and I. M. Verma. 1999. Severe liver degeneration in mice lacking the I $\kappa$ B kinase 2 gene. *Science* 284:321-325.
155. Rivera-Walsh, I., M. E. Cvijic, G. Xiao, and S. C. Sun. 2000. The NF-kappa B signaling pathway is not required for Fas ligand gene induction but mediates protection from activation-induced cell death. *J.Biol.Chem.* 275:25222-25230.
156. Kauffmann-Zeh, A., P. Rodriguez-Viciano, E. Ulrich, C. Gilbert, P. Coffey, J. Downward, and G. Evan. 1997. Suppression of c-Myc-induced apoptosis by Ras signalling through PI(3)K and PKB. *Nature* 385:544-548.
157. Sutherland, C. L., A. W. Heath, S. L. Pelech, P. R. Young, and M. R. Gold. 1996. Differential activation of the ERK, JNK, and p38 mitogen-activated protein kinases by CD40 and the B cell antigen receptor. *J.Immunol.* 157:3381-3390.
158. van den Brink, M. R., R. Kapeller, J. C. Pratt, J. H. Chang, and S. J. Burakoff. 1999. The extracellular signal-regulated kinase pathway is required for activation-induced cell death of T cells. *J.Biol.Chem.* 274:11178-11185.
159. Xia, Z., M. Dickens, J. Raingeaud, R. J. Davis, and M. E. Greenberg. 1995. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270:1326-1331.
160. Verheij, M., R. Bose, X. H. Lin, B. Yao, W. D. Jarvis, S. Grant, M. J. Birrer, E. Szabo, L. I. Zon, J. M. Kyriakis, A. Haimovitz-Friedman, Z. Fuks, and R. N. Kolesnick. 1996. Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. *Nature* 380:75-79.
161. Dong, C., D. D. Yang, M. Wysk, A. J. Whitmarsh, R. J. Davis, and R. A. Flavell. 1998. Defective T cell differentiation in the absence of Jnk1. *Science* 282:2092-2095.
162. Nishina, H., K. D. Fischer, L. Radvanyi, A. Shahinian, R. Hakem, E. A. Rubie, A. Bernstein, T. W. Mak, J. R. Woodgett, and J. M. Penninger. 1997. Stress-signalling kinase Sek1 protects thymocytes from apoptosis mediated by CD95 and CD3. *Nature* 385:350-353.
163. Sen, J., R. Kapeller, R. Fragoso, R. Sen, L. I. Zon, and S. J. Burakoff. 1996. Intrathymic signals in thymocytes are mediated by p38 mitogen-activated protein kinase. *J.Immunol.* 156:4535-4538.
164. Zhang, J., J. X. Gao, K. Salojin, Q. Shao, M. Grattan, C. Meagher, D. W. Laird, and T. L. Delovitch. 2000. Regulation of fas ligand expression during activation-induced cell death in T cells by p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun NH2-terminal kinase. *J.Exp.Med.* 191:1017-1030.
165. Faris, M., N. Kokot, K. Latinis, S. Kasibhatla, D. R. Green, G. A. Koretzky, and A. Nel. 1998. The c-Jun N-terminal kinase cascade plays a role in stress-induced apoptosis in Jurkat cells by up-regulating Fas ligand expression. *J.Immunol.* 160:134-144.

166. Liu, Z. G., H. Hsu, D. V. Goeddel, and M. Karin. 1996. Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell* 87:565-576.
167. Lenczowski, J. M., L. Dominguez, A. M. Eder, L. B. King, C. M. Zacharchuk, and J. D. Ashwell. 1997. Lack of a role for Jun kinase and AP-1 in Fas-induced apoptosis. *Mol.Cell Biol.* 17:170-181.
168. Huang, S., Y. Jiang, Z. Li, E. Nishida, P. Mathias, S. Lin, R. J. Ulevitch, G. R. Nemerow, and J. Han. 1997. Apoptosis signaling pathway in T cells is composed of ICE/Ced-3 family proteases and MAP kinase kinase 6b. *Immunity.* 6:739-749.
169. Holmstrom, T. H., I. Schmitz, T. S. Soderstrom, M. Poukkula, V. L. Johnson, S. C. Chow, P. H. Krammer, and J. E. Eriksson. 2000. MAPK/ERK signaling in activated T cells inhibits CD95/Fas-mediated apoptosis downstream of DISC assembly. *EMBO J.* 19:5418-5428.
170. Latinis, K. M., L. L. Carr, E. J. Peterson, L. A. Norian, S. L. Eliason, and G. A. Koretzky. 1997. Regulation of CD95 (Fas) ligand expression by TCR-mediated signaling events. *J.Immunol.* 158:4602-4611.
171. Kasibhatla, S., T. Brunner, L. Genestier, F. Echeverri, A. Mahboubi, and D. R. Green. 1998. DNA damaging agents induce expression of Fas ligand and subsequent apoptosis in T lymphocytes via the activation of NF-kappa B and AP-1. *Mol.Cell* 1:543-551.
172. Alkan, S., C. Akdis, and H. Towbin. 1994. Chemiluminescent and enzyme-linked immuno assays for sensitive detection of human IFN-gamma. *J.Immunoassay* 15:217-238.
173. Pimentel-Muinos, F. X., J. Mazana, and M. Fresno. 1995. Biphasic control of nuclear factor-kappa B activation by the T cell receptor complex: role of tumor necrosis factor alpha. *Eur.J.Immunol.* 25:179-186.
174. Thien, C. B., D. D. Bowtell, and W. Y. Langdon. 1999. Perturbed regulation of ZAP-70 and sustained tyrosine phosphorylation of LAT and SLP-76 in c-Cbl-deficient thymocytes. *J.Immunol.* 162:7133-7139.
175. Michel, F., L. Grimaud, L. Tuosto, and O. Acuto. 1998. Fyn and ZAP-70 are required for Vav phosphorylation in T cells stimulated by antigen-presenting cells. *J.Biol.Chem.* 273:31932-31938.
176. Harder, T. and M. Kuhn. 2000. Selective accumulation of raft-associated membrane protein LAT in T cell receptor signaling assemblies. *J.Cell Biol.* 151:199-208.
177. Tuosto, L., I. Parolini, S. Schroder, M. Sargiacomo, A. Lanzavecchia, and A. Viola. 2001. Organization of plasma membrane functional rafts upon T cell activation. *Eur.J.Immunol.* 31:345-349.

178. Tuosto, L., F. Michel, and O. Acuto. 1996. p95vav associates with tyrosine-phosphorylated SLP-76 in antigen-stimulated T cells. *J.Exp.Med.* 184:1161-1166.
179. Herndon, T. M., X. C. Shan, G. C. Tsokos, and R. L. Wange. 2001. Zap-70 and slp-76 regulate protein kinase C-theta and NF-kappaB activation in response to engagement of CD3 and CD28. *J.Immunol.* 166:5654-5664.
180. Tartare-Deckert, S., M. N. Monthouel, C. Charvet, I. Foucault, E. Van Obberghen, A. Bernard, A. Altman, and M. Deckert. 2001. Vav2 activates c-fos serum response element and CD69 expression, but negatively regulates NF-AT and IL-2 gene activation in T lymphocyte. *J.Biol.Chem.*
181. D'Ambrosio, D., D. A. Cantrell, L. Frati, A. Santoni, and R. Testi. 1994. Involvement of p21ras activation in T cell CD69 expression. *Eur.J.Immunol.* 24:616-620.
182. Taylor-Fishwick, D. A. and J. N. Siegel. 1995. Raf-1 provides a dominant but not exclusive signal for the induction of CD69 expression on T cells. *Eur.J.Immunol.* 25:3215-3221.
183. Zheng, L., G. Fisher, R. E. Miller, J. Peschon, D. H. Lynch, and M. J. Lenardo. 1995. Induction of apoptosis in mature T cells by tumour necrosis factor. *Nature* 377:348-351.
184. Yablonski, D., T. Kadlecsek, and A. Weiss. 2001. Identification of a phospholipase C-gamma1 (PLC-gamma1) SH3 domain-binding site in SLP-76 required for T-cell receptor-mediated activation of PLC-gamma1 and NFAT. *Mol.Cell Biol.* 21:4208-4218.
185. Fang, N., D. G. Motto, S. E. Ross, and G. A. Koretzky. 1996. Tyrosines 113, 128, and 145 of SLP-76 are required for optimal augmentation of NFAT promoter activity. *J.Immunol.* 157:3769-3773.
186. Hill, C. S. and R. Treisman. 1995. Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. *Cell* 80:199-211.
187. Lee, F. S., R. T. Peters, L. C. Dang, and T. Maniatis. 1998. MEKK1 activates both I-kappaB kinase alpha and I-kappaB kinase beta. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95:9319-9324.
188. Bruyns, E., A. Marie-Cardine, H. Kirchgessner, K. Sagolla, A. Shevchenko, M. Mann, F. Autschbach, A. Bensussan, S. Meuer, and B. Schraven. 1998. T cell receptor (TCR) interacting molecule (TRIM), a novel disulfide-linked dimer associated with the TCR-CD3-zeta complex, recruits intracellular signaling proteins to the plasma membrane. *J.Exp.Med.* 188:561-575.
189. Salojin, K. V., J. Zhang, and T. L. Delovitch. 1999. TCR and CD28 are coupled via ZAP-70 to the activation of the Vav/Rac-1-/PAK-1/p38 MAPK signaling pathway. *J.Immunol.* 163:844-853.
190. Karandikar, M., S. Xu, and M. H. Cobb. 2000. MEKK1 binds raf-1 and the ERK2 cascade components. *J.Biol.Chem.* 275:40120-40127.



191. Leppa, S., R. Saffrich, W. Ansorge, and D. Bohmann. 1998. Differential regulation of c-Jun by ERK and JNK during PC12 cell differentiation. *EMBO J.* 17:4404-4413.
192. Johnson, N. L., A. M. Gardner, K. M. Diener, C. A. Lange-Carter, J. Gleavy, M. B. Jarpe, A. Minden, M. Karin, L. I. Zon, and G. L. Johnson. 1996. Signal transduction pathways regulated by mitogen-activated/extracellular response kinase kinase kinase induce cell death. *J.Biol.Chem.* 271:3229-3237.
193. Sloan-Lancaster, J., A. S. Shaw, J. B. Rothbard, and P. M. Allen. 1994. Partial T cell signaling: altered phospho-zeta and lack of zap70 recruitment in APL-induced T cell anergy. *Cell* 79:913-922.
194. Sousa, C., E. H. Levine, and R. N. Germain. 1996. Partial signaling by CD8+ T cells in response to antagonist ligands. *J.Exp.Med.* 184:149-157.
195. Evavold, B. D., J. Sloan-Lancaster, and P. M. Allen. 1993. Tickling the TCR: selective T-cell functions stimulated by altered peptide ligands. *Immunol.Today* 14:602-609.
196. Madrenas, J., R. L. Wange, J. L. Wang, N. Isakov, L. E. Samelson, and R. N. Germain. 1995. Zeta phosphorylation without ZAP-70 activation induced by TCR antagonists or partial agonists. *Science* 267:515-518.
197. Jameson, S. C. and M. J. Bevan. 1998. T-cell selection. *Curr.Opin.Immunol.* 10:214-219.
198. Combadiere, B., C. R. Sousa, R. N. Germain, and M. J. Lenardo. 1998. Selective induction of apoptosis in mature T lymphocytes by variant T cell receptor ligands. *J.Exp.Med.* 187:349-355.
199. Ashton-Rickardt, P. G. and S. Tonegawa. 1994. A differential-avidity model for T-cell selection. *Immunol.Today* 15:362-366.
200. Jameson, S. C., K. A. Hogquist, and M. J. Bevan. 1995. Positive selection of thymocytes. *Annu.Rev.Immunol.* 13:93-126.
201. Sebzda, E., S. Mariathasan, T. Ohteki, R. Jones, M. F. Bachmann, and P. S. Ohashi. 1999. Selection of the T cell repertoire. *Annu.Rev.Immunol.* 17:829-874.
202. Rincon, M., A. Whitmarsh, D. D. Yang, L. Weiss, B. Derijard, P. Jayaraj, R. J. Davis, and R. A. Flavell. 1998. The JNK pathway regulates the In vivo deletion of immature CD4(+)CD8(+) thymocytes. *J.Exp.Med.* 188:1817-1830.
203. Sugawara, T., T. Moriguchi, E. Nishida, and Y. Takahama. 1998. Differential roles of ERK and p38 MAP kinase pathways in positive and negative selection of T lymphocytes. *Immunity.* 9:565-574.
204. Bommhardt, U., Y. Scheuring, C. Bickel, R. Zamoyska, and T. Hunig. 2000. MEK activity regulates negative selection of immature CD4+CD8+ thymocytes. *J.Immunol.* 164:2326-2337.

205. Mariathasan, S., S. S. Ho, A. Zakarian, and P. S. Ohashi. 2000. Degree of ERK activation influences both positive and negative thymocyte selection. *Eur.J.Immunol.* 30:1060-1068.

Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral, se han publicado los siguientes artículos:

**TÍTULO:** T cell receptor (TCR) engagement in apoptosis-defective, but interleukin 2 (IL-2)-producing, T cells results in impaired ZAP-70/CD3- $\zeta$  association.

**AUTORES:** A. García-Sahuquillo, A. Roumier, **E. Teixeira**, R. Bragado y B. Alarcón.

**REVISTA:** J.Exp. Med. 1998. 187: 1179-1192.

**TÍTULO:** Increased Expression of Vascular Endotelial Growth Factor in Pyogenic Granulomas.

**AUTORES:** R. Bragado, E. Bello, L. Requena, G. Renedo, **E. Teixeira**, M. V. Alvarez, M.A. Castilla y C. Caramelo.

**REVISTA:** Acta Derm. Venereol. 1999;79: 1-4..

**TÍTULO:** Disruption of Cadherin-Related Junctions Triggers Autocrine Expression of Vascular Endotelial Growth Factor in Bovine Aortic Endothelial Cells. Effects on Cell Proliferation and Death Resistance.

**AUTORES:** M.A. Castilla, M. V. Alvarez, E. Aceituno, P. Aragoncillo, F.R. González, **E. Teixeira**, R. Bragado y C. Caramelo.

**REVISTA:** Circ. Res. 1999. 85:1132-1138

**TÍTULO:** Apoptosis-resistant T cells have a deficiency in NF- $\kappa$ B-mediated induction of Fas ligand transcription.

**AUTORES:** **E. Teixeira**, A. García-Sahuquillo, Balbino Alarcón y R. Bragado.

**REVISTA:** Eur. J. Immunol. 1999. 29:745-754

**TÍTULO:** A novel functional interaction between Vav and PKC $\theta$  is required for TCR-induced T cell activation.

**AUTORES:** M.Villalba, N. Coudronniere, M Deckert, **E. Teixeira**, P. Mas y Altman A.

**REVISTA:** Immunity. 2000 Feb;12(2):151-60

**TÍTULO:** Localization of the Lipid receptors CD36 and CLA-1/SR-BI in the Human Gastrointestinal Tract : Towards the identification of Receptors Mediating the Intestinal Absorption of Dietary Lipids.

**AUTORES:** M.Lobo, L.Huerta, N. Ruíz- Velasco, **E. Teixeira**, P. de la Cueva, A. Celdrán, A. Martín Hidalgo, M.A. Vega y R. Bragado

**REVISTA:** J Histochem Cytochem. 2001 Oct;49(10):1253-60.

**TITULO:** TCR-mediated signal transduction controlled by the  $\beta$  chain transmembrane domain : Apoptosis deficient- but normally display unbalanced MAPKs activation levels upon TCR engagement.

**AUTORES:** **E. Teixeira**, P. Fuentes, B. Galocha, B. Alarcón y R. Bragado

**REVISTA:** J. Biol. Chem. Sometido a publicación.

A continuación se presenta una copia de los trabajos que están más relacionados con esta Tesis.

# T Cell Receptor (TCR) Engagement in Apoptosis-defective, but Interleukin 2 (IL-2)-producing, T Cells Results in Impaired ZAP70/CD3- $\zeta$ Association

By Almudena G. Sahuquillo,\* Anne Roumier,<sup>§</sup> Emma Teixeira,<sup>‡</sup> Rafael Bragado,\* and Balbino Alarcón<sup>§</sup>

From the \*Department of Immunology, Fundación Jiménez-Díaz, Avenida Reyes Católicos 2, 28040 Madrid, Spain; <sup>‡</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Universidad Complutense de Madrid, Spain; and <sup>§</sup>Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC-Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

## Summary

We have previously shown that a tyrosine to leucine replacement in the transmembrane region of T cell receptor (TCR)- $\beta$  results in a deficient induction of CD95-L and apoptosis upon TCR triggering in a transfected T cell line. By contrast, interleukin (IL)-2 production and the expression of CD25 and CD69 were normally induced. Since the mutation in TCR- $\beta$  also resulted in impaired association of CD3- $\zeta$ , it was proposed that this chain is specifically required for the induction of apoptosis. We now show that the deficient induction of CD95-L and apoptosis does not derive from a general lower production of second messengers, since intracellular  $Ca^{2+}$  fluxes and tyrosine phosphorylation of total proteins were elicited at wild-type levels. Unlike in T cell clones stimulated with partial agonists, both p21 and p18 forms of tyrosine-phosphorylated CD3- $\zeta$  were detected, although the overall level of tyrosine-phosphorylated CD3- $\zeta$  was low. More strikingly, inducible association of ZAP70 to CD3- $\zeta$  was strongly inhibited, despite a normal induction of ZAP70 tyrosine phosphorylation. Finally, ZAP70 was not concentrated near the plasma membrane in the apoptosis-deficient cells. These results suggest that CD3- $\zeta$  is necessary for engagement of a specific signaling pathway leading to CD95-L expression that also needs the recruitment of ZAP70.

The TCR complex is composed of two functionally distinct modules. Whereas the TCR- $\alpha/\beta$  heterodimer is responsible for recognition of the antigen/MHC ligand, the cytoplasmic tails of the CD3 components (CD3- $\gamma$ , CD3- $\delta$ , CD3- $\epsilon$ , CD3- $\zeta$ ) are responsible for signal transduction. Thus, engagement of the TCR initiates a cascade of signal transduction events that trigger T cell proliferation and differentiation. It seems that the earliest activation event measurable is the recruitment and activation of non-receptor tyrosine kinases of the Src family that in turn phosphorylate the tyrosine residues of the immunoreceptor tyrosine-based activation motifs (ITAMs)<sup>1</sup> present in the cytoplasmic tails of the CD3 chains (1–4). CD3- $\gamma$ , CD3- $\delta$ , and CD3- $\epsilon$  each contain one ITAM, whereas CD3- $\zeta$  contains three. It has been proposed that the multiplicity of ITAMs in the TCR complex may serve primarily to am-

plify TCR activation signals. Once phosphorylated, the ITAMs become sites for high-affinity binding of tyrosine kinases of the Syk family, mainly of ZAP70 in T cells, through their tandem src homology 2 (SH2) domains (5–8). After binding to the phosphorylated ITAMs, ZAP70 becomes tyrosine phosphorylated and activated by a src kinase, which is thought to be primarily Lck (9). Once activated, ZAP70 probably autophosphorylates on multiple tyrosine residues (2), thus generating docking sites for SH2 domain-containing proteins, including Lck and Vav (10, 11). Subsequently, downstream effector functions are triggered, including the mobilization of intracellular  $Ca^{2+}$  and the transport to the nucleus of an array of transcription factors that drive, among others, cytokine gene expression and programmed cell death.

Programmed cell death and its accompanying morphological changes, called apoptosis, are active processes by which unnecessary or harmful cells are self-eliminated in multicellular organisms (12, 13). Evidence has accumulated that signaling through the TCR complex can elicit apoptosis in immature thymocytes, human leukemic T cells, and mature peripheral T cells (14). This mechanism contributes

<sup>1</sup>Abbreviations used in this paper: APL, altered peptide ligands; ECL, enhanced chemiluminescence; GFP, green fluorescent protein; ITAM, immunoreceptor tyrosine-based activation motif; NFAT, nuclear factor of activated T cells; SEB, *Staphylococcal enterotoxin B*; SH2, src homology 2.

The first two authors contributed equally to this work.

to the downregulation of ongoing peripheral immune responses and to the establishment of tolerance to self-antigens. Engagement of the TCR frequently triggers both proliferation and death of mature cells, raising the question of how these two outcomes are differentially regulated. Several members of the growing families of the TNF and TNFR have been shown to be involved in mediation of the final stages of programmed cell death (for recent reviews see references 15–17). Of these members, it seems that the fas-ligand (CD95-L), TNF, and their receptors (fas or CD95, TNFR1, and TNFR2) are the most important mediators of apoptosis in peripheral T cells (18, 19). Stimulation of the TCR complex results in upregulation of CD95 and CD95-L, and subsequent binding of CD95 to its ligand results in the direct activation of a cascade of proteases that finally lead to apoptosis (for review see references 16, 17). Although this process has been and is still under intense scrutiny, the activation pathways that lead to CD95 and CD95-L expression are mostly unknown. A recently cloned gene, TDAG51, seems necessary for TCR induction of CD95 in T cell hybridomas (20). On the other hand, it is known that the induction of CD95-L gene transcription is nuclear factor of activated cells (NFAT) dependent (21–24). Indeed, the recent characterization of the CD95-L promoter has shown the presence of an inducible NFAT-binding site that could be responsible for the regulation of CD95-L expression in T cells (25).

It was recently described that cross-linking of a Tac- $\zeta$  chimera results in induction of apoptosis in a transfected murine T hybridoma, suggesting that CD3- $\zeta$  is capable of inducing CD95-L expression on its own (26). Furthermore, Combadière et al. (27) showed in transgenic mice that the CD3- $\zeta$  chain, through one of its ITAMs, might play unique roles in TCR responses leading to apoptosis by engaging specific signaling pathways. In addition, we have previously described that transfection of a transmembrane tyrosine to leucine mutant of TCR- $\beta$  into TCR- $\beta$ -negative Jurkat cells results in a defective association of CD3- $\zeta$  to the other subunits of the TCR complex (28). Compared with cells transfected with wild-type TCR- $\beta$ , the mutant cells responded normally to TCR cross-linking by IL-2 secretion, TCR downregulation, and expression of the activation-induced receptors CD25 and CD69. By contrast, compared with wild-type cells, mutant cells were resistant to programmed death after TCR cross-linking. This defective induction of apoptosis was found to be based on a defective induction of CD95-L. On the basis of this evidence, we suggested that CD3- $\zeta$  is needed for activation of a signaling pathway leading to expression of CD95-L and apoptosis. We now show that the defective signaling in the mutant cells is not derived from a generalized lower production of second messengers, including intracellular  $Ca^{2+}$  increases and total protein tyrosine phosphorylation, but must be derived from a specific defect in a signaling pathway. In this regard, we have found that both a defective association of ZAP70 to CD3- $\zeta$  and a defective recruitment of ZAP70 to a near-plasma membrane location might be responsible for the apoptosis-defective phenotype.

## Materials and Methods

**Cell Lines.** The wild-type and mutant cell lines were obtained by reconstitution of the TCR- $\beta$ -negative Jurkat variant 31.13 (generously provided by Dr. A. Alcover, Institut Pasteur, Paris, France), with either a wild-type V $\beta$ 3<sup>+</sup> TCR- $\beta$  cDNA derived from the T cell clone HA1.7, or with a mutant TCR- $\beta$  cDNA that contains a transmembrane tyrosine to leucine mutation (28).

**DNA Constructs and Antibodies.** The plasmid encoding for the chimeric protein consisting of the extracellular and transmembrane domain of human IL-2R  $\alpha$  chain and the intracytoplasmic domain of CD3- $\zeta$  was generously given by Dr. F. Letourneur (29). The ZAP70-green fluorescent protein (GFP) construct was prepared by PCR using as template the HA-tagged ZAP70 cDNA construct generously provided by Dr. A. Weiss (University of California at San Francisco, CA). The PCR primers used added a EcoRI site in 5' and a BamHI site in 3'. The PCR product was digested and subcloned in the plasmid pEGFP-N1 (CLONTECH Laboratories, Inc., Palo Alto, CA) previously digested with the same restriction enzymes.

The antibody 448, specific for CD3- $\zeta$ , was generated by immunization of a New Zealand rabbit with a synthetic peptide corresponding to the 109–132-amino acid sequence of human CD3- $\zeta$  coupled to KLH, as previously described (30). The anti-ZAP70-specific rabbit antiserum ZAP4, as well as the antiserum specific for human Vav, were generously donated by Dr. S. Ley (Medical Research Council, Mill Hill, London, UK) (31). The rabbit anti-human PLC- $\gamma$ 1 was kindly given by Dr. Peter Parker (Imperial Cancer Research Fund, London, UK). The anti-V $\beta$ 3 antibody Jovi.3 was a generous gift of Dr. M. Owen (Imperial Cancer Research Fund, London, UK). The anti-Tac antibody MAR108 was generously provided by Dr. Miguel López Botet (Hospital de la Princesa, Madrid, Spain). The anti-CD3- $\epsilon$  and anti-CD3- $\delta$  antibodies, APA1/1 and APA1/2, respectively, have been previously described (32). The anti-CD3 antibodies OKT3 and UCHT1 were purchased from Ortho Diagnostics (Raritan, NJ) and Immunokontakt (Bioggio, Switzerland), respectively. The anti-V $\beta$ 8 and anti-CD95 antibodies were from PharMingen (San Diego, CA). The anti-phosphotyrosine antibody 4G10 was acquired from Upstate Biotechnology Inc. (Lake Placid, NY) and the anti-phosphotyrosine antibody PY20 from Transduction Laboratories (Lexington, KY).

**Cytokine Assays.** A total of  $5 \times 10^5$  cells/ml were stimulated with soluble *Staphylococcal enterotoxin B* (SEB; 10  $\mu$ g/ml) for 48 h or with soluble UCHT1 (10  $\mu$ g/ml) plus PMA (10 ng/ml) for 24 h. The IL-2 content in the supernatants of these cultures was determined by a commercial ELISA, following the manufacturer's instructions (Genzyme Corp., Boston, MA). IFN- $\gamma$  was also detected in the same supernatants by ELISA using the mAbs 43.11 and 45.11 (kindly donated by Dr. Sefik Alkan, Novartis, Basel, Switzerland) as previously described (33). In both cases, supernatants were tested in duplicate and OD values were converted to U/ml by comparison with standard curves determined with recombinant human IL-2 (Hoffman-La Roche, Nutley, NY) and IFN- $\gamma$  (Genzyme Corp.). The culture supernatants were diluted to make the OD values fall in the linear range of the curves.

**Analysis of Intracellular  $Ca^{2+}$  Fluxes.** A total of  $10^7$  cells/ml were washed three times with serum-free RPMI and loaded with 5  $\mu$ g/ml fura-2AM (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) for 1 h at 37°C in the dark. They were then washed twice with RPMI, resuspended at  $5 \times 10^6$  cells/ml in PSS- $Ca^{2+}$  (140 mM NaCl, 4.6 mM KCl, 2 mM  $CaCl_2$ , 10 mM  $MgCl_2$ , 10 mM D-glucose, 10 mM HEPES, pH 7.4), placed in a cuvette, and allowed to equilibrate.

brate in a Perkin-Elmer fluorimeter at 37°C under gentle stirring until the baseline was stable. The excitation wavelength was of 339 nm and emission was measured at 510 nm. Primary and secondary fluorimetric responses were recorded after stimulation with 10 µg/ml OKT3 and subsequent cross-linking with 30 µg/ml polyclonal rabbit anti-mouse Ig, respectively. Triton X-100 (Sigma Chemical Co.) was added to 1% to establish a maximum signal ( $F_{\max}$ ), followed by EGTA to 100 mM to establish a minimum ( $F_{\min}$ ). Absolute  $Ca^{2+}$  concentration increases were calculated as described (34).

**Activation, Immunoprecipitation and Immunoblotting.** For activation  $3 \times 10^7$  cells per time point were collected, washed, and resuspended in 1 ml of RPMI supplemented with 10 mM Hepes, pH 7.4 and prewarmed at 37°C for 15 min. Afterwards, 10 µg/ml OKT3 or SEB (Sigma Chemical Co.) was added and the cells were collected at different time intervals by brief centrifugation in an Eppendorf centrifuge. Each cell pellet was subsequently resuspended in 1 ml of 1% Brij96 lysis buffer (1% Brij96, 140 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.8, 10 mM iodoacetamide, 1 mM PMSF, 1 µg/ml leupeptin, 1 µg/ml aprotinin, 1 mM sodium orthovanadate, 20 mM sodium fluoride) and maintained for 30 min on ice. The cell lysates were centrifuged at 12,000 *g* for 15 min and the supernatants were subjected to immunoprecipitation with protein A- or G-Sepharose beads precoated with specific antibodies as previously described (32). The immunoprecipitates were subjected to SDS-PAGE and the electrophoresed proteins were transferred to a nitrocellulose membrane (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) by standard procedures. The membrane was blocked in a solution of 10% nonfat dry milk in PBS for 1 h at room temperature. The membrane was rinsed three times with 100 ml of 0.1% Tween 20 in PBS and incubated with the appropriate dilutions of the specific antibodies in PBS-Tween for 1 h at room temperature. The membrane was then washed five times with 100 ml PBS-Tween and subsequently incubated with a peroxidase-labeled sheep anti-mouse Ig (Amersham International, Little Chalfont, UK) in PBS-Tween for 1 h. After six washes with 100 ml PBS-Tween the membrane was processed by the enhanced chemiluminescence (ECL) method according to the manufacturer's specifications (Amersham International).

To analyze tyrosine phosphorylation of total proteins, an aliquot of the 1% Brij96 cell lysate containing the equivalent of 300,000 cells was mixed with an equal volume of ice-cold acetone and kept on ice for 10 min. The samples were centrifuged at 12,000 *g* for 10 min, air-dried and resuspended in sample buffer for SDS-PAGE.

**In Vitro Kinase Assay.** For the in vitro kinase assay, the anti-ZAP70 immunoprecipitates were washed six times with lysis buffer and once with kinase buffer (100 mM NaCl, 50 mM Hepes, pH 7.5, 5 mM  $MgCl_2$ , 5 mM  $MnCl_2$ , 1 mM sodium orthovanadate). The beads were resuspended in 50 µl kinase buffer plus 5 µM cold ATP and 10 µCi  $\gamma$ - $^{32}P$ ATP (5,000 Ci/mmol; Amersham International) and incubated for 20 min at room temperature. The beads were then washed three times with lysis buffer containing 20 mM EDTA, and finally were boiled in Laemmli sample buffer and the samples subjected to SDS-PAGE. To measure the phosphorylation of an exogenous substrate, 8 µg of purified bovine brain tubulins (generously given by Dr. J. Avila, Centro de Biología Molecular, Madrid, Spain) were added to the kinase reaction.

**Confocal Microscopy.** Wild-type and mutant cells at  $10^6$ /ml in RPMI were stimulated with 10 µg/ml OKT3 for 1 min at 37°C and then diluted in 10 ml ice-cold PBS and centrifuged onto coverslips. The cells were fixed in 2% paraformaldehyde in PBS

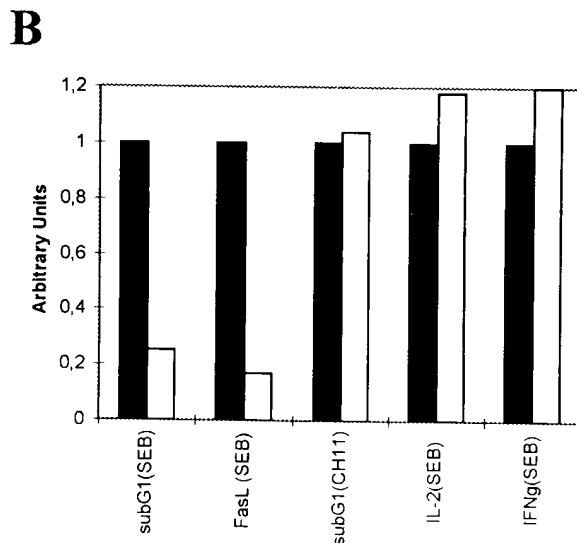
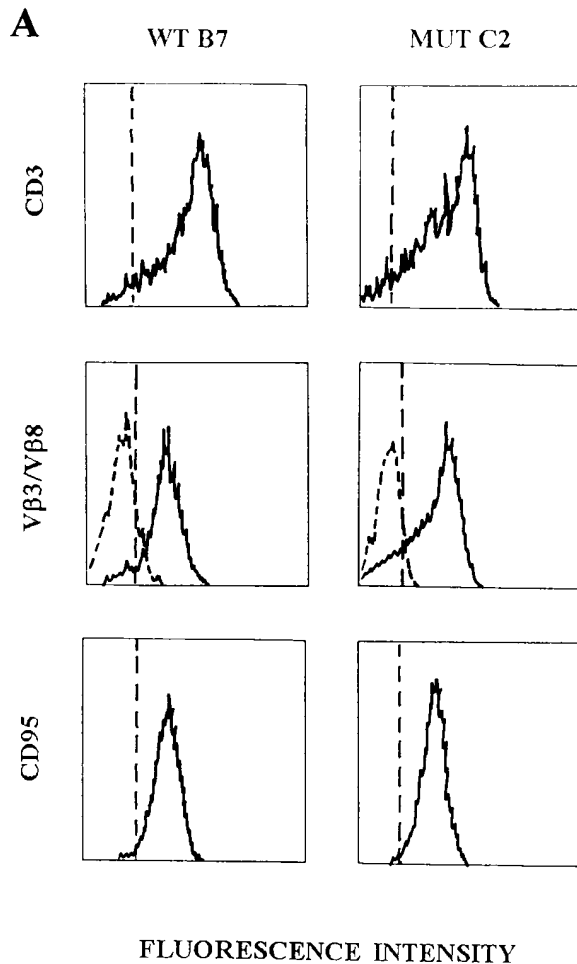
for 20 min at room temperature and subsequently blocked and permeabilized in PBS containing 1% BSA and 0.1% saponin. The cells were then stained with a 1:1,000 dilution of ZAP4 antibody in blocking buffer for 30 min at room temperature, followed by staining with a mixture of a Texas red-labeled goat anti-rabbit Ig and fluoresceinated goat anti-mouse Ig antibodies (Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham, AL). The coverslips were subsequently washed and mounted in mowiol as described (35). The preparations were examined in a Zeiss confocal microscope.

**Transient Transfections.** For transient transfection,  $5 \times 10^6$  cells were collected, resuspended in 500 µl of RPMI plus 20% FCS and transferred to a 0.4-mm electroporation cuvette (Bio-Rad Laboratories). A total of 50 µg of plasmid DNA was added and the cells were incubated for 15 min at room temperature before electroporation was performed at 260 V and 960 µF in a Bio-Rad Gene Pulser. After electroporation, the cells were allowed to stand for 2 min and then centrifuged and put in culture. Expression of the transfected protein was usually examined 24 h after transfection.

**Apoptosis Assays.** A total of  $10^5$  transfected cells/well were plated 24 h after electroporation on 96-well plates (Costar Corp., Cambridge, MA) precoated with variable concentrations of anti-CD3 or anti-Tac antibodies. To estimate the number of cells in apoptosis, 20 h later they were stained with biotinylated annexin V (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany) followed by staining with PE-labeled streptavidin (Southern Biotechnology Associates Inc.). To distinguish the transfected from the nontransfected cells, the samples were double stained with anti-Tac antibody, followed by a fluoresceinated goat anti-mouse Ig antibody (Southern Biotechnology Associates Inc.) and analyzed in an EPICS-XL flow cytometer (Coulter Immunology, Hialeah, FL). ZAP-GFP transfected cells were single stained with biotinylated annexin V- and PE-labeled streptavidin and subjected to two-color analysis. The level of apoptosis within the transfected population was estimated as the percentage of annexin V-positive cells.

## Results

**Apoptosis but Not Cytokine Release Is Defective in Jurkat T Cell Clones Expressing a TCR-β Mutant That Impairs CD3-ζ Association.** The ability of the TCR complex to elicit different activation events in several Jurkat cell clones that express either wild-type TCR-β or a transmembrane tyrosine to leucine mutant have been studied. Mutant clones that expressed similar amounts of the TCR complex to those of wild-type transfectants (Fig. 1 A) were chosen for comparative purposes. A comparison of the ability of wild-type and mutant clones to secrete cytokines and to die by apoptosis upon stimulation of the TCR complex with SEB is shown in Fig. 1 B. Strikingly, although the mutant clone C2 released similar amounts of IL-2 and IFN-γ to the wild-type clone B7, it was, however, refractory to activation-induced cell death. Indeed, as shown in Fig. 1 B, the mutant cell clone was defective in the induction of CD95-ligand, although it did maintain an intact apoptosis machinery that could be triggered by direct stimulation of CD95 (CH11 stimulation). These data suggest that, as previously shown (28), the mutation in the transmembrane domain of



**Figure 1.** TCR- $\beta$  mutant clones release normal levels of cytokines but are resistant to TCR-mediated apoptosis. (A) Flow cytometry analysis of clones expressing either wild-type (B7) or mutant TCR- $\beta$  (C2) chains. B7 and C2 cells were analyzed for the cell surface expression of the CD3 complex (antibody UCHT1), the transfected TCR- $\beta$  chain (V $\beta$ 3, *continuous line*), the Jurkat endogenous TCR- $\beta$  (V $\beta$ 8, *broken line*) and CD95. (B) Wild-type B7 (*filled bars*) and mutant C2 cells (*open bars*) were stimulated with 10  $\mu$ g/ml SEB for 48 h at 37°C. The percentages of cells with

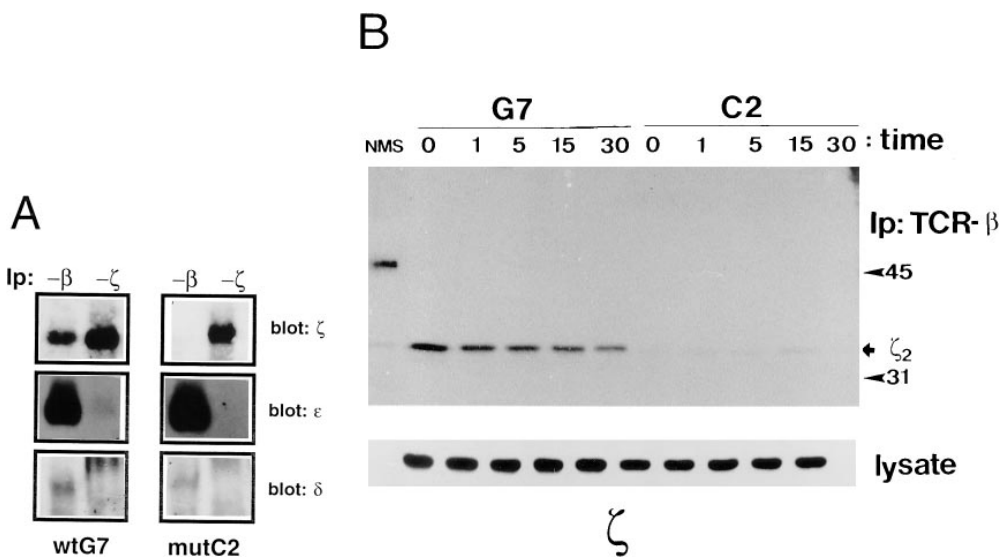
TCR- $\beta$  results in a selective defect in the induction of CD95-L, but not of IL-2 and IFN- $\gamma$ .

Despite the high cell surface expression of the TCR-CD3 complex in the wild-type and mutant cell clones studied (Fig. 1 A and reference 28) we found that the association of CD3- $\zeta$  to the remaining chains of the complex is impaired. Thus, immunoprecipitation with an anti-TCR- $\beta$  antibody from 1% Brij96 lysates of the mutant cell clone (C2) resulted in the coprecipitation of very low amounts of CD3- $\zeta$  compared with those coprecipitated from a wild-type clone (G7, Fig. 2, A and B). However, normal amounts of CD3- $\delta$  and CD3- $\epsilon$  chains were coprecipitated (Fig. 2 A), suggesting that the TCR-CD3 complex in the mutant clone is assembled without CD3- $\zeta$ . Thus, these data confirm those obtained by surface iodination (28), where an otherwise complete TCR-CD3 complex was shown to be expressed at the cell surface in the almost complete absence of CD3- $\zeta$ . As a control for the expression of CD3- $\zeta$  in the mutant clone, aliquots of the total lysates from the wild-type and the mutant clones were subjected to SDS-PAGE and to immunoblotting with anti- $\zeta$  antibody. The result showed that, despite the low association of CD3- $\zeta$  to the TCR complex in the mutant clone, the total levels of CD3- $\zeta$  were normal (Fig. 2 B). The defective association of CD3- $\zeta$  was not reverted in the mutant clone upon TCR cross-linking with an anti-CD3 antibody while, in the wild-type clone, the amount of CD3- $\zeta$  associated to the TCR complex seems to decrease upon activation (Fig. 2 B), suggesting this chain may be inducibly internalized and degraded, as recently proposed (36, 37).

According to these data, the defective induction of CD95-L upon stimulation of the TCR-CD3 complex could be the result of weak association of the CD3- $\zeta$  chain. By contrast, a high level of CD3- $\zeta$  association would not be required for activation of the signaling mechanisms leading to secretion of IL-2 and other cytokines, as was previously established in murine T cell hybridomas (38).

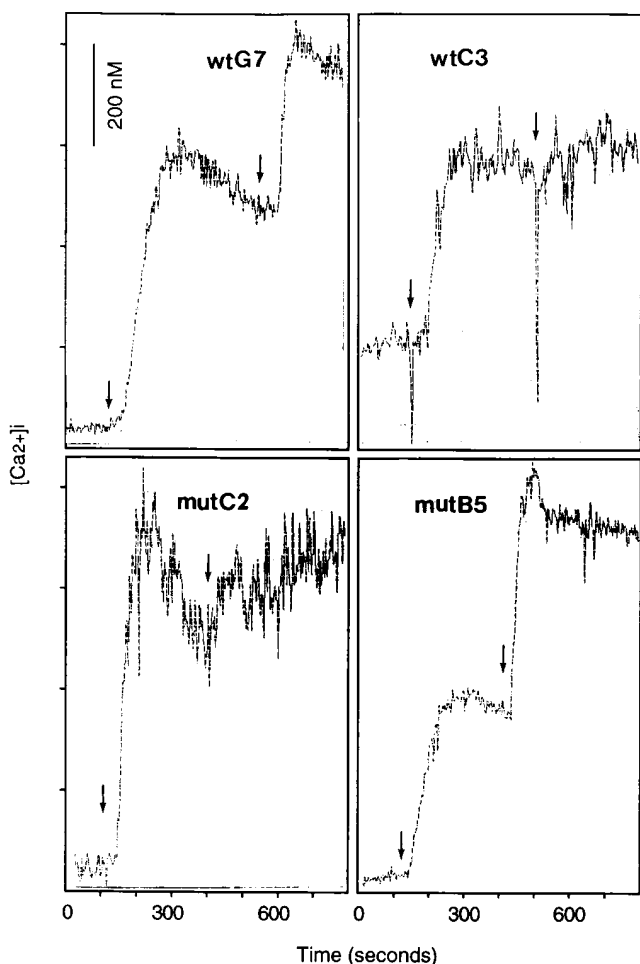
*Defective CD95-L Expression Does Not Result from a Generalized Decrease of Second Messengers.* Since the CD3- $\zeta$  homodimer contributes with six ITAMs to the TCR complex, it could be hypothesized that a stimulation of a complex with low levels of associated CD3- $\zeta$  would elicit lower levels of intracellular second messengers. Thus, if the threshold of second messengers required for CD95-L were higher than for IL-2 induction, then a defective recruitment of CD3- $\zeta$  to the TCR complex should result in a selective defect on CD95-L induction. Alternatively, CD3- $\zeta$  could trigger a special activation pathway required for the induction of CD95-L but not for cytokines. To investigate

sub-G1 amounts of DNA were quantified by flow cytometry after staining the cells with propidium iodide. Secretion of IL-2 and IFN- $\gamma$  was measured by ELISA in the supernatants of stimulated cells. CD95-L mRNA expression of cells stimulated for 3 h was determined by Northern blotting and quantified by densitometry. Cells were also stimulated with the anti-CD95 antibody CH11 to demonstrate that the apoptotic machinery works well in both types of cell. Values are expressed in arbitrary units as a result of the normalization of the wild-type (WT) values to 1.



**Figure 2.** CD3- $\zeta$  is loosely associated to the TCR-CD3 complex in the apoptosis-defective mutant cells. (A) Wild-type G7 and mutant C2 cell clones were lysed in 1% Brij96 immunoprecipitation buffer and the cell lysates were immunoprecipitated (Ip) with either anti-TCR- $\beta$  antibody Jovi.3 or anti-CD3- $\zeta$  antibody 448. The immunoprecipitates were subjected to SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose and immunoblotted with anti-CD3- $\zeta$  antibody 448, anti-CD3- $\epsilon$  antibody APA1/1 and anti-CD3- $\delta$  antibody APA1/2. (B) Wild-type G7 and mutant C2 cells were stimulated with 10  $\mu\text{g/ml}$  OKT3 for the indicated times (in min), and then lysed in 1% Brij96. Immunoprecipitation was performed with anti-

$\beta$ 3 antibody Jovi.3. The immunoprecipitates were resolved by SDS-PAGE under nonreducing conditions and the proteins were transferred to a nitrocellulose membrane. Immunoblotting was then performed with anti- $\zeta$  antibody 448. A portion of the total cell lysate was run in parallel to verify the level of CD3- $\zeta$  expression. The position of the CD3- $\zeta$  homodimer is indicated by an arrow. The running positions of the molecular mass standards are indicated with arrowheads.

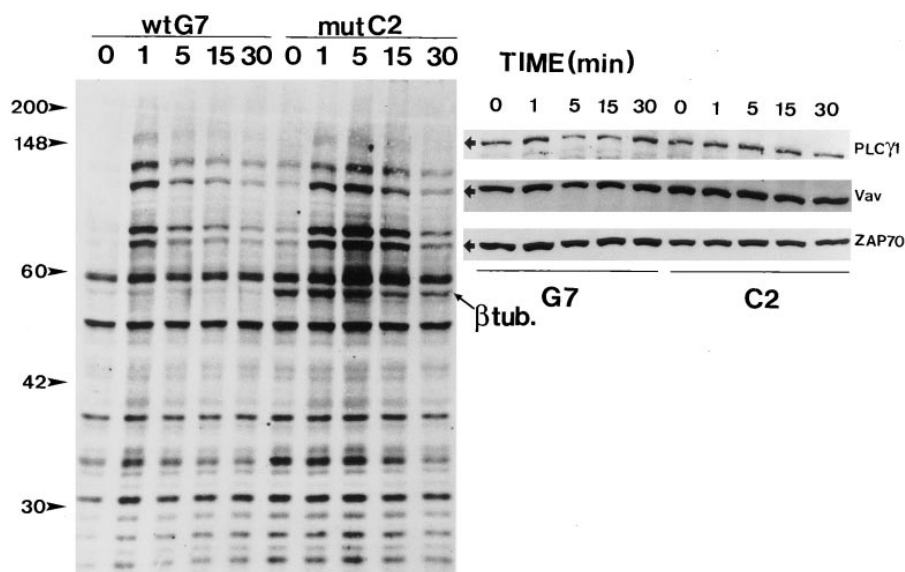


whether the ability of mutant cells to produce second messengers is diminished, intracytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  increases were recorded in two wild-type and two mutant clones. As shown in Fig. 3, all four clones responded similarly to anti-CD3 stimulation before and after cross-linking with a second anti-mouse Ig antibody. Although there were some differences in the intensity of the  $\text{Ca}^{2+}$  signal and in the response to the cross-linking antibody, these differences could not be ascribed to wild-type or mutant phenotypes. Similar results were obtained upon stimulation with SEB (data not shown).

Despite the normal  $\text{Ca}^{2+}$  fluxes induced upon TCR cross-linking, it was possible that the level of tyrosine phosphorylation in total proteins was diminished in the clones that have a low level of CD3- $\zeta$  associated to the TCR complex. This was not the case and, indeed, stimulation of the TCR complex with antibodies (Fig. 4) or with superantigen (not shown) did not result in lower tyrosine phosphorylation. On the contrary, activation-induced tyrosine phosphorylation reached consistently higher levels in mutant clones. Interestingly, tyrosine phosphorylation of total proteins was considerably higher in nonactivated mutant than in wild-type cells. At present, we do not know what could be the cause of this effect. Some protein bands were readily identified after reprobing the membrane with spe-

**Figure 3.** TCR triggering elicits normal intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  increases in apoptosis-deficient cells. Wild-type clones G7 and C3 and mutant clones C2 and B5 loaded with the  $\text{Ca}^{2+}$  sensitive dye fura-2 were stimulated with 10  $\mu\text{g/ml}$  OKT3 (first arrow), and when the peaks of intracytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  began to decrease, a second stimulation was produced by adding 30  $\mu\text{g/ml}$  of a rabbit anti-mouse Ig cross-linking antibody (second arrow).





**Figure 4.** TCR activation in apoptosis-deficient cells results in high level of total tyrosine phosphorylation. Wild-type G7 and mutant C2 cells were stimulated with 10  $\mu\text{g/ml}$  OKT3 for the indicated times and total cytoplasmic proteins were obtained by acetone precipitation from detergent cell lysates. The samples (equivalent to  $3 \times 10^5$  cells per lane) were subjected to SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. Immunoblotting was performed with antiphosphotyrosine antibody 4G10. Afterwards, the membrane was stripped and sequentially reprobed with antibodies specific for PLC- $\gamma$ 1, Vav and ZAP70. The position of  $\beta$ -tubulin was identified in a separate experiment. Molecular mass standards are indicated by arrowheads.

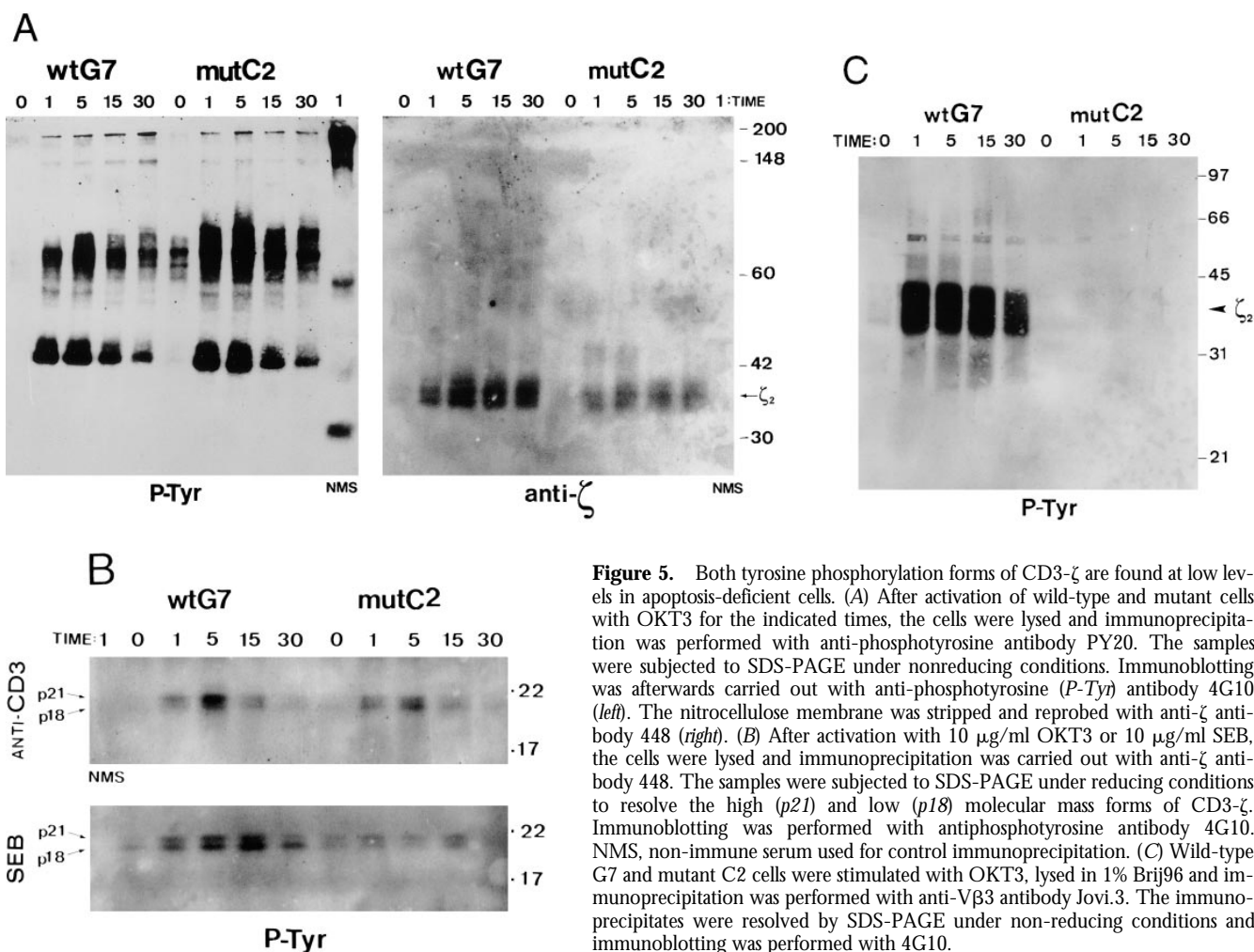
sific antibodies. Thus, it was clear that PLC- $\gamma$ 1 became tyrosine-phosphorylated upon activation of wild-type and mutant clones. Since tyrosine phosphorylation activates PLC- $\gamma$ 1 (39-42), this result is consistent with the normal intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  fluxes observed in mutant clones. Tyrosine phosphorylation of ZAP70 was also clearly induced to wild-type levels in mutant clones, as well as tyrosine phosphorylation of Vav, one of the ZAP70 binding proteins (31, 43). A major difference between the wild-type clone G7 and the mutant clone C2 was that a 50-kD protein was tyrosine phosphorylated at much higher levels in the mutant clone. This protein had the mobility of  $\beta$ -tubulin, as demonstrated after reprobing the membrane with a specific antibody (data not shown). However, in other mutant clones  $\beta$ -tubulin was not as heavily phosphorylated as in C2, suggesting that it is not relevant to the apoptosis-resistant phenotype. In summary, the  $\text{Ca}^{2+}$  flux measurements and the total protein tyrosine phosphorylation results suggest that TCR triggering in mutant cells does not result in a generalized lower production of second messengers, and favors the existence of a specific signaling defect for CD95-L induction.

*Both Tyrosine-phosphorylated Forms of CD3- $\zeta$  Are Detected in Apoptosis-deficient Cell Clones.* Further experiments to assess the level of tyrosine phosphorylation in wild-type and mutant clones were performed by immunoprecipitation with anti-phosphotyrosine antibodies from anti-CD3 stimulated cell lysates. As shown in Fig. 5 A, the immunoprecipitation and immunoblotting with the antiphosphotyrosine antibody showed higher levels of total tyrosine-phosphorylated proteins in mutant than in wild-type cells (Fig. 5, left). Again, as in Fig. 4, a considerable level of constitutive tyrosine phosphorylation was detected in nonstimulated mutant cells. After reprobing the membrane with an anti- $\zeta$  antibody it was found that the amount of CD3- $\zeta$  homodimer that had been immunoprecipitated with the anti-

phosphotyrosine antibody was considerably reduced in mutant cells (Fig. 5 A, right). This effect was specially clear when the intensity of the CD3- $\zeta$  bands was compared with those of the tyrosine-phosphorylated proteins. Note that CD3- $\zeta$  is not one of the major tyrosine-phosphorylated proteins and is not visualized in the film exposure shown in Fig. 5 A.

There are marked differences in the patterns of tyrosine-phosphorylated proteins obtained either after direct immunoblotting of a total lysate with the antiphosphotyrosine antibody (Fig. 4) or by immunoblotting of an antiphosphotyrosine immunoprecipitate (Fig. 5 A). The differences could be attributed to nonspecific binding of either the anti-phosphotyrosine or the peroxidase-conjugated second antibody to nontyrosine-phosphorylated bands; this could hold true for the low molecular mass noninducible proteins bands in Fig. 4. In addition, the immunoprecipitation with the antiphosphotyrosine antibody could introduce a bias by selecting the most heavily phosphorylated proteins or the tyrosine-phosphorylated sequences for which the antibody has higher affinity.

Since the mutation in the transmembrane domain of TCR- $\beta$  resulted in impaired association of CD3- $\zeta$ , it was compelling to examine whether it became phosphorylated to its low and high molecular mass forms. Therefore, a direct immunoprecipitation under reducing conditions with the anti- $\zeta$  antibody was performed from lysates of cells stimulated with superantigen or with anti-CD3 antibody (Fig. 5 B). As shown in this figure, although the levels of tyrosine-phosphorylated CD3- $\zeta$  were consistently lower in the mutant clone, both p18 and p21 phosphorylated forms were detected. Furthermore, the ratio of p21 to p18 was never lower in mutant than in wild-type cells. A control for gel loading was established after reprobing the membrane with the anti- $\zeta$  antibody. This demonstrated that the amounts of immunoprecipitated CD3- $\zeta$  were equivalent in



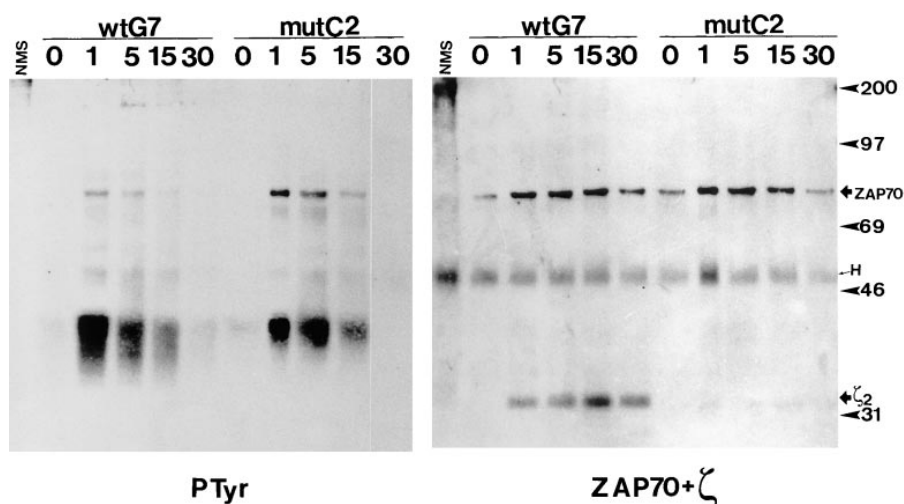
**Figure 5.** Both tyrosine phosphorylation forms of CD3- $\zeta$  are found at low levels in apoptosis-deficient cells. (A) After activation of wild-type and mutant cells with OKT3 for the indicated times, the cells were lysed and immunoprecipitation was performed with anti-phosphotyrosine antibody PY20. The samples were subjected to SDS-PAGE under nonreducing conditions. Immunoblotting was afterwards carried out with anti-phosphotyrosine (P-Tyr) antibody 4G10 (left). The nitrocellulose membrane was stripped and reprobed with anti- $\zeta$  antibody 448 (right). (B) After activation with 10  $\mu$ g/ml OKT3 or 10  $\mu$ g/ml SEB, the cells were lysed and immunoprecipitation was carried out with anti- $\zeta$  antibody 448. The samples were subjected to SDS-PAGE under reducing conditions to resolve the high (p21) and low (p18) molecular mass forms of CD3- $\zeta$ . Immunoblotting was performed with antiphosphotyrosine antibody 4G10. NMS, non-immune serum used for control immunoprecipitation. (C) Wild-type G7 and mutant C2 cells were stimulated with OKT3, lysed in 1% Brij96 and immunoprecipitation was performed with anti-V $\beta$ 3 antibody Jovi.3. The immunoprecipitates were resolved by SDS-PAGE under non-reducing conditions and immunoblotting was performed with 4G10.

the wild-type and mutant clones (data not shown). According to these experiments, and unlike in altered peptide ligands (APL)-stimulated T cell clones (44–46), CD3- $\zeta$  is tyrosine-phosphorylated to its high molecular mass form. Thus, in regard to the tyrosine phosphorylation of CD3- $\zeta$ , the only difference observed between wild-type and mutant clones was a decreased level of total phosphorylation in the latter. Notwithstanding, it was surprising that despite its low stoichiometry of association to the TCR complex (Fig. 2) CD3- $\zeta$  became tyrosine phosphorylated to relatively high levels in the mutant clone (Fig. 5, A and B). A possible explanation for this discrepancy is that tyrosine-phosphorylated CD3- $\zeta$  could associate in the mutant clone to the TCR complex with higher stoichiometry than non-phosphorylated one. To control for the amount of tyrosine-phosphorylated CD3- $\zeta$  associated to the TCR complex, an immunoprecipitation with anti-TCR- $\beta$  antibody was performed from wild-type and mutant clones stimulated with anti-CD3 antibodies. As shown in Fig. 5 C, high levels of the tyrosine-phosphorylated CD3- $\zeta$  dimer were detected in the wild-type clone samples after activation whereas in the mutant clone it was practically undetectable.

Thus, this result excludes the possibility that the TCR complex preferably associates with phospho- $\zeta$  in the mutant clone.

*ZAP70 Becomes Tyrosine Phosphorylated in Apoptosis-deficient Clones but Does Not Stably Associate to CD3- $\zeta$ .* Although ZAP70 appeared to become tyrosine-phosphorylated in mutant cells (Fig. 4), it was compelling to test the level of ZAP70 phosphorylation by direct immunoprecipitation with a specific antibody. As shown in Fig. 6, after immunoprecipitation with an anti-ZAP70 antibody and immunoblotting with anti-phosphotyrosine, tyrosine-phosphorylated proteins of 35–38 and 70 kD were detected in samples from the wild-type clone G7 (Fig. 6, left). These proteins were inducibly phosphorylated or inducibly associated to ZAP70, although at different times after stimulation. To identify these protein bands, the membrane was stripped and reprobed sequentially with anti-ZAP70 and anti- $\zeta$  antibodies (Fig. 6, right). Thus, the 70-kD band was identified as ZAP70, whereas the mobility of the CD3- $\zeta$  band did not correspond to any of the major tyrosine-phosphorylated proteins.

Several differences were observed with the samples from



**Figure 6.** ZAP70 becomes tyrosine phosphorylated but does not associate to CD3- $\zeta$  in apoptosis-deficient cells. Wild-type and mutant cell clones were stimulated with 10  $\mu$ g/ml OKT3 for the indicated times and lysed in 1% Brij96-containing buffer. The cell lysates were subjected to immunoprecipitation with anti-ZAP70 antiserum ZAP4, the immunoprecipitates were resolved by SDS-PAGE under nonreducing conditions, and the proteins were transferred to a nitrocellulose membrane. The membrane was subsequently incubated with antiphosphotyrosine antibody 4G10 (PTyr, left), and later stripped and sequentially re-probed with ZAP4 and anti- $\zeta$  antibody 448 (right). The running positions of molecular mass standards, as well as of ZAP70, the CD3- $\zeta$  homodimer ( $\zeta_2$ ) and the immunoglobulin heavy chain (H), are indicated.

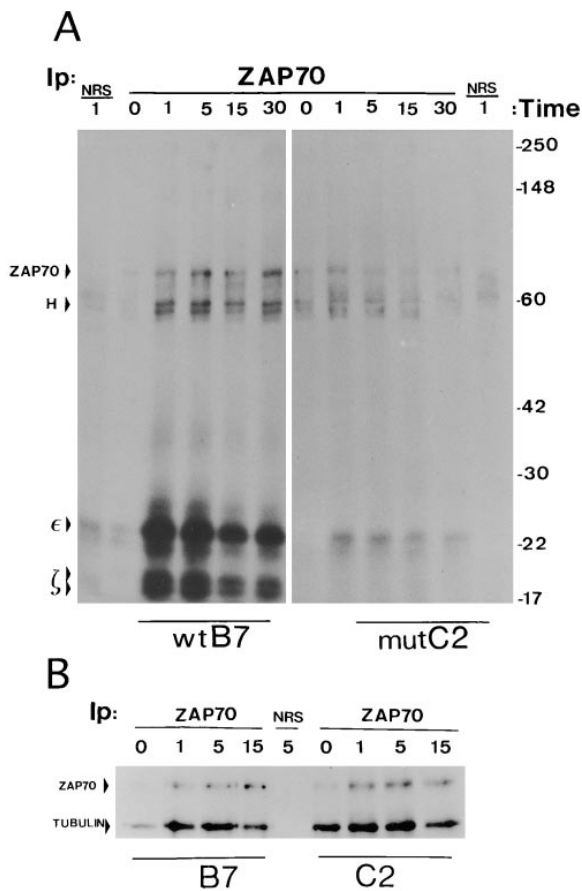
the mutant clone C2. Interestingly, higher levels of tyrosine-phosphorylated ZAP70 were detected in the mutant clones (Fig. 6, left), even though the amount of immunoprecipitated ZAP70 was equivalent (Fig. 6, right). Nevertheless, ZAP70 was tyrosine phosphorylated with similar kinetics in each type of cell. These results show that ZAP70 becomes tyrosine phosphorylated in the mutant T cell clones defective in induction of CD95-L. Interestingly, despite the fact that ZAP70 becomes tyrosine phosphorylated, its association to CD3- $\zeta$  in the mutant clone is negligible (Fig. 6, right). Accordingly, the 35–38-kD tyrosine-phosphorylated protein that is found associated to ZAP70 both in the wild-type and mutant clones must be a different protein. This protein may be pp36, a membrane-bound tyrosine-phosphorylated protein that has been described to associate to the adapter Grb2, to PLC- $\gamma$ 1, and to other proteins (47–49). Nevertheless, the 35–38-kD phosphoprotein band runs fuzzier in the wild-type than in the mutant samples, suggesting that the lowest part of the band could correspond to tyrosine-phosphorylated CD3- $\zeta$ .

The anti-ZAP70 immunoprecipitations were repeated, with similar results, using another wild-type and another mutant clone obtained from an independent transfection (data not shown). Although it has been established that ZAP70 must be bound to tyrosine-phosphorylated ITAMs, mainly of CD3- $\zeta$ , in order to become tyrosine-phosphorylated by one of the Src-family kinases associated to the TCR complex or its coreceptors (5), the results shown in Fig. 6 demonstrate that ZAP70 becomes tyrosine phosphorylated in the mutant clone in the almost total absence of CD3- $\zeta$  binding. It is possible that, in the mutant clones, ZAP70 becomes tyrosine-phosphorylated after binding to the ITAMs of other CD3 subunits or, alternatively, that ZAP70 becomes tyrosine-phosphorylated after a transient association with CD3- $\zeta$ .

To examine the kinase activities associated with ZAP70 in the mutant cell clones, an *in vitro* kinase assay was performed with anti-ZAP70 immunoprecipitates obtained from

anti-CD3 stimulated cell samples. As shown in Fig. 7 A, a phosphorylated 70-kD protein band was observed both in wild-type and mutant clones, although the intensities of the bands were somewhat lower in the immunoprecipitates from the mutant clone samples. The 70-kD band, which corresponded to ZAP70, as demonstrated after reprobing with a specific antiserum (data not shown), was already phosphorylated at low levels in nonactivated wild-type and mutant cells, but its intensity increased after 1 min of activation in both types of cell. Most striking was the intensity of two series of ZAP70-associated protein bands with molecular masses in the range of 18–21 and 22–24 kD that became strongly phosphorylated in samples from stimulated wild-type cells. After reprobing with specific antibodies, it was demonstrated that the two bands just above the 17-kD molecular mass marker corresponded to the two forms of tyrosine-phosphorylated CD3- $\zeta$ , p18 and p21, and that the strong phosphorylated protein band of 23 kD corresponded to CD3- $\epsilon$  (data not shown). However, although the sizes of the 22- and 24-kD protein bands that run just below and above CD3- $\epsilon$  are reminiscent of the CD3- $\delta$  and CD3- $\gamma$  subunits, their identity could not be confirmed by probing with specific antibodies, due to technical difficulties.

Since it has been shown that purified ZAP70 does not phosphorylate CD3- $\zeta$  (50), the phosphorylation of this chain in the *in vitro* kinase assay (Fig. 7 A) suggests the participation of an inducible ZAP70-associated kinase different to ZAP70. On the other hand, the fact that the CD3 ITAMs are not substrates for ZAP70 makes it difficult to estimate the kinase activity of ZAP70 in the mutant clone in the experiment shown in Fig. 7 A. To solve this problem, an exogenous substrate specific for ZAP70 (50) was added to the *in vitro* kinase assay. As shown in Fig. 7 B, tubulin was phosphorylated with similar efficiency in ZAP70 immunoprecipitates from wild-type and mutant cells, suggesting that ZAP70 was equally active in both types of cell. Interestingly, ZAP70 was constitutively more active in samples from nonstimulated mutant cells (time 0) than



**Figure 7.** In vitro kinase assays. ZAP70 is not associated to CD3 subunits in apoptosis-deficient cells. (A) Wild-type and mutant clones were stimulated with OKT3, lysed in 1% Brij96 and immunoprecipitation was performed with anti-ZAP70 antiserum. The immunoprecipitates were incubated with  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ATP in kinase buffer, washed, resolved by SDS-PAGE under reducing conditions and transferred to a nitrocellulose membrane. The membrane was dried and exposed to x-ray film. The positions of ZAP70, CD3- $\epsilon$  and the p18 and p21 forms of CD3- $\zeta$  (arrowheads) were located by probing the membrane with specific antibodies. NRS, nonimmune rabbit serum used as a control; H, immunoglobulin heavy chain. (B) An in vitro kinase experiment was performed as in A but 8  $\mu\text{g}$  per time point of purified bovine tubulin were added to the reaction mixture. The positions of the phosphorylated ZAP70 and tubulin are indicated.

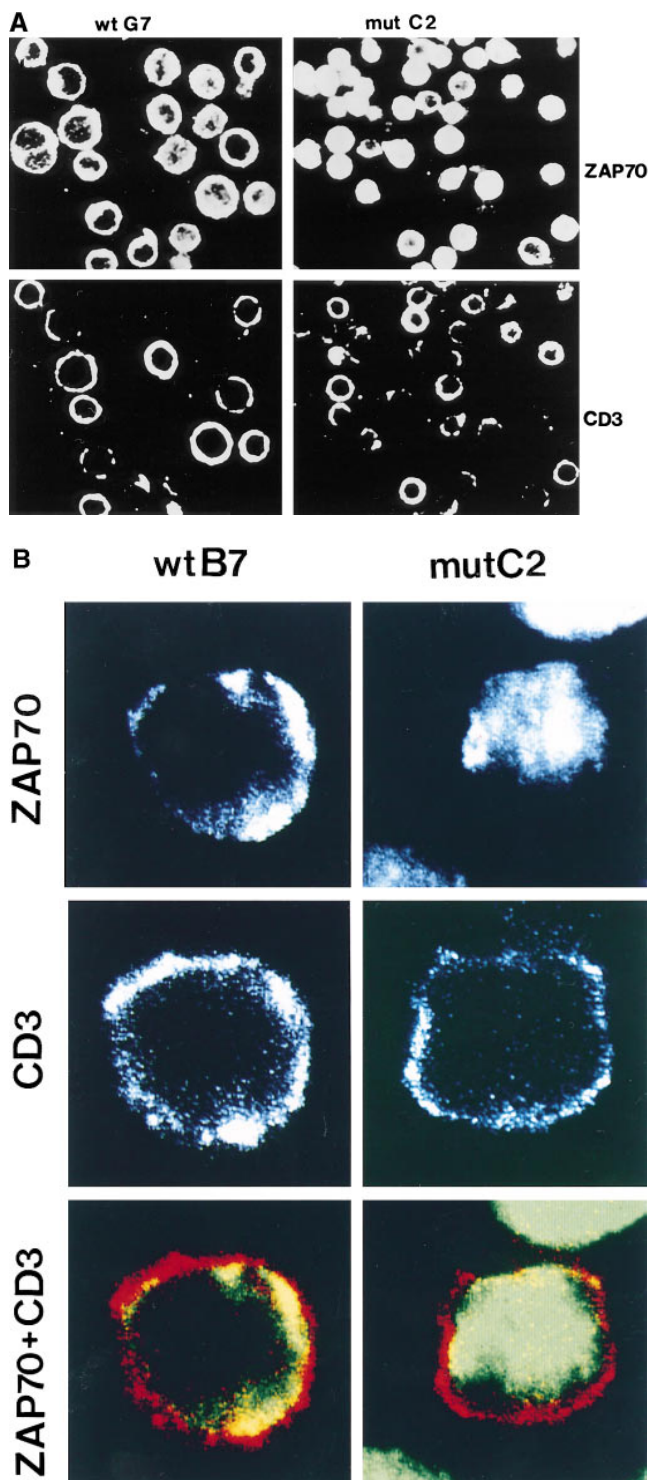
from the wild type, suggesting that ZAP70 could contribute to the higher level of constitutive general tyrosine phosphorylation observed in mutant cells (Figs. 4 and 5 A).

Although there was an inducible kinase activity that phosphorylated ZAP70 in mutant cell samples, the phosphorylation of CD3- $\epsilon$  was strongly diminished, and both forms of phosphorylated CD3- $\zeta$  were undetectable (Fig. 7 A). In principle, the low level of phosphorylation in CD3- $\epsilon$  and CD3- $\zeta$  could be due either to low kinase activity in the samples or to low concentration of these substrates. This latter possibility seems to be correct since, after re-probing the membrane, CD3- $\zeta$  and CD3- $\epsilon$  were not detected in the mutant clone samples (data not shown). Thus,

the results shown in Fig. 7 suggest that ZAP70 is active and becomes tyrosine phosphorylated in mutant cells despite its low-level association to CD3- $\zeta$  and other CD3 subunits.

*ZAP70 Is Not Recruited to a Juxtamembrane Localization in Apoptosis-deficient Cell Clones.* Despite being mostly present as a cytosolic protein, ZAP70 has been described to be intracellularly located in a juxtamembrane position in activated lymphoblasts (51), Jurkat cells, and transfected fibroblasts (52). Although it could have been expected that ZAP70 location in a juxtamembrane position depends on binding to the phosphorylated ITAMs of the TCR-CD3 complex, it was demonstrated that a ZAP70 mutant deprived of the SH2 domains was still located near the membrane (52). By contrast, a kinase dead mutant was not located near the membrane, suggesting that this domain is necessary for the localization of ZAP70 by a yet unknown mechanism. To examine whether the low association of ZAP70 to CD3- $\zeta$  in the mutant clones caused a mislocation of ZAP70, wild-type and mutant cells were stimulated for 1 min with anti-CD3 antibody and subsequently fixed, permeabilized with saponin and stained with the anti-ZAP70 antiserum. ZAP70 and CD3 stainings were observed after incubation with fluoresceinated and Texas red-labeled second antibodies, respectively. As shown in Fig. 8 A, ZAP70 was concentrated in a near-plasma membrane location in most of the wild-type clone cells, whereas it remained more evenly distributed throughout the cytosol in most of the mutant clone cells and was not specially concentrated near the membrane. On the other hand, CD3 staining corresponded to a plasma membrane pattern, as was expected. A higher magnification of single wild-type and mutant cells is shown in Fig. 8 B. The observed patterns obtained with the anti-peptide ZAP4 antibody were absent in cells that had been stained in the presence of the competing peptide, suggesting that they were specific (data not shown). In addition, the ZAP70 staining patterns characteristic of wild-type and mutant clones were reproduced by a transfected HA-tagged ZAP70 construct (data not shown), adding further support to their specificity.

Although the immunofluorescence data indicated that ZAP70 was located near the plasma membrane in wild-type cells, in a cell fractionation experiment it was mostly found in a nonmembrane-bound cytosolic fraction (data not shown), such as has been previously described (52). As these authors proposed, the localization of ZAP70 near the plasma membrane seems to be the result of a dynamic process of association and dissociation to a yet unidentified receptor in the plasma membrane, rather than the result of permanent binding. Accordingly, a ZAP70 gradient is generated. On the other hand, our results show that ZAP70 is not concentrated near the plasma membrane in TCR-activated mutant cells where the association of ZAP70 to CD3- $\zeta$  is impaired, suggesting that this binding might be required for its localization near the plasma membrane in Jurkat cells. In addition, these results suggest that the defective induction of CD95-L in mutant cells may derive from the mislocation of ZAP70.

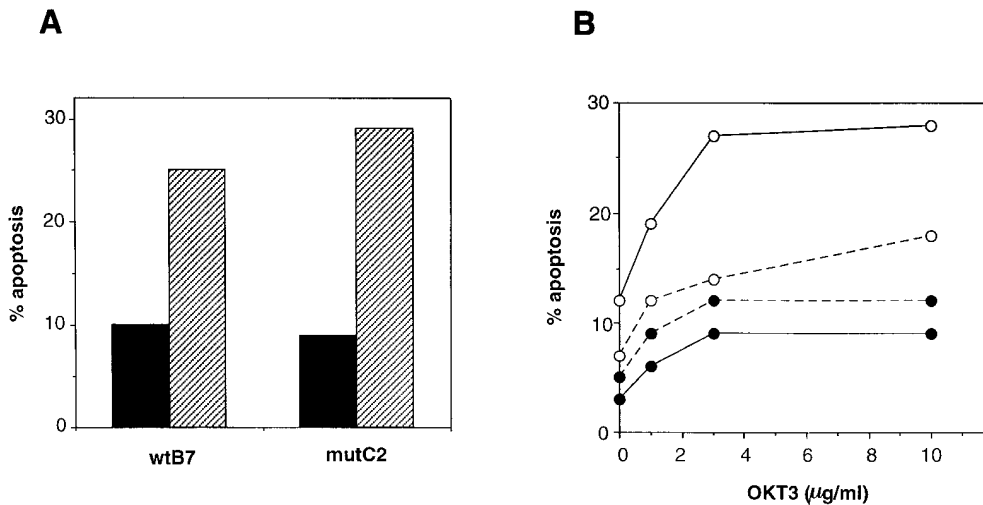


**Figure 8.** ZAP70 is not located near the plasma membrane in apoptosis-deficient cells. Wild-type and mutant cells were stimulated for 1 min with 10  $\mu$ g/ml OKT3, fixed, permeabilized, and stained with anti-ZAP70 antiserum. The cells were then incubated with a Texas red-labeled goat anti-mouse Ig antibody and with a fluoresceinated goat anti-rabbit Ig antibody. A general field is shown in *A*, whereas magnifications of single wild-type and mutant cells are shown in *B*. ZAP70 appears in green and CD3 in red.

*Direct Stimulation of a CD3- $\zeta$  Chimera, but Not ZAP70 Overexpression, Reestablishes the Sensitivity of Mutant Cells to Apoptosis.* Since the defective induction of CD95-L and apoptosis in Jurkat cells transfected with a plasma membrane TCR- $\beta$  point mutant may derive from the concomitant impaired association of CD3- $\zeta$  to the remaining subunits of the TCR complex, it was compelling to test whether direct stimulation of CD3- $\zeta$  resulted in induction of apoptosis. To this end, wild-type B7 and mutant C2 cells were transiently transfected with a Tac- $\zeta$  chimera that contains the intracytoplasmic tail of CD3- $\zeta$  bound to the extracellular and transmembrane domains of CD25. The transfected cells were plated on anti-Tac-coated plastic wells and the induction of apoptosis was measured 24 h later by annexin V staining. As shown in Fig. 9 *A*, the percentage of annexin V and Tac double positive cells increased to similar extents in wild-type and mutant cells after stimulation with anti-Tac antibody. These results suggest that the poor induction of apoptosis in mutant cells can be overcome if CD3- $\zeta$  is directly stimulated, and reinforces the idea that this poor induction results from a defective transmission of the activation signal from the TCR to the CD3- $\zeta$  chain. On the other hand, since ZAP70 is poorly associated to CD3- $\zeta$  in apoptosis-resistant mutant cells, we tried to determine whether overexpression of ZAP70 could overcome the apoptosis induction defect. To this end, a ZAP70-GFP chimera was constructed, in order to distinguish transfected from untransfected cells by flow cytometry in a transient transfection assay. Wild-type B7 and mutant C2 cells were transfected with either ZAP70-GFP or GFP alone, and 24 h later the cells were plated on anti-CD3 antibody-coated plastic wells. The percentage of apoptotic cells within the transfected population was evaluated 20 h later by annexin V staining. As shown in Fig. 9 *B*, the overexpression of ZAP70 resulted in enhanced induction of apoptosis in the wild type, but not in the mutant clone. Interestingly, ZAP70 overexpression also increased the level of basal apoptosis in nonstimulated wild-type cells, suggesting that it is sufficient to trigger the apoptosis pathway. The results shown in Fig. 9 could be interpreted in terms of the impaired association of ZAP70 to CD3- $\zeta$  in the mutant clones; the overexpression of ZAP70 did not result in an increased percentage of apoptotic cells because the underlying association defect was not overcome.

## Discussion

In this paper we have analyzed early biochemical events in an apoptosis-resistant variant of Jurkat cells as a tool for dissecting possible pathways specific for the induction of CD95-L. Since the variant was derived from transfection of an amino acid substituted TCR- $\beta$  cDNA that resulted in impaired association of CD3- $\zeta$ , and because the CD3- $\zeta$  homodimer contributes with six of the ITAMs of the TCR-CD3 complex, it could have been expected that the defective induction of CD95-L was the result of a general-



fectured with plasmids expressing either a ZAP70-GFP fusion protein (continuous lines) or GFP (broken lines). 24 h after electroporation the cells were plated on wells precoated with the indicated concentrations of OKT3, and 20 h later, the percentage of apoptotic cells within the transfected populations was measured by annexin V staining.

**Figure 9.** Direct stimulation of a Tac- $\zeta$  chimera, but not ZAP70 overexpression, results in apoptosis of the apoptosis-deficient cells. (A) Apoptosis through a Tac- $\zeta$  chimera. Wild-type and mutant cell clones were transiently transfected with a Tac- $\zeta$  chimera and 24 h later were stimulated with plastic-bound anti-Tac antibody (striped bars) or left unstimulated (filled bars). 20 h later the percentage of cells in apoptosis within the Tac- $\zeta$ -transfected population was measured by annexin V staining. (B) Effect of ZAP70 overexpression on apoptosis induction. Wild-type B7 (open symbols) and mutant C2 (filled symbols) cell clones were transiently trans-

ized lower production of second messengers. In other words, a different requirement for second messenger levels could be the basis for a defective CD95-L induction versus IL-2 production. This was not the case, and similar levels of intracellular  $Ca^{2+}$  fluxes were recorded in wild-type and mutant clones. These results are consistent with those describing the production of normal levels of IL-2 and  $Ca^{2+}$  fluxes in murine T hybridomas that express a CD3- $\zeta$  chain deprived of the cytoplasmic tail (38). Furthermore, the levels of total protein tyrosine phosphorylation were never lower in the mutant than in the wild-type clones, thus suggesting that impaired CD95-L production results from alteration of a specific signaling pathway. Although the putative specific pathway, necessary for CD95-L induction but not for cytokine production nor for expression of activation antigens, has not yet been characterized, we have found two specific alterations in mutant cells: first, a lower level of tyrosine phosphorylation of CD3- $\zeta$ ; second, and more important, a lower level of ZAP70/CD3- $\zeta$  association.

The fact that CD3- $\zeta$  becomes phosphorylated, albeit at low level, despite its low stoichiometry of association to the other chains of the complex, suggests that CD3- $\zeta$  becomes transiently associated to the complex and then phosphorylated. Alternatively, either isolated CD3- $\zeta$  or CD3- $\zeta$  associated to other membrane receptors could become tyrosine phosphorylated by a *trans*-acting mechanism. Although we do not yet know which of these possibilities is correct, we favor the idea of the existence of an equilibrium of association of CD3- $\zeta$  on the cell surface that is displaced towards dissociation in cells expressing the TCR- $\beta$  mutant. It would be in the TCR-associated form when CD3- $\zeta$  becomes phosphorylated. Interestingly, CD3- $\zeta$  was found in its two tyrosine-phosphorylated forms of 18 and 21 kD in the apoptosis-deficient clones, contrarily to the findings on

T cell clones stimulated with partial agonists, where only the lower molecular mass form of tyrosine-phosphorylated CD3- $\zeta$  was detected (44–46).

The involvement of CD3- $\zeta$  in the induction of apoptosis through the TCR complex has been shown earlier (27, 28). Although the components of the TCR-CD3 complex may be in part functionally redundant, we believe our data and those of Combadière et al. (27) suggest the existence of a specialized role for CD3- $\zeta$  in the induction of CD95-L. Furthermore, the data of Combadière et al. (27) showed that the membrane-proximal ITAM of CD3- $\zeta$  (ITAM1), and not the others, was effective in the induction of apoptosis. These results suggest that the functional specialization within the TCR-CD3 complex can be narrowed down not only to individual subunits but to particular regions of these subunits as well. In line with this idea, previous works in vitro have shown that different ITAMs of the TCR-CD3 complex have different affinities for components of the transduction machinery, including ZAP70 and the p85 subunit of PI 3-kinase (6, 8, 53). A further degree of specialization was made evident by Sunder-Plassman et al. (54), who showed that the  $NH_2$ -terminal and  $COOH$ -terminal YxxL/I sequences within ITAM1 of CD3- $\zeta$  may each trigger different activation events.

In addition to a different pattern of CD3- $\zeta$  tyrosine phosphorylation, in APL-stimulated T cell clones ZAP70 was not tyrosine phosphorylated (44, 45). By contrast, in the apoptosis-deficient clones ZAP70 became tyrosine phosphorylated to similar or even higher levels than in wild-type clones. Although the impaired induction of CD95-L and apoptosis were not paralleled by a defective tyrosine phosphorylation of ZAP70, two results seem to link this tyrosine kinase to the underlying apoptosis induction defect. First, the stoichiometry of ZAP70/CD3- $\zeta$  association was very low in apoptosis-defective mutants. Second, in these



mutants, ZAP70 is not found in a near-plasma membrane location. Tyrosine phosphorylation of ZAP70 is believed to be performed by Src family tyrosine kinases once ZAP70 is bound to tyrosine-phosphorylated CD3- $\zeta$  (reviewed in references 2, 3). Our findings in the apoptosis-deficient mutants are apparently contradictory to this idea, since ZAP70 becomes inducibly tyrosine phosphorylated even at higher levels than in wild-type cells, despite the fact that ZAP70 association to CD3- $\zeta$  and to the other subunits of the TCR complex is very poor. It may be that in the mutant cells ZAP70 associates transiently to the TCR complex, and that this association is sufficient for ZAP70 to become tyrosine phosphorylated and activated. It could also be speculated that the higher levels of tyrosine-phosphorylated ZAP70 detected in the mutant cells could be due to mislocation of ZAP70 that would make it less accessible to tyrosine phosphatases such as SHP-1, which binds and dephosphorylates ZAP70 (55). The differential induction of cytokines versus CD95-L in the apoptosis-resistant cells could thus derive from a quantitative difference in the levels of membrane-bound ZAP70. Alternatively, the differential signaling may derive from a different orientation adopted by ZAP70, since it has recently been suggested that ZAP70 may "sense" in this way different TCR ligands (56).

The tyrosine kinase activity of ZAP70 has recently been shown to be essential for TCR triggering of apoptosis via CD95-L expression (57) and, according to our data, the localization of ZAP70 near the plasma membrane is also necessary for the induction of CD95-L ligand. In this regard, it has been shown that the permanent association of ZAP70 to the plasma membrane by transfection of a CD2/ZAP70 chimera results in constitutive activation of the NFAT transcription factor and apoptosis (58). Thus, we could hypothesize the existence of a ZAP70 substrate, located at or near the plasma membrane, necessary for the induction of CD95-L expression. The transient recruitment of ZAP70 to the plasma membrane in the mutant cells would cause a deficit in the recruitment or in the phosphorylation of that substrate. So far, we do not know the identity of this possible substrate, since the pattern of total tyrosine-phosphorylated proteins is very similar to that of wild-type cells. It has been described that ZAP70 recruitment to the plasma membrane does not involve its SH2 domains and needs its kinase activity intact (52). These results imply the existence of a membrane-bound ZAP70 substrate that, once phosphorylated, may promote the localization of ZAP70 near the plasma membrane. The translocation of ZAP70 to the plasma membrane in fibroblasts, in the complete absence of T cell-specific components, argues strongly against an involvement of the TCR-CD3 complex. However, we have found in our mutant cells a correlation between impaired ZAP70 association to CD3- $\zeta$  and mislocation of ZAP70. Thus, it is likely that the association to CD3- $\zeta$  is indirectly involved, at least in T cells, in the localization of ZAP70 near the plasma membrane; perhaps as a requisite for the tyrosine phosphorylation of the putative membrane-bound ZAP70 substrate. Nevertheless, it is still possible that the

strongly diminished binding of ZAP70 to CD3- $\zeta$  and the mislocation of ZAP70 observed in the mutant cells are independent processes. Overexpression of ZAP70 in the mutant clones, unlike in the wild-type ones, does not result in increased apoptosis, perhaps because the defective recruitment of ZAP70 to the cell surface is not bypassed. By contrast, the transfection and direct stimulation of a Tac- $\zeta$  chimera results in an induction of apoptosis comparable to that found in transfected wild-type cells. This result supports the hypothesis that the defective induction of apoptosis in the mutant clones results from an impaired recruitment of CD3- $\zeta$  to the TCR complex.

The expression of CD95-L is inhibited by cyclosporin A treatment (21–23) and is not induced in NFATp-deficient mice (24), strongly suggesting that it is dependent on NFAT transcription factors. Indeed, an inducible NFAT-binding site has been demonstrated in the CD95-L promoter (25). Thus, the regulation of the CD95-L gene expression seems to be very similar to that of cytokine genes. Furthermore, the induction of CD95-L expression is dependent on early signals that involve Lck (59, 60) and CD45 (25), as well as the participation of the ras pathway (25). Nevertheless, the inducible NFAT-binding site in the CD95-L promoter is more reminiscent of that of the TNF- $\alpha$  promoter than the IL-2 promoter (25). For instance, the CD95-L promoter does not contain a predicted AP-1-binding site in the proximity of the NFAT site. Against this background, it seems clear that the fine regulation of CD95-L versus IL-2 expression is dependent on rather subtle differences. The results shown in this paper and Rodriguez-Tarduchy et al. (28) show that it is possible to distinguish between the two pathways, and that the signaling pathways diverge very early in the signaling cascade, involving the ZAP70/CD3- $\zeta$  interaction. The unstable interaction of ZAP70 with CD3- $\zeta$  may cause an unbalanced cascade of phosphorylations, which may be detrimental for CD95-L expression but not for induction of IL-2 expression and for other activation events. Interestingly, it has recently been proposed that Lck, but not Fyn, may mediate a signaling activation pathway that results in CD95-L upregulation and apoptosis (60). Since it has been shown that tyrosine-phosphorylated ZAP70 recruits Lck through its SH2 domain (11, 51), an intriguing possibility is that CD95-L is not induced in the apoptosis-deficient cells analyzed here because Lck is not recruited by ZAP70. In support of this idea, it has been shown that Lck lies downstream of ZAP70 when apoptosis is triggered by permanent localization of ZAP70 near the plasma membrane (58).

Our results suggest that a point mutation in the transmembrane domain of TCR- $\beta$  impairs the association of CD3- $\zeta$ , and that this is translated into transient association of ZAP70. This association is sufficient for activation of ZAP70 and to elicit the gene expression of IL-2, IFN- $\gamma$ , CD25, and CD69, but not for induction of CD95-L. We are at present trying to characterize the pathway that links ZAP70 with CD95-L induction, and which must be inactive in the apoptosis-resistant cells.

We are indebted to Drs. Steven Ley, Arthur Weiss, Michael Owen, Sefik Alkan, Jesús Avila, and Peter Parker for providing reagents, and to Drs. Oreste Acuto, Andrés Alcover, and Gary Koretzky for critically reading the manuscript and for helpful discussions.

This work was supported by grants from Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (PM95.0005 and PM95.0047), Fondo de Investigaciones Sanitarias (97/0597), and Comunidad de Madrid (07/047/96 and 07/055/96). The institutional support of the Fundación Ramón Areces is also acknowledged. A.G. Sahuquillo and E. Teixeira are fellows of the Fundación Conchita Rábago and Universidad Complutense de Madrid, respectively.

Address correspondence to Balbino Alarcón, Centro de Biología Molecular, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain. Phone: 34-1-3978049; Fax: 34-1-3978087; E-mail: balarcon@trasto.cbm.uam.es

Received for publication 22 October 1997 and in revised form 29 January 1998.

## References

1. Reth, M. 1989. Antigen receptor tail clue. *Nature*. 338:383–384.
2. Qian, D., and A. Weiss. 1997. T cell antigen receptor transduction. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9:205–212.
3. Wange, R.L., and L.E. Samelson. 1996. Complex complexes: signaling at the TCR. *Immunity*. 5:197–205.
4. Chan, A.C., and A.S. Shaw. 1995. Regulation of antigen receptor signal transduction by protein tyrosine kinases. *Curr. Opin. Immunol.* 8:394–401.
5. Iwashima, M., B.A. Irving, N.S.C. Van Oers, A.C. Chan, and A. Weiss. 1994. Sequential interactions of the TCR with distinct cytoplasmic tyrosine kinases. *Science*. 263:1136–1139.
6. Isakov, N., R.L. Wange, W.H. Burgess, J.D. Watts, R. Aebersold, and L.E. Samelson. 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.
7. Bu, J.Y., A.S. Shaw, and A.C. Chan. 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.
8. Osman, N., S.C. Lucas, H. Turner and D. Cantrell. 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.
9. Van Oers, N.S.C., N. Killeen, and A. Weiss. 1996. Lck regulates the tyrosine phosphorylation of the T cell receptor subunits and ZAP-70 in murine thymocytes. *J. Exp. Med.* 183: 1053–1062.
10. Wu, J., Q. Zhao, T. Kurosaki, and A. Weiss. 1997. The Vav binding site (Y315) in ZAP-70 is critical for antigen receptor-mediated signal transduction. *J. Exp. Med.* 10:1877–1882.
11. Duplay, P., M. Thome, F. Hervé, and O. Acuto. 1994. p56lck interacts via its src homology 2 domain with the ZAP-70 kinase. *J. Exp. Med.* 179:1163–1172.
12. Steller, H. 1995. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science*. 267:1445–1462.
13. Nagata, S. 1997. Apoptosis by death factor. *Cell*. 88:355–365.
14. Strasser, A. 1995. Death of a T cell. *Nature*. 373:385–386.
15. Van Parijs, L., and A.K. Abbas. 1996. Role of Fas-mediated cell death in the regulation of immune responses. *Curr. Opin. Immunol.* 8:355–361.
16. Wong, B., and Y. Choi. 1997. Pathways leading to cell death in T cells. *Curr. Opin. Immunol.* 9:358–364.
17. Winoto, A. 1997. Cell death in the regulation of immune responses. *Curr. Opin. Immunol.* 9: 365–370.
18. Zheng, L., G. Fisher, R.E. Miller, J. Peschon, D.H. Lynch, and M.J. Lenardo. 1995. Induction of apoptosis in mature T cells by tumor necrosis factor. *Nature*. 377:348–351.
19. Sytwu, H.K., R.S. Libau, and H.O. McDevitt. 1996. The roles of Fas/APO-1 (CD95) and TNF in antigen-induced programmed cell death in T cell receptor transgenic mice. *Immunity*. 5:17–30.
20. Park, C.G., S.Y. Lee, G. Kandala, S.Y. Lee, and Y. Choi. 1996. A novel gene product that couples TCR signaling to Fas (CD95) expression in activation-induced cell death. *Immunity*. 4:583–591.
21. Anel, A., M. Buferne, C. Boyer, A.M. Schmitt-Verhulst, and P. Golstein. 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.
22. Dhein, J., H. Walczak, C. Baumler, K.M. Debatin, and P.H. Kramer. 1995. Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). *Nature*. 373:438–441.
23. Brunner, T., J.Y. Nam, D. LaFace, and C.F. Ware. 1996. Activation-induced cell death in murine T cell hybridomas: differential regulation of Fas (CD95) versus Fas ligand expression by cyclosporin A and FK506. *Int. Immunol.* 8:1017–1026.
24. Hodge, M.R., A.M. Ranger, F.C. de la Brousse, T. Hoey, M.J. Grusby, and L.H. Glimcher. 1996. Hyperproliferation and dysregulation of IL-4 expression in NF-ATp-deficient mice. *Immunity*. 4:397–405.
25. Latinis, K.M., L.L. Carr, E.J. Peterson, L.A. Norian, S.L. Eliason, and G.A. Koretzky. 1997. Regulation of CD95 (Fas) ligand expression by TCR-mediated signaling events. *J. Immunol.* 158:4602–4611.
26. Vignaux, F., E. Vivier, B. Malissen, V. Depraetere, S. Nagata, and P. Golstein. 1995. TCR/CD3 coupling to Fas-based cytotoxicity. *J. Exp. Med.* 181:781–786.
27. Combadière, B., M. Freedman, L. Chen, E.W. Shores, P. Love, and M.J. Lenardo. 1996. Qualitative and quantitative contributions of the T cell receptor  $\zeta$  chain to mature T cell apoptosis. *J. Exp. Med.* 183:2109–2117.
28. Rodríguez-Tarduchy, G., A.G. Sahuquillo, B. Alarcón, and R. Bragado. 1996. Apoptosis but not other activation events is inhibited by a mutation in the transmembrane domain of T cell receptor  $\beta$  that impairs CD3 $\zeta$  association. *J. Biol. Chem.* 271:30417–30425.
29. Letourneur, F., and R.D. Klausner. 1991. T-cell and basophil activation through the cytoplasmic tail of T-cell receptor  $\zeta$



- family proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:8905–8909.
30. Sancho, J., J. Ledbetter, M.S. Choi, S.B. Kanner, J.P. Deans, and C. Terhorst. 1992. CD3- $\zeta$  surface expression is required for CD4-p56<sup>lck</sup>-mediated up-regulation of T cell antigen receptor-CD3 signaling in T cells. *J. Biol. Chem.* 267:7871–7879.
  31. Huby, R.D.J., G.W. Carlile, and S.C. Ley. 1995. Interactions between the protein-tyrosine kinase ZAP-70, the proto-oncogene protein Vav, and tubulin in Jurkat T cells. *J. Biol. Chem.* 270:30241–30244.
  32. Alarcón, B., S.C. Ley, F. Sánchez-Madrid, R.S. Blumberg, S.T. Ju, M. Fresno, and C. Terhorst. 1991. The CD3- $\gamma$  and CD3- $\delta$  subunits of the T cell antigen receptor can be expressed within distinct functional TCR/CD3 complexes. *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J.* 10:903–912.
  33. Alkan, S., C. Akdis, and H. Towbin. 1994. Chemiluminescent and enzyme-linked immunoassays for sensitive detection of human IFN- $\gamma$ . *J. Immunoassay.* 15:217–238.
  34. Shaw, A.C., R.N. Mitchell, Y.K. Wever, J. Campos-Torres, A.K. Abbas, and P. Leder. 1990. Mutations of immunoglobulin transmembrane and cytoplasmic domains: effects on intracellular signaling and antigen presentation. *Cell.* 63:381–392.
  35. Bonay, P., S. Munro, M. Fresno, and B. Alarcón. 1996. Intra-Golgi transport inhibition by megalomicin. *J. Biol. Chem.* 271:3719–3726.
  36. Valitutti, S., Müller, S., M. Salio, and A. Lanzavecchia. 1997. Degradation of T cell receptor (TCR)-CD3- $\zeta$  complexes after antigenic stimulation. *J. Exp. Med.* 185:1859–1864.
  37. Kishimoto, H., R.T. Kubo, H. Yorifuji, T. Nakayama, Y. Asano, and T. Tada. 1995. Physical dissociation of the TCR/CD3 complex accompanies receptor ligation. *J. Exp. Med.* 182:1997–2006.
  38. Wegener, A.M.K., F. Letourneur, A. Hoeveler, T. Brocker, F. Luton and B. Malissen. 1992. The T cell receptor/CD3 complex is composed of at least two autonomous transduction modules. *Cell.* 68:83–95.
  39. Granja, C., L.L. Lin, E.J. Yunis, V. Relias, and J.D. Dasgupta. 1991. PLC- $\gamma$ 1: a possible mediator of T cell receptor function. *J. Biol. Chem.* 266:16277–16280.
  40. Secrist, J.P., L. Karnitz, and R.T. Abraham. 1991. T cell antigen receptor ligation induces tyrosine phosphorylation of phospholipase C- $\gamma$ 1. *J. Biol. Chem.* 266:12135–12139.
  41. Weiss, A., G. Koretzky, R.C. Schatzman, and T. Kadlecik. 1991. Functional activation of the T cell antigen receptor induces tyrosine phosphorylation of phospholipase C- $\gamma$ 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:5484–5488.
  42. Park, D.J., H.W. Rho, and S.G. Rhee. 1991. CD3 stimulation causes phosphorylation of phospholipase C- $\gamma$ 1 on serine and tyrosine residues in a human T cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:5453–5456.
  43. Katzav, S., M. Sutherland, G. Packham, T. Yi, and A. Weiss. 1994. The protein tyrosine kinase ZAP-70 can associate with the SH2 domain of proto-vav. *J. Biol. Chem.* 269:32579–32585.
  44. Sloan-Lancaster, J., A.S. Shaw, J.B. Rothbard, and P.M. Allen. 1994. Partial T cell signaling: Altered phospho- $\zeta$  and lack of ZAP70 recruitment in APL-induced T cell anergy. *Cell.* 79:913–922.
  45. Madrenas, J., R.L. Wange, J.L. Wang, N. Isakov, L.E. Samelson, and R.N. Germain. 1995.  $\zeta$  phosphorylation without ZAP70 activation induced by TCR antagonists or partial agonists. *Science.* 267:515–518.
  46. Smith, J.A., J.Y. Tso, M.R. Clark, M.S. Cole, and J.A. Bluestone. 1997. Nonmitogenic anti-CD3 monoclonal antibodies deliver partial T cell receptor signal and induce clonal anergy. *J. Exp. Med.* 185:1413–1422.
  47. Sieh, M., A. Batzer, J. Schlessinger, and A. Weiss. 1994. Grb2 and phospholipase C $\gamma$ 1 associate with a 36- to 38-kilodalton phosphotyrosine protein after T cell receptor stimulation. *Mol. Cell. Biol.* 14:4435–4442.
  48. Buday, L., S.E. Egan, P. Rodríguez-Viciana, D.A. Cantrell and J. Downward. 1994. A complex of Grb2-adaptor protein, SOS exchange factor and a 36 kD membrane bound tyrosine phosphoprotein is implicated in Ras activation in T cells. *J. Biol. Chem.* 269:9019–9023.
  49. Motto, D., S. Ross, J. Jackman, Q. Sun, A.L. Olson, P. Findell, and G. Koretzky. 1994. In vivo association of Grb2 with pp116, a substrate of the T cell antigen receptor activated protein tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* 269:21608–21613.
  50. Isakov, N., R.L. Wange, J.D. Watts, R. Aebersold, and L.E. Samelson. 1996. Purification and characterization of human ZAP70 protein-tyrosine kinase from a baculovirus expression system. *J. Biol. Chem.* 271:15753–15761.
  51. Thome, M., P. Duplay, M. Guttinger, and O. Acuto. 1995. Syk and ZAP-70 mediate recruitment of p56<sup>lck</sup>/CD4 to the activated T cell receptor/CD3/ $\zeta$  complex. *J. Exp. Med.* 181:1997–2006.
  52. Huby, R.D.J., M. Iwashima, A. Weiss, and S.C. Ley. 1997. ZAP-70 protein tyrosine kinase is constitutively targeted to the T cell cortex independently of its SH2 domains. *J. Cell Biol.* 137:1639–1649.
  53. Exley, M., L. Varticovski, M. Peter, J. Sancho, and C. Terhorst. 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.
  54. Sunder-Plassmann, R., F. Lialios, M. Madsen, S. Koyasu, and E.L. Reinherz. 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.
  55. Plas, D.R., R. Johnson, J.T. Pingel, R.J. Matthews, M. Dalton, G. Roy, A.C. Chan, and M.L. Thomas. 1996. Direct regulation of ZAP-70 by SHP-1 in T cell antigen receptor signaling. *Science.* 272:1173–1176.
  56. Graef, I.A., L.J. Holsinger, S. Diver, S.L. Schreiber, and G.R. Crabtree. 1997. Proximity and orientation underlie signaling by the non-receptor tyrosine kinase ZAP70. *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J.* 16:5618–5628.
  57. Eischen, C.M., B.L. Williams, W. Zhang, L.E. Samelson, D.H. Lynch, R.T. Abraham, and P.J. Leibson. 1997. ZAP-70 tyrosine kinase is required for the up-regulation of fas ligand in activation-induced T cell apoptosis. *J. Immunol.* 159:1135–1139.
  58. Yamasaki, S., M. Takamatsu, and M. Iwashima. 1996. The kinase, SH3 and SH2 domains of Lck play critical roles in T-cell activation after ZAP-70 membrane localization. *Mol. Cell. Biol.* 13:7408–7417.
  59. Oyaizu, N., S. Than, T.W. McCloskey, and S. Pahwa. 1995. Requirement of p56<sup>lck</sup> in T-cell receptor/CD3 mediated apoptosis and Fas-ligand induction in Jurkat cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 213:994–1001.
  60. González-García, A., L.R. Borlado, E. Leonardo, I. Mérida, C. Martínez-A., and A.C. Carrera. 1997. Lck is necessary and sufficient for Fas-ligand expression and apoptotic cell death in mature cycling T cells. *J. Immunol.* 158:4104–4112.

# Apoptosis-resistant T cells have a deficiency in NF- $\kappa$ B-mediated induction of Fas ligand transcription

Emma Teixeira<sup>1,2</sup>, Almudena García-Sahuquillo<sup>1</sup>, Balbino Alarcón<sup>3</sup> and Rafael Bragado<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Immunology, Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain

<sup>2</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology I, Universidad Complutense, Madrid, Spain

<sup>3</sup> Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC-Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

Apoptosis induced through the TCR in CD4<sup>+</sup> T cells is mostly mediated by the inducible expression of Fas ligand (FasL) as a primary event leading to the commitment to death. To gain a better understanding of the transcriptional events that regulate this expression, we took advantage of our previously described mutant Jurkat cells. These cells are deficient in FasL expression and apoptosis induced upon TCR triggering, although their cytokine (IL-2 and IFN- $\gamma$ ) production is normal. Here we show that both a FasL- and a consensus NF- $\kappa$ B-reporter construct are inefficiently induced in these cells compared to wild-type cells. In addition, we demonstrate that the inducible transcriptional activity of the FasL reporter is abolished by specific inhibitors of NF- $\kappa$ B activation. Thus, we could trace the deficit of the mutant cells to an inefficient NF- $\kappa$ B activation, evidencing a relevant role for NF- $\kappa$ B in the regulation of FasL expression in activated T cells. Furthermore, our results suggest that the induction of FasL versus cytokine gene expression is differentially sensitive to NF- $\kappa$ B deprivation.

**Key words:** Fas ligand / NF- $\kappa$ B / Apoptosis / TCR / T cell activation

Received	25/10/98
Accepted	1/12/98

## 1 Introduction

T cell activation and the resulting effector functions have been thought to be binary events being either on or off. However, recent investigations have shown that this view is too simplistic and that various T cell effector functions can be uncoupled from each other (reviewed in [1]). Central to these conclusions is the concept that the TCR has the capacity to deliver multiple signals which lead to the induction of selective T cell functions by using specific intracellular signaling pathways. In this context, the fact that TCR engagement in mature T cells triggers both proliferation and cell death is particularly interesting and raises the question of how these two outcomes are differentially regulated.

Programmed cell death (apoptosis) represents one of the fundamental regulatory mechanisms in development of multicellular organisms and in antitumor immunity. The

pathways for activation of apoptosis are multiple and distinct in different cell types [2]. Activation-induced apoptosis of mature T cells may play a role in the maintenance of peripheral tolerance and in the limitation of antigen-specific T cell responses [3]. It is now recognized that the binding of Fas to its ligand, FasL, is an important mechanism for activation-induced cell death (AICD) in many experimental systems including human leukemia cell lines, murine T cell hybridomas and mature peripheral T cells [4–6]. Furthermore, it has been suggested that, in CD4<sup>+</sup> cells, Fas-mediated apoptosis is the main mechanism for TCR/CD3-induced cell death [7–9]. Since Fas is constitutively expressed in a wide range of normal tissues, the efforts to understand the regulation of this cell death pathway have been mostly directed at the activation mechanisms that lead to FasL expression. In T cells, FasL mRNA expression is induced upon TCR triggering or by stimuli such as PMA plus Ca<sup>2+</sup> ionophore that bypass TCR signaling. In both cases, the FasL induction is prevented by cyclosporin A (CsA) [10], a well-known inhibitor of NFAT transcription factor translocation.

Additional compelling evidence suggests an important role for NFAT in FasL promoter regulation. First, two

[1 18972]

**Abbreviations:** **FasL:** Fas ligand **AICD:** Activation-induced cell death **CsA:** Cyclosporin A **EMSA:** Electrophoretic mobility shift assay

NFAT binding sites in the FasL gene have been reported and the mutation of the distal site inhibits FasL promoter-driven transcription [11–13]. Second, mice with an NFATp null mutation showed reduced FasL expression after anti-CD3 stimulation *in vivo* [14]. And third, ZAP-70-deficient cells are both unable to activate NFAT and to enter into apoptosis upon TCR stimulation [15, 16]. However, it has been recently described that other transcription factors may also be involved in FasL promoter regulation. Thus, a new site called FLRE (FasL regulatory element), with binding capacity for the Egr-3 transcription factor, has been reported as necessary and sufficient for FasL promoter activity after TCR stimulation in a murine hybridoma [17]. Although the identity of the corresponding transcription factor has not been determined, the importance of this inducible regulatory element has also been described in Jurkat cells stimulated either through the TCR or with PMA plus ionomycin [18, 19]. Another factor, LKLF, has also been implicated in the suppression of FasL gene expression to control T cell quiescence and survival [20]. The use of specific inhibitors of NF- $\kappa$ B translocation [21] or NF- $\kappa$ B antisense oligonucleotides [22] have revealed a potential role of NF- $\kappa$ B in FasL induction in T lymphocytes upon CD3 stimulation. Furthermore, a role for both NF- $\kappa$ B and AP-1 has been invoked in the induction of FasL expression in Jurkat cells after treatment with DNA-damaging agents [23]. Whether all these results reflect different mechanisms for FasL induction in different cell types or a plausible synergistic regulation of FasL gene expression by several transcription factors remains to be clarified.

We have previously described that Jurkat mutant (MUT) T cell clones, bearing a tyrosine to leucine replacement in the transmembrane domain of TCR- $\beta$ , are defective in TCR-induced apoptosis. This defect resulted from an impaired FasL mRNA induction. By contrast, other activation events including cytokine (IL-2 and IFN- $\gamma$ ) secretion, expression of activation receptors (CD25 and CD69), TCR down-regulation and Ca<sup>2+</sup> mobilization were normal, as compared with wild-type (WT) cells [24, 25]. These data suggested that FasL expression may be regulated in a manner different to the expression other activation genes. Here, we have studied the potential role of NFAT and NF- $\kappa$ B in FasL induction. We have found an inefficient NF- $\kappa$ B induction in the apoptosis-resistant cells that suggests an important role for this transcription factor in the regulation of FasL expression.

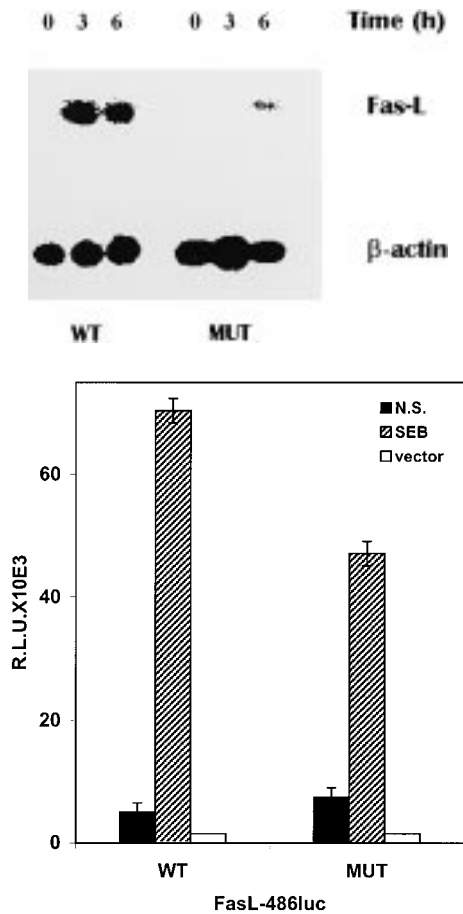
## 2 Results

### 2.1 Impaired FasL mRNA induction in apoptosis-resistant cells is reflected by low transcriptional activity of the FasL promoter

We have previously reported that MUT T cells that expressed amounts of the TCR/CD3 complex similar to those of the WT phenotype showed resistance to TCR-induced apoptosis despite their normal ability to secrete cytokines (IL-2 and IFN- $\gamma$ ) and to mobilize intracellular Ca<sup>2+</sup>. The fact that MUT clones were refractory to this type of AICD has been characterized as due solely to an impaired FasL transcription. Indeed, the cells did maintain an intact apoptotic machinery that could be triggered by direct stimulation of Fas receptor [24, 25]. To test whether the impaired induction of FasL mRNA in MUT cells (Fig. 1A) was secondary to a defective up-regulation of the FasL enhancer region, WT and MUT cells were transfected with a FasL reporter comprised of 486 bp of DNA immediately 5' of the translational start site of the human FasL gene (FasL-486). It has been shown that this fragment contains critical promoter elements [26] for TCR-induced transcriptional activation in the Jurkat T cell line [11–13, 18, 19]. Fig. 1B shows that the transfection of the FasL reporter construct into WT and MUT cells, followed by triggering of the TCR/CD3 complex with the superantigen staphylococcal enterotoxin B (SEB), yielded inducible luciferase activity in both cell types. However, the values for MUT cells were reproducibly lower than those for WT cells and ranged between 40 % and 60 %. Inducible luciferase activity was not detected when both cells were transfected with the empty vector. These results confirm that a cis-acting TCR/CD3-responsive element is located within the FasL-486 construct. More importantly, the results also suggest that the impaired induction of FasL in MUT cells could be ascribed to a lower induction of specific effectors that regulate the activation of transcription factors with binding sites in the reporter construct.

### 2.2 The low induction of FasL reporter in MUT cells can be correlated with low levels of transcriptional activity of NF- $\kappa$ B but not of NFAT

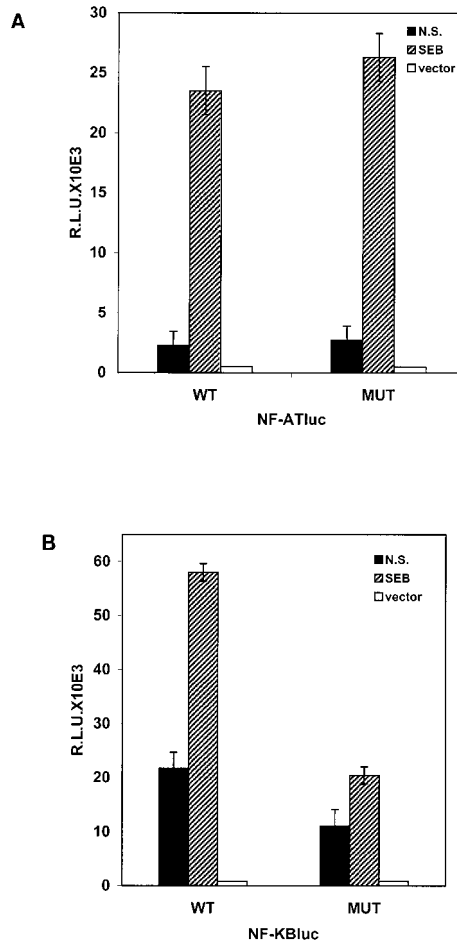
Previous studies using proteasome inhibitors [21] and NF- $\kappa$ B antisense oligonucleotides [22], both reagents inhibiting NF- $\kappa$ B activation, have suggested a role for NF- $\kappa$ B in FasL gene expression. In addition, at least one of the NFAT sites found in the FasL promoter seems to be quite important in the regulation of FasL expression [11–13]. Consequently, we decided to test whether the impaired FasL mRNA induction in MUT cells, and the low



**Figure 1.** FasL promoter is poorly induced in FasL induction-defective cells. (A) FasL induction detected by reverse transcription-PCR analysis is shown. WT and MUT cells were stimulated with 10  $\mu$ g/ml SEB at 37  $^{\circ}$ C for the indicated times. Then, total RNA was isolated, reverse transcribed and the cDNA amplified by PCR with two specific oligonucleotides for human FasL. As loading control, each PCR included a pair of oligonucleotides derived from the human  $\beta$ -actin sequence. After transferring to nylon membranes, the amplified products were probed with specific  $^{32}$ P-labeled oligonucleotides for FasL and  $\beta$ -actin. (B) Inducible luciferase activity of the FasL promoter reporter. WT and MUT cells were transfected with the 486-bp FasL reporter or the empty vector (Luc-Link) and left unstimulated (N.S.) or stimulated for 5 h with 10  $\mu$ g/ml SEB. Cells were lysed and assayed for luciferase activity. Luciferase light units were normalized to the transfection efficiency of the pRL-CMV *Renilla* reporter with the *Renilla* dual system and are shown as relative luciferase units (R.L.U.). The data are representative of five independent experiments performed in duplicate samples. SD is indicated on top of each bar.

induction of the FasL reporter (Fig. 1), could be secondary to a differential up-regulation of the NF- $\kappa$ B and NFAT transcription factors induced after TCR/CD3 triggering. To do this, WT and MUT cells were transfected with

NFAT-luc and NF- $\kappa$ B-luc reporter constructs and incubated with soluble SEB. As shown in Fig. 2A, no differences were observed in the luciferase activities detected in the lysates of WT and MUT cells that had been transfected with the NFAT-luc reporter. These results are in agreement with our previous results showing similar intracellular  $Ca^{2+}$  mobilization in both cell types after TCR/CD3 stimulation [25]. They also provide evidence that the resulting NFAT translocation, although necessary [11-14, 17, 19], is not sufficient to drive FasL transcription. However, when cells were transfected with an NF- $\kappa$ B-luc reporter, we observed that NF- $\kappa$ B was induced, on average, twofold more in WT than in MUT



**Figure 2.** MUT cells are deficient in NF- $\kappa$ B but not in NFAT activity. WT and MUT cells were transfected with NFAT-luc (A) or NF- $\kappa$ B-luc (B) reporter constructs or with the corresponding empty vectors. Transfectants were left unstimulated (N.S.) or stimulated for 5 h with 10  $\mu$ g/ml SEB. Cells were lysed and assayed for luciferase activity. Luciferase light values were normalized as in Fig. 1. The data are representative of five independent experiments performed in duplicate samples. SD is indicated on top of each bar.

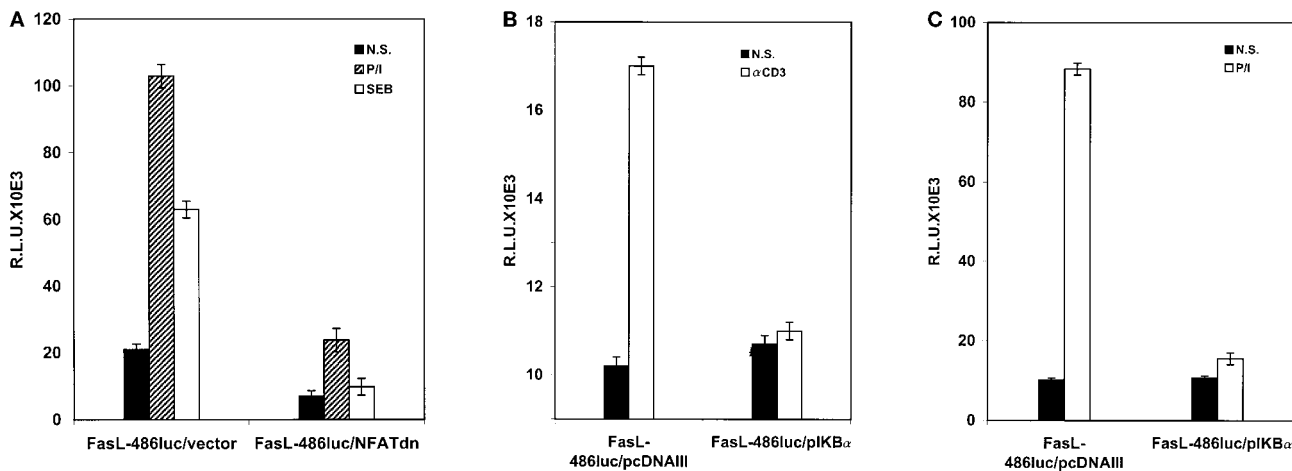
cells (Fig. 2B). Similar results were obtained with plastic-bound anti-CD3 mAb (not shown). These data suggest a role for NF- $\kappa$ B in FasL expression and indicate that the low induction of NF- $\kappa$ B in MUT cells is probably responsible for the suboptimal induction of FasL promoter and, consequently, of the impaired FasL mRNA induction after TCR/CD3 stimulation.

### 2.3 The inhibition of NF- $\kappa$ B activation correlates with the inhibition of the transcriptional activity of FasL

To confirm the above results, we next addressed the functional importance of NFAT and NF- $\kappa$ B in the FasL reporter activity by performing cotransfection experiments in WT cells. To this end, we overexpressed a dominant negative form of NFATc as effector plasmid together with the FasL-486 reporter construct followed by triggering the TCR/CD3 complex with SEB or by PMA plus ionomycin stimulation. The inhibitory capacity of the dominant negative form of NFATc was tested, previous to the experiments, on Jurkat cells transfected with NFAT-luc and stimulated with PMA plus ionomycin (data not shown). As shown in Fig. 3A, the functional inhibition of the active NFATc by the dominant negative one did result in an almost complete inhibition of the FasL promoter activity induced by both stimuli. This result would be in agreement with the important role played by NFAT in reg-

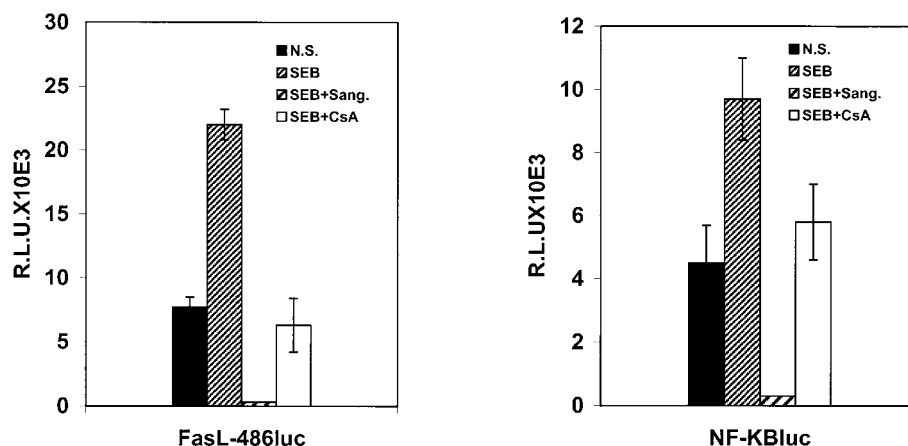
ulating FasL expression either directly, through specific binding sites, or indirectly through another factor that is itself regulated by NFAT [19]. Interestingly, when the FasL reporter was cotransfected with quasi-equimolar amounts of an expression vector that encodes I $\kappa$ B $\alpha$ , which inhibits NF- $\kappa$ B translocation to the nucleus, the expression of the FasL reporter induced either by plastic-bound anti-CD3 mAb or by PMA plus ionomycin was completely abolished (Fig. 3B). The same results were obtained with soluble SEB and in the Jurkat T cell line (not shown). Again, these data suggest that NF- $\kappa$ B is a key mediator in FasL promoter activity.

To provide further evidence for the role of NF- $\kappa$ B on FasL induction, we performed additional experiments with drugs that have been characterized as NF- $\kappa$ B inhibitors, namely sanguinarine, which has been described as a potent inhibitor of NF- $\kappa$ B activation that blocks the phosphorylation and degradation of I $\kappa$ B $\alpha$  [27], and CsA, a potent inhibitor of NFATp [28], which also inhibits I $\kappa$ B $\alpha$  degradation and the nuclear translocation of NF- $\kappa$ B [29–32]. A preliminary control experiment to test the specificity of sanguinarine was performed. As expected, incubation with the drug at non-toxic doses had no significant effect on the inducible activity of the consensus NFAT reporter construct (not shown). As shown in Fig. 4, when WT cells were transfected with the FasL reporter construct followed by pre-incubation with 1  $\mu$ M sanguinarine or 200 ng/ml CsA and then stimulated with SEB,



**Figure 3.** Both NFAT and NF- $\kappa$ B are required for activation of the FasL reporter. (A) WT cells were cotransfected with the 486-bp FasL reporter and an expression vector encoding a negative dominant version of NFATc –pSH102cD418– (ratio 3:1 on a molar basis with the reporter). Transfected cells were left unstimulated (N.S.) or were stimulated for 5 h with either 10  $\mu$ g/ml SEB or PMA plus ionomycin, lysed and assayed for luciferase activity. (B, C) WT cells were cotransfected with the 486-bp FasL reporter and an expression vector encoding I $\kappa$ B $\alpha$  –pcDNAIII $\kappa$ B $\alpha$ – (ratio 1.5:1 on a molar basis with the reporter) or its empty vector, pcDNAIII. Transfected cells were left unstimulated (N.S.) or stimulated for 5 h with 10  $\mu$ g/ml plastic-bound anti-CD3 mAb (B) or PMA plus ionomycin (C), lysed and assayed for luciferase activity. Luciferase light values were normalized as in Fig. 1. The data are representative of four independent experiments performed in duplicate samples. SD is indicated on the top of each bar.





**Figure 4.** Drugs inhibitory for NF- $\kappa$ B activation inhibit FasL luciferase reporter activity. WT cells were transfected with the 486-bp FasL reporter (left) or the NF- $\kappa$ B-luc reporter (right). Transfectants were left unstimulated (N.S.) or stimulated for 5 h with 10  $\mu$ g/ml SEB in the presence or in the absence of 1  $\mu$ M sanguinarine or 200 ng/ml CsA. Cells were lysed and assayed for luciferase activity. Luciferase light values were normalized as in Fig. 1. The data are representative of three independent experiments performed in duplicate samples. SD is indicated on top of each bar.

the inducible transcriptional activity of FasL was reduced to basal levels. Sanguinarine strongly inhibited the basal activity of the reporters, suggesting that this activity requires NF- $\kappa$ B. As control, Fig. 4 also shows the effect of the drugs on the transcriptional activity of the NF- $\kappa$ B-luc construct. As predicted, the inducible NF- $\kappa$ B reporter activity was also blocked by the addition of the drugs during TCR stimulation. As sanguinarine did not have any effect on the transcriptional activity of the NFAT-luc construct, these data suggest that its effect on NF- $\kappa$ B is specific. Similar data were obtained in the Jurkat T cell line when using plastic-bound anti-TCR/CD3 mAb or PMA plus ionomycin as stimulators (data not shown). These results add new evidences on the participation of NF- $\kappa$ B in the maximal activation of FasL reporter and, consequently, on the FasL induction and apoptosis.

#### 2.4 TCR/CD3-induced cytoplasmic I $\kappa$ B $\alpha$ degradation is delayed in apoptosis-resistant cells

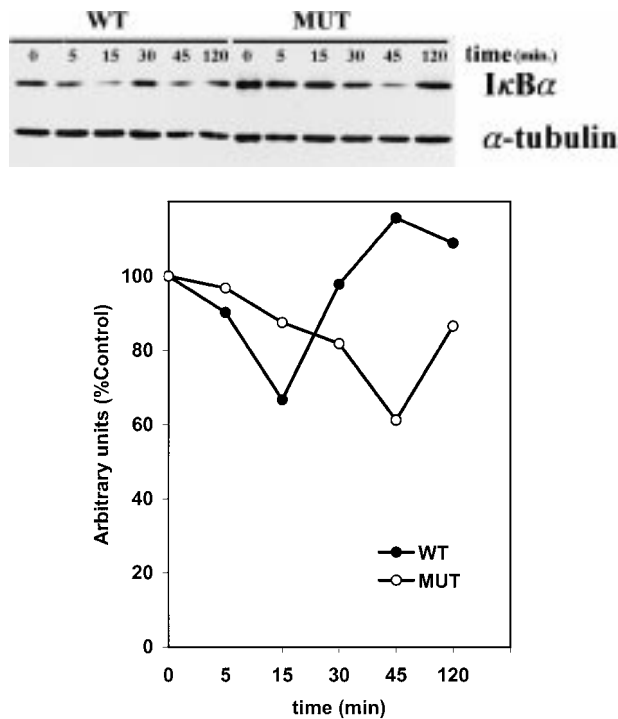
Since we observed that overexpression of I $\kappa$ B $\alpha$  inhibits the reporter activity of FasL and we detected a significant difference in NF- $\kappa$ B induction in WT vs. MUT cells, it was reasonable to ask whether the cytoplasmic I $\kappa$ B $\alpha$  degradation, a previous and necessary event for NF- $\kappa$ B activation, followed the same kinetics in both cell types. Consequently, cytoplasmic extracts of WT and MUT cells, stimulated at different times with SEB, were tested for the presence of I $\kappa$ B $\alpha$  by immunoblotting with a specific anti-I $\kappa$ B $\alpha$  antibody. As shown in Fig. 5, maximal

degradation of cytoplasmic I $\kappa$ B $\alpha$  in WT cells was observed after 15 min of stimulation and then returned to basal levels. However, in MUT cells, maximal degradation of I $\kappa$ B $\alpha$  was considerably delayed (45 min of stimulation), suggesting a mechanism for the alteration of the fine regulation of FasL expression.

### 3 Discussion

The critical role played by FasL in AICD in T cells has attracted much attention in the last years. However, little is yet understood about the control of the inducible expression of FasL in T lymphocytes. In this study we have explored the potential role of NF- $\kappa$ B in FasL induction upon TCR stimulation. In this regard, we have made the following observations. (1) A FasL reporter construct is weakly induced in MUT cells, which are deficient in FasL mRNA induction upon TCR/CD3 triggering. (2) A consensus NF- $\kappa$ B reporter is also inefficiently induced in MUT cells. (3) The reporter activity of a FasL promoter construct is inhibited by the overexpression of the NF- $\kappa$ B-sequestering agent I $\kappa$ B $\alpha$ . (4) The cytoplasmic I $\kappa$ B $\alpha$  degradation is delayed in MUT cells. (5) A potent and specific inhibitor of NF- $\kappa$ B activation, sanguinarine, blocks the FasL reporter activity.

The analysis of the 5' regulatory region of the human FasL gene [26] revealed a sequence from positions -266 to -282, relative to the translational start site, that includes putative overlapping SP-1/NF- $\kappa$ B binding sites. Interestingly, this sequence includes itself a GGAAA



**Figure 5.** Cytoplasmic I $\kappa$ B $\alpha$  degradation in MUT cells takes place later than in WT cells. (A) Western blot analysis. Per time point,  $5 \times 10^6$  cells were stimulated with 10  $\mu$ g/ml SEB. Cells were lysed and 10  $\mu$ g of cytoplasmic extracts from each sample were subjected to SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane. Immunoblotting was performed with anti-I $\kappa$ B $\alpha$  or with anti- $\alpha$ -tubulin Ab. (B) Scanning densitometry of the Western blot. The values on the Y-axis represent the relative amount of I $\kappa$ B $\alpha$  in each sample, obtained by normalization to the loading control, with respect to the value obtained in nonstimulated samples ( $t = 0$ ).

sequence which confers to this site the potential to be recognized by activated NFAT and, indeed, the role of this site for NFAT binding and the consequent regulation of FasL expression in Jurkat cells have been sufficiently proved upon ionomycin or PMA plus ionomycin stimulation [11–13]. However, it has been described that the NFAT site at  $-275$  was almost entirely dispensable for activation of the FasL promoter in a murine T cell hybridoma and in HeLa cells and that the CsA sensitivity of FasL expression is, in fact, secondary to inhibition of the Egr-3 transcription factor expression, presumably because Egr-3 transcription itself is regulated by NFAT [17].

The published results concerning the critical role played by NFAT in regulating FasL expression after TCR/CD3 triggering [11, 19] are also supported by the inhibitory effects of CsA. Since the calcineurin pathway is known to control the activation not only of NFAT [28–33] but also that of NF- $\kappa$ B [29–32], the published data do not

formally preclude the possibility that NF- $\kappa$ B participates in the activation of the FasL promoter. Indeed, our results on the different induction of the FasL promoter in WT and MUT cells (Fig. 1B), but identical induction with an NFAT reporter (Fig. 2A), together with the fact that our MUT cells mobilize intracellular Ca<sup>2+</sup> to the same extent as WT cells after TCR/CD3 stimulation [25], suggest the participation of transcription factors other than NFAT in FasL expression.

Without excluding a role for both NFAT and the factor that binds to the recently described response element [18, 19], the results presented here add new insights on the regulation of FasL expression on Jurkat cells as model of activated T cells. In these cells, the role of NF- $\kappa$ B in FasL induction after TCR/CD3 stimulation has not been sufficiently explored previously. Inconclusive evidences have been previously reported on these cells after ionomycin or PMA plus ionomycin stimuli [13]. In this study, the transfection of expression vectors of NF- $\kappa$ B subunits followed by the stimulation did not result in an inducible transcription of the FasL enhancer beyond that observed by the combination of NFAT and the stimulus. These results do not necessarily exclude NF- $\kappa$ B as regulator of FasL expression. In fact, we have been able to reproducibly obtain on average double inducible luciferase activity in WT vs. MUT cells when using a consensus NF- $\kappa$ B construct as reporter (Fig. 2B), thus suggesting a role for NF- $\kappa$ B in FasL-mediated apoptosis. This difference is more than significant, taking into account that TCR/CD3 triggering is a weak and a much less potent way for activating cells than PMA plus ionomycin and that our luciferase readouts were done after only 5 h stimulation. Furthermore, the short time used would make it unlikely that the involvement of NF- $\kappa$ B in apoptosis is only through the Fas/FasL signaling. These results, together with the inhibition of the FasL reporter activity either by overexpression of I $\kappa$ B $\alpha$  (Fig. 3B) or incubation with sanguinarine (Fig. 4), are additional evidence of the direct implication of NF- $\kappa$ B in FasL expression.

Our data on the involvement of NF- $\kappa$ B in FasL gene activation in activated T lymphocytes add to the ones previously described in other T cell types. Thus, in a T cell hybridoma, it has been reported that the specific inhibition of NF- $\kappa$ B translocation to the nucleus correlated with the inhibition of the expression of FasL mRNA in a dose-dependent manner [21]. Additionally, an inhibitor of NF- $\kappa$ B activation (forskolin) and an antisense p65 oligonucleotide inhibited the capacity of anti-CD3 to induce cell surface expression of FasL and cell death in a different hybridoma [22].

The putative NF- $\kappa$ B element of the FasL promoter region GGAAACTTCC [26], that differs from the canonical  $\kappa$ B

motif GGGRNNYYCC only by one nucleotide, might be the binding site for NF- $\kappa$ B subunits. However, the analysis of the capacity of this element to bind to NF- $\kappa$ B in a T cell hybridoma has revealed a very weak binding of p65 subunit when compared to NF- $\kappa$ B binding to HIV promoter (data not shown in [22]). In electrophoretic mobility shift assay (EMSA) studies, we have also failed to directly demonstrate NF- $\kappa$ B binding to a probe containing this putative NF- $\kappa$ B binding site (not shown). Similar negative results have been described in antigen-stimulated murine CTL clones [34] and in an anti-CD3-triggered hybridoma [21]. These data would suggest that NF- $\kappa$ B is not involved in the regulation of the expression of the FasL gene at the NF- $\kappa$ B-like site. There are, however, several explanations to reconcile these data with the results presented here. First, the existence in the FasL-486 construct of NF- $\kappa$ B sites other than the previously described ones cannot be excluded. Indeed, there is a putative NF- $\kappa$ B-like site, at -155 bp relative to the translational initiation site, that differs from the consensus sequence in only one nucleotide. Supershift analysis with a double-stranded DNA probe have shown the ability of this site to bind dimers of NF- $\kappa$ B (data not shown). Second, it is possible that combined binding of both NFAT and NF- $\kappa$ B subunits to the overlapping region may be functionally relevant. Possible interactions between NFAT and NF- $\kappa$ B transcription factor families (both families belong to the Rel superfamily) in the regulation of transcription have been previously described [35, 36]. Third, the role of NF- $\kappa$ B could be secondary to the regulation of the transcription of other transcription factors themselves controlling FasL induction through specific binding sites (*i.e.* Egr-3 and NFAT) [17]. However, these possibilities should in no case exclude the potential role of other sites, upstream of the promoter, as it has been described for NF- $\kappa$ B and AP-1 for regulating FasL expression in Jurkat cells after treatment with DNA-damaging agents [23]. Experiments to test these alternatives are in progress in our laboratories.

From the point of view of the immune activation of T lymphocytes it is intriguing that TCR/CD3 stimulation will result in the activation of transcription factors, such as NFAT and NF- $\kappa$ B, that target not only the gene for IL-2 but also the FasL gene. The observations that optimal expression of both FasL and IL-2 molecules is dependent on CD45-dependent protein tyrosine kinase signals [11], Ick expression [37] and Ras and calcineurin activation events [11, 33] suggest that T cells do not use these TCR-mediated signaling messengers to differentially drive proliferation or apoptosis and that the fine regulation of FasL vs. IL-2 expression would be dependent on rather subtle differences. Moreover, it has been suggested that the TCR pathway of NF- $\kappa$ B activation is different from the cytokine pathway [38]. In this regard, our

results in previous studies [24, 25] have shown that it is possible to distinguish between the two pathways, even at a very early signaling step such as the one involving CD3 $\zeta$ /ZAP70 interaction. How this interaction influences NF- $\kappa$ B activation is being investigated. This early divergence could be reflected in downstream intermediate effectors which have been suggested to be involved in NF- $\kappa$ B activation, *e.g.* Raf kinase [39]. Indeed, the delayed I $\kappa$ B $\alpha$  degradation on MUT cells (Fig. 5) could be interpreted as the result of low induction (incomplete signaling) of the signal that, coming from the TCR via signaling complexes, leads to Raf activation and later to the proteolysis of I $\kappa$ B $\alpha$  and the translocation of NF- $\kappa$ B to bind to its DNA sites. Additionally, in preliminary experiments, we have observed kinetic differences between the activation of Erk 1, 2 kinases of WT and MUT cells upon TCR/CD3 stimulation. This would confirm the previous evidences [11] on the important role played by the Raf/ERK signaling cascade for optimal expression of FasL.

In summary, our results allow to trace the impaired FasL mRNA induction in the apoptosis-deficient cells to an inefficient NF- $\kappa$ B activation upon TCR/CD3 triggering, which is not relevant for the regulation of cytokine expression, thus suggesting that the requirements for the orchestrated activation of different transcription factors are different for the different activation outcomes. Furthermore, our data disclose a role for NF- $\kappa$ B in the regulation of FasL expression in activated T lymphocytes upon TCR/CD3 stimulation and add to the previous evidences in other T cell types.

## 4 Materials and methods

### 4.1 Cell lines

The WT and MUT cell lines have been previously described [23, 24]. Briefly, they were obtained by reconstitution of the TCR $\beta$ -negative Jurkat variant 31.13 with either a WT V $\beta$ 3 TCR cDNA or with a mutant cDNA that contains a transmembrane tyrosine to leucine mutation. Both cell lines and the human leukemia T cell line Jurkat were maintained in RPMI supplemented with 10 % FCS and antibiotics. Expression of TCR/CD3 complex was routinely tested by flow cytometry before each assay.

### 4.2 Antibodies, DNA constructs and reagents

The mAb UCHT-1, a CD3 $\epsilon\gamma$ - and CD3 $\epsilon\delta$ -specific mAb, was purchased from ImmunoKontakt (Switzerland) and used for stimulations at 10  $\mu$ g/ml. The rabbit anti-human I $\kappa$ B $\alpha$  Ab was from Santa Cruz (Santa Cruz, CA). The anti- $\alpha$ -tubulin mAb was from Sigma (Spain). SEB was from Toxin Technology (Sarasota, FL) and was used for stimulations at 10  $\mu$ g/ml.



PMA (used for stimulations at 20–50 ng/ml), ionomycin (used for stimulations at 1  $\mu$ M) and sanguinarine (used for inhibitions at 1  $\mu$ M) were from Sigma (Spain). CsA was from Novartis (used for inhibitions at 200 ng/ml). The luciferase reporter FasL-486 was generously provided by Dr. G. Koretzky [11, 12, 19]. The luciferase reporter constructs p3CONALuc, p3NF $\kappa$ BALuc, and the expression vector encoding I $\kappa$ B $\alpha$  (pcDNAIII-I $\kappa$ B $\alpha$ ) were a gift of Dr. F. Arenzana (Institut Pasteur, Paris) [40, 41]. The luciferase reporter NF-ATluc and the expression vector encoding the dominant negative human NF-ATc (pSH102cD418) were gifts from Dr. G. Crabtree (Stanford, CA). The pRL-CMV *Renilla* reporter gene was purchased from Promega (Madison, WI).

#### 4.3 Reverse transcription-PCR

After the corresponding stimulation, total RNA was isolated from WT and MUT cells and reverse transcribed to cDNA using a cDNA synthesis kit (Promega, Madison, WI). Aliquots from each cDNA preparation were amplified by PCR using the oligonucleotides: 5'-TCTGGAATGGGAAGACAC (sense) and 5'-TCAGCACTGGTAAGATTG (antisense), derived from the human FasL gene sequence [26]. After 25 cycles of 1 min at 95 °C, 1 min at 47 °C and 1 min at 72 °C, the amplified products were run on a 1.5 % agarose gel and transferred to nylon membrane (Zeta-Probe, Bio-Rad, Spain). Autoradiographs were obtained after hybridization with the <sup>32</sup>P-labeled oligonucleotide 5'-GAGGAAGTCT-AAGTATCC which was internal to those used in the PCR. As cDNA loading control, each PCR included a pair of oligonucleotides of the human  $\beta$ -actin. As above, an internal <sup>32</sup>P-labeled oligonucleotide was used for hybridization.

#### 4.4 Transient transfections and luciferase assays

Cells ( $20 \times 10^6$ ) were transfected by the lipofectin method (Life Technologies, Inc.) as recommended by the manufacturer. Briefly, cells were washed twice with PBS, resuspended in 1 ml Opti-MEM (Life Technologies, Inc.) medium and incubated for 8 h at 37 °C with a mixture of 20  $\mu$ g lipofectin and 50  $\mu$ g of the plasmid DNA in 2 ml Opti-MEM. The medium was replaced by complete medium (RPMI plus 10 % FCS) and the cells incubated for additional 24 h at 37 °C. Cells were then left unstimulated or stimulated with SEB, PMA plus ionomycin or immobilized anti-CD3 mAb for 5 h and collected by centrifugation. Transfection efficiencies were normalized by cotransfecting 5  $\mu$ g pRL-CMV *Renilla* reporter construct. Aliquots of cells were lysed according to the luciferase assay kit and to the Dual luciferase assay kit (both from Promega, Madison, WI). For each experimental condition, firefly luciferase and *Renilla* luciferase activities were determined in duplicate samples using a luminometer Lumat LB9506 (Berthold, Germany). In cotransfection experiments with expression vectors, the same protocol was followed, but transfection included 1.5 mol I $\kappa$ B $\alpha$  construct or pcDNAIII empty vector per mol of the FasL-486

reporter construct. In the case of the dominant negative NFATc, the ratio between expression vector and reporter was 3. Values are represented as relative light units (R.L.U.), and correspond to the ratios between the firefly luciferase and *Renilla* luciferase light measurements.

#### 4.5 Western blot

A total of  $5 \times 10^6$  cells per time point were collected, washed and resuspended in RPMI supplemented with 15 mM Hepes, pH 7.5 and prewarmed at 37 °C for 10 min. After adding 10  $\mu$ g/ml SEB, the cells were incubated at 37 °C for different times, collected and washed twice with ice-cold PBS. Cell pellets were lysed in 100  $\mu$ l lysis buffer (20 mM Hepes, pH 7.5, 1 mM EGTA, 1 % NP40, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 2  $\mu$ g/ml aprotinin, 2  $\mu$ g/ml leupeptin) for 30 min on ice and microcentrifuged for 15 min at 4 °C. Supernatants were collected and the protein concentration was determined by the Bio-Rad Protein assay kit (Bio-Rad, Spain). Ten micrograms of total protein per point were loaded onto SDS-10 % polyacrylamide gels and subjected to SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membrane and then incubated with blocking solution [10 % (w/v) skimmed milk in PBS plus 0.1 % Tween-20 (PBS-T)] for 1 h at room temperature. After washing four times in PBS-T, the membrane was cut into different pieces, according to the expected molecular mass of the protein to be detected, and incubated with the specific Ab for 1 h at room temperature. After washing five times in PBS-T, the pieces of membrane were incubated with peroxidase-labeled goat anti-mouse or anti-rabbit IgG for 1 h at room temperature. After six washes in PBS-T, the membrane-bound antibody was visualized by the enhanced chemiluminescence (ECL) detection reagent (Amersham Corp.). Quantification of bands was performed in a laser densitometer (Molecular Dynamics, Kent, GB) and normalized to a protein ( $\alpha$ -tubulin) serving as loading control.

**Acknowledgments:** We are indebted to Drs. F. Arenzana, G. Crabtree and G. Koretzky for providing expression vectors and reporter constructs. This work was supported by grants from Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología –CICYT– (PM95/0047 and PM95/0005), Fondo de Investigaciones Sanitarias –FIS– (97/0597) and Comunidad Autónoma de Madrid –CAM– (97/083/0005 and 08.2/0004/1998). E. Teixeira and A. García-Sahuquillo are fellows of the Universidad Complutense de Madrid and Comunidad Autónoma de Madrid, respectively.

#### 5 References

- 1 Sloan-Lancaster, J. and Allen, P., Altered peptide ligand-induced partial T cell activation: Molecular mechanisms and roles in T cell biology. *Annu. Rev. Immunol.* 1996. **14**: 1–27.

- 2 Cohen, J. J., Apoptosis. *Immunol. Today* 1993. **14**: 126–130.
- 3 Ashwell, J. D. and Snow, E. C. (Eds.) *Handbook of B and T Lymphocytes*. Academic Press, San Diego 1994, pp 63–89.
- 4 Dhein, J., Walczak, H., Bäumler, C., Debatin, K. M. and Krammer, P. H., Autocrine T cell suicide mediated by APO-1 (Fas/CD95). *Nature* 1995. **373**: 438–441.
- 5 Brunner, T., Mogil, R. J., LaFace, D., Yoo, N. J., Mabhoubi, A., Echeverri, F., Martin, S. J., Force, W. R., Lynch, D. H., Ware, C. F. and Green, D. R., Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-Ligand interaction mediates activation induced apoptosis in T-cell hybridomas. *Nature* 1995. **373**: 441–444.
- 6 Ju, S. T., Panka, D. J., Cui, H., Ettinger, R., El-Khatib, M., Sherr, D. H., Stanger, B. Z. and Marshak-Rothstein, A., Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. *Nature* 1995. **373**: 444–448.
- 7 Ettinger, R., Panka, D. J., Wang, J. K. L., Stanger, B. Z., Ju, S. and Marshak-Rothstein, A., Fas ligand-mediated cytotoxicity is directly responsible for apoptosis of normal CD4<sup>+</sup> T cells responding to a bacterial superantigen. *J. Immunol.* 1995. **154**: 4302–4308.
- 8 Peter, M. E., Dhein, J., Ehret, A., Hellbardt, S., Walczak, H., Moldenhauer, G. and Krammer, P. H., APO-1 (CD95)-dependent and -independent antigen receptor-induced apoptosis in human T and B cell lines. *Int. Immunol.* 1995. **7**: 1873–1877.
- 9 Zheng, L., Fisher, G., Miller, R. E., Peshon, J., Lynch, D. N. and Lenardo, M. J., Induction of apoptosis in mature T cells by tumour necrosis factor. *Nature* 1995. **377**: 348–351.
- 10 Anel, A., Buferne, M., Boyer, C., Schmitt-Verhulst, A. and Goldstein, P., 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.* 1994. **24**: 2469–2476.
- 11 Latinis, K., Carr, L. L., Peterson, E. J., Norian, L. A., Eliason, S. L. and Koretzky, G. A., Regulation of CD95 (Fas) ligand expression by TCR-mediated signaling events. *J. Immunol.* 1997. **158**: 4602–4611.
- 12 Latinis, K., Norian, L. A., Eliason, S. L. and Koretzky, G. A., Two NFAT transcription factor binding sites participate in the regulation of CD95 (Fas) ligand expression in activated human T cells. *J. Biol. Chem.* 1998. **272**: 31427–31434.
- 13 Holtz-Heppelmann, C. J., Algeciras, A., Badley, A. D. and Paya, C. V., Transcriptional regulation of the human FasL promoter-enhancer region. *J. Biol. Chem.* 1998. **273**: 4416–4423.
- 14 Hodge, M. R., Ranger, A. M., de la Brouse, F. C., Hoey, T., Grusby, M. J. and Glimcher, L. H., Hyperproliferation and dysregulation of IL-4 expression in NFATp-deficient mice. *Immunity* 1996. **4**: 397–405.
- 15 Eishen, C. M., Williams, B. L., Zhang, W., Samelson, L. E., Lynch, D. H., Abraham, R. T. and Leibson, P. J., ZAP-70 tyrosine kinase is required for the up-regulation of Fas ligand in activation-induced T cell apoptosis. *J. Immunol.* 1997. **159**: 1135–1139.
- 16 Qian, D., Mollenauer, M. N. and Weiss, A., Dominant-negative zeta-associated protein 70 inhibits T cell antigen receptor signaling. *J. Exp. Med.* 1996. **188**: 611–618.
- 17 Mittelstadt, P. R. and Ashwell, J. D., Cyclosporin A-sensitive transcription factor Egr-3 regulates Fas ligand expression. *Mol. Cell. Biol.* 1998. **18**: 3744–3751.
- 18 Li-Weber, M., Laur, O., Hekele, A., Coy, J., Walczak, H. and Krammer, P. H., A regulatory element in the CD95(APO-1/Fas) ligand promoter is essential for responsiveness to TCR-mediated activation. *Eur. J. Immunol.* 1998. **28**: 2373–2383.
- 19 Norian, L. A., Latinis, K. M. and Koretzky, G. A., A newly identified response element in the CD95 ligand promoter contributes to optimal inducibility in activated T cells. *J. Immunol.* 1998. **161**: 1078–1082.
- 20 Kuo, C. T., Veselite, M. L. and Leiden, J. M., LKLF: A transcriptional regulator of single-positive T cell quiescence and survival. *Science* 1997. **277**: 1986–1990.
- 21 Matsui, K., Omura, S., Cui, H., Schauer, S. L., Sonenshein, G. E. and Ju, S., Proteasome regulation of Fas ligand cytotoxicity. *Eur. J. Immunol.* 1998. **27**: 2269–2278.
- 22 Ivanov, V. N., Lee, R. K., Podack, E. R. and Malek, T. R., Regulation of Fas-dependent activation-induced T cell apoptosis by cAMP signaling: a potential role for transcription factor NF- $\kappa$ B. *Oncogene* 1997. **14**: 2455–2464.
- 23 Kasibhatla, S., Brunner, T., Genestier, L., Echeverri, F., Manboubi, A. and Green, D. R., DNA damaging agents induce expression of Fas ligand and subsequent apoptosis in T lymphocytes via the activation of NF- $\kappa$ B and AP-1. *Mol. Cell* 1998. **1**: 543–551.
- 24 Rodriguez-Tarduchy, G., García-Sahuquillo, A., Alarcón, B. and Bragado, R., Apoptosis but not other activation events is inhibited by a mutation in the transmembrane domain of T cell receptor  $\beta$  that impairs CD3 $\zeta$  association. *J. Biol. Chem.* 1996. **271**: 30417–30425.
- 25 García-Sahuquillo, A., Roumier, A., Teixeira, E., Bragado, R. and Alarcón, B., T cell receptor (TCR) engagement in apoptosis-defective, but interleukin 2 (IL-2)-producing, T cells results in impaired ZAP70/CD3 $\zeta$  association. *J. Exp. Med.* 1998. **187**: 1179–1192.

- 26 **Takahashi, T., Tanaka, M., Inazawa, J., Abe, T., Suda, T. and Nagata, S.**, Human Fas ligand: gene structure, chromosomal location and species specificity. *Int. Immunol.* 1994. **6**: 1567–1574.
- 27 **Chatuverdi, M. M., Kumar, A., Darnay, B. G., Chainy, G. B., Agarwal, S. and Aggarwal, B. B.**, Sanguinarine (Pseudocheleerythrine) is a potent inhibitor of NF- $\kappa$ B activation, I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylation, and degradation. *J. Biol. Chem.* 1997. **272**: 30129–30134.
- 28 **McCaffrey, P. G., Perrino, B. A., Soderling, R. R. and Rao, A.**, NF-ATp, a T lymphocyte DNA-binding protein that is target for calcineurin and immunosuppressive drugs. *J. Biol. Chem.* 1993. **268**: 3747–3752.
- 29 **Mattila, P. S., Ullman, K. S., Fiering, S., Emmel, E. A., McCutcheon, M., Crabtree, G. R. and Herzenberg, L. A.**, The actions of cyclosporin A and FK506 suggest a novel step in the activation of T lymphocytes. *EMBO J.* 1990. **9**: 4425–4433.
- 30 **Schmidt, A., Hennighausen, L. and Siebenlist, U.**, Inducible nuclear factor binding to the  $\kappa$ B elements of the human immunodeficiency virus enhancer in T cells can be blocked by cyclosporin A in a signal-dependent manner. *J. Virol.* 1990. **64**: 4037–4041.
- 31 **Frantz, B., Nordby, E. C., Bren, G., Steffan, N., Paya, C. V., Lincaid, R. L., Tocci, M. J., O'Keefe, S. J. and O'Neill, E. A.**, Calcineurin acts in synergy with PMA to inactivate I $\kappa$ B/MAD3, an inhibitor of NF- $\kappa$ B. *EMBO J.* 1994. **13**: 861–870.
- 32 **Steffan, N. M., Bren, B. D., Frantz, B., Tocci, M. J., O'Neill, E. A. and Paya, C. V.**, Regulation of I $\kappa$ B $\alpha$  alpha phosphorylation by PKC- and Ca<sup>2+</sup> dependent signal transduction. *J. Immunol.* 1995. **155**: 4685–4691.
- 33 **O'Keefe, S. J., Tamura, R. I., Rincaid, M. J., Tocci, M. J. and Neil, E. A.**, FK-506 and Cs-A-sensitive activation of the IL-2 promoter by calcineurin. *Nature* 1992. **357**: 692–695.
- 34 **Anel, A., Simon, A. K., Auphan, N., Buferne, M., Boyer, C., Goldstein, P. and Schmitt-Verhulst, A.**, Two signaling pathways can lead to Fas ligand expression in CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocyte clones. *Eur. J. Immunol.* 1995. **25**: 3381–3387.
- 35 **McCaffrey, P. J., Jain, J., Jamieson, C., Sen, R. and Rao, A.**, A T cell nuclear factor resembling NF-AT binds to an NF- $\kappa$ B site and to the conserved lymphokine promoter sequence "cytokine-1". *J. Biol. Chem.* 1992. **267**: 1864–1871.
- 36 **Casolaro, V., Georas, S. N., Song, Z., Zubkoff, I. D., Abdulkadir, S. A., Thanos, D. and Ono, S. J.**, Inhibition of NF-AT-dependent transcription by NF- $\kappa$ B: Implications for differential gene expression in T helper cell subsets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995. **92**: 11623–11627.
- 37 **Oyaizu, N. S., Than, S., McCloskey, T. W. and Pahwa, S.**, Requirement of p56lck in TCR/CD3-mediated apoptosis and Fas-ligand induction in Jurkat cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995. **213**: 994–998.
- 38 **Lederer, J. A., Liou, J. S., Kim, S., Rice, N. and Lichtman, A. H.**, Regulation of NF- $\kappa$ B activation in T helper 1 and T helper 2 cells. *J. Immunol.* 1996. **156**: 56–63.
- 39 **Kanno, T. and Siebenlist, U.**, Activation of Nuclear Factor- $\kappa$ B via T cell receptor requires a Raf kinase and Ca<sup>2+</sup> influx. Functional synergy between Raf and Calcineurin. *J. Immunol.* 1996. **157**: 5277–5283.
- 40 **Rodriguez, M. S., Wright, J., Thompson, J., Thomas, D., Baleux, F., Virelizier, J.-L., Hay, R. T. and Arenzana-Seisdedos, F.**, Identification of lysine residues required for signal-induced ubiquitination and degradation of I $\kappa$ B $\alpha$  *in vivo*. *Oncogene* 1996. **12**: 2425–2435.
- 41 **Arenzana-Seisdedos, F., Fernández, B., Dominguez, I., Jacque, J. M., Thomas, D., Díaz-Meco, M. T., Moscat, J. and Virelizier, J.-L.**, Phosphatidylcholine hydrolysis activates NF- $\kappa$ B and increases human immunodeficiency virus replication in human monocytes and T lymphocytes. *J. Virol.* 1993. **67**: 6596–6604.

---

**Correspondence:** Rafael Bragado, Department of Immunology, Fundación Jiménez Díaz, Avda. Reyes Católicos 2, E-28040 Madrid, Spain  
Fax: +34-915448246  
e-mail: rbragado@uni.fjd.es

# A Novel Functional Interaction between Vav and PKC $\theta$ Is Required for TCR-Induced T Cell Activation

Martin Villalba,\* Nolwenn Coudronniere,\*  
Marcel Deckert,\*<sup>||</sup> Emma Teixeira,<sup>†</sup>  
Paloma Mas,<sup>‡</sup> and Amnon Altman\*<sup>§</sup>

\*Division of Cell Biology  
La Jolla Institute for Allergy and Immunology  
San Diego, California 92121

<sup>†</sup>Department of Immunology  
Fundación Jiménez Díaz  
Universidad Complutense  
Madrid 28040  
Spain

<sup>‡</sup>Department of Cell Biology  
The Scripps Research Institute  
La Jolla, California 92037

## Summary

**Vav and PKC $\theta$  play an early and important role in the TCR/CD28-induced stimulation of MAP kinases and activation of the IL-2 gene. Vav is also essential for actin cytoskeleton reorganization and TCR capping. Here, we report that PKC $\theta$  function was selectively required in a Vav signaling pathway that mediates the TCR/CD28-induced activation of JNK and the IL-2 gene and the upregulation of CD69 expression. Vav also promoted PKC $\theta$  translocation from the cytosol to the membrane and cytoskeleton and induced its enzymatic activation in a CD3/CD28-initiated pathway that was dependent on Rac and on actin cytoskeleton reorganization. These findings reveal that the Vav/Rac pathway promotes the recruitment of PKC $\theta$  to the T cell synapse and its activation, essential processes for T cell activation and IL-2 production.**

## Introduction

T cell activation induced by triggering of the antigen-specific T cell receptor (TCR)/CD3 complex in concert with costimulatory and adhesion receptors is a complex process that involves multiple enzymes, adapters, and other cellular proteins. Activation is initiated by stimulation of TCR-coupled protein tyrosine kinases (PTKs) of the Src and Syk families, which then phosphorylate various cellular substrates (reviewed in Weiss and Littman, 1994). This is followed by the recruitment and assembly of membrane signaling complexes that mediate different signal transduction pathways. These signals are relayed to the nucleus, where they induce a defined genetic program, of which the best characterized constituent is the activation of the interleukin-2 (IL-2) gene by coordinated binding of several transcription factors to the IL-2 gene promoter (reviewed in Crabtree and Clipstone, 1994; Jain et al., 1995). Recent studies have indicated

that formation of the T cell synapse (Grakoui et al., 1999) and assembly of productive signaling complexes depend on reorganization of the actin cytoskeleton (reviewed in Penninger and Crabtree, 1999) and are regulated, in addition, by specialized lipid microdomains (reviewed in Xavier and Seed, 1999).

Vav (reviewed in Romero and Fischer, 1996; Collins et al., 1997; Cantrell, 1998) and protein kinase C- $\theta$  (PKC $\theta$ ; reviewed in Meller et al., 1998) represent two critical enzymes in the TCR signaling machinery leading to IL-2 production. Analysis of Vav-deficient mice indicated that Vav is required for T cell development and antigen receptor-mediated T or B lymphocyte activation (Fischer et al., 1995; Zhang et al., 1995; Turner et al., 1997) as well as for TCR clustering and actin cytoskeleton reorganization (Fischer et al., 1998; Holsinger et al., 1998). Proper Vav function is also necessary for receptor-induced activation of the MAP kinase ERK and the transcription factors NFAT and NF- $\kappa$ B and for intact Ca<sup>2+</sup> mobilization (Fischer et al., 1998; Holsinger et al., 1998; Costello et al., 1999). Consistent with these findings, Vav overexpression in T cells enhances activation of transcriptional elements in the IL-2 gene (Wu et al., 1995; Deckert et al., 1996), in particular NFAT.

PKC $\theta$  is a novel Ca<sup>2+</sup>-independent PKC isoform (Baier et al., 1993) that plays an important early role in TCR-induced activation (Meller et al., 1998). Among several PKC isoforms tested, only PKC $\theta$  was capable of significantly stimulating Ras-dependent transcription from an AP-1 element in T cells (Baier-Bitterlich et al., 1996). Furthermore, PKC $\theta$  specifically cooperates with calcineurin (Cn) and plays a critical role in c-Jun N-terminal kinase (JNK) activation and induction of the IL-2 gene (Werlen et al., 1998; Ghaffari-Tabrizi et al., 1999). In addition, PKC $\theta$  selectively colocalizes with the TCR/CD3 complex in the central core of the supramolecular activation complex (SMAC) that forms at the contact region between antigen-specific T cells and antigen-presenting cells (APCs; Monks et al., 1997, 1998).

Several recent studies indirectly suggested that Vav and PKC $\theta$  display some functional similarities and/or operate in overlapping signaling pathways. For example, both signaling molecules can cooperate with a Ca<sup>2+</sup> signal or with constitutively active Cn (CA-Cn) to activate JNK and the IL-2 gene (Werlen et al., 1998; Villalba et al., unpublished data); PKC activation by phorbol ester can overcome the TCR-induced signaling defects (Fischer et al., 1998; Holsinger et al., 1998) and the resistance to apoptosis (Kong et al., 1998) in Vav-deficient T cells or thymocytes, respectively. In the latter case, Vav was found to constitutively associate with PKC $\theta$  but not with other PKC isoforms (Kong et al., 1998).

These findings prompted us to study possible interactions between those two signaling proteins. Here, we provide evidence that PKC $\theta$  is a Vav effector in T cells and that the requirement for intact PKC $\theta$  function dissociates two distinct Vav signaling pathways, i.e., its ability to stimulate IL-2 gene transcription, JNK activation, and CD69 upregulation versus actin cytoskeleton reorganization.

<sup>§</sup> To whom correspondence should be addressed (e-mail: amnon@liai.org).

<sup>||</sup> Present address: INSERM Unité 343, Central Immunology Laboratory, 06202 Nice, Cedex 3, France.



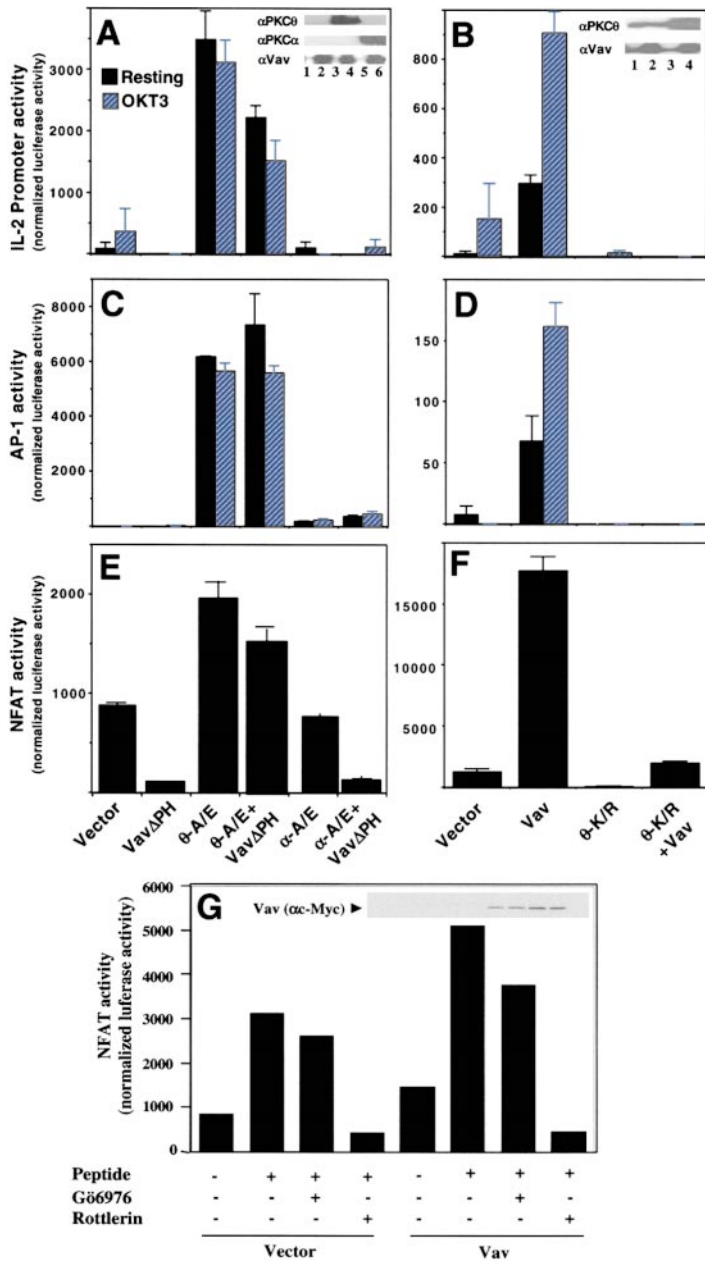


Figure 1. Interaction between Vav and PKCθ in IL-2 Promoter, AP-1, and NFAT Activation Jurkat-TAg cells ( $10 \times 10^6$ ) were transfected with the indicated combinations of constitutively active (A/E) PKCθ or α mutants (5 μg) and/or DN Vav (ΔPH; 10 μg) (A, C, and E) or with wild-type Vav (5 μg) and/or DN (K/R) PKCθ (10 μg; B, D, and E) in the presence of an IL-2-Luc (A and B), AP-1-Luc (C and D), or NFAT-Luc (E and F) reporter plasmid (5 μg each). Cells were left unstimulated or stimulated for the final 6 hr of culture with an anti-CD3 mAb (OKT3; 1 μg/ml). Luciferase activity was determined after 48 hr of culture and normalized to the activity of a cotransfected β-galactosidase plasmid. Maximal luciferase activity (in arbitrary luciferase units) of the IL-2, AP-1, or NFAT reporter in PMA-stimulated plus ionomycin-stimulated cells was 21,800, 100,000, and 400,000 arbitrary luciferase units, respectively. OKT3-stimulated activity of the NFAT reporter was 300,000 arbitrary luciferase units. Overexpression of the transfected proteins was confirmed by immunoblotting with the corresponding PKC- or Vav-specific antibodies ([A and B], insets). The numbers under the different lanes correspond to the transfection groups shown in each panel. Equivalent Vav and PKC expression levels were also detected in the AP-1 and NFAT assays (data not shown). (G) CH7C17 cells were transfected with the indicated combinations of empty vector, Vav, and/or NFAT reporter plasmids. After 24 hr in culture, the cells ( $10 \times 10^6$ /group) were stimulated for an additional 6 hr with  $2 \times 10^6$  mitomycin C-treated APCs alone or with APCs plus HA peptide (10 μg/ml) in the absence or presence of rottlerin (10 μM) or G66976 (5 μM). Luciferase activity was quantitated as above. The inset shows the expression levels of transfected Vav.

**Results**

**A Selective Requirement of PKCθ in Vav-Induced IL-2 Gene Activation**

In order to clarify whether these two proteins function in an overlapping pathway, we evaluated the effects of transfection with combinations of active or dominant-negative (DN) mutants of PKCθ and/or Vav on the basal and/or anti-CD3-stimulated activity of an IL-2 promoter-reporter gene in transiently transfected Jurkat T cells. As shown in Figure 1A, stimulation with an anti-CD3 monoclonal antibody (mAb; OKT3) induced minimal activation of the IL-2 promoter, consistent with findings that optimal induction of this promoter requires combined stimulation with an anti-CD3 antibody plus phorbol ester (Crabtree and Clipstone, 1994; Jain et al., 1995). A constitutively active PKCθ mutant, θ-A/E, induced signifi-

cant activation of the IL-2 promoter, which was similar in the absence or presence of OKT3 stimulation. This activity represented ~15% of the maximal activity induced by stimulation with phorbol ester (PMA) plus ionomycin. This effect of θ-A/E was selective since a constitutively active PKCα mutant failed to induce significant activity, even though it was properly overexpressed (Figure 1A, inset) and was more active than θ-A/E in stimulating the activity of a cotransfected ERK2 reporter (data not shown; Werlen et al., 1998). The equal expression levels of PKCθ and α were confirmed by using the corresponding epitope-tagged vectors in similar experiments (Coudronniere et al., 2000). Transient overexpression of VavΔPH, a DN Vav mutant whose pleckstrin-homology (PH) domain has been deleted (Villalba et al., unpublished data), blocked both the basal and OKT3-induced weak promoter activity in empty vector-transfected

cells. In contrast, the same Vav mutant only partially reduced the  $\theta$ -A/E-induced promoter activity under either basal (30% inhibition) or stimulated (50% inhibition) conditions.

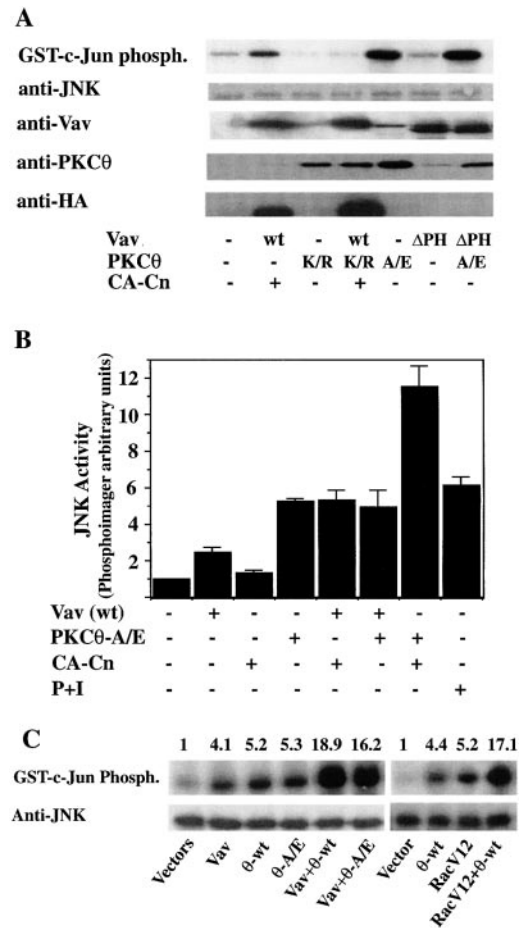
As reported earlier (Wu et al., 1995), transient Vav overexpression stimulated the basal activity of the IL-2 promoter and enhanced the anti-CD3-induced activity (Figure 1B). However, Vav was less active than  $\theta$ -A/E (compare Figure 1A versus 1B). A DN PKC $\theta$  mutant ( $\theta$ -K/R) blocked the promoter activity induced by OKT3 stimulation and/or transfected Vav. This effect was selective since, under similar conditions, the same  $\theta$ -K/R mutant did not inhibit the ability of Vav to promote actin polymerization (Figure 4B). Immunoblotting with anti-PKC $\theta$  or -Vav antibodies confirmed the overexpression of the relevant proteins in the appropriate transfection groups (Figures 1A and 1B, insets). These findings suggest that functional PKC $\theta$  is required for TCR- and/or Vav-stimulated promoter activity and tentatively place PKC $\theta$  downstream of Vav or in an essential pathway that acts in parallel to Vav.

Similar to their effects on the IL-2 promoter,  $\theta$ -A/E and Vav were each capable of activating the AP-1 (Figures 1C and 1D) or NFAT (Figures 1E and 1F) reporters, respectively. PKC $\theta$ -A/E was much more effective than Vav in inducing AP-1 activity (compare Figure 1C versus 1D) but, conversely, Vav was a more potent activator of NFAT than  $\theta$ -A/E (compare Figure 1F versus 1E). As in the case of the IL-2 promoter, the stimulatory effect of  $\theta$ -A/E was specific since  $\alpha$ -A/E failed to stimulate AP-1 or NFAT and Vav $\Delta$ PH failed to significantly inhibit the  $\theta$ -A/E-induced activities of these two reporters (Figures 1C and 1E). In contrast, the DN PKC $\theta$  mutant blocked the Vav-induced reporter activity (Figures 1D and 1F). We were unable to address in an informative manner the effect of Vav $\Delta$ PH on PKC $\theta$ -A/E-induced NFAT activity in activated cells since PKC $\theta$ -A/E consistently inhibited the anti-CD3-stimulated NFAT activity. The reason for this is unclear, but it may be related to the observed inhibition of Ca<sup>2+</sup>-dependent NFAT activity in T cells by constitutively active Ras (Chen et al., 1996) since our previous work established a functional connection between PKC $\theta$  and Ras (Baier-Bitterlich et al., 1996).

The biological relevance of these findings was further established by using a previously characterized antigen-dependent activation system, i.e., variant Jurkat cells (CH7C17) that stably express an  $\alpha\beta$ -TCR specific for a hemagglutinin (HA)-derived peptide (Hewitt et al., 1992). Stimulation of these cells with peptide plus APCs induced activation of the NFAT reporter, which was further enhanced by transient Vav overexpression (Figure 1G). Rottlerin, a selective inhibitor of PKC $\theta$  (Villalba et al., 1999a; Coudronniere et al., 2000), blocked antigen-induced NFAT activation and reduced it to a level lower than the basal activity in unstimulated cells. In contrast, Gö6976, an inhibitor selective for Ca<sup>2+</sup>-dependent PKC isoforms (Villalba et al., 1999), caused minimal inhibition of NFAT activation (Figure 1G).

#### Relationship between Vav and PKC $\theta$ in JNK Activation

Vav cannot efficiently activate JNK in T cells, but it can cooperate with CA-Cn to do so (Villalba et al., unpublished data). On the other hand, PKC $\theta$  is unique among



**Figure 2. Interactions between Vav and PKC $\theta$  in JNK Activation**  
(A) PKC $\theta$  is downstream of Vav in the pathway leading to JNK activation. Jurkat-TAG cells were transfected with an HA-JNK1 plasmid (5  $\mu$ g) together with CA-Cn, CA-PKC $\theta$ , and Vav or with 10  $\mu$ g of DN-PKC $\theta$  or DN-Vav. After 2 days, HA-JNK was immunoprecipitated with an anti-HA antibody and JNK kinase activity was determined by an in vitro immune complex kinase assay. Under the same conditions, DN-PKC $\theta$  blocked the anti-CD3 plus CD28-induced activation of JNK (data not shown). These results are representative of three similar experiments.  
(B) Vav and PKC $\theta$  do not cooperate to activate JNK in T cells. Cells were transfected and analyzed as in (A). As a control, some cells were stimulated for 15 min with PMA (100 ng/ml) plus ionomycin (1  $\mu$ g/ml). Results represent the mean  $\pm$  SD of three experiments.  
(C) Vav and PKC $\theta$  synergize to activate JNK in nonhematopoietic cells. 293T cells ( $1 \times 10^6$ ) were transfected with the indicated plasmids plus HA-JNK1 (5  $\mu$ g each). JNK kinase activity (top panel) or its expression level (bottom panel) were determined as described in (A) and (B). The numbers above each lane represent the fold activation of JNK relative to the empty vector-transfected group (=1), as determined by phosphorimager analysis.

T cell-expressed PKCs in its ability to activate JNK and to cooperate with CA-Cn (Werlen et al., 1998; Ghaffari-Tabrizi et al., 1999). Therefore, we ascertained the inter-relationship between PKC $\theta$  and Vav with regard to JNK activation. Transient coexpression of Vav and CA-Cn induced significant activation of a cotransfected JNK plasmid (Figure 2A), and, moreover, this activation was completely blocked by coexpressed  $\theta$ -K/R. On the other hand,  $\theta$ -A/E by itself also activated JNK, but Vav $\Delta$ PH

failed to inhibit this effect. The same Vav mutant inhibited, however, JNK activation induced by anti-CD3 plus anti-CD28 stimulation (Villalba et al., unpublished data).

In addition, Vav or CA PKC $\theta$  cooperated with CA-Cn but not with each other to induce JNK activity (Figure 2B). This lack of cooperation between Vav and PKC $\theta$  favors the idea that PKC $\theta$  acts downstream of Vav in the same (or a partially overlapping) pathway leading to JNK activation and, furthermore, that this pathway cooperates with Ca<sup>2+</sup>/Cn signals. This is consistent with the two-signal requirement for JNK activation in T cells (Su et al., 1994; Werlen et al., 1998).

Since this two-signal requirement is unique to T cells (Su et al., 1994) and neither PKC $\theta$  (Werlen et al., 1998) nor Vav (Villalba et al., unpublished data) cooperate with Cn in nonhematopoietic cells, it might be predicted that ectopic expression of Vav plus PKC $\theta$  will result in a cooperative effect in cells that lack both proteins. To test this possibility, we analyzed the effects of Vav and/or PKC $\theta$  on the activity of a cotransfected JNK reporter in heterologous 293 cells (Figure 2C). Each of these proteins stimulated the activity of JNK compared to the empty vector-transfected cells (lanes 2–4 versus lane 1). When the two were combined, synergistic effect was observed (lanes 5 and 6). No significant difference was observed between wild-type and constitutively active PKC $\theta$ , perhaps reflecting the possibility that normal PKC $\theta$  regulatory mechanisms are absent in 293 cells. Nevertheless, PKC $\theta$  activity was essential for JNK activation since the kinase-inactive  $\theta$ -K/R, either alone or in combination with Vav (data not shown), failed to stimulate JNK activity in 293 cells. Similar to Vav, a constitutively active Rac mutant (RacV12) also synergized with PKC $\theta$  to activate JNK (lanes 7–10). A constitutively active Cdc42 mutant (Cdc42V12) behaved in a similar manner (data not shown).

### Specific Inhibition of Vav-Mediated CD69 Upregulation by DN PKC $\theta$

We recently found that transient overexpression of either Vav (Figure 3A) or constitutively active PKC $\theta$  (data not shown) upregulates the expression of the activation antigen CD69 in Jurkat T cells. The biological relevance of this novel finding is indicated by the report that Vav<sup>-/-</sup> thymocytes display a defect in CD69 expression following TCR/CD3 stimulation (Fischer et al., 1995) and, furthermore, by our finding that the Vav-induced CD69 upregulation was dependent on functional Ras (Villalba et al., unpublished data), similar to the TCR/CD3-induced expression of CD69 (D'Ambrosio et al., 1994). We determined whether PKC $\theta$  is also required for Vav-mediated CD69 upregulation by assessing the effects of DN PKC $\theta$ . Coexpression of  $\theta$ -K/R inhibited the effect of Vav by ~90%. In contrast, DN mutants of other PKC isoforms, which were properly overexpressed in the cells (data not shown), failed to cause a significant inhibition of Vav-induced CD69 expression (Figure 3). As a positive control (D'Ambrosio et al., 1994), a constitutively active Ras mutant (RasL61) also upregulated the expression of CD69.

### Vav-Induced Actin Cytoskeleton Reorganization Is Independent of PKC $\theta$

Vav is required for TCR clustering, reflecting its ability to promote Rac-dependent reorganization of the actin

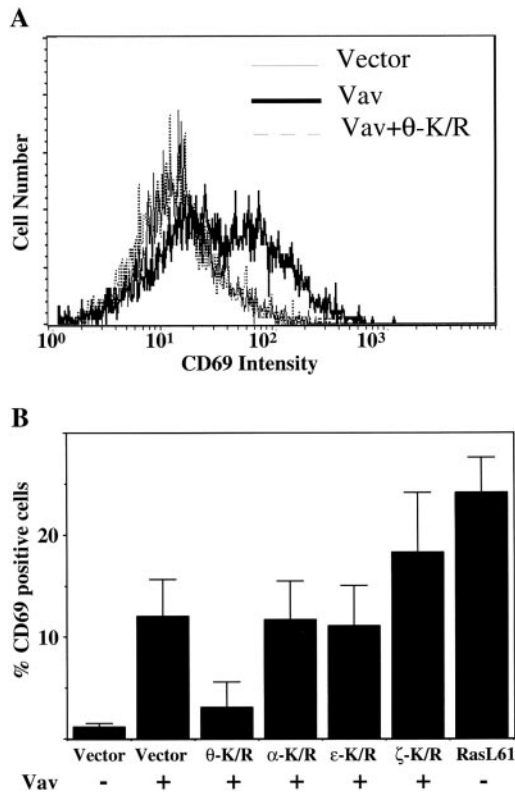


Figure 3. Vav Upregulates CD69 Expression via a Selective, PKC $\theta$ -Dependent Pathway

Jurkat-TAG cells were transfected with empty vector, Vav, or Vav plus the indicated DN PKC mutants (5  $\mu$ g each) in the presence of pEF-GFP. CD69 expression was determined 2 days later by FACScan analysis of GFP-gated cells. The results are displayed as histograms (A) or as average percentage of CD69-positive cells  $\pm$  SE in three separate experiments (B). As a positive control, one group of cells was transfected with CA-Ras (RasL61) to induce CD69 expression (B).

cytoskeleton (Fischer et al., 1998; Holsinger et al., 1998; Kong et al., 1998; Penninger and Crabtree, 1999). As shown in Figure 4A, transient Vav overexpression increased the F-actin content and its accumulation in the submembranous area, which was similar to the effect induced by anti-CD3 stimulation. This effect was sensitive to cytochalasin D, which disrupts the actin cytoskeleton.

Next, we determined whether Vav-induced actin polymerization was dependent on PKC $\theta$  by quantitating the binding of phalloidin to F-actin. Transient Vav overexpression increased the amount of F-actin in either unstimulated or anti-CD3-stimulated T cells (Figure 4B). In contrast to the selective requirement of PKC $\theta$  for Vav-induced transcriptional activation (Figure 1), JNK activation (Figure 2), or CD69 upregulation (Figure 3), DN PKC $\theta$  consistently failed to significantly reduce the Vav-mediated actin polymerization in unstimulated or anti-CD3-activated cells (Figure 4B, left panel). Similarly, transient overexpression of  $\theta$ -K/R alone also did not interfere with the OKT3-stimulated F-actin accumulation. Consistent with these findings, the selective PKC $\theta$  inhibitor (rottlerin; Figure 1G) did not significantly inhibit Vav- or anti-CD3-induced actin polymerization (data not shown). These results indicate that Vav participates in at least



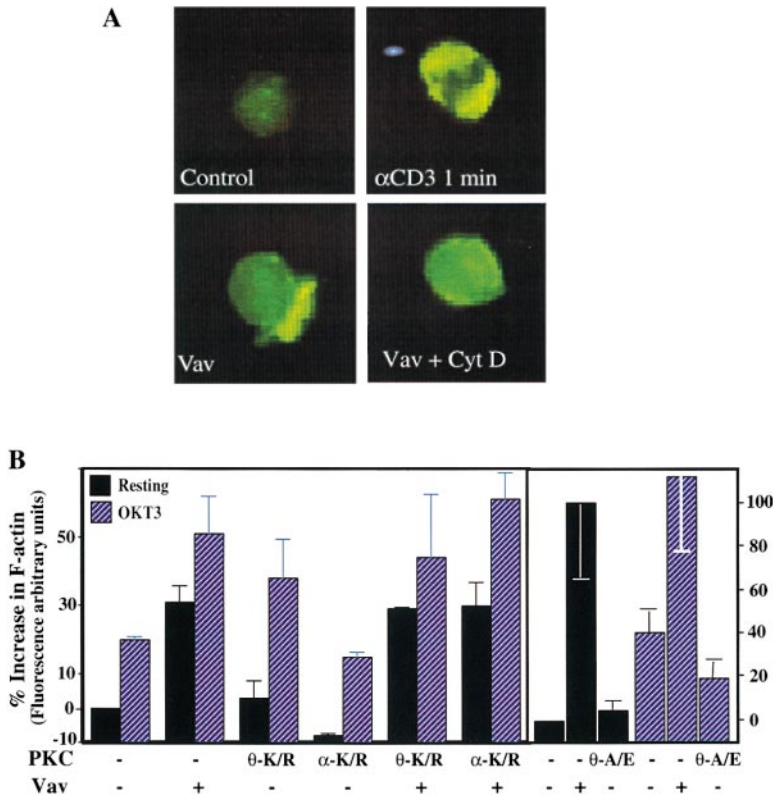


Figure 4. Vav Regulation of Actin Polymerization Is PKC $\theta$  Independent

(A) Empty vector (pEF)-transfected Jurkat T cells were left unstimulated or activated with OKT3 for 1 min (left and right upper panels, respectively). Another group of cells was transfected for 48 hr with Vav, and a portion of these cells was treated with cytochalasin D (10  $\mu$ g/ml). The cells were fixed and permeabilized, and F-actin was visualized by TRITC-phalloidin staining and immunofluorescence microscopy.

(B) Jurkat-TAg cells ( $10 \times 10^6$ ) were cotransfected with the indicated combinations of Vav (5  $\mu$ g) DN (K/R) or CA (A/E) PKC $\theta$  or  $\alpha$  mutants (10  $\mu$ g each) plus pEF-GFP (5  $\mu$ g). Half of the cells in each group were stimulated with OKT3 (1  $\mu$ g/ml) for the final 10 min of culture. After 2 days, the cells were fixed and analyzed for F-actin content as in (A). The results are displayed as percentage increase in mean fluorescence intensity relative to empty vector-transfected, unstimulated cells, and represent the mean  $\pm$  SD of three (left panel) or two (right panel) experiments.

two distinct signaling pathways, i.e., a PKC $\theta$ -dependent pathway that upregulates CD69 and activates JNK and the IL-2 gene and a PKC $\theta$ -independent pathway that mediates actin polymerization and, therefore, is most likely involved in TCR/CD3 capping (Penninger and Crabtree, 1999). The independence of the latter pathway on PKC $\theta$  is further supported by the finding that, unlike Vav, transient overexpression of constitutively active PKC $\theta$  failed to induce significant F-actin accumulation (Figure 4B, right panel).

#### Vav Promotes the Selective Membrane Translocation of PKC $\theta$

A recent study reported an association between PKC $\theta$  and Vav (Kong et al., 1998). However, numerous coimmunoprecipitation experiments using anti-Vav or -PKC $\theta$  antibodies failed to demonstrate detectable association between these two proteins either before or after stimulation with anti-CD3 and/or anti-CD28 antibodies (Figure 5A), even when they were overexpressed by transient transfection. Under the same conditions, the association between Vav and the adapter protein SLP-76 (Wu et al., 1996) and its upregulation by T cell activation could be readily demonstrated (Figure 5A). It is, therefore, possible that the reported Vav-PKC $\theta$  association (Kong et al., 1998) is a unique feature of immature T cells.

PKC $\theta$  activation is associated with its membrane and cytoskeletal translocation (Meller et al., 1996) as well as with its colocalization with the TCR to the contact site between antigen-specific T cells and APCs (Monks et al., 1997). Consistent with this, costimulation of Jurkat T cells with anti-CD3 plus anti-CD28 antibodies induced a time-dependent translocation of PKC $\theta$  from the cytosol to the membrane and detergent-insoluble (cytoskeleton) subcellular fractions, which peaked at 10 min

(Figure 5B). We ascertained whether transient Vav overexpression could promote a similar translocation of PKC. Jurkat cells were transfected with Vav, and the distribution of endogenous PKC $\theta$ ,  $\alpha$ ,  $\epsilon$ , and  $\zeta$  among the cytosol, membrane, and detergent-insoluble fractions was determined by immunoblotting. The results (Figure 5C) show an increase in the membrane and cytoskeletal fractions of PKC $\theta$  relative to its cytosolic content, but not of the other PKC isoforms, in the Vav-transfected cells. This selective translocation of PKC $\theta$  is evident after quantitation of the PKC signals (Figure 5D). In contrast to the selective effect of Vav, PMA treatment induced cytosol-to-membrane translocation of PKC $\theta$ ,  $\alpha$ , and  $\epsilon$  but had no effect on PKC $\zeta$ , which is unresponsive to PMA (Ohno et al., 1989). The effect of Vav on PKC $\theta$  localization probably represents an underestimate since only a fraction of the cell population expressed the transfected Vav vector.

Next, we cotransfected Jurkat cells with an epitope-tagged PKC $\theta$  expression vector plus wild-type or DN ( $\Delta$ PH) Vav and analyzed the expression of the transfected PKC $\theta$  in different subcellular fractions by immunoblotting with an anti-Xpress tag mAb (Figure 5E). The results clearly indicate that anti-CD3 stimulation as well as Vav coexpression caused a similar redistribution of the cotransfected PKC $\theta$  from the cytosol to the membrane and cytoskeleton fractions. More importantly, the basal expression of PKC $\theta$  in the membrane and cytoskeleton and, in particular, its OKT3-induced translocation to the same fractions was severely reduced by coexpressing a DN Vav mutant (second panels from bottom). In addition, the effect of wild-type Vav was reversed by coexpressing a DN Rac mutant (bottom panels). We confirmed these effects of Vav by using



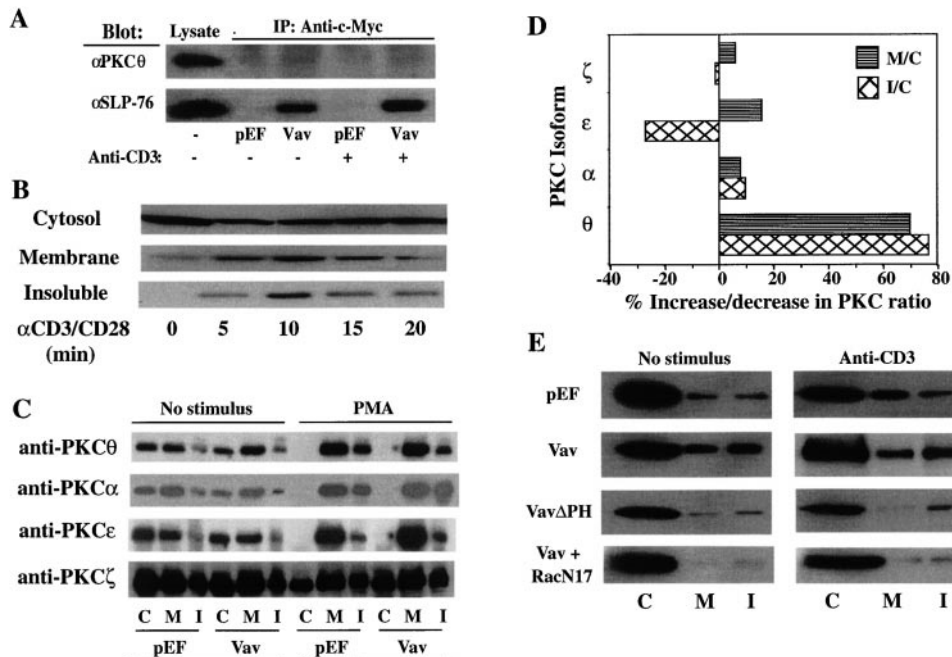


Figure 5. Vav Induces Membrane and Cytoskeleton Translocation of PKC $\theta$

(A) Jurkat-TAg cells were transfected with empty vector (pEF) or pEF-c-Myc-Vav (10  $\mu$ g) and left unstimulated or activated with OKT3 for the final 2 min of a 48 hr culture. The cells were lysed, and Vav was immunoprecipitated with an anti-c-Myc mAb. The immunoprecipitates, or a sample of the cell lysate, were analyzed by immunoblotting with anti-PKC $\theta$  or -SLP-76 antibodies. Similar results were obtained in several experiments.

(B) Jurkat cells were stimulated with anti-CD3 plus anti-CD28 antibodies for the indicated times. Cytosol, membrane, and detergent-insoluble fractions were prepared, resolved by SDS-PAGE, and the expression of PKC $\theta$  in each fraction was determined by immunoblotting with a specific antibody. These results are representative of five similar experiments.

(C) Vav induces selective translocation of endogenous PKC $\theta$  to the membrane and cytoskeleton. Jurkat-TAg cells ( $20 \times 10^6$ ) were transfected with empty vector (pEF) or Vav (5  $\mu$ g each) and lysed after 40 hr. Cytosol (C), membrane (M), and detergent-insoluble (I) cell fractions were prepared, resolved by SDS-PAGE, and expression of the indicated endogenous PKC isoforms in each fraction was analyzed by immunoblotting with the corresponding isoform-specific antibodies (left panels). As a positive control for PKC translocation, a portion of the cells in each transfection group was stimulated with PMA (100 ng/ml) for the final 10 min of culture (right panels). The same protein amounts from each fraction were loaded in each lane. Similar findings were obtained in a separate experiment.

(D) PKC signals from the unstimulated cells in (C) were quantitated by scanning densitometry, normalized to an equal cell number in each fraction, and the membrane-to-cytosol (M/C) or cytoskeleton-to-cytosol (I/C) PKC ratios were calculated. The results are displayed as percentage of increase/decrease of the PKC ratio in the Vav-transfected cells relative to pEF-transfected cells.

(E) PKC $\theta$  translocation is regulated by Vav. Jurkat-TAg cells ( $20 \times 10^6$ ) were transfected with the indicated combinations of wild-type Vav (5  $\mu$ g), DN-Vav ( $\Delta$ PH), and/or DN-Rac (RacN17) (10  $\mu$ g each) together with an Xpress-tagged PKC $\theta$  plasmid (5  $\mu$ g). A portion of the cells in each group was stimulated with OKT3 (1  $\mu$ g/ml) for the final 10 min of culture. Cells were lysed and fractionated as in (C), and expression of the transfected PKC $\theta$  in each fraction was determined by anti-Xpress immunoblotting. These results are representative of three similar experiments.

confocal microscopy to follow the localization of a transfected recombinant protein consisting of the regulatory domain of PKC $\theta$  fused to green fluorescent protein (GFP). Similar constructs of other PKCs were found to mimic the behavior of native PKC and its stimulus-dependent response (Oancea and Meyer, 1998). F-actin distribution was followed in parallel by phalloidin staining. As reported (Meller et al., 1996), a fraction of PKC $\theta$ -GFP localized to the membrane in unstimulated Jurkat cells (Figure 6, top right panel). PMA stimulation (middle right panel) as well as Vav overexpression (bottom right panel) induced increased translocation and a more granular appearance of PKC $\theta$  to the membrane and sub-membranous area, and this coincided with the redistribution of F-actin in the same cells (left panels). A similar result was obtained when heterologous 293 cells were cotransfected with Vav and the PKC $\theta$ -GFP plasmids (data not shown). Consistent with this effect of Vav,

transient Vav overexpression enhanced the redistribution of PKC $\theta$  into clustered membrane lipid rafts (K. Bi and A. A., unpublished data). Taken together, the results in Figures 5 and 6 indicate that Vav-dependent signals, which most likely reflect its regulation of the actin cytoskeleton (Figure 4), are important for the translocation of PKC $\theta$  from the cytosol into compartments where it can potentially interact with the TCR signaling machinery (Monks et al., 1997) and mediate its biological activities.

#### Vav Activates PKC $\theta$ and Is Involved in Receptor-Mediated PKC $\theta$ Activation

In order to determine whether the Vav-induced translocation of PKC $\theta$  to the membrane and cytoskeleton is associated with its enzymatic activation, we performed immune complex kinase assays of PKC $\theta$  isolated from

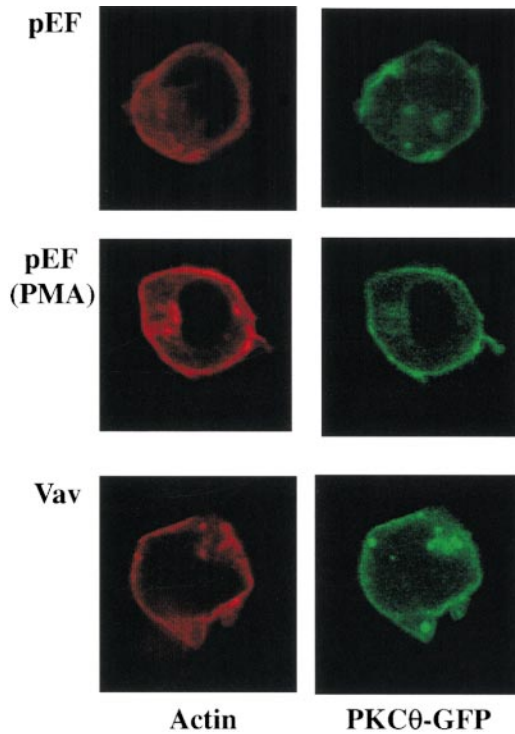


Figure 6. Vav Induces Membrane Translocation of a PKC $\theta$ -GFP Fusion Protein

Jurkat-TAG cells were transfected with empty vector (pEF) or Vav (5  $\mu$ g each) together with 5  $\mu$ g of a PKC $\theta$  regulatory domain-GFP expression plasmid. After 2 days, GFP localization was analyzed by confocal imaging. Some cells were stimulated for the final 10 min of culture with PMA (100 ng/ml) as a positive control for PKC $\theta$  translocation. F-actin localization in the same cells was revealed by phalloidin staining. These images are representative of 80% of the pEF-transfected cells (43/50 cells observed), 95% of the PMA-stimulated cells (26/27 cells observed), and 75% of the Vav-transfected cells (32/41 cells observed).

empty vector-transfected cells or from cells cotransfected with Vav or a CA Rac (RacV12) mutant. The kinase assays were performed in the absence of the activating lipid cofactors in order to assess the in situ activity of PKC (Monks et al., 1997). Vav as well as RacV12 induced activation of PKC $\theta$ , and this effect was selective since activation of PKC $\alpha$  was not detected (Figure 7A).

Finally, we analyzed the effects of DN Vav (Vav $\Delta$ PH) or Rac (RacN17) mutants on the anti-CD3/CD28-stimulated activation of PKC $\theta$ . This stimulation induced a readily detectable activation of PKC $\theta$  (Figure 7B; lane 2 versus lane 1). However, PKC $\theta$  activation was blocked when the cells were cotransfected with the DN Vav (lane 3) or Rac (lane 4) mutants. For comparison, cytochalasin D pretreatment also blocked the ability of the antibodies to induce PKC $\theta$  activation (lane 5) or actin polymerization (Figure 4A). Nearly equal amounts of PKC $\theta$  were expressed in all groups (Figure 7B, bottom panel).

## Discussion

Productive T cell activation requires the proper assembly and formation of the T cell SMAC (Monks et al., 1998) or synapse (Grakoui et al., 1999) in the contact region

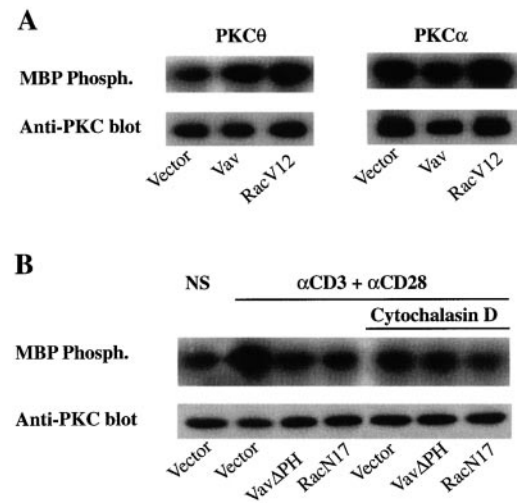


Figure 7. A Vav/Rac/Cytoskeleton Pathway Mediates Receptor-Stimulated PKC $\theta$  Activation

(A) Jurkat-TAG cells were transfected with 5  $\mu$ g empty vector, Vav, or CA-Rac (RacV12). Endogenous PKC $\theta$  or PKC $\alpha$  was immunoprecipitated after 40 hr, and enzymatic activity was determined by an in vitro kinase reaction using MBP as a substrate (top panels). The kinase reactions were performed in the absence of lipid cofactors or PMA to reflect the in situ activity of the kinases (Monks et al., 1997). Aliquots of the immunoprecipitates were immunoblotted with the corresponding PKC-specific antibodies to confirm the similar expression levels of PKC $\theta$  or  $\alpha$  in different groups (bottom panels). (B) Jurkat-TAG cells were transfected with the indicated plasmids and were either left unstimulated or stimulated with anti-CD3 plus anti-CD28 antibodies for the final 10 min of culture. Some groups were pretreated with cytochalasin D (10  $\mu$ g/ml) as indicated. PKC $\theta$  activity (top panel) or expression levels (bottom panel) were determined as in (A). Similar results to those in (A) and (B) were obtained in two additional experiments.

with APCs, a process that depends on reorganization of the actin cytoskeleton (Penninger and Crabtree, 1999) and on the selective accumulation of the TCR/CD3 complex and associated signaling molecules within membrane lipid rafts (Xavier and Seed, 1999). Our findings reveal a novel role for Vav in the recruitment of PKC $\theta$  to the relevant membrane/cytoskeletal compartments, where it needs to localize in order to become activated and promote TCR-initiated proliferation (Monks et al., 1997, 1998). The relevance of these results to physiological events associated with TCR/CD3-mediated T cell activation is established by the following: the ability of DN Vav or PKC $\theta$  mutants to inhibit CD3 or CD3/CD28-mediated transcriptional activation (Figure 1) or JNK activation (Werlen et al., 1998; Villalba et al., unpublished data); the inhibition of antigen- and/or Vav-induced NFAT activity by a selective PKC $\theta$  inhibitor (Figure 1G); the translocation and activation of PKC $\theta$  induced by physiological CD3/CD28 stimulation (Figure 5A), which is mimicked by Vav (Figures 5B–5D and 6); and the inhibition of receptor-induced PKC $\theta$  translocation (Figure 5D) or activation (Figure 7B) by DN Vav or Rac and by cytochalasin D. Taken together, all of these findings and, in particular, the similarities between the actions of Vav and PKC $\theta$  at the level of transcriptional stimulation, JNK activation, and CD69 upregulation suggest

that Vav and PKC $\theta$  are components of the same signaling pathway. Moreover, the findings that the above functional effects induced by Vav are blocked by DN PKC $\theta$  but not vice versa indicate that PKC $\theta$  can be functionally placed downstream of Vav in this pathway.

Despite these similarities, there are some notable differences between Vav and PKC $\theta$ . Thus, PKC $\theta$  is considerably more efficient than Vav in stimulating the IL-2 gene promoter and particularly AP-1 in unstimulated cells; conversely, Vav is a more potent inducer of NFAT activity. We attribute these differences to the fact that PKC $\theta$  is an effective activator of the Ras/JNK/AP-1 pathway (Baier-Bitterlich et al., 1996; Werlen et al., 1998; Ghaffari-Tabrizi et al., 1999) but, most likely, does not have a role in activating the Ca<sup>2+</sup>/Cn pathway; in contrast, Vav is a weak inducer of the Ras/JNK pathway (Villalba et al., unpublished data), but it plays an important role in activating the Ca<sup>2+</sup>/Cn pathway (Fischer et al., 1998; Holsinger et al., 1998; Costello et al., 1999), which is essential for NFAT induction (Rao et al., 1997; Crabtree, 1999). Based on these differences, we favor the view that Vav and PKC $\theta$  function in overlapping but not identical pathways. One pathway, which is shared by both signaling proteins, mediates transcription factor and JNK activation as well as CD69 upregulation. However, each of these proteins uniquely regulates other nonoverlapping signaling events (Collins et al., 1997; Meller et al., 1998).

Despite being able to block transcriptional activation, JNK stimulation, and CD69 upregulation (Figures 1–3), DN PKC $\theta$  has no detectable effect on the Vav- or anti-CD3-induced F-actin accumulation (Figure 4B). The most plausible model to explain this finding is as follows: first, TCR/CD28 stimulation activates tyrosine kinases, which, in turn, activate Vav via its tyrosine phosphorylation in a process that is not strictly dependent on actin cytoskeleton reorganization. This is consistent with the findings that early tyrosine phosphorylation events are intact in cytochalasin D-treated normal T cells or in Vav-deficient T cells (Fischer et al., 1998; Holsinger et al., 1998). Second, activated Vav induces actin polymerization and TCR capping via Rac/Cdc42, and this process does not require functional PKC $\theta$ . However, these Vav-induced events are essential for the translocation of PKC $\theta$  and its colocalization with the TCR in the T cell SMAC (Monks et al., 1997, 1998) as well as for its enzymatic activation. Direct or indirect association of PKC $\theta$  with a cytoskeletal protein could represent one mechanism through which Vav may promote PKC $\theta$  translocation and activation. Finally, the Vav/Rac-induced membrane recruitment of PKC $\theta$  induces its activation and, consequently, activation of JNK and the IL-2 gene as well as upregulation of CD69. The dependence of this pathway on intact PKC $\theta$  function reflects the essential role of a Vav/Rac pathway in inducing PKC $\theta$  membrane localization and activation. It would be interesting to determine whether this represents an alternative PKC $\theta$  activation mechanism that is independent of PLC- $\gamma$ 1 activation and diacylglycerol production.

According to this model, Vav independently regulates different T cell functions, as would be expected from its domain structure and multifunctional nature (Collins et al., 1997). This notion is generally consistent with the

recently emerging view that Vav independently regulates different signaling pathways, including growth and cytoskeleton reorganization pathways (Cantrell, 1998; Fischer et al., 1998). It is also consistent with the findings that distinct functions of the Vav effectors, Rac or Cdc42, i.e., their ability to induce reorganization of the actin cytoskeleton and JNK activation versus the activation of PAK, can be dissociated by mutations in their effector domains (Lamarche et al., 1996).

The major novel aspect of our study is the functional linkage of PKC $\theta$  to Vav and Rac in the T cell growth regulatory pathway and the apparent absolute dependence of Vav on intact PKC $\theta$  function in this pathway. This link between Vav and PKC $\theta$  provides a mechanistic basis for the implied connection between these two proteins suggested recently by Penninger and Crabtree (1999). However, since we failed to confirm the reported (Kong et al., 1998) physical association between Vav and PKC $\theta$  (Figure 5A), it is likely that, at least in our system, PKC $\theta$  is functionally but not physically linked to Vav. It is possible that the reported association between Vav and PKC $\theta$  (Kong et al., 1998) reflects their localization to the same membrane microdomains and/or cytoskeletal structures, rather than a direct physical interaction.

The model proposed herein provides a common mechanistic basis for several recent findings concerning the assembly and organization of the T cell synapse (Grakoui et al., 1999) or SMAC (Monks et al., 1998): first, the selective antigen-induced activation and localization of PKC $\theta$  to the contact site between antigen-specific T cells and APCs (Monks et al., 1997); second, the selective role of PKC $\theta$  in JNK, AP-1, and IL-2 induction (Baier-Bitterlich et al., 1996; Werlen et al., 1998; Ghaffari-Tabrizi et al., 1999); third, the importance of Vav in reorganizing the T cell actin cytoskeleton and TCR cap (Fischer et al., 1998; Holsinger et al., 1998); fourth, its accumulation in the same lipid rafts where the TCR complex and various signaling elements, including (presumably) PKC $\theta$  (Monks et al., 1997), are found (Xavier and Seed, 1999); and, finally, the ability of Vav to independently regulate actin polymerization and growth signals (our findings herein; Miranti et al., 1998). The availability of Vav-deficient mice and the anticipated generation of PKC $\theta$ -deficient mouse lines will now make it possible to test several experimental predictions that can be formulated based on the model emerging from our findings.

## Experimental Procedures

### Antibodies and Reagents

Polyclonal rabbit antibodies against PKC $\theta$  and JNK and the anti-Myc mAb (9E10) were obtained from Santa Cruz Biotechnology. PKC $\theta$ -,  $\alpha$ -,  $\epsilon$ -, or  $\zeta$ -specific mAbs were obtained from Transduction Laboratories. The anti-CD3 mAb (OKT3) was purified as previously described (Villalba et al., 1999a). The anti-human CD28 and phycoerythrin (PE)-conjugated anti-human CD69 mAbs were from Pharmingen. The anti-HA (clone 12CA5) and -Xpress tag mAbs were obtained from Roche Molecular Biochemicals and Invitrogen, respectively. The anti-phospho-c-Jun polyclonal antibody was from New England Biolabs, and the anti-human Vav mAb was from Upstate Biotechnology. Donkey anti-rabbit or sheep anti-mouse IgG antibodies were obtained from Amersham. Rottlerin and Gö6976 were purchased from Calbiochem. All other reagents were obtained from Sigma.



### Plasmids

The cDNAs encoding human wild-type PKC $\theta$  and  $\alpha$ , the corresponding constitutively active (A/E) mutants, and the DN (kinase-inactive; K/R) mutants of these PKCs as well as rat PKC $\epsilon$  and mouse PKC $\zeta$  in the eukaryotic expression vector pEFneo have been described (Villalba et al., 1999). To generate an epitope-tagged version of PKC $\theta$ , the PKC $\theta$  plasmids were subcloned into the BamHI and XbaI sites, respectively, of the pEF4/His-C mammalian expression vector (Invitrogen) by standard techniques. This vector encodes in-frame His<sub>6</sub> and Xpress tags upstream of the insert. The construction of c-Myc-tagged Vav expression plasmids in the pEF vector was described (Villalba et al., unpublished data). Briefly, the PH domain of wild-type Vav cDNA (Deckert et al., 1996) was deleted ( $\Delta$ PH) by digesting the corresponding cDNA with NgoMI and BspEI, thereby excising a fragment encoding residues 403–507 of Vav. An HA-tagged, constitutively active calcineurin A mutant (CA-Cn), a CA Ras (RasL61) mutant, CA (RacV12) or DN (RacN17) Rac mutants (all in the pSR $\alpha$  vector), and HA-tagged JNK1 in pCDNA3 were obtained from Dr. M. Karin and have been described (Werlen et al., 1998; Villalba et al., unpublished data). An expression vector encoding the regulatory domain of PKC $\theta$  fused to the N terminus of GFP was a generous gift from Dr. J. Neefjes and E. Reits (The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam). This plasmid was generated by PCR-mediated amplification of the PKC $\theta$  regulatory domain and its ligation into the pEGFP-N1 vector (Clontech). A GFP expression plasmid in the pEF vector was obtained from Dr. G. Baier (University of Innsbruck). As control for transfection efficiencies, a  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal) expression plasmid in the pEF vector was used.

### Cell Culture and Transfection

Simian virus 40 large T antigen–transfected human leukemic Jurkat T (Jurkat-TAg) cells were grown in RPMI 1640 medium (Life Technologies), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 10 mM HEPES, 1 $\times$  MEM nonessential amino acid solution (Life Technologies), and 100  $\mu$ M/ml each of penicillin G and streptomycin. CH7C17 is a Jurkat variant that stably expresses an HA peptide (residues 307–319) specific TCR (Hewitt et al., 1992). The EBV-transformed human B lymphoblastoid cell line LG-2 was used as a source of mitomycin C–treated APCs. COS cells and simian virus 40 large T antigen–transfected 293 (293 T) cells were grown in DMEM (Life Technologies) supplemented with 2 mM glutamine, 10% FBS, 1 mM sodium pyruvate, and the same antibiotics. Cells in a logarithmic growth phase were transfected with the indicated amounts of plasmid DNAs by electroporation as described previously (Villalba et al., 1999a).

### Luciferase and $\beta$ -Galactosidase Assays

Transfected Jurkat-TAg cells were harvested after 2 days, washed twice with PBS, lysed, and luciferase or  $\beta$ -galactosidase activities in cell extracts were determined as described (Villalba et al., 1999a, unpublished data).

### Immunoprecipitation and Immunoblotting

Cells were lysed in 1 ml lysis buffer (20 mM Tris–HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, plus 1% Nonidet P-40 [NP-40] and 10  $\mu$ g/ml each of aprotinin and leupeptin) for 10 min on ice. After centrifugation (16,000  $\times$  g, 10 min at 4°C), the supernatants were incubated with optimal concentrations of antibodies for 1 hr at 4°C, followed by 30  $\mu$ l of protein A/G–plus-agarose (Santa Cruz Biotechnology) and overnight incubation at 4°C. Samples were washed four times in lysis buffer, precipitates were dissolved in Laemmli buffer and resolved by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). Electrophoresed samples were processed for Western blot analysis as previously described (Villalba et al., 1999).

### Kinase Assays

For PKC assays, 20  $\times$  10<sup>6</sup> Jurkat or 2  $\times$  10<sup>6</sup> 293 cells were lysed, and PKC was immunoprecipitated as described above. Immunoprecipitates were washed two times with lysis buffer, two times with PKC kinase buffer (20 mM HEPES, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, and 0.1 mM EGTA (PKC $\theta$ ) or 10 mM MgCl<sub>2</sub> and 0.1 mM CaCl<sub>2</sub> [PKC $\alpha$ ]), and resuspended in 20  $\mu$ l of the corresponding kinase buffer plus 10  $\mu$ M [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP,

100  $\mu$ M ATP, and 2  $\mu$ g of myelin basic protein (MBP) as substrate. Samples were incubated for 20 min at 30°C with gentle shaking. The reaction was stopped by adding 20  $\mu$ l of 2 $\times$  Laemmli buffer. Samples were incubated at 100°C for 5 min and subjected to SDS-PAGE and autoradiography. [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP incorporation was determined using a STORM 860 PhosphorImager (Molecular Dynamics).

Transfected JNK1 was immunoprecipitated with an anti-HA mAb as described above, and its activity was assayed in 20  $\mu$ l of JNK kinase buffer (25 mM HEPES [pH 7.5], 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 1 mM DTT, and 0.1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) for 20 min at 30°C with gentle shaking, using 2  $\mu$ g of GST-c-Jun as a substrate. Reactions were stopped and processed as described above.

### CD69 Expression

Cells were transfected with the indicated vectors plus a GFP expression plasmid and harvested 2 days later. The cells were washed in RPMI-1640 medium and suspended in 500  $\mu$ l of RPMI-1640 plus 20  $\mu$ l of PE-conjugated anti-human CD69 mAb for 15 min. CD69 expression was analyzed by flow cytometry (FACScan, Becton and Dickinson) after gating on GFP-positive cells.

### Actin Polymerization

Jurkat-TAg cells (10  $\times$  10<sup>6</sup> per condition) were transfected with the indicated Vav or PKC $\theta$  vectors plus 5  $\mu$ g pEF-GFP and cultured for 36 hr in the absence or presence of cytochalasin D (10  $\mu$ M). The cells were collected, washed, resuspended in RPMI plus 10% FBS, and prewarmed for 15 min at 37°C. Some groups were stimulated with an anti-CD3 mAb (OKT3; 5  $\mu$ g/ml) for the indicated times. Reactions were stopped by adding 1 ml of 3.7% paraformaldehyde in PBS and incubating for 15 min at room temperature, followed by blocking with PBS/1% BSA/0.1% NaN<sub>3</sub> under the same conditions. Following centrifugation (2000 rpm, 3 min), the pellet was carefully resuspended in PBS/1% BSA/0.1% NaN<sub>3</sub>/0.05% saponin and incubated for 30 min at 4°C in order to permeabilize the cells. The cells were centrifuged again, resuspended in the same solution plus 100 ng/ml TRITC-conjugated phalloidin (Sigma), and incubated for 30–60 min at 4°C in the dark. Following three washes with cold PBS/1% BSA/0.1% NaN<sub>3</sub>, GFP-gated cells were analyzed by flow cytometry.

### Immunofluorescence Microscopy

Jurkat-TAg cells were transfected with the corresponding plasmids, harvested 2 days later, washed, fixed, and permeabilized as described above. The cells were incubated overnight at 4°C with 1  $\mu$ g/ml of an anti-PKC $\theta$  antibody in 50  $\mu$ l of PBS/1% BSA, washed three times in the same medium, and incubated for 30 min at room temperature in the dark with FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (1:100 dilution; Cappel) to visualize PKC $\theta$ . The cells were stained in parallel with TRITC-phalloidin as described above. After three washes with ice-cold PBS/1% BSA, the cells were mounted on coverglasses using a SlowFade kit (Molecular Probes) and analyzed by conventional fluorescence microscopy or by confocal microscopy (MRC 1024S; Bio-Rad).

### Subcellular Fractionation

Cells were resuspended in ice-cold hypotonic buffer (42 mM KCl, 10 mM HEPES [pH 7.4], 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10  $\mu$ g/ml each aprotinin and leupeptin) and incubated on ice for 15 min. Cells were transferred to a 1 ml syringe and sheared by being passed five times through a 30 gauge needle. The lysates were centrifuged at 200  $\times$  g for 10 min to remove nuclei and cell debris, and the supernatant was collected and centrifuged at 13,000  $\times$  g for 60 min at 4°C. The supernatant (cytosol) was collected, and the pellet was resuspended in lysis buffer (20 mM Tris–HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl, 1% NP-40, and 10  $\mu$ g/ml each aprotinin and leupeptin), vortexed for 5 min at 4°C, and centrifuged again at 13,000  $\times$  g for 60 min at 4°C. The supernatant representing the particulate (membrane) fraction was saved, and the detergent-insoluble fraction (cytoskeleton) was resuspended in 1% SDS in water. Each fraction was then diluted to a final concentration of 1 $\times$  Laemmli buffer and separated by SDS-PAGE.

### Acknowledgments

We would like to thank Drs. G. Baier, M. Karin, J. Neefjes, and E. Reits for reagents, and N. Weaver for manuscript preparation. This

work was supported by National Institutes of Health grants CA35299 and GM50819 (A. A.) and a fellowship from the UC AIDS Research Program (N. C.). M. V. is and M. D. was a Special Fellow of the Leukemia Society of America. This is publication number 338 from the La Jolla Institute for Allergy and Immunology.

Received October 4, 1999; revised December 22, 1999.

## References

- Baier, G., Telford, D., Giampa, L., Coggeshall, K.M., Baier-Bitterlich, G., Isakov, N., and Altman, A. (1993). Molecular cloning and characterization of PKC $\theta$ , a human novel member of the protein kinase C (PKC) gene family expressed predominantly in hematopoietic cells. *J. Biol. Chem.* **268**, 4997–5004.
- Baier-Bitterlich, G., Überall, F., Bauer, B., Fresser, F., Wachter, H., Grünicke, H., Utermann, G., Altman, A., and Baier, G. (1996). PKC $\theta$  isoenzyme selective stimulation of the transcription factor complex AP-1 in T lymphocytes. *Mol. Cell Biol.* **16**, 1842–1850.
- Cantrell, D. (1998). Lymphocyte signaling: a coordinating role for Vav? *Curr. Biol.* **8**, R535–R538.
- Chen, C.Y., Forman, L.W., and Faller, D.V. (1996). Calcium-dependent immediate-early gene induction in lymphocytes is negatively regulated by p21Ha-ras. *Mol. Cell Biol.* **16**, 6582–6592.
- Collins, T., Deckert, M., and Altman, A. (1997). Views on Vav. *Immunol. Today* **18**, 221–225.
- Costello, P.S., Walters, A.E., Mee, P.J., Turner, M., Reynolds, L.F., Prisco, A., Sarner, N., Zamoyska, R., and Tybulewicz, V.L.J. (1999). The Rho-family GTP exchange factor Vav is a critical transducer of T cell receptor signals to the calcium, ERK, and NF- $\kappa$ B pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 3035–3040.
- Coudronniere, N., Villalba, M., Englund, N., and Altman, A. (2000). NF- $\kappa$ B activation induced by CD28 costimulation is mediated by PKC $\theta$ . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, in press.
- Crabtree, G.R. (1999). Genetic signals and specific outcomes: signaling through Ca<sup>2+</sup>, calcineurin and NF-AT. *Cell* **96**, 611–614.
- Crabtree, G.R., and Clipstone, N.A. (1994). Signal transmission between the plasma membrane, and nucleus of T lymphocytes. *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 1045–1083.
- D'Ambrosio, D., Cantrell, D.A., Frati, L., Santoni, A., and Testi, R. (1994). Involvement of p21<sup>ras</sup> in T cell CD69 expression. *Eur. J. Immunol.* **24**, 616–620.
- Deckert, M., Tartare Deckert, S., Couture, C., Mustelin, T., and Altman, A. (1996). Functional and physical interactions of Syk family kinases with the Vav proto-oncogene product. *Immunity* **5**, 591–604.
- Fischer, K.D., Zmuldzinas, A., Gardner, S., Barbacid, M., Bernstein, A., and Gidos, C. (1995). Defective T-cell receptor signaling and positive selection of Vav-deficient CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> thymocytes. *Nature* **374**, 474–477.
- Fischer, K.D., Kong, Y.Y., Nishina, H., Tedford, K., Marengere, L.E., Koziarzki, I., Sasaki, T., Starr, M., Chan, G., Gardener, S., et al. (1998). Vav is a regulator of cytoskeletal reorganization mediated by the T-cell receptor. *Curr. Biol.* **8**, 554–562.
- Ghaffari-Tabrizi, N., Bauer, B., Altman, A., Utermann, G., Überall, F., and Baier, G. (1999). Protein kinase C $\theta$ , a selective upstream regulator of JNK/SAPK and IL-2 promoter activation in Jurkat T-cells. *Eur. J. Immunol.* **29**, 132–142.
- Grakoui, A., Bromley, S.K., Sumen, C., Davis, M.M., Shaw, A.S., Allen, P.M., and Dustin, M.L. (1999). The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* **285**, 221–227.
- Hewitt, C.R.A., Lamb, J.R., Hayball, J., Hill, M., Owen, M.J., and O'Hehir, R.E. (1992). Major histocompatibility complex independent clonal T cell anergy by direct interaction of *Staphylococcus aureus* enterotoxin B with the T cell antigen receptor. *J. Exp. Med.* **175**, 1493–1499.
- Holsinger, L.J., Graef, I.A., Swat, W., Chi, T., Bautista, D.M., Davidson, L., Lewis, R.S., Alt, F.W., and Crabtree, G.R. (1998). Defects in actin-cap formation in Vav-deficient mice implicate an actin requirement for lymphocyte signal transduction. *Curr. Biol.* **8**, 563–572.
- Jain, J., Loh, C., and Rao, A. (1995). Transcriptional regulation of the IL-2 gene. *Curr. Opin. Immunol.* **7**, 333–342.
- Kong, Y.Y., Fischer, K.D., Bachmann, M.F., Mariathasan, S., Koziarzki, I., Nghiem, M.P., Bouchard, D., Bernstein, A., Ohashi, P.S., and Penninger, J.M. (1998). Vav regulates peptide-specific apoptosis in thymocytes. *J. Exp. Med.* **188**, 2099–2111.
- Lamarche, N., Tapon, N., Stowers, L., Burbelo, P.D., Aspenstrom, P., Bridges, T., Changt, J., and Hall, A. (1996). Rac and Cdc42 induce actin polymerization and G1 cell cycle progression independently of p65<sup>PAK</sup> and the JNK/SAPK MAP kinase cascade. *Cell* **87**, 519–552.
- Miranti, C.K., Leng, L., Maschberger, P., Brugge, J.S., and Shattil, S.J. (1998). Identification of a novel integrin signaling pathway involving the kinase Syk and the guanine nucleotide exchange factor Vav1. *Curr. Biol.* **8**, 1289–1299.
- Meller, N., Liu, Y.C., Collins, T.L., Bonnefoy-Berard, N., Baier, G., Isakov, N., and Altman, A. (1996). Direct interaction between protein kinase C  $\theta$  (PKC- $\theta$ ) and 14-3-3 $\tau$  in T cells: 14-3-3 overexpression results in inhibition of PKC $\theta$  translocation and function. *Mol. Cell Biol.* **16**, 5782–5791.
- Meller, N., Altman, A., and Isakov, N. (1998). New perspectives on PKC $\theta$ , a member of the novel subfamily of protein kinase C. *Stem Cells* **16**, 178–192.
- Monks, C.R.F., Kupfer, H., Tamir, I., Barlow, A., and Kupfer, A. (1997). Selective modulation of protein kinase C- $\theta$  during T-cell activation. *Nature* **385**, 83–86.
- Monks, C.R., Freiberg, B.A., Kupfer, H., Sciaky, N., and Kupfer, A. (1998). Three-dimensional segregation of supramolecular clusters in T cells. *Nature* **395**, 82–86.
- Oancea, E., and Meyer, T. (1998). Protein kinase C as a molecular machine for decoding calcium and diacylglycerol signals. *Cell* **95**, 307–318.
- Ohno, Y., Fuji, T., Ogita, K., Kikkawa, U., Igarashi, K., and Nishizuka, Y. (1989). Protein kinase C  $\zeta$  subspecies from rat brain: its structure, expression, and properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 3099–3103.
- Penninger, J.M., and Crabtree, G.R. (1999). The actin cytoskeleton and lymphocyte activation. *Cell* **96**, 9–12.
- Rao, A., Luo, C., and Hogan, P.G. (1997). Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 707–747.
- Romero, F., and Fischer, S. (1996). Structure and function of vav. *Cell Signal.* **8**, 545–553.
- Su, B., Jacinto, E., Hibi, M., Kallunki, T., Karin, M., and Ben Neria, Y. (1994). JNK is involved in signal integration during costimulation of T lymphocytes. *Cell* **77**, 727–736.
- Turner, M., Mee, P.J., Walters, A.E., Quinn, M.E., Mellor, A.L., Zamoyska, R., and Tybulewicz, V.L.J. (1997). A requirement for the Rho-family GTP exchange factor Vav in positive and negative selection of thymocytes. *Immunity* **7**, 451–460.
- Villalba, M., Kasibhatla, S., Genestier, L., Mahboubi, A., Green, D.R., and Altman, A. (1999). PKC $\theta$  is a necessary component, and cooperates with calcineurin, to induce FasL expression during activation-induced T cell death. *J. Immunol.* **163**, 5813–5819.
- Weiss, A., and Littman, D.R. (1994). Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* **76**, 263–274.
- Werlen, G., Jacinto, E., Xia, Y., and Karin, M. (1998). Calcineurin preferentially synergizes with PKC- $\theta$  to activate JNK and IL-2 promoter in T lymphocytes. *EMBO J.* **17**, 3101–3111.
- Wu, J., Katzav, S., and Weiss, A. (1995). A functional T-cell receptor signaling pathway is required for p95<sup>owr</sup> activity. *Mol. Cell Biol.* **15**, 4337–4346.
- Wu, J., Motto, D.G., Koretzky, G.A., and Weiss, A. (1996). Vav and SLP-76 interact and functionally cooperate in IL-2 gene activation. *Immunity* **4**, 593–602.
- Xavier, R., and Seed, B. (1999). Membrane compartmentation and the response to antigen. *Curr. Opin. Immunol.* **11**, 265–269.
- Zhang, R., Alt, F.W., Davidson, L., Orkin, S.H., and Swat, W. (1995). Defective signaling through the T- and B-cell antigen receptors in lymphoid cells lacking the vav proto-oncogene. *Nature* **374**, 470–473.

# T Cell Receptor-mediated Signal Transduction Controlled by the $\beta$ Chain Transmembrane Domain

APOPTOSIS-DEFICIENT CELLS DISPLAY UNBALANCED MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASES ACTIVITIES UPON T CELL RECEPTOR ENGAGEMENT\*

Received for publication, August 14, 2001, and in revised form, November 13, 2001  
Published, JBC Papers in Press, November 27, 2001, DOI 10.1074/jbc.M107797200

Emma Teixeira<sup>‡§</sup>, Patricia Fuentes<sup>‡§</sup>, Begoña Galocha<sup>¶</sup>, Balbino Alarcón<sup>||</sup>,  
and Rafael Bragado<sup>‡\*\*</sup>

From the <sup>‡</sup>Department of Immunology, Fundación Jiménez Díaz, Avenida. Reyes Católicos 2, 28040 Madrid, Spain, the <sup>¶</sup>Hospital Clínico San Carlos, Unidad de Investigación, Profesor Martín Lagos s/n, 28040 Madrid, Spain, and the <sup>||</sup>Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

The bases that support the versatility of the T cell receptor (TCR) to generate distinct T cell responses remain unclear. We have previously shown that mutant cells in the transmembrane domain of TCR $\beta$  chain are impaired in TCR-induced apoptosis but are not affected in other functions. Here we describe the biochemical mechanisms by which this mutant receptor supports some T cell responses but fails to induce apoptosis. Extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) is activated at higher and more sustained levels in TCR $\beta$ -mutated than in wild type cells. Conversely, activation of both c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase is severely reduced in mutant cells. By attempting to link this unbalanced induction to altered upstream events, we found that ZAP-70 is normally activated. However, although SLP-76 phosphorylation is normally induced, TCR engagement of mutant cells results in lower tyrosine phosphorylation of LAT but in higher tyrosine phosphorylation of Vav than in wild type cells. The results suggest that an altered signaling cascade leading to an imbalance in mitogen-activated protein kinase activities is involved in the selective impairment of apoptosis in these mutant cells. Furthermore, they also provide new insights in the contribution of TCR to decipher the signals that mediate apoptosis distinctly from proliferation.

The TCR<sup>1</sup> expressed in the majority of peripheral T lymphocytes is a complex composed of the clonotypic TCR  $\alpha\beta$  heterodimer, responsible for antigen and superantigen recognition, linked to the monomorphic CD3- $\gamma$ , - $\delta$ , - $\epsilon$  and - $\zeta$  chains, which are involved in signal transduction. This structural com-

plexity, in comparison with other families of cytokines and growth receptors, might be responsible for the different outcomes of TCR engagement. The fact that TCR engagement triggers either cytokine-driven proliferation or cell death is particularly intriguing and raises the question of how these outcomes are differentially regulated. It has promoted the concept that the TCR does not function as a simple on-off switch upon activation. In fact, several approaches have provided evidence that TCR could signal to some activation while keeping other pathways functionally inactive (reviewed in Ref. 1). Because of the short length of the cytoplasmic tails and the apparent lack of inherent activity of both clonotypic chains, it is assumed that the heterodimer transmits the signal through the CD3/ $\zeta$  chains. In this context, questions that remain to be answered are the following. 1) How do engaged TCR transfer signals to initiate signal transduction? 2) Which domains of the TCR conserved regions are involved in such transmission? 3) What effector functions are modulated through the integrity of such domains?

Only a few reports have stressed the contribution of individual structural domains of the  $\alpha\beta$  clonotypic module to specific signal transduction. TCR $\alpha$  chain tail seems to be required for down-regulation of the TCR-CD3 complex (2), and chimeric TCRs containing clonotypic  $\delta$  instead of  $\alpha$  residues in the connecting peptide of the TCR $\alpha$  chain fail to trigger IL-2 production upon cell activation (3). In addition, double positive thymocytes bearing this chimeric TCR undergo negative, but not positive, selection because of a failure in the activation of the extracellular signal-regulated kinase (ERK) (4, 5). A single mutation in the  $\beta$  chain connecting peptide results in a TCR that is specifically deficient in activating both the calcium pathway and IL-2 secretion (6). Furthermore, individual mutations at either of the two conserved Tyr residues in  $\beta$  chain transmembrane domain allow TCR-CD3 expression and are compatible with normal signaling. On the contrary, dual mutations affected signaling efficiency to a greater extent than predicted by surface expression alone and resulted in severe reductions in IL-2 production and apoptosis (7, 8). Notwithstanding, although different mouse T cell hybridomas dramatically differed in their functional response to the same mutations, these results suggest that membrane-spanning domains in TCR $\beta$  are relevant for signal transduction (8). In all works, however, information on how mutations might affect biochemical events involved in the activation of upstream intermediates and signaling pathways is basically lacking.

The ability of the TCR to transduce quantitatively and qual-

\* This work was supported by grants from the Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología and the Fondo de Investigaciones Sanitarias Grants PM98/0063 and 01/0272 (to R. B.), and by the Fundación Rodríguez Pascual. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

<sup>§</sup> Fellow of the Comunidad Autónoma de Madrid.

\*\* To whom correspondence should be addressed. Fax: 34-915448246; E-mail: rbragado@fjd.es.

<sup>1</sup> The abbreviations used are: TCR, T cell receptor; IL, interleukin; ERK, extracellular signal-regulated kinase; CTL, cytotoxic T lymphocyte; MAPK, mitogen-activated protein kinase; JNK, c-Jun N-terminal kinase; GST, glutathione S-transferase; RBD, Ras-binding domain; PKC, protein kinase C; PLC, phospholipase C; ITAM, immunoreceptor tyrosine-based activation motif.



itatively different signals is strongly supported by the existence of partial agonists, peptide analogues that can selectively stimulate only some T cell effector functions (9). Partial agonists, usually related to low affinity ligands, have been proved to be a useful tool to understand mechanisms regulating TCR differential signaling. In fact, a broad variety of such peptides has been described that trigger TCR to usually result in anergy, cytokine production, cytolytic activity, or Fas-mediated cytotoxicity as opposed to perforin-dependent cytotoxicity or proliferation (10–12). Analogues that selectively impair triggering to apoptosis have not been reported, but, singularly, TCR ligands that uniquely trigger apoptosis in CD4<sup>+</sup> lymphocytes have been described (13). No similar selective peptides have been reported for CD8<sup>+</sup> cells. However, some partial agonists, being inducers of T cell cytotoxicity, can dissociate the induction of Fas-L-dependent CTL death from CTL activation and perforin-dependent (14) or Fas-L-dependent target cell death (10, 11). In some experimental systems, the ability to divorce killing of the targets and Fas-L-mediated CTL apoptosis has been demonstrated to occur by blocking CD8/MHC class I interaction (15). Two major biochemical events are characteristics of triggering with partial agonist: 1) the phosphorylation of CD3- $\zeta$  chains, which results in the predominant phosphorylation of the higher mobility phospho- $\zeta$  isoform with the almost absent phosphorylation of the lower mobility isoform, was incomplete, and 2) although ZAP-70 was seen to bind to CD3- $\zeta$  following signaling, the ZAP-70 molecule itself was not phosphorylated, and its kinase activity was not induced (16, 17). In this regard, the fact that a consistent pattern of early signaling is not elicited by ligands capable of inducing similar functional responses (9, 13) suggests that differential signaling would take place after CD3- $\zeta$  and ZAP-70 phosphorylation.

Signal transduction through the TCR is initiated by Src kinase-mediated phosphorylation of the ITAMs of the CD3 and  $\zeta$  chains, followed by the recruitment, phosphorylation, and activation of ZAP-70. The coordinated action of Src kinases and ZAP-70 results in the phosphorylation of multiple substrates. Among these substrates, LAT becomes heavily tyrosine-phosphorylated upon TCR activation, a fact that endows LAT with the capacity for recruiting multiple signaling molecules. It has been hypothesized that signaling through Ras is exquisitely dependent on tyrosine-phosphorylated LAT (18). However, several lines of evidence suggest that Ras activation involves additional interactions and that the Ras-MAPK activation can occur through alternative pathways independent of LAT phosphorylation (19). These alternative interactions might lead to distinct patterns of ERK activation, which could be associated with the regulation of T cell death or survival (20, 21). In addition to Ras, other small GTPases belonging to the Rho family (Rac-1, Cdc42, and RhoA) are activated upon stimulation of the TCR. These GTPases can activate other MAPK cascades, such as the c-Jun N-terminal kinase (JNK) and p38<sup>MAPK</sup> activation pathways that have also been related to apoptosis (22). Vav is a guanine nucleotide exchange factor for Rho family GTPases whose exchange activity can be modulated by TCR signaling. Such a mechanism, on operating over Rac-1, has been reported to link the TCR to the activation of JNK and p38<sup>MAPK</sup> (23, 24). LAT phosphorylation appears to play a critical role on the assembly of ZAP-70-LAT-Vav complexes in lipids rafts and on its translocation in the vicinity of Vav downstream effectors (25). Additionally, it has been reported that Vav plays TCR-mediated roles other than acting as the GDP/GTP exchanger (26–28), but the mechanisms involved are poorly understood.

We have previously reported that Jurkat-derived mutant T cell clones, bearing a mutation (Tyr to Leu) in the C-terminal tyrosine of the conserved ITAM-like motif of the transmem-

brane domain of TCR $\beta$  chain, show normal ability: to secrete cytokines (IL-2 and interferon- $\gamma$ ); to express activation markers; to down-modulate their TCR-CD3 complex; and to mobilize intracellular Ca<sup>2+</sup> upon TCR activation. However, these mutant cells show a resistance to TCR-induced apoptosis, a defect that is not observed upon direct Fas stimulation or after stimulating with reagents that bypass TCR engagement (*i.e.* phorbol esters plus calcium ionophore) (29–31). Altogether, these findings prompted us to further investigate the effects of the mutation on TCR signaling, in an attempt to clarify the mechanisms by which the integrity of the transmembrane domain of the TCR $\beta$  chain contributes to the early biochemical events and MAPK activation pathways associated with TCR-mediated signaling efficiency.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Cell Lines

Wild type and mutant clones have been previously described (29, 30). Briefly, they were obtained by reconstitution of the TCR $\beta$ -negative Jurkat variant 31.13 with either a wild type V $\beta$ 3 TCR cDNA or with a mutant cDNA that contains a tyrosine to leucine mutation in the C-terminal tyrosine of the transmembrane domain. No clonal variation was observed between different clones derived from independent wild type or mutant cDNA transfections (29, 30). The cells were maintained in RPMI supplemented with 10% fetal calf serum and antibiotics. Expression of TCR-CD3 complex was routinely tested by flow cytometry before each assay.

### Antibodies and Reagents

The following antibodies were used: 1) for cytometry, anti-CD3 $\epsilon$  (UCHT-1-fluorescein isothiocyanate (Caltag, Burlingame, CA); anti-TCRV $\beta$ 3 (JOVI-3, a gift from Dr. M. Owen); and anti-CD69-fluorescein isothiocyanate (Becton Dickinson, Madrid, Spain); 2) for stimulation, anti-CD3 $\epsilon$  (UCHT-1, Immunokontakt, Switzerland; used for stimulation at 10  $\mu$ g/ml); anti-CD28 (Pharmingen, San Diego, CA; used for stimulation at 1  $\mu$ g/ml); and the cross-linking antibody goat anti-mouse (Pierce; used for stimulation at 10  $\mu$ g/ml); 3) for immunoprecipitation assays, anti-ZAP-70 (ZAP-4, a gift from Dr. S. Ley, NIMR, London); anti-LAT and anti-Vav (Upstate Biotechnology, Inc., Lake Placid, NY); and anti-SLP-76 (kindly provided by Dr. G. Koretzky, University of Pennsylvania School of Medicine); 4) for Western blot, anti-PLC $\gamma$ 1 and anti-Vav (BD Transduction Laboratories, Lexington, KY); anti-c-Cbl and anti-Raf-1 kinase (Santa Cruz, Santa Cruz, CA); anti-SLP-76 (kindly provided by Dr. G. Koretzky); anti-ERK (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA); anti-phospho-p44/42<sup>MAPK</sup>, anti-phospho-p38<sup>MAPK</sup>, anti-p38<sup>MAPK</sup>, and anti-JNK (New England Biolabs, Beverly, CA); anti- $\alpha$ -tubulin (Sigma-Aldrich); and anti-LAT, anti-Ras, and anti-phosphotyrosine 4G10 (Upstate Biotechnology, Inc.). Staphylococcal enterotoxin B was purchased from Toxin Technology (Sarasota, FL; used for stimulation at 10  $\mu$ g/ml). Biotinylated annexin-V was from Roche Molecular Biochemicals, and phycoerythrin-labeled streptavidin was from Caltag (Burlingame, CA). The construct for the glutathione S-transferase (GST) fusion protein containing the Ras-binding domain (RBD) of Raf was from Upstate Biotechnology, Inc.

### TCR Stimulation

0.5–2.5  $\times$  10<sup>7</sup> cells/ml were resuspended in RPMI containing 15 mM HEPES. Unless otherwise detailed, stimulation was performed by incubation with anti-CD3 (10  $\mu$ g/ml) together with anti-CD28 (1  $\mu$ g/ml) antibodies for 10 min on ice followed by cross-linking with goat anti-mouse antibodies at 37 °C for the indicated times.

### Flow Cytometry

10<sup>6</sup> cells were incubated on ice for 1 h with a fluorescein isothiocyanate-conjugated specific antibody, washed, and analyzed in a flow cytometer (EPICS-XL MCL, Coulter).

### Immunoprecipitations

2.5  $\times$  10<sup>7</sup> cells were unstimulated or stimulated as described and lysed for 30 min at 4 °C in a buffer containing 1% Brij-96 (or 1% Nonidet P-40), 20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, leupeptin, pepstatin, and aprotinin (1  $\mu$ g/ml each), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 20 mM NaF, and 1 mM NaVO<sub>4</sub>. After centrifugation, the lysates were pre-cleared sequentially with Sepharose beads and with protein A- or G-Sepharose beads coated with the appropriate control antibody and

afterward subjected to immunoprecipitation for 4 h at 4 °C with protein A- or G-Sepharose beads coated with specific antibodies. Immunoprecipitates were then washed four times with lysis buffer and subjected to SDS-PAGE followed by standard immunoblot analysis with the indicated antibodies.

#### Subcellular Fractionation

Upon stimulation, the cells were resuspended in ice-cold hypotonic buffer (42 mM KCl, 10 mM HEPES, pH 7.4, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10  $\mu$ g/ml each aprotinin and leupeptin) and incubated on ice for 15 min. The cells were transferred to a 1-ml syringe and sheared by being passed five times through a 30-gauge needle. Whole cell lysates were centrifuged at 200  $\times$  g for 10 min at 4 °C to remove nuclei and cell debris, and the supernatant was collected and centrifuged at 13,000  $\times$  g for 60 min at 4 °C. The supernatant (cytosol) was collected, and the pellet was resuspended in lysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, and 10  $\mu$ g/ml each aprotinin and leupeptin), vortexed for 5 min at 4 °C, and centrifuged again at 13,000  $\times$  g for 60 min at 4 °C. The supernatant representing the particulate (membrane) fraction was then saved. Each fraction was then diluted to a final concentration of 1 $\times$  Laemmli buffer and separated by SDS-PAGE, and the Western blots were analyzed with anti-PKC $\theta$  antibodies.

#### Kinase Activity Assays

**Raf Kinase, ERK, and p38<sup>MAPK</sup> Activities**—10<sup>6</sup> cells/time point were unstimulated or stimulated for the indicated times and lysed for 30 min at 4 °C in 50  $\mu$ l of a buffer containing 1% Nonidet P-40, 20 mM HEPES, 10 mM EGTA, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 40 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 1 mM dithiothreitol, and the following protease and phosphatase inhibitors (1  $\mu$ g/ml each): leupeptin, pepstatin, and aprotinin, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 20 mM NaF, and 1 mM NaVO<sub>4</sub>. Lysates were then centrifuged, and the supernatants were subjected to standard 10% SDS-PAGE for ERK and p38<sup>MAPK</sup> or 8% (acrylamide/bisacrylamide 24/0.6) for Raf kinase to improve resolution of phosphorylated band shifts. Electrophoresed proteins were transferred to nitrocellulose membrane for immunoblot analysis with specific antibodies. In the cases of ERK and p38<sup>MAPK</sup>, their phosphorylation status, as determined by immunoblotting with antibodies that specifically recognize the phosphorylated forms of these kinases, is assumed to be an indication of their activation state. Raf kinase activation was evaluated by the band shifts corresponding to the protein phosphorylated forms, which can be detected by immunoblotting with specific anti-Raf-1 kinase antibodies.

**Ras Activity**—5  $\times$  10<sup>6</sup> cells/time point were not stimulated or stimulated for the indicated times and lysed for 30 min at 4 °C in 300  $\mu$ l of a buffer containing 1% Nonidet P-40, 0.25% sodium deoxycholate, 20 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 25 mM NaF, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% glycerol, leupeptin, pepstatin, and aprotinin (1  $\mu$ g/ml each), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and 1 mM NaVO<sub>4</sub>. The lysates were then centrifuged, and the supernatants were mixed with 20  $\mu$ l of a freshly prepared GST fusion protein containing the Ras-binding domain of Raf-1 (GST-RBD), immobilized in glutathione-Sepharose beads (Amersham Biosciences, Inc.). The samples were incubated by rotating for 90 min at 4 °C, and the beads were then washed three times with lysis buffer. The bound Ras-GTP protein was eluted in Laemmli sample buffer and subjected to 12.5% SDS-PAGE. The levels of active (GTP-bound) Ras were assessed by immunoblotting with specific anti-Ras antibodies.

**JNK Activity**—5  $\times$  10<sup>6</sup> cells were not stimulated or stimulated for the indicated times and lysed for 15 min at 4 °C in 200  $\mu$ l of lysis buffer (0.1% Triton X-100, 25 mM HEPES, pH 7.5, 300 mM NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM dithiothreitol, 20 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 0.1 mM NaVO<sub>4</sub>, 2  $\mu$ g/ml leupeptin, and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride). After centrifuging, solid phase kinase assays were performed on supernatants by pull-down precipitation as previously described (32). Briefly, cell extracts were mixed with 10  $\mu$ l of immobilized GST-c-Jun 1-79, and the samples were rotated at 4 °C for 3 h. After centrifugation, GST-c-Jun-Sepharose beads were washed four times and resuspended in 30  $\mu$ l of kinase buffer (20 mM HEPES, pH 7.6, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 0.1 mM NaVO<sub>4</sub>, 2 mM dithiothreitol) supplemented with 20  $\mu$ M ATP and 5  $\mu$ Ci of [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP. After incubation for 20 min at 30 °C, the reaction was stopped by washing with kinase buffer, and the proteins were eluted in Laemmli buffer and subjected to SDS-PAGE followed by autoradiography. The phosphorylation of GST-c-Jun was quantified using a laser densitometer (Molecular Dynamics, Kent, UK) and normalized to JNK as a loading control.

## RESULTS

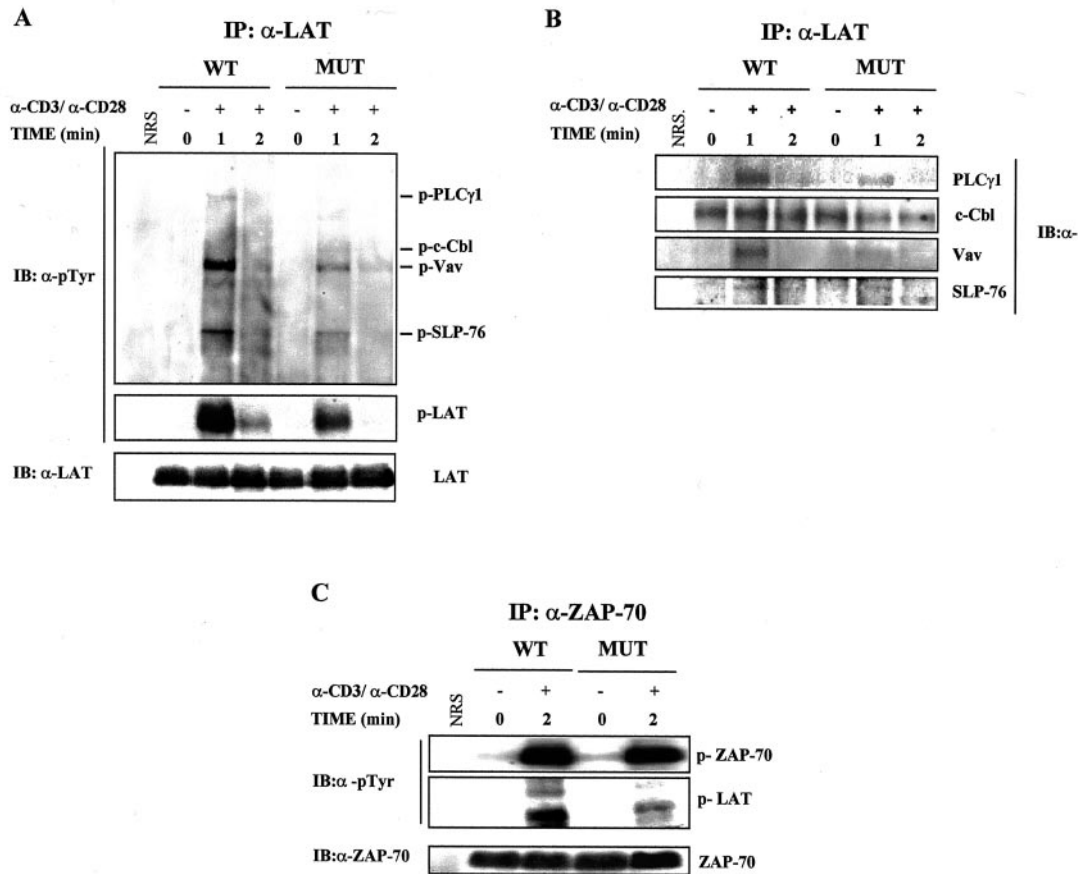
**Impaired *In Vivo* Tyrosine Phosphorylation of LAT in TCR $\beta$  Chain Mutant Cells**—We have previously shown that T cell clones bearing a single replacement in the ITAM-like motif of the TCR $\beta$  chain transmembrane domain express high amounts of TCR-CD3 complexes, similar to those of wild type cells. In these mutant clones, ZAP-70 becomes normally tyrosine-phosphorylated upon TCR activation. Furthermore, ZAP-70 activity was similar in wild type and mutant cells, as shown in an *in vitro* kinase assay using an exogenous specific substrate (29, 30). To further characterize the effects of the mutation in TCR-mediated signal transduction, we tested whether this alteration might affect the *in vivo* tyrosine phosphorylation of ZAP-70 substrates in mutant cells. Among these substrates, LAT is an adapter protein that constitutes the foremost scaffold that links the proximal and distal events of the TCR signaling pathway. Immunoprecipitation with specific anti-LAT antibodies followed by immunoblot with anti-phosphotyrosine showed that in comparison with wild type cells, TCR-inducible tyrosine phosphorylation of LAT was clearly diminished in mutant cells (Fig. 1A). A longer exposure of the LAT immunoprecipitation membrane revealed the presence of previously described tyrosine-phosphorylated proteins that coprecipitate with LAT upon TCR triggering (33) identified as PLC $\gamma$ 1, c-Cbl, Vav, and SLP76. Interestingly, although the levels of LAT-associated tyrosine-phosphorylated SLP76, Vav, and PLC $\gamma$ 1 were reduced in mutant cells, the levels of LAT-associated phospho-c-Cbl were higher. Furthermore, blotting with specific antibodies indicated that mutant cells are defective in the recruitment of PLC $\gamma$ 1, Vav, and SLP-76 to LAT and in a lesser extent in the recruitment of c-Cbl (Fig. 1B).

Because ZAP70 was not detectable in LAT immunoprecipitates (33) and we had reported that ZAP-70 was scarcely recruited to the plasma membrane in TCR-activated mutant cells (30), we performed reverse immunoprecipitation with specific anti-ZAP-70 antibodies to determine whether the low level of induced phospho-LAT in mutant cells was the result of poor activity of ZAP-70 on its membrane substrate. The immunoprecipitation revealed lower levels of coprecipitated phospho-LAT in mutant cells than in wild type cells (Fig. 1C). Furthermore and as expected, the immunoprecipitation revealed similar levels of tyrosine-phosphorylated ZAP-70 in both stimulated cells (Fig. 1C). Thus, despite the fact that both the tyrosine phosphorylation level of ZAP-70 and *in vitro* ZAP-70 activity were similar in both cell types, our results show that the *in vivo* phosphorylation of LAT and the recruitment to LAT of other signaling molecules are impaired in TCR-stimulated mutant cells.

**TCR Triggering in Mutant Cells Results in a Higher Activation of the Ras-ERK Pathway than That in Wild Type Cells**—Most of the current evidence suggests that the activation of the Ras-Raf-ERK pathway, after TCR signaling, requires tyrosine-phosphorylated LAT (18). If this dependence were absolute, in light of the aforementioned results, we would expect that the impaired LAT phosphorylation would lead downstream to a deficient activation of the ERK pathway in mutant cells. We therefore studied whether the mutation could influence the activation of the Ras-ERK signaling pathway.

ERK is the last member in the MAPK cascade that is initiated when Raf is activated after its recruitment by the activated form of Ras. The analysis of the phosphorylation status of ERK, an indication of their activation state (34), upon TCR engagement revealed not only that the induced ERK activity was higher in mutant cells than in wild type cells but also that this activity lasted longer. Thus, although both activities peaked at 5 min, a high phosphorylation in both p42 and p44





**FIG. 1. Stimulated mutant cells show an impaired LAT phosphorylation compared with wild type cells.** Wild type (WT) and mutant (MUT) clones were unstimulated or stimulated for the indicated times and lysed in 1% Brij96-containing buffer. *A*, cell lysates were subjected to immunoprecipitation (IP) with anti-LAT antibodies and analyzed by immunoblotting (IB) with the antibody 4G10 to phosphotyrosine (pTyr). Because of the notable difference in the developing times, the immunoblotting of phospho-LAT and that of the other phospho-proteins correspond to different exposures. As a control that similar amounts of LAT were immunoprecipitated in all samples, an immunoblot with anti-LAT antibodies is shown. *B*, after stripping, blots were re-probed with specific antibodies to identify individual LAT-associated proteins. *C*, cell lysates were subjected to immunoprecipitation with anti-ZAP-70 antibodies and analyzed by immunoblotting with the antibody 4G10. The identity of p-LAT and p-ZAP-70 was confirmed by re-probing the blot with anti-LAT (not shown) and anti-ZAP-70 antibodies. NRS, preimmune normal rabbit serum used as control for immunoprecipitation.

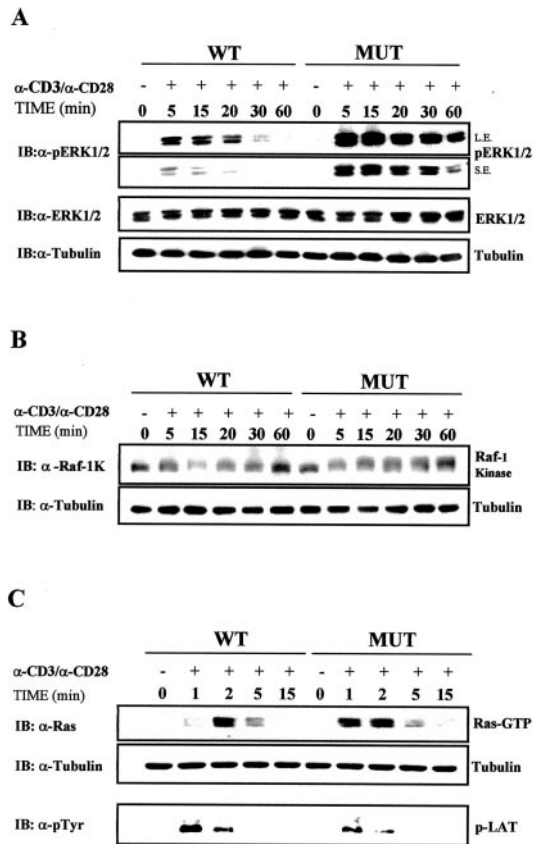
bands was still observed at 60 min in mutant cells, whereas in wild type cells, ERK phosphorylation was almost undetectable after 20 min of stimulation (Fig. 2A). Expression of ERK, assessed by immunoblotting with anti-ERK antibodies, was unaffected by TCR stimulation. As controls, phorbol 12-myristate 13-acetate alone or in combination with ionomycin induced similar kinetics and ERK activities in both wild type and mutant cells (not shown).

It was then reasonable to test whether this altered activity of ERK in mutant cells could be the consequence of a similar activation pattern of the upstream intermediates Raf and Ras. Interestingly, the activation of Raf in mutant cells was higher and was sustained longer compared with that in wild type cells, as evidenced by the band shift corresponding to the phosphorylated forms of Raf (Fig. 2B). Finally, we evaluated the levels of active (GTP-bound) Ras by pull-down experiments using an immobilized GST fusion protein containing the RBD of Raf. As shown in Fig. 2C (upper panels), the levels of Ras-GTP significantly increased as early as 1 min in mutant cells, were similarly maintained for 2 min, and were detectable after at least 15 min post-stimulation. In contrast, TCR triggering in wild type cells resulted in a modest increase in the level of Ras-GTP at 1 min, which peaked at 2 min and was undetectable at 15 min of stimulation. As an additional control that Ras activation follows an opposite pattern to that of LAT phosphorylation in mutant cells, a phosphotyrosine Western blotting performed on

the same lysates showed that LAT phosphorylation was more weakly induced in mutant cells than in wild type cells (Fig. 2C, bottom strip). Similar results were obtained with different wild type and mutant clones that were derived from independent transfections (not shown). These data suggest a role for the TCR $\beta$  chain transmembrane region in modulating the Ras-ERK cascade and also support the notion that ERK activation can be modulated by LAT-independent pathways.

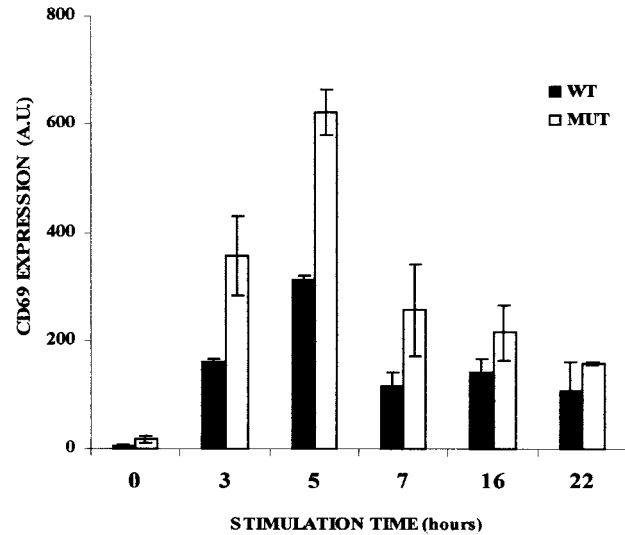
**CD69 Expression Is Highly Induced in Mutant Cells**—To further assess whether the differences in the activation of the Ras-Raf-ERK signaling pathway between wild type and mutant cells might have a functional relevance, we used CD69 expression as a readout that is clearly dependent on the activation of the Ras-ERK pathway (26). We previously showed that TCR-mediated induction of CD69 expression measured after 18 h of stimulation was similar in both cell types (30). However, CD69 is an early activation marker that can be detected by flow cytometry a few hours after TCR engagement. The time course of CD69 expression revealed that CD69 was more strongly induced in mutant cells than in wild type cells after 3–7 h post-stimulation (Fig. 3), consistent with the increased ERK activity in mutant cells (Fig. 2). As expected, the levels of CD69 expression in both cell types equalized at longer stimulation times (Fig. 3).

**JNK and p38<sup>MAPK</sup> Activities Are Substantially Decreased in TCR-stimulated Mutant Cells**—Given the unexpected afore-



**FIG. 2. TCR triggering of mutant cells results in overactivation of the Ras/Raf/ERK pathway.** A, wild type (WT) and mutant (MUT) cells were unstimulated or stimulated for the indicated times and lysed in 1% Nonidet P-40-containing buffer. The cell lysates were subjected to 10% SDS-PAGE, and the proteins were transferred to a membrane. The blot was probed with anti-pERK to determine ERK activity. Both short (SE) and long (LE) exposures are shown to illustrate more adequately the normal activation kinetics in wild type cells. After developing, the blot was stripped and reprobed with anti-ERK antibodies to verify that ERK levels were not affected by stimulation. An additional loading control is shown as determined by immunoblotting (IB) of the same membrane with anti- $\alpha$ -tubulin antibodies. B, upon stimulation for the indicated times, lysates from wild type and mutant cells were subjected to 8% (acrylamide:bisacrylamide 24:0.6) SDS-PAGE. Immunoblotting was then performed with antibodies to Raf kinase to detect kinase activity. The shift in the mobility of this protein to a slower migrating form of higher apparent molecular weight is caused by phosphorylation, and it is indicative of its activation. The shift is readily seen upon extended electrophoresis. After stripping, the blot was reprobed with anti- $\alpha$ -tubulin antibodies to control for loading. C, wild type and mutant cells were unstimulated or stimulated for the indicated times and lysed in 1% Nonidet P-40-containing buffer. Cell lysates were then subjected to pull-down assays with GST-RBD-Sepharose followed by SDS-PAGE and immunoblotting with an anti-Ras antibody to detect active (GTP-bound) Ras. Aliquots of the same total lysates were independently analyzed by immunoblotting with anti- $\alpha$ -tubulin antibodies to control for loading and with an antibody to phosphotyrosine (pTyr) to evaluate LAT phosphorylation. Representative results of three independent experiments of each type performed with different wild type and mutant clones are shown.

mentioned effect of the TCR $\beta$  mutation on the activation of the Ras-ERK pathway, we reasoned that the mutation would also affect the activation of the other MAPKs, JNK and p38<sup>MAPK</sup>. Solid phase kinase analysis was performed to study JNK activity induced by coligation of CD3 and CD28. We found that JNK activity in wild type cells peaked at 15 min and was maintained at high level for at least 30 min; meanwhile, the induction of JNK activity in mutant cells was drastically reduced both in intensity and time (Fig. 4A). JNK activity was not naturally altered on mutant cells, and it was only influ-



**FIG. 3. CD69 is more strongly induced in mutant than in wild type cells.** After stimulation for the indicated times, wild type (WT) and mutant (MUT) clones were stained with an anti-CD69 fluorescein isothiocyanate-labeled antibody. CD69 expression was measured by flow cytometry. The results are expressed as arbitrary units (A.U.), corresponding to the product of the mean value of CD69 fluorescence and the percentage of CD69 positive cells. This experiment is representative of five independent experiments performed in triplicate with different wild type and mutant clones.

enced by TCR-mediated stimuli, because its response to phorbol 12-myristate 13-acetate plus ionomycin was similar in both wild type and mutant cells (Fig. 4A).

The induction of the p38<sup>MAPK</sup> activity was studied by immunoblotting with antibodies that recognize the phosphorylated form, an indication of its activation state. Similarly to JNK, the activity of p38<sup>MAPK</sup> was severely reduced in TCR-stimulated mutant cells (Fig. 4B). Clonal variation was not observed when using different wild type or mutant clones in these assays (not shown). These results, together with those described for ERK activation (Fig. 2), show that the mutation in TCR $\beta$  differentially affects the activation of different MAPKs induced through the TCR, increasing ERK but decreasing both JNK and p38<sup>MAPK</sup> activities.

**TCR $\beta$  Mutation Results in Higher than Normal Tyrosine Phosphorylation of Vav**—The results reported above suggest that other ZAP-70 substrates than LAT might contribute to the unbalanced MAPKs activation in mutant cells. Moreover, we did not know whether the TCR $\beta$  mutation was also affecting the *in vivo* ZAP-70 activity on other substrates than LAT. SLP-76 is also a major ZAP-70 substrate and an important linker of the TCR to cellular activation. Furthermore, both SLP76 and Vav are also considered to play critical roles in ERK activation. In fact, ERK activation is blocked in Vav-deficient mice as well as in SLP76-deficient cells (35, 36). In addition, it has been demonstrated that in T cells Vav can regulate not only Ras-dependent responses, such as ERK activation and CD69 expression (26, 27), but also the activation of JNK and p38<sup>MAPK</sup> through its GDP-GTP exchange activity (23, 24). Therefore, we performed immunoprecipitation with anti-SLP-76-specific antibodies. The immunoprecipitation from TCR+CD28 costimulated cells revealed similar levels of tyrosine-phosphorylated SLP-76 in both mutant and wild type cells (Fig. 5A). Furthermore, although in LAT immunoprecipitation we observed a slight decrease in the recruitment of phospho-SLP-76 to LAT in mutant cells with respect to wild type cells (Fig. 1A), we have found no substantial differences in the levels of phospho-LAT associated to SLP-76 between wild type and mutant cells (Fig.

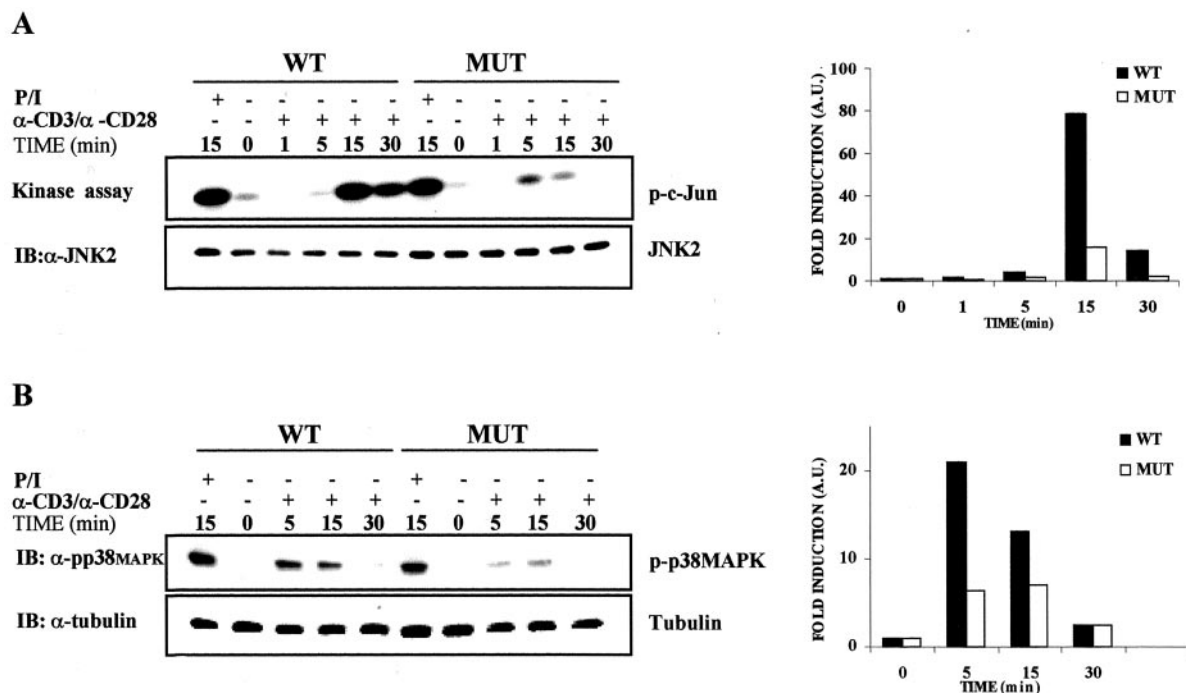


FIG. 4. JNK and p38<sup>MAPK</sup> activities are substantially reduced in TCR-stimulated mutant cells. Wild type (WT) and mutant (MUT) clones were unstimulated or stimulated for the indicated times. A, cell lysates were subjected to pull-down assays with GST-Jun-Sepharose followed by solid phase kinase assays. The autoradiograph (upper strip) corresponds to a blot showing phosphorylation of the JNK substrate, c-Jun. Simultaneously, aliquots removed from the same pull-down precipitates were analyzed by immunoblotting (IB) with an anti-JNK as control for loading (bottom strip). B, cell lysates in 1% Nonidet P-40-containing buffer were subjected to SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. The membrane was probed with anti-pp38<sup>MAPK</sup> antibodies to determine p38<sup>MAPK</sup> activity and with anti- $\alpha$ -tubulin to control for loading. P/I, phorbol 12-myristate 13-acetate plus ionomycin. The right panels show the induced JNK (A) and p38<sup>MAPK</sup> (B) activities after normalization to the densitometric values of their respective loading controls and to the relative activation level in unstimulated cells. The results shown are representative of three similar experiments performed with different wild type and mutant clones.

5A). Remarkably, however, the levels of tyrosine-phosphorylated Vav coprecipitated with SLP-76 were found to be notably higher in mutant than in wild type cells (Fig. 5A). Western blot analysis with specific anti-Vav antibodies revealed that the recruitment of Vav to phospho-SLP-76 was similar in both cell types (not shown), in agreement with the similar levels of induced phospho-SLP-76 in wild type and mutant cells. These data, together with those shown in Fig. 1, demonstrate that TCR $\beta$  mutation does not lead to a poor *in vivo* ZAP70 activity resulting in a generalized deficient phosphorylation of its substrates, consistent with our previous *in vitro* kinase experiments (30). More plausibly, our data suggest that TCR $\beta$  mutation seems to differentially affect the accessibility of ZAP70 to specific substrates (e.g. LAT versus SLP-76).

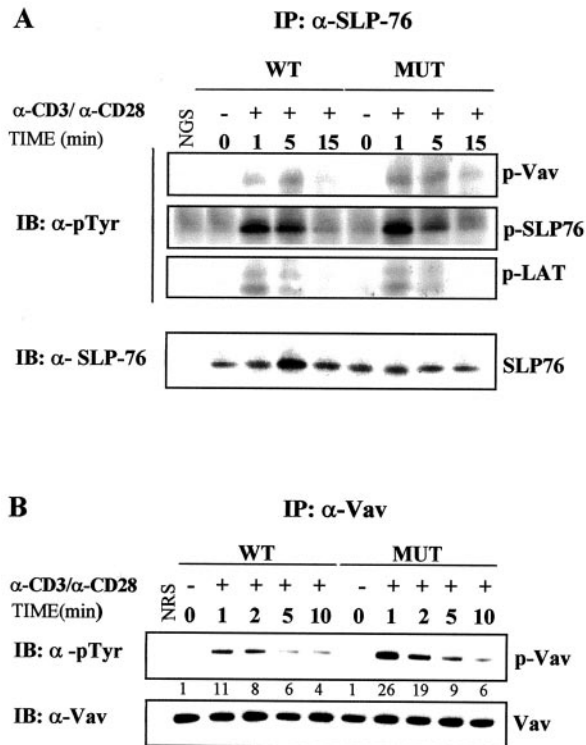
To examine whether the high phosphorylation of Vav associated with SLP-76 in mutant cells was a feature of such association or was reflecting an alteration of the total phosphorylation status of Vav upon TCR triggering, we performed immunoprecipitation with anti-Vav antibodies. In stimulated mutant cells, we found that Vav becomes tyrosine-phosphorylated at higher levels compared with wild type cells. Furthermore, the tyrosine-phosphorylated Vav signal was sustained for a longer period in mutant than in wild type cells (Fig. 5B). Altogether, the results shown in Figs. 1 and 5 indicate that the mutation in the transmembrane domain of TCR $\beta$  had opposite effects on different mediators of signaling pathways: higher TCR-induced tyrosine phosphorylation of Vav and lower tyrosine phosphorylation of LAT, compared with those in wild type cells.

*In Mutant Cells, the Translocation of PKC $\theta$  to Plasma Membrane Was Sustained Longer than in Wild Type Cells*—Both the activation of the Ras/ERK pathway and CD69 up-regulation have been shown to be dependent on Vav activation (26, 37).

Furthermore, it has been reported that PKC $\theta$  is selectively required in the Vav signaling pathway that mediates up-regulation of CD69 expression (37). Additionally, it has been suggested that PKC $\theta$  acts as an intermediate between Vav and Ras (26). Given that the activation of the Ras/ERK pathway and the up-regulation of CD69 are both increased in stimulated mutant cells (Figs. 3 and 5), we decided to test whether PKC $\theta$  might also contribute as intermediate to these altered activation readouts observed in mutant cells. To do that, wild type and mutant cells were stimulated and subjected to subcellular fractionation to compare the translocation of PKC $\theta$  to cell membrane, a phospho-Vav dependent event that is assumed to be directly associated with the kinase activation and with its localization in the supramolecular activation complex together with the TCR (38, 39).

Analyzing the PKC $\theta$  immunoblots of membrane and cytosolic fractions, we found significant differences between the patterns in wild type and those of mutant cells. They revealed that PKC $\theta$  remained translocated in the cell membrane for longer time in mutant cells than in wild type cells (Fig. 6). Both cell types showed a similar and pronounced loss of PKC $\theta$  in the cytosolic fraction after 5 min of stimulation, correlating with an increase in the amount of PKC $\theta$  translocated to the membrane. However, a consistent level of the kinase was only observed in mutant cells after 20 min of stimulation. In fact, the return of PKC $\theta$  to the cytosol was quicker in wild type cells, and consequently PKC $\theta$  was almost undetectable on the membrane of these cells after 20 min of stimulation. Expression of PKC $\theta$ , assessed by immunoblotting on whole cell lysates, was unaffected by TCR stimulation. In light of the above reports (26, 37), these data not only support the notion that PKC $\theta$  is an intermediate in both Vav-dependent Ras/ERK pathway activation and CD69 up-regulation, but also they suggest that the long





**FIG. 5. TCR stimulation in mutant cells result in higher than normal Vav phosphorylation.** Wild type (*WT*) and mutant (*MUT*) clones were unstimulated or stimulated for the indicated times and lysed in 1% Nonidet P-40-containing buffer. **A**, cell lysates were immunoprecipitated (*IP*) with antibodies to SLP-76 and analyzed by immunoblotting (*IB*) with the antibody 4G10 to phosphotyrosine (*pTyr*). Individual phosphotyrosine-containing proteins were identified by reprobing the blot with antibodies to LAT and Vav (not shown) and to SLP-76. *NGS*, preimmune normal goat serum used as control for immunoprecipitation. **B**, cell lysates were immunoprecipitated with antibodies to Vav and analyzed by immunoblotting with the antibody 4G10 to phosphotyrosine. The identity of phospho-Vav (*p-Vav*) was confirmed by reprobing the blot with an anti-Vav antibody. The numbers below the phosphotyrosine blot represent the relative induction of tyrosine phosphorylation of Vav normalized to Vav loading in each lane and to the relative amount of p-Vav in the second lane (unstimulated wild type cells). *NRS*, preimmune normal rabbit serum used as control for immunoprecipitation.

lasting translocation of PKC $\theta$  is contributing to the enhanced activation of these pathways in mutant cells.

#### DISCUSSION

The role played by constant domains of clonotypic TCR chains in TCR-mediated signaling is poorly understood. We describe here that the transmembrane domain of  $\beta$  chain is crucial in controlling signaling efficiency by coupling properly TCR stimulation to downstream effectors. Thus, engagement of a TCR bearing a single replacement in such a domain results in higher and more sustained ERK activation but in lower JNK and p38<sup>MAPK</sup> activation than in wild type cells. We have traced these defects as being due to a compendium of altered upstream events including low phosphorylation of LAT and high and long lasting phosphorylation of Vav. Because mutant cells are apoptosis-defective but IL-2-producing cells, our results provide new evidence for TCR-mediated differential signaling and shows that a combined effect of altered phosphorylation events is likely responsible for the impaired apoptosis in mutant cells but seems to be not relevant for IL-2 secretion. Further, the model emphasizes the role of phosphorylated linkers in dissociating signaling pathways leading to the development of effector T cell responses.

The most unexpected result has been the high and sustained

activation of ERK in mutant cells compared with that in wild type cells. This sustained activation correlates with the activation time course of the upstream intermediates Ras and Raf (Fig. 2). Furthermore, the overactivation of this pathway in mutant cells was consistent with a higher up-regulation of CD69 (Fig. 3), a downstream response that is dependent on the activation of Ras (40), Raf (41), and ERK.<sup>2</sup> Current evidence suggests that TCR-induced Ras activation is likely determined by the recruitment of adapter molecules to phosphorylated LAT (18, 42, 43). However, TCR-stimulated mutant cells show a significant defect on TCR-induced LAT phosphorylation, which consequently results in a defective recruitment of SLP-76 and PLC $\gamma$ 1 (Fig. 1A), which are both important for Ras activation (44, 45). Therefore, alternative pathways must contribute to elicit Ras-MAPK activation in mutant cells. In this regard, recent studies have shown that TCR-induced Ras-MAPK activation can occur through phospho-LAT-independent pathways. Thus, TCR triggering of SLP-76 deficient cells results in a blockade of ERK activation, although these cells show normal phospho-LAT (36). Furthermore, in ZAP-70-deficient cells, the Ras-MAPK pathway can be almost normally activated upon TCR engagement (46). Moreover, normal ERK activity can be induced in ZAP-70 mutant cells, Y/F 319, although they show a defective LAT phosphorylation (47). Additionally, TCR partial agonist ligands use a phospho-LAT-independent pathway to selectively activate the Ras-MAPK pathway (19).

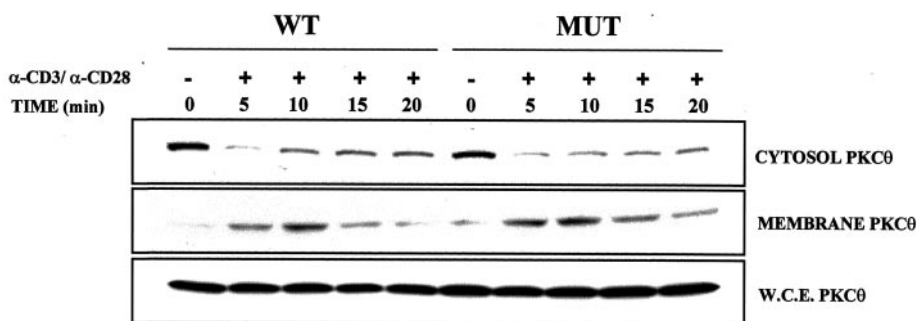
The following question arises: If LAT is not involved, what other molecules can be invoked to explain the activation pattern of the Ras-MAPK pathway in TCR $\beta$  mutant cells? c-Cbl should be discarded, because the phosphorylation of this adapter has been correlated with the inhibition of the Ras-MAPK pathway (48). On the other hand, SLP-76, which has been shown to be required for ERK activity (36), is similarly phosphorylated in wild type and mutant cells (Fig. 5A). We also dismiss the putative contribution of Ras-GRP to Ras activation, because this event is phospho-PLC $\gamma$ 1-dependent, and we found a low level of phospho-PLC $\gamma$ 1 associated with LAT in mutant cells (Fig. 1A). The most probable candidate is Vav, based on two facts: 1) Vav is more highly phosphorylated in TCR $\beta$  mutant cells than in wild type cells and 2) Vav recruited to the relevant adapter SLP-76 is more phosphorylated in mutant than in wild type cells (Fig. 5). Two additional observations support this hypothesis: 1) the time course for Vav phosphorylation and Ras activation correlate much better in mutant than in wild type cells (Figs. 2 and 5) and 2) the intense induction of phospho-Vav in mutant cells matches the strong induction of CD69 expression in these cells (Figs. 3 and 5). Interestingly, Vav has been shown to play a relevant role in both ERK activation and CD69 up-regulation by acting upstream of Ras, through a Rac-1-independent pathway (26, 27).

The intermediates and the mechanisms relating Vav and Ras are presently unknown. However, in light of our results, one putative intermediate would be SLP-76, provided that it could perform a ZAP-70-dependent, but LAT-independent, function not previously reported. An alternative intermediate is PKC $\theta$ . Upon TCR engagement, this protein is activated by a phospho-Vav-dependent mechanism and induces CD69 up-regulation (37). In this regard, our cell fractionation experiments (Fig. 6) show that in TCR-stimulated mutant cells, PKC $\theta$  remains located in the membrane for a longer period than in stimulated wild type cells, indicating that PKC $\theta$  contributes to the enhanced activation of the Ras/ERK pathway and to the high up-regulation of CD69 in mutant cells.

Therefore, according to our data, it is tempting to speculate

<sup>2</sup> E. Teixeira and R. Bragado, unpublished data.

**FIG. 6. The translocation of PKC $\theta$  to plasma membrane is sustained longer in mutant than in wild type cells.** Wild type (WT) and mutant (MUT) cells were unstimulated or stimulated for the indicated times. Whole cell lysates (W.C.E.), cytosol, and membrane fractions were prepared, and the aliquots were resolved by SDS-PAGE. The expression of PKC $\theta$  in each sample was determined by immunoblotting with a specific antibody. The results are representative of three similar experiments.



about two putative roles of Vav. Its recruitment to LAT-including complexes would be closely related to its role as a guanine nucleotide exchange factor for Rho family GTPases and, consequently, to the JNK and p38<sup>MAPK</sup> activation (23, 24). This would explain the low level of activation of these kinases in mutant cells where Vav is poorly recruited to LAT. This role of Vav could be consistent with the previously described Rac-1-independent modulating effect of Vav on the Ras/Raf/ERK signaling pathway and on CD69 up-regulation (26). The latter function could be mediated by an inducible interaction with SLP-76 not necessarily in association with LAT. How the Vav-SLP-76 complex elicits Ras-ERK activation and how the two putative roles of Vav are balanced to contribute to a physiological response in normal cells are unknown.

In mutant cells, despite the fact that the induced association between ZAP-70 and  $\zeta$  is very poor, ZAP-70 is inducibly tyrosine-phosphorylated at levels similar to those in wild type cells. Moreover, this protein shows comparable kinase activity in both cell types upon TCR activation. In addition, in TCR-activated mutant cells, ZAP-70 is incompletely concentrated near the plasma membrane, where the ZAP-70/ $\zeta$  association is impaired (30). Thus, it can be hypothesized that subsequent defects following TCR triggering in mutant cells might be accounted for by the partial mislocation of this kinase. Further, TCR stimulation of mutant cells could resemble the interaction of altered ligands with normal TCRs. In this regard, it has been suggested that an altered signaling may derive from the different orientations adopted by membrane-associated ZAP-70 because this kinase somehow senses the nature of the TCR-ligand interaction and assumes a configuration that is differentially effective on its substrates (49). Alternatively, the phosphorylation of ZAP-70 could not be critical for Fas-L induction.

All of our studies have been performed without overexpressing constitutively active or dominant negative signaling proteins. Because the cause/effect relationships of these modified proteins is commonly examined many hours following their introduction, whereas most signaling molecules are normally only active for minutes, compensation and indirect effects are sometimes impossible to distinguish from direct effects. Therefore, in the absence of these studies, our results more than tentatively provide evidence that the serial biochemical alterations observed in mutant clones is responsible for the specific TCR-mediated apoptosis-defective phenotype of these cells. Two facts support this notion: 1) TCR-mediated apoptosis is the only activation outcome that is defective in mutant cells and 2) we have not observed significant differences between mutant clones derived from independent transfections in both functional and biochemical assays. Furthermore, our data would suggest that TCR $\beta$  transmembrane region imparts a specific signaling function to T cells and/or serves to assure a proper balance in the activation of the various MAPK involved in TCR signaling. Indeed, a function where this balance is more strongly regulated is the TCR-mediated cell death (activation-induced cell death). In this regard, several studies have re-

ported relationships between ERK, JNK, and p38<sup>MAPK</sup> activities and the up-regulation of Fas-L and apoptosis (20, 22, 50).

Elucidating whether the functional and biochemical events we described here are relevant in the context of a physiological TCR is a hard task. In the absence of similar biological and biochemical studies, the more comparable situation is that provided by the stimulation of normal TCR with altered peptide ligands. Indeed, in both cases it is possible to activate some, but not all, functional features of the response elicited on wild type cells with cognate ligands. Although it is not clear why a consistent pattern of early signaling is not elicited by ligands capable of inducing similar functional responses (9, 13), the functional evidence that a TCR can interpret subtle changes in its ligand unequivocally highlights the exquisite sensitivity that the TCR-CD3 complex has in its recognition unit. In this sense, our results and previous works addressing the role of the TCR itself in controlling signaling efficiency (2–8, 29, 30) provide complementary evidence that the different domains of the TCR constitutes a support to differential signaling, at least from the point of view of its structural integrity.

Despite the functional similarities, two major biochemical differences distinguish the mutant cells from the altered peptide ligand system. First, stimulation with altered peptide ligands usually results in the absence of phosphorylation of the lower mobility phospho- $\zeta$  isoform, a fact that is not observed in stimulated mutant cells (30). It has been reported the ability of  $\zeta$  chain to promote apoptosis (51); however, the comparison between the similar phosphorylation of the two phospho- $\zeta$  isoforms in stimulated mutant cells (30) with the partial phosphorylation in T cells selectively induced to apoptosis (13) would indicate that functional  $\zeta$  ITAMs could be dispensable for antigen-mediated up-regulation of Fas-L and apoptosis. Indeed, it has been suggested that apoptosis does not depend on cooperative interaction between CD3- $\zeta$  and CD3- $\gamma\delta\epsilon$  modules, being the last one sufficient for qualitatively normal signaling (52, 53). Further support for this notion is the fact that although blocking of CD8 substantially reduces phosphorylation of the CTL TCR $\zeta$  chain, CTLs are still fully competent to up-regulate Fas-L and undergo activation-induced cell death (15). Second, and similarly, the normal phosphorylation of ZAP-70 in stimulated mutant cells and the absence of such event in T cells selectively induced to apoptosis with a partial agonist ligand (9) would also suggest that the phosphorylation of the kinase is not critical in the apparent specificity engaged in TCR-stimulated cells to prevent or induce Fas-L induction and apoptosis.

If the early phosphorylation of both  $\zeta$  chains and ZAP-70 does not explain differential signaling, what other events are responsible for such kind of cell activation? Although the possibility of engagement of specific signaling pathways could exist, our results and those obtained with partial agonist could also be interpreted in the light of a new kinetic model of TCR signaling (54). By using partial agonists with similar occupancy to agonist ligands, it has been shown that all T cell

responses can be triggered by a cumulative signal that is reached at different time points for different TCR ligands, even in the absence of full phosphorylation of early intermediates. In fact, TCR-stimulated mutant cells show significant apoptosis but at a much more delayed time than do wild type cells (54). In this regard, the transmembrane region could help the overall TCR to sense the ligand affinity.

Notwithstanding, a question remains on how to conceal the fact that an inefficient signal emanating from the mutant TCR simultaneously results in an inefficient activity of some signaling intermediates, such as JNK and p38 activities, but in overactivation of others such as ERK. We do not know whether the functional phenotype and signaling events displayed by the agonist stimulation of mutant cells could be triggered in normal cells by stimulating with partial agonists. By assuming the existence of such ligands, our results would support a model of dissociated activation, such as previously described (19, 55), in which activation of Ras/ERK cascade could occur through the phospho-LAT-independent pathway we describe here, emphasizing the importance of ZAP-70 recruitment in determining the location of specific signaling complexes. In this case, the alternative pathway for ERK activation would be also triggered upon agonist TCR stimulation as a transient mechanism to control the risky decision to cell death commitment. However, it would not be detectable because the full signal provided by the agonist would interfere with that mechanism to induce the balanced MAPK activation related to a full spectrum of T cell effector functions.

The role played by altered peptide ligands has been enigmatic. Recently, it has been shown that these analogues could take part in mature T cell apoptosis as a mechanism of tolerance to self-peptides *in vivo* (56). Our data, however, preclude any conclusion regarding the putative role *in vivo* of T cells displaying a mutant cell-like phenotype induced by a self-peptide. Whether this phenotype mimics the "competence to die" signal delivered by some partial agonist self-peptides to promote the specific and benign deletion by apoptosis of the responding cells (56) deserves further investigation.

The present study was carried out in a Jurkat cell model, and therefore we cannot draw definite conclusions on how the TCR $\beta$  mutation could affect thymic selection. Furthermore, it remains unclear whether the signals mediated by the TCR during the selection of thymocytes and the activation of mature T cells are quantitatively or qualitatively different. This notwithstanding and in light of recent studies that report the direct contribution of the  $\alpha$  chain connecting peptide domain (4, 5) and the conserved CD3 $\delta$  chain (57) in selective coupling the TCR to activation of the ERK signaling pathway, our results support the notion that different constant/conserved structural domains of the TCR complex might contribute to the fine balance of MAPK activation involved in thymic selection.

In conclusion, the results herein describe the signaling pathways affected by a mutation in the transmembrane domain of TCR $\beta$ . The data demonstrate how the mutation promotes an unbalanced phosphorylation of different adapters that leads to an unbalanced activations of the different MAPKs. Further, the data provide biochemical evidence to explain the ability for differential signaling of the mutant TCR to support some T cell responses but to impair the induction to apoptosis.

*Acknowledgments*—We thank Dr. X. Bustelo for critically reading the manuscript, Drs. M. Villalba and A. Altman for technical support and discussion, and Drs. G. Koretzky and S. Ley for providing reagents.

## REFERENCES

1. Germain, R. N. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 35223–35226
2. Backstrom, B. T., Rubin, B., Peter, A., Tiefenthaler, G., and Palmer, E. (1997) *Eur. J. Immunol.* **27**, 1433–1441
3. Backstrom, B. T., Milia, E., Peter, A., Jaureguierry, B., Baldari, C. T., and Palmer, E. (1996) *Immunity* **5**, 437–447
4. Backstrom, B. T., Muller, U., Hausmann, B., and Palmer, E. (1998) *Science* **281**, 835–838
5. Werlen, G., Hausmann, B., and Palmer, E. (2000) *Nature* **406**, 422–426
6. Backstrom, B. T., Hausmann, B. T., and Palmer, E. (1997) *J. Exp. Med.* **186**, 1933–1938
7. Fuller-Espie, S., Hoffman, T. P., Wiest, D. L., Tietjen, I., and Spain, L. M. (1998) *Int. Immunol.* **10**, 923–933
8. Kunjibettu, S., Fuller-Espie, S., Carey, G. B., and Spain, L. M. (2001) *Int. Immunol.* **13**, 211–222
9. Sloan-Lancaster, J., and Allen, P. M. (1996) *Annu. Rev. Immunol.* **14**, 1–27
10. Brossart, P., and Bevan, M. J. (1996) *J. Exp. Med.* **183**, 2449–2458
11. Cao, W., and Braciale, T. J. (1996) *J. Mol. Med.* **74**, 573–582
12. Sloan-Lancaster, J., Evavold, B. D., and Allen, P. M. (1994) *J. Exp. Med.* **180**, 1195–1205
13. Combadiere, B., Sousa, C. R., Germain, R. N., and Lenardo, M. J. (1998) *J. Exp. Med.* **187**, 349–355
14. Wei, C. H., Beeson, C., Masucci, M. G., and Levitsky, V. (1999) *J. Immunol.* **163**, 2601–2609
15. Xu, X. N., Purbhoo, M. A., Chen, N., Mongkolsapaya, J., Cox, J. H., Meier, U. C., Tafuro, S., Dunbar, P. R., Sewell, A. K., Hourigan, C. S., Appay, V., Cerundolo, V., Burrows, S. R., McMichael, A. J., and Srean, G. R. (2001) *Immunity* **14**, 591–602
16. Chau, L. A., Bluestone, J. A., and Madrenas, J. (1998) *J. Exp. Med.* **187**, 1699–1709
17. Madrenas, J., Wange, R. L., Wang, J. L., Isakov, N., Samelson, L. E., and Germain, R. N. (1995) *Science* **267**, 515–518
18. Finco, T. S., Kadlecck, T., Zhang, W., Samelson, L. E., and Weiss, A. (1998) *Immunity* **9**, 617–626
19. Chau, L. A., and Madrenas, J. (1999) *J. Immunol.* **163**, 1853–1858
20. Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R. J., and Greenberg, M. E. (1995) *Science* **270**, 1326–1331
21. Penninger, J. M., and Crabtree, G. R. (1999) *Cell* **96**, 9–12
22. Zhang, J., Gao, J. X., Salojin, K., Shao, Q., Grattan, M., Meagher, C., Laird, D. W., and Delovitch, T. L. (2000) *J. Exp. Med.* **191**, 1017–1030
23. Salojin, K. V., Zhang, J., and Delovitch, T. L. (1999) *J. Immunol.* **163**, 844–853
24. Kaminuma, O., Deckert, M., Elly, C., Liu, Y. C., and Altman, A. (2001) *Mol. Cell. Biol.* **21**, 3126–3136
25. Salojin, K. V., Zhang, J., Meagher, C., and Delovitch, T. L. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 5966–5975
26. Villalba, M., Hernandez, J., Deckert, M., Tanaka, Y., and Altman, A. (2000) *Eur. J. Immunol.* **30**, 1587–1596
27. Tartare-Deckert, S., Monthouel, M. N., Charvet, C., Foucault, I., Van Obberghen, E., Bernard, A., Altman, A., and Deckert, M. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 20849–20857
28. Fischer, K. D., Kong, Y. Y., Nishina, H., Tedford, K., Marengere, L. E., Koziaradzki, I., Sasaki, T., Starr, M., Chan, G., Gardener, S., Nghiem, M. P., Bouchard, D., Barbacid, M., Bernstein, A., and Penninger, J. M. (1998) *Curr. Biol.* **8**, 554–562
29. Rodriguez-Tarduchy, G., Sahuquillo, A. G., Alarcon, B., and Bragado, R. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 30417–30425
30. Sahuquillo, A. G., Roumier, A., Teixeira, E., Bragado, R., and Alarcon, B. (1998) *J. Exp. Med.* **187**, 1179–1192
31. Teixeira, E., Garcia-Sahuquillo, A., Alarcon, B., and Bragado, R. (1999) *Eur. J. Immunol.* **29**, 745–754
32. Hibi, M., Lin, A., Smeal, T., Minden, A., and Karin, M. (1993) *Genes Dev.* **7**, 2135–2148
33. Zhang, W., Sloan-Lancaster, J., Kitchen, J., Triple, R. P., and Samelson, L. E. (1998) *Cell* **92**, 83–92
34. Schaeffer, H. J., and Weber, M. J. (1999) *Mol. Cell. Biol.* **19**, 2435–2444
35. Costello, P. S., Walters, A. E., Mee, P. J., Turner, M., Reynolds, L. F., Prisco, A., Sarner, N., Zamojska, R., and Tybulewicz, V. L. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 3035–3040
36. Yablonski, D., Kuhne, M. R., Kadlecck, T., and Weiss, A. (1998) *Science* **281**, 413–416
37. Villalba, M., Coudronniere, N., Deckert, M., Teixeira, E., Mas, P., and Altman, A. (2000) *Immunity* **12**, 151–160
38. Meller, N., Altman, A., and Isakov, N. (1998) *Stem Cells* **16**, 178–192
39. Monks, C. R., Kupfer, H., Tamir, I., Barlow, A., and Kupfer, A. (1997) *Nature* **385**, 83–86
40. D'Ambrosio, D., Cantrell, D. A., Frati, L., Santoni, A., and Testi, R. (1994) *Eur. J. Immunol.* **24**, 616–620
41. Taylor-Fishwick, D. A., and Siegel, J. N. (1995) *Eur. J. Immunol.* **25**, 3215–3221
42. Zhang, W., Irvin, B. J., Triple, R. P., Abraham, R. T., and Samelson, L. E. (1999) *Int. Immunol.* **11**, 943–950
43. Martelli, M. P., Lin, H., Zhang, W., Samelson, L. E., and Bierer, B. E. (2000) *Blood* **96**, 2181–2190
44. Puente, L. G., Stone, J. C., and Ostergaard, H. L. (2000) *J. Immunol.* **165**, 6865–6871
45. Boerth, N. J., Sadler, J. J., Bauer, D. E., Clements, J. L., Gheith, S. M., and Koretzky, G. A. (2000) *J. Exp. Med.* **192**, 1047–1058
46. Griffith, C. E., Zhang, W., and Wange, R. L. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 10771–10776
47. Williams, B. L., Irvin, B. J., Sutor, S. L., Chini, C. C., Yacyszyn, E., Bubeck, W. J., Dalton, M., Chan, A. C., and Abraham, R. T. (1999) *EMBO J.* **18**, 1832–1844
48. Bos, J. L. (1998) *EMBO J.* **17**, 6776–6782



49. Graef, I. A., Holsinger, L. J., Diver, S., Schreiber, S. L., and Crabtree, G. R. (1997) *EMBO J.* **16**, 5618–5628
50. van den Brink, M. R., Kapeller, R., Pratt, J. C., Chang, J. H., and Burakoff, S. J. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 11178–11185
51. Combadiere, B., Freedman, M., Chen, L., Shores, E. W., Love, P., and Lenardo, M. J. (1996) *J. Exp. Med.* **183**, 2109–2117
52. Ardouin, L., Boyer, C., Gillet, A., Trucy, J., Bernard, A. M., Nunes, J., Delon, J., Trautmann, A., He, H. T., Malissen, B., and Malissen, M. (1999) *Immunity* **10**, 409–420
53. She, J., Matsui, K., Terhorst, C., and Ju, S. T. (1998) *Int. Immunol.* **10**, 1733–1740
54. Rosette, C., Werlen, G., Daniels, M. A., Holman, P. O., Alam, S. M., Travers, P. J., Gascoigne, N. R., Palmer, E., and Jameson, S. C. (2001) *Immunity* **15**, 59–70
55. Chau, L. A., Tso, J. Y., and Madrenas, J. (2001) *Transplant. Proc.* **33**, 528–529
56. Combadiere, B., Sousa, C., Trageser, C., Zheng, L. X., Kim, C. R., and Lenardo, M. J. (1998) *Immunity* **9**, 305–313
57. Delgado, P., Fernandez, E., Dave, V., Kappes, D., and Alarcon, B. (2000) *Nature* **406**, 426–430