

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Biología Animal II (Fisiología Animal)



TESIS DOCTORAL

Regulación por proteínas señalizadoras de la adhesión dependiente de integrinas linfocitarias en respuesta a quimioquinas

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Ana María Dios Esponera

Director

Joaquín Teixidó Calvo

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA ANIMAL II (FISIOLOGÍA ANIMAL)

**REGULACIÓN POR PROTEÍNAS
SEÑALIZADORAS DE LA ADHESIÓN
DEPENDIENTE DE INTEGRINAS
LINFOCITARIAS EN RESPUESTA A
QUIMIOQUINAS**

TESIS DOCTORAL
ANA MARÍA DIOS ESPONERA
2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA ANIMAL II (FISIOLOGÍA ANIMAL)

**REGULACIÓN POR PROTEÍNAS
SEÑALIZADORAS DE LA ADHESIÓN
DEPENDIENTE DE INTEGRINAS
LINFOCITARIAS EN RESPUESTA A
QUIMIOQUINAS**

Este trabajo ha sido realizado por **Ana María Dios Esponera** para optar al grado de Doctor, en el centro de Investigaciones Biológicas de Madrid (CSIC), bajo la dirección del Dr. Joaquín Teixidó Calvo.

Fdo: Dr. Joaquin Teixidó Calvo



A mi familia y amigos

AGRADECIMIENTOS

Muchas personas han contribuido en este periodo de mi vida, bien ayudándome en el trabajo del día a día, como sirviendo de apoyo en los momentos difíciles. A todos ellos quería agradecer su ánimo y su paciencia infinita.

En primer lugar quería agradecer a Joaquín, mi director de tesis, la posibilidad de realizar la tesis doctoral en su laboratorio y por dedicar gran parte de su tiempo en darme una formación científica.

A continuación quiero dar las gracias a todos mis compañeros del laboratorio, pasados y presentes, con los que tantas horas de trabajo, y no trabajo, he compartido. Quiero agradecer a David, mi *teacher* y compañero en el mundo de los linfocitos; a Rubén, un gran amigo que sabe escuchar y animar a cualquiera; a Pablo, ese chico nervioso siempre preocupado por los demás; a Nohemí, la persona más trabajadora y siempre dispuesta a ayudar; a Sole, mi compi en el equipo linfocito; a Marta, por ser la alegría de la huerta siempre con una sonrisa en la cara; a Mónica, que aunque físicamente no esté en el 141 es una más; a Alicia, la última incorporación que siempre nos deleita con un paso de baile; también a Jan, ese holandés que por una temporada nos “obligó” a hablar en inglés; a Geor y a Ana Serrano.

También me gustaría nombrar al resto de compañeros del CIB, con los cuales he compartido tantas fiestas de primavera y cañas después del trabajo. Al labo de Geli que tanto visito y que tanto me han ayudado. A Estefi me gustaría decirle que aparte de ser compañera de piscina, carreras, baile y estado “pre-tésico” es la mejor amiga que he podido ganar en estos cinco años y lo seguirá siendo por mucho más. Muchas gracias por ser como eres. A Elviri, esa *granaína* tan fuerte y simpática que siempre me ha ayudado con los cálculos; a Irene y Mónica II. A Roi, ese chico con tanto talento. A Emi, Jesús, Miguel Ángel, Gema, Alberto, Irene, Sofía, Agustín y Sheila, esa chica tan laboriosa!, y a los que ya no están, Mariangels o *Queen of England*, con la que tantas risas he compartido, Eva, Patri, Rodrigo, David (Panam), Sergio, Maca, Javi y Juande. Y también a Nani, que aunque no sea del CIB es uno más. Gracias a todos por alegrarme los días.

En siguiente lugar quiero agradecer al personal de los servicios del centro la labor que realizan. Y en especial a Pedro Lastres, de citometría, por ayudarme con todos mis ensayos, a Maite y Gema de confocal, a María del servicio de proteómica, y también a la gente del servicio de limpieza.

Quiero agradecer a los doctores Ángeles García Pardo, Carlos Cabañas, Paloma Sánchez Mateos, Rafael Samaniego, Ronen Alon, Francisco Sánchez-Madrid, Xosé Bustelo, Andrés Hidalgo, José Luis Rodríguez Fernández, Ignacio Casal, José Alberto García Sanz y Jesús Jiménez Barbero por su contribución a este trabajo. Gracias por todos los reactivos facilitados y por sus útiles comentarios científicos y sugerencias. Sin su contribución nuestro trabajo no habría sido posible.

En un lugar muy destacado para mí se encuentra el laboratorio del doctor Larry Samelson y su gente, sobre todo la doctora Valarie A. Barr e Itoro Akpan, gracias por acogerme y enseñarme nuevas técnicas. Y a los amigos que allí hice, Juanlu y Pepe.

Mis amigos merecen una mención especial, porque aunque pase el tiempo sé que puedo contar con ellos, ya estén cerca o lejos. Gracias a Eva, Dani, Roci, Sheila, Llanos y Alex. Y especialmente quería dar las gracias a esa persona tan importante actualmente en mi vida. Gracias por adelantarme en el camino, hacer que la distancia no signifique nada y hacerme ver la vida de otra manera. Dámaso, gracias por estar ahí.

Por último, y más importante, quiero dar las gracias a mi familia. Gracias a mis padres y hermano por apoyarme y animarme en todas las decisiones que he tomado. Gracias por soportar mis cambios de humor y facilitarme las cosas siempre que podéis.

Gracias a todos!

Índice

ÍNDICE

ÍNDICE.....	i
ABREVIATURAS.....	vii
ABSTRACT.....	xi
INTRODUCCIÓN.....	1
Modelo de migración leucocitario.....	1
Moléculas de adhesión: las integrinas.....	2
Estructura de las integrinas.....	3
Regulación de la actividad de las integrinas.....	5
Principales integrinas linfocitarias.....	7
Las integrinas $\alpha 4$ y sus ligandos.....	7
La integrina $\alpha L\beta 2$ y sus ligandos.....	10
Las quimioquinas y sus receptores.....	11
La quimioquina CXCL12 y su receptor CXCR4.....	15
Proteínas implicadas en la señalización <i>inside-out</i>	18
Las GTPasas.....	18
Las Rho GTPasas.....	19
GEF de las Rho GTPasa.....	20
Proteínas Vav.....	21
ZAP-70.....	23
Talina.....	26
Pyk2.....	29
SLP-76.....	31
ADAP.....	32
La familia de proteínas RGS: RGS10.....	34
OBJETIVOS.....	39

MATERIALES Y MÉTODOS.....	43
Cultivos celulares y purificación de células T.....	43
Anticuerpos.....	43
Vectores de expresión y siRNAs.....	45
Transfección celular.....	46
Western blotting.....	47
Inmunoprecipitación.....	47
Ensayos de actividad GTPasa.....	48
Ensayos de fraccionamiento celular.....	49
Ensayos de adhesión celular estática.....	49
Ensayos de adhesión celular en cámaras de flujo.....	50
Citometría de flujo.....	52
Ensayos de unión soluble de VCAM-1 y ICAM-1.....	52
Detección de integrinas $\beta 1$ y $\beta 2$ activas.....	53
Ensayos de polimerización de actina.....	54
Ensayos de movilización de calcio.....	54
Ensayos de quimiotaxis.....	54
Microscopia confocal.....	54
Ensayos de <i>spreading</i> celular.....	55
Análisis estadístico.....	55
 RESULTADOS.....	 59
1. PAPEL DE ZAP-70 EN LA ESTIMULACIÓN POR QUIMIOQUINAS DE LA ADHESIÓN DE CÉLULAS T DEPENDIENTE DE LA INTEGRINA $\alpha 4\beta 1$.....	 59
• La disociación del complejo Vav1-talina en respuesta a quimioquinas es dependiente de ZAP-70.....	59
• ZAP-70 es esencial en la adhesión de células T dependiente de $\alpha 4\beta 1$ en respuesta a quimioquinas.....	61
• Papel de ZAP-70 en la asociación Vav1-talina en células T dependiente de TCR.....	63

2. PAPEL DE SLP-76, ADAP Y PYK2 EN LA REGULACIÓN DE LA ADHESIÓN DE CÉLULAS T DEPENDIENTE DE $\alpha 4\beta 1$ EN RESPUESTA A QUIMIOQUINAS.....	67
• Papel de SLP-76 y ADAP en la adhesión de células T dependiente de $\alpha 4\beta 1$ en respuesta a quimioquinas.....	67
• Pyk2 regula la adhesión de células T dependiente de $\alpha 4\beta 1$ en respuesta a quimioquinas.....	69
• El silenciamiento de SLP-76/ADAP y Pyk2 no afecta a la activación inicial de $\alpha 4\beta 1$	72
• Papel de SLP-76, ADAP y Pyk2 en el reforzamiento de la adhesión y el <i>spreading</i> de células T mediada por $\alpha 4\beta 1$ en respuesta a CXCL12...	75
• La regulación de Pyk2 de la adhesión de células T dependiente de $\alpha 4\beta 1$ es mediada por la estimulación de Rac.....	78
• Relaciones funcionales entre Pyk2 y ADAP en la estimulación de Rac y en la adhesión de células T dependiente de $\alpha 4\beta 1$ en respuesta a quimioquinas.....	79
• Papel de Pyk2 en la fosforilación de Erk1/2 y Akt en respuesta a CXCL12.....	80
3. PAPEL DE RGS10 EN LA REGULACIÓN POR QUIMIOQUINAS DE LA ADHESIÓN DEPENDIENTE DE $\alpha 4\beta 1$ Y $\alpha L\beta 2$ EN CÉLULAS T HUMANAS.....	83
• La estimulación por CXCL12 de la adhesión de células T mediada por la integrina $\alpha 4\beta 1$ está regulada por RGS10.....	83
• RGS10 regula la adhesión de células T dependiente de $\alpha L\beta 2$ en respuesta a quimioquinas.....	87
• El silenciamiento de RGS10 no afecta la activación inicial de $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha L\beta 2$ en respuesta a quimioquinas.....	88
• RGS10 regula el reforzamiento de la adhesión y el <i>spreading</i> de células T mediada por $\alpha 4\beta 1$ en respuesta a CXCL12.....	91
• El control por RGS10 de la adhesión de células T dependiente de $\alpha 4\beta 1$ es mediado por la activación de Vav1-Rac en respuesta a CXCL12.....	93
• RGS10 regula la quimiotaxis y la activación de Cdc42 en células T...	96

DISCUSIÓN.....	101
CONCLUSIONES.....	115
BIBLIOGRAFÍA.....	119
ANEXOS.....	157

- Garcia-Bernal, D., Parmo-Cabañas, M., **Dios-Esponera-A**, Samaniego, R., Hernán-P de la Ossa, D. and Teixidó, J. Chemokine-induced Zap70 kinase-mediated dissociation of the Vav1-Talin complex activates $\alpha 4\beta 1$ integrin for T cell adhesion. *Immunity*. Vol. 31, 953-964, 2009..... **ANEXO I**
- Garcia-Bernal D *, **Dios-Esponera A ***, Sotillo-Mallo E, García-Verdugo R, Arellano N and Teixido J. RGS10 represses the upregulation by chemokines of T cell adhesion mediated by $\alpha 4\beta 1$ and $\alpha L\beta 2$ integrins. 2011. *The Journal Immunology*. Vol. 187, 1264-72, 2011.....**ANEXO II**
- **Dios-Esponera A***, Isern de Val S*, García-Verdugo R, García-Bernal D, Arellano-Sánchez N, Cabañas C, Teixidó J. Vav1-interacting molecules as positive or negative regulators of chemokine-stimulated T lymphocyte adhesion mediated by integrin $\alpha 4\beta 1$. *En preparación*.....**ANEXO III**
- Garcia-Bernal D*, Redondo-Muñoz J*, **Dios-Esponera A**, Chèvre R, Bailón E, Garayoa M, Arellano-Sánchez N, Gutierrez NC, Hidalgo A, García-Pardo A, Teixidó J. Sphingosine-1-phosphate activates chemokine-promoted myeloma cell adhesion and migration involving $\alpha 4\beta 1$ integrin function. *The Journal Pathology*. Vol. 229, 36-48, 2013.....**ANEXO IV**

Abreviaturas

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico.
Akt	<i>Protein kinase B</i> , proteína quinasa B.
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> , análisis de la varianza.
APC	<i>Antigen-presenting cell</i> , célula presentadora de antígenos.
ARN	Ácido ribonucleico.
BCECF-AM	<i>2',7'-bis (carboxyethyl)-5(6')-carboxyfluorescein-acetoxymethyl ester</i> , 2',7'-bis (carboxietil)-5(6')-carboxifluoresceinato de acetoximetil ester.
BCR	<i>B-cell receptor</i> , receptor de células B.
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> , albúmina de suero bovino.
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> , medio de Eagle modificado por Dulbecco.
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i> , dimetil sulfóxido.
DTT	<i>Dithiothreitol</i> .
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> , ácido etileno-diamino-tetraacético.
EGTA	<i>Ethyleneglycol-bis(β-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraacetic Acid</i> , ácido etileno-glicol-bis (β aminoetil)-N,N,N',N'-tetra-acético.
ERK1/2	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i> , quinasa regulada por señales extracelulares.
FAK	<i>Focal adhesion kinase</i> , quinasa de adhesión focal.
FBS	<i>Fetal bovine serum</i> , suero bovino fetal.
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i> , isotiocianato de fluoresceína.
FN-H89	<i>Fibronectin fragment H89</i> , fragmento H89 de la fibronectina.
GAP	<i>GTPase-activating protein</i> , proteína activadora de actividad GTPasa.
GDI	<i>GDP-dissociation inhibitor</i> , inhibidor de disociación de GDP.
GDP	<i>Guanine 5'-diphosphate</i> , guanina 5'-difosfato.
GEF	<i>Guanine nucleotide exchange factor</i> , factor intercambiador de nucleótidos de guanina.
GFP	<i>Green fluorescent protein</i> , proteína verde fluorescente.
GPCR	<i>G-protein coupled receptor</i> , receptor acoplado a proteínas G heterotriméricas.
GRK	<i>G-protein associated kinase</i> , quinasa asociada a proteína G.
GST	<i>Gluthation sulphur transferase</i> , transferasa de azufre a glutatión.

GTP	<i>Guanine 5'-triphosphate</i> , guanina 5'-trifosfato.
HEPES	<i>4-(2-hidroxethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid</i> , ácido 4-(2-hidroxietil) piperacina-1-etanosulfónico.
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> , peroxidasa de rábano.
ICAM	<i>Intercellular Adhesion Molecule</i> , moléculas de adhesión intercelular.
IRM	<i>Interference of the reflection microscopy</i> , microscopía basada en la interferencia de la reflexión.
JAK	<i>Janus kinase</i> , quinasa janus.
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i> , quinasa N-terminal de c-Jun.
LFA-1	<i>leukocyte function-associated antigen 1</i> , antígeno 1 asociado a la función de los leucocitos.
MAdCAM-1	<i>Mucosal addressin cell adhesion molecule-1</i> , molécula de adhesión celular de adresinas mucosas-1.
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i> , quinasa de proteínas activadas por mitógenos.
NF-κB	<i>Nuclear factor-κB</i> , factor nuclear κB.
PAGE	<i>Poliacrylamide gel electrophoresis</i> , electroforesis en geles de poliacrilamida.
PAK	<i>p-21 Activated kinase</i>
PBL-T	<i>Peripheral blood lymphocyte T</i> , linfocito T de sangre periférica.
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , solución salina tamponada con fosfatos.
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i> , factor de crecimiento derivado de plaquetas.
PH	<i>Pleckstrin-homology domain</i> , dominio de homología con pleckstrina.
PI ₃ K	<i>Phosphatidylinositol-3-kinase</i> , quinasa fosfatidilinositol-3.
PIP ₂	<i>Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate</i> , fosfatidilinositol 4,5-bifosfato.
PIP ₃	<i>Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate</i> , fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato.
PKA	<i>AMPC-dependent protein-kinase</i> , proteína-quinasa dependiente de AMPc.
PKC	<i>Calcium-dependent protein-kinase</i> , proteína-quinasa dependiente de calcio.
PR	<i>Proline-rich regions</i> , regiones ricas en prolina.
PVDF	<i>Polyvinylidene difluoride</i> , difluoruro de polivinilideno.
RT-PCR	<i>Reverse transcription-polymerase chain reaction</i> , ensayo de transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa.

SDF-1	<i>Stromal-cell derived factor-1</i> , factor derivado de células estromales-1.
SCID	<i>Severe combined immunodeficiency</i> , inmunodeficiencia combinada severa.
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> , dodecilsulfato de sodio.
SH ₂	<i>Src-homology domain 2</i> , dominio 2 de homología con Src.
SH ₃	<i>Src-homology domain 3</i> , dominio 3 de homología con Src.
shRNA	<i>Interfering short-hairpin RNA</i> , horquilla de ARN interferente.
siRNA	<i>Small interfering ribonucleic acid</i> , oligoribonucleótido de interferencia.
Src	<i>Sarcoma tyrosine-kinase</i> , tirosín-quinasa sarcoma.
Stat	<i>Signaling transducer and activator of transcription</i> , transductor de señal y activador de transcripción.
TCR	<i>T-cell receptor</i> , receptor de células T.
TGF-β1	<i>Transforming growth factor-β1</i> , factor de crecimiento transformante β1.
TNF-α	<i>Tumor necrosis factor-α</i> , factor de necrosis tumoral α.
UV	<i>Ultraviolet light</i> , luz ultravioleta.
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule-1</i> , molécula de adhesión de células endoteliales-1.
VLA-4	<i>Very late antigen-4</i> .
ZF	<i>Zinc-fingers</i> , dedos de zinc.

ABSTRACT

Chemokines stimulate cell migration and activation, and exert their functions upon binding to heterotrimeric guanine nucleotide-binding (G) protein-coupled receptors (GPCR). In the immune system, chemokines promote the migration of immune cells from lymph and blood circulation into lymphoid tissues and sites of inflammation during immune surveillance. For T lymphocytes, this process is achieved after rapid stimulation of $\alpha 4\beta 1$ and $\alpha L\beta 2$ integrin activity by chemokines presented on the endothelium. This activation must be rapid to deliver tight cell attachment to resist the blood shear stress, but also transient to allow lymphocyte locomotion on and diapedesis across endothelial layers. Thus, chemokine binding to GPCR induces activation of intracellular effector molecules that lead to integrin-mediated upregulation of lymphocyte adhesion, a process called inside-out signaling. Key inside-out molecules that regulate the activation of $\alpha 4\beta 1$ and $\alpha L\beta 2$ include talin and kindlin-3, as well as the Vav1-Rac1 and RAPL-Rap1 pathways, that stimulate the transition to high-affinity $\alpha 4\beta 1$ and $\alpha L\beta 2$ conformations. In the present thesis, we have characterized the inside-out signaling required for the regulation of chemokine-stimulated T lymphocyte adhesion mediated by $\alpha 4\beta 1$.

When T lymphocytes become exposed to chemokines, inside-out signals are generated that finally impinge on integrin cytoplasmic domains, leading to integrin activation and stimulation of cell adhesion. Vav1 is a key component of this signaling because it is required for $\alpha 4\beta 1$ integrin activation. Talin directly interacts with β subunit integrin cytoplasmic domains and regulates integrin activation, thereby representing a main candidate for chemokine-stimulated T lymphocyte adhesion mediated by $\alpha 4\beta 1$. Previous results achieved in our laboratory demonstrated that Vav1 and talin constitutively associate in human resting T lymphocytes and that they complex into an essential signaling platform. Thus, when chemokine-triggered signaling converges on this platform, Vav1 and talin gradually dissociate. This dissociation correlates with an increase in talin- $\beta 1$ association, which represents a key event for integrin activation and induces an upregulation of cell adhesion. The importance of this platform is based on the fact that silencing Vav1 or talin leads to failure to assemble the complex and to a subsequent blockade of the chemokine CXCL12-stimulated T cell attachment to VCAM-1, the main ligand of $\alpha 4\beta 1$ in endothelial cells.

Coincident with the dissociation of Vav1 from talin we observed that the kinase ZAP-70 enters in the Vav1-talin complex, leading to Vav1 tyrosine phosphorylation. The

first objective in this thesis consisted in the study of the function of ZAP-70 in the regulation of the dynamics of Vav1, talin and $\beta 1$ associations, as well as in chemokine stimulated T lymphocyte adhesion mediated by $\alpha 4\beta 1$. Our results indicate that ZAP-70 is involved in $\alpha 4\beta 1$ activation in response to CXCL12, because this activation requires ZAP-70-dependent dissociation of Vav1-talin complexes. ZAP-70 binding to Vav1-talin complexes leads to Vav1 phosphorylation, which possibly weakens Vav1-talin association. Therefore, our data strongly suggest that chemokine promoted, ZAP-70-dependent phosphorylation of Vav1 starts while this protein is still associated with talin in the signaling platform. This conclusion is based on the fact that talin knockdown impairs Vav1-ZAP-70 binding, and inhibition of ZAP-70 activity abolishes chemokine-dependent Vav1 phosphorylation associated with blocking of Vav1-talin disassembly. Furthermore, we show that when ZAP-70 function or expression is inhibited, there is a defect in chemokine-stimulated T lymphocyte adhesion mediated by $\alpha 4\beta 1$. This defect is linked with a decrease in integrin activation, as detected with binding of VCAM-1-Fc or HUTS-21 anti- $\beta 1$ integrin mAb, a reporter of $\alpha 4\beta 1$ activation. Together, our data suggest that Vav1 functions as a constitutive adaptor of talin that needs to be phosphorylated by ZAP-70 in order to be released from the Vav1-talin complexes, thus rendering talin available for additional $\alpha 4\beta 1$ integrin activation.

We have started preliminary work addressed to determine of TCR-dependent integrin activation following similar pattern as those from chemokine-stimulated activation. Notably, confocal microscopy assays revealed that Vav1-talin and ZAP-70-talin co-localizations decreased following TCR activation. These preliminary data suggest that signaling generated upon chemokine receptor or TCR activation might follow common traits converging in integrin activation.

Give the key role of Vav1 in chemokine-stimulated, $\alpha 4\beta 1$ -dependent T cell adhesion, we then analyzed the function of Vav1-binding partners in this adhesion process. We focused on SLP-76 and on the non-receptor tyrosine kinase Pyk2. Furthermore, we study the possible implication in this process of ADAP, an adapter that binds SLP-76 SH2 domain. SLP-76 plays a positive regulatory role for T cell development and for T cell activation in response to TCR stimulation. SLP-76 is an adaptor protein with the ability to bind multiple intracellular proteins upon TCR stimulation, and likely acts as a scaffold to recruit these proteins, therefore contributing to integrin activation. ADAP is an adaptor protein with minor roles in lymphocyte

differentiation, but with an important involvement in late responses follows TCR activation. ADAP is connected to the cytoskeleton as a result of its binding to the EVH1 domain in Ena and VASP, and it also associates with RIAM, a protein that helps in the recruitment of talin in close proximity to integrin β subunit cytoplasmic domains. Importantly, ADAP plays key roles in TCR-stimulated T cell adhesion mediated by $\beta 1$ and $\beta 2$ integrins. Finally, Pyk2 is a protein tyrosine kinase with a high homology with the focal adhesion kinase, FAK. Pyk2 is activated by chemokines and following TCR stimulation, involving both tyrosine autophosphorylation and Src-dependent phosphorylation. Pyk2 regulates cell migration and platelet aggregation.

Our results indicated that CXCL12 promotes the association of SLP-76 with ADAP, Vav1, talin and ZAP-70 in T cells following exposure to CXCL12. Furthermore, CXCL12 stimulated Vav1-Pyk2 association, and we found that Pyk2 can also specifically associate with talin. Our data showed that SLP-76, ADAP and Pyk2 function as controllers of chemokine-stimulated T cell adhesion involving $\alpha 4\beta 1$. Thus, adhesion assays under flow conditions revealed that T cells silenced for SLP-76 or ADAP had a reduction in CXCL12-upregulated attachment to VCAM-1 compared with control siRNA transfectants. On the contrary, T cells silenced for Pyk2 expression showed significantly stronger attachment to VCAM-1. Such different effects in adhesion of cells silenced for SLP-76, ADAP or Pyk2 were not due to alterations in generation of $\alpha 4\beta 1$ high-affinity conformation, but to defects in adhesion strengthening and in spreading mediated by $\alpha 4\beta 1$ following stimulation by chemokines. Hence, we found a reduction in the strength of adhesion and in spreading in ADAP-depleted cells, and a development of higher resistance to detachment and larger spreading on VCAM-1 in cells silenced for Pyk2 compared to control siRNA transfectants. We only could detect minor contribution of SLP-76 in $\alpha 4\beta 1$ -mediated cell adhesion strengthening, although we observed a reduction in cellular spreading in SLP-76-depleted cells.

Notably, in cells silenced for Pyk2, the increase in the strengthening of adhesion and the spreading was associated with higher activation of Rac. Furthermore, expression of a dominant negative form of Rac1 reduced to control levels the chemokine-upregulated adhesion to VCAM-1 that showed Pyk2-silenced T cells, suggesting that Pyk2 regulate the adhesion mediated by $\alpha 4\beta 1$ that is target of chemokine activation by modulating Rac1 activation. Additionally, depletion of Pyk2 led to rescue of adhesion to VCAM-1 due to ADAP silencing, involving Rac function, suggesting that this GTPase represents a Pyk2 and ADAP common mediator of chemokine-activated, $\alpha 4\beta 1$ -dependent T cell adhesion.

The third objective focused on studying the role of RGS10 in chemokine-stimulated T lymphocyte adhesion mediated by $\alpha 4\beta 1$ and $\alpha L\beta 2$ integrins. RGS10 belongs to the regulators of G protein signaling (RGS) family, and function as an accelerator of the GTPase activity of $G\alpha$ subunits in heterotrimeric G proteins. This activity promotes the return of $G\alpha$ to its inactive form, which leads to faster termination of G protein-dependent signaling. Therefore, RGS proteins control the timing and duration of GPCR-dependent signaling leading, which could then regulate the adhesive response dependent of integrins on lymphocytes. RGS10 was found to be expressed in T cells, and we show that RGS10 opposes the chemokine-stimulated signaling that is needed for T cell adhesion mediated by $\alpha 4\beta 1$ and $\alpha L\beta 2$. Thus, upregulation of adhesion to $\alpha 4\beta 1$ and $\alpha L\beta 2$ ligands in response to CXCL12 and CCL21 was significantly stronger in RGS10-depleted cells than in control transfectants. On the contrary, when RGS10 was overexpressed, stimulation of adhesion by these chemokines was limited. RGS10 transiently associated to $G\alpha_i$ in T cells following exposure to CXCL12, and pertussis toxin blocked chemokine-upregulated adhesion to VCAM-1 of both control and RGS10-silenced cells, suggesting that RGS10 is inhibiting the adhesion mediated by $\alpha 4\beta 1$ by repressing $G\alpha_i$ -dependent signaling.

Flow chamber adhesion experiments revealed that RGS10 functions principally by promoting cell spreading and strengthening of adhesion mediated by $\alpha 4\beta 1$. Additionally, we showed that chemokine-stimulated Rac1 activation, a process taking place during the strengthening and spreading phases of the adhesion after the integrin activation step, was longer sustained and of higher intensity in RGS10-silenced cells, or inhibited in cells overexpressing RGS10. Importantly, expression of constitutively active Rac1 forms in cells overexpressing RGS10 led to the rescue of CXCL12-stimulated adhesion to VCAM-1 to levels similar to control transfectants. The regulation of Rac1 activation by RGS10 was most likely a consequence of RGS10-dependent control of Vav1 tyrosine phosphorylation, as it was increased or decreased in cells silenced or overexpressing RGS10, respectively. Moreover, flow chamber adhesion experiments, binding of soluble VCAM-1-Fc, and ICAM-1-Fc, and biochemical analysis revealed a minor involvement of RGS10 in the initial integrin activation phases. Therefore, these results strongly suggest that RGS10 actions mostly oppose the Vav1-Rac1-dependent adhesion strengthening and spreading steps of $\alpha 4\beta 1$ -mediated T cell adhesion triggered by chemokines. In addition to repress chemokine-upregulated T cell adhesion dependent on $\alpha 4\beta 1$ and $\alpha L\beta 2$, RGS10

also inhibited adhesion-independent cell chemotaxis and cdc42 activation in response to CXCL12.

Together, these results indicate that chemokine binding to their receptors triggers $G\alpha_i$ -dependent signaling that leads to changes in molecular associations between Vav1, talin and $\beta 1$ resulting in early $\alpha 4\beta 1$ activation, but also promotes $G\alpha_i$ association with RGS10. While the initial steps of adhesion are not targeted following RGS10- $G\alpha_i$ association, the consequence of the assembly of this complex may well be the gradual termination of Vav1-Rac1 activation that triggers chemokine-upregulated strengthening of the adhesion mediated by $\alpha 4\beta 1$.

In conclusion, in this thesis we have studied the functions of signalling and adapter proteins in chemokine-triggered inside-out signalling leading to integrin activation. Three of these proteins, ZAP-70, SLP-76 and ADAP, positively regulated the adhesion mediated by $\alpha 4\beta 1$ in T cells in response to chemokines, whereas RGS10 and Pyk2 are involved in mechanisms opposing or limiting the stimulation of this adhesion.

Introducción

1.-Modelo de migración leucocitario

Los leucocitos son células capaces de migrar desde la médula ósea o el timo a través de tejidos linfoides especializados y tejidos extralinfoides periféricos (Butcher et al., 1999). La migración leucocitaria es esencial para el desarrollo de una respuesta inmune apropiada (Butcher and Picker, 1996; Springer, 1994). Este proceso consta de una secuencia de etapas mediadas por diversas moléculas de adhesión y quimioquinas (**Figura 1**). Las selectinas posibilitan la captura inicial o *tethering* de leucocitos circulantes por ligandos de estas moléculas de adhesión expresados en el endotelio vascular (McEver, 2002). A continuación, los leucocitos experimentan *rolling* mediado principalmente por las selectinas (Rosen, 2004), que es seguido por una adhesión firme y estable de estas células sobre el endotelio, lo cual es dependiente de la actividad de varias integrinas leucocitarias y de sus ligandos endoteliales, permitiendo a los leucocitos resistir el flujo sanguíneo. A excepción de los blastos de células T y B y subtipos de células inmunes innatas que expresan muchas integrinas adhesivas, los leucocitos circulantes mantienen sus integrinas en un estado inactivo. La capacidad adhesiva de las integrinas aumenta durante los contactos con señales estimulatorias localizadas sobre el endotelio (Alon and Feigelson, 2012; Alon et al., 2003). Dichas señales están representadas por las quimioquinas ancladas sobre el endotelio, las cuales se unen a receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), lo que se traduce en un rápido aumento de la activación de las integrinas en leucocitos que realizan *rolling* sobre el endotelio (Alon and Dustin, 2007; Alon and Feigelson, 2012). Las quimioquinas incrementan rápidamente la afinidad y avidéz de las integrinas (Alon and Feigelson, 2012; Grabovsky et al., 2000), provocando la parada del leucocito y estimulando la motilidad de éste sobre el endotelio. Esta adhesión firme puede ser reversible, de modo que si el leucocito no recibe señales adicionales que estimulen la migración transendotelial, la célula comenzará de nuevo a rodar y finalmente retornará al flujo sanguíneo (Butcher et al., 1999). Si el leucocito recibe las señales necesarias, éste se polariza, de modo que adquiere una morfología migratoria que le permite migrar a través del endotelio en respuesta a un gradiente de factores quimioatrayentes (Butcher and Picker, 1996; Kinashi, 2005; Laudanna and Alon, 2006; Springer, 1994; von Andrian and Mackay, 2000). Cuando los leucocitos alcanzan uniones intercelulares, empiezan a realizar diapédesis entre las células endoteliales (Johnson-Leger et al., 2000; Ley et al., 2007). Además de las vías de transmigración

paracelular, los linfocitos pueden migrar de una manera transcelular (Carman and Springer, 2004).

En las secciones siguientes de esta Introducción se describen las principales moléculas que intervienen en la migración leucocitaria transendotelial, especialmente en la migración de los leucocitos a lugares de inflamación.

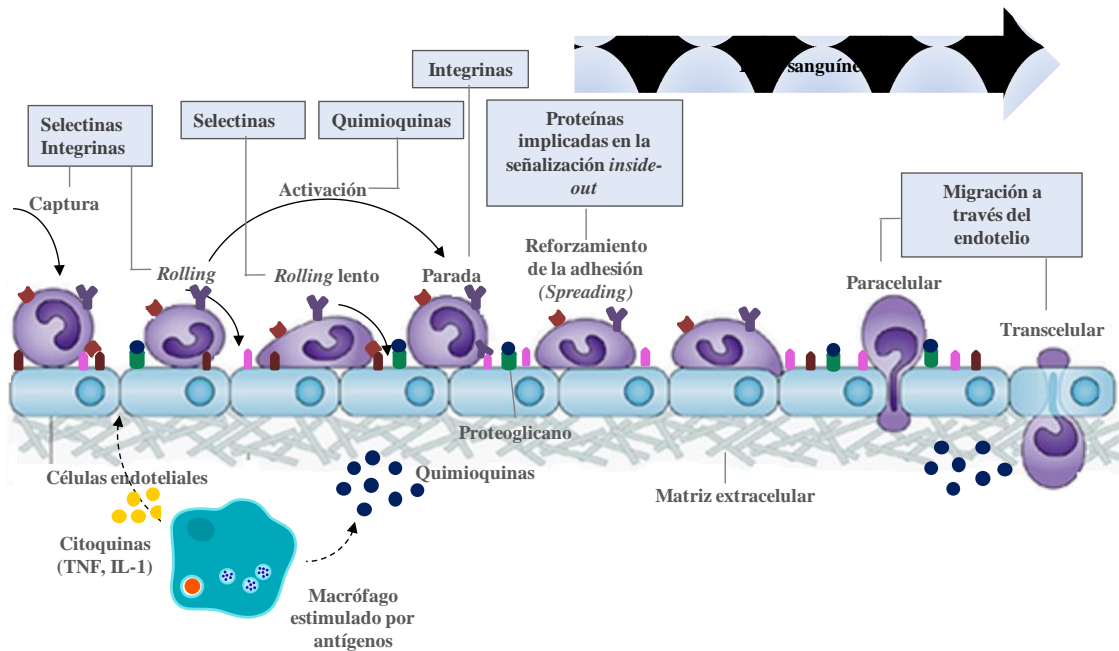


Figura 1. Modelo de migración leucocitaria. Se muestran los distintos tipos de interacciones entre moléculas presentes en la superficie del leucocito y sobre el endotelio vascular. Estas interacciones son secuenciales y están reguladas de forma independiente, permitiendo una especificidad muy elevada en la migración dirigida de células desde la sangre. Adaptado de Ley et al., 2007.

2.-Moléculas de adhesión: Las integrinas.

Las moléculas de adhesión son glicoproteínas de membrana que actúan como receptores de ligandos presentes en otras células o en la matriz extracelular. La interacción de estas moléculas con sus ligandos constituye el soporte que las células utilizan para su correcta disposición y función en organismos multicelulares, participando en procesos como diferenciación, migración celular y organogénesis. El papel de las moléculas de adhesión es especialmente importante en el sistema inmune. Así, la interacción de estas moléculas con sus ligandos tiene un papel crucial en la regulación de la hematopoyesis, la maduración de los timocitos, el control del tráfico linfocitario y en la migración de las células a través de los tejidos durante respuestas inflamatorias.

Hasta la fecha se han descrito distintas familias de moléculas de adhesión, como las selectinas, la superfamilia de las inmunoglobulinas y las integrinas. Como ya se ha mencionado, las selectinas tienen un papel importante en la migración leucocitaria ya que intervienen en la captura inicial y en el *rolling* de los leucocitos sobre el endotelio vascular. En concreto, las selectinas que participan en estos procesos son las L-, P- y E-selectinas. La L-selectina se expresa en la mayoría de los leucocitos circulantes y es el receptor clave que inicia los eventos de captura del leucocito en tejidos linfoides secundarios y sitios periféricos de daño e inflamación (Rosen, 2004). Por otro lado, la P- y E-selectinas se expresan de forma inducible en el endotelio, de forma tanto aguda como crónica, y constituyen mediadores críticos del *rolling* leucocitario (Ley et al., 1995; McEver, 2002). Aunque los primeros pasos de captura y *rolling* del leucocito sobre el endotelio vascular están mediados principalmente por selectinas, se ha descrito que las integrinas $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha 4\beta 7$ pueden participar asimismo en estos procesos (Grabovsky et al., 2000). Las integrinas más relevantes en la adhesión leucocitaria al endotelio son las integrinas LFA-1 ($\alpha L\beta 2$), VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$), $\alpha 4\beta 7$ y Mac-1 ($\alpha M\beta 2$) (Hynes, 2002; Ley et al., 2007; Luster et al., 2005; Shulman et al., 2009). Dichas integrinas median la adhesión firme del leucocito al endotelio a través de su interacción con moléculas de la superfamilia de las inmunoglobulinas, como son ICAM-1, VCAM-1 y MAdCAM-1. La interacción de las integrinas con sus ligandos promueve las adhesiones célula-matriz extracelular y célula-célula, fundamentales para diversos procesos biológicos tales como la embriogénesis, angiogénesis y formación de órganos. En el sistema inmune regulan la proliferación celular, activación linfocitaria, migración y homeostasis. Adicionalmente, las integrinas contribuyen también a la progresión de diversas patologías autoinmunes, y juegan importantes papeles en diferentes neoplasias (Hynes, 2002; Kinashi, 2005).

2.1. Estructura de las integrinas:

Las integrinas son receptores heterodiméricos formados por la asociación no covalente de una subunidad α (120-180 kDa) y una β (90-110 kDa). En mamíferos se han descrito 18 subunidades α y 8 subunidades β , cuya combinación da lugar a 24 integrinas diferentes (**Figura 2**) (Hynes, 2002). Las integrinas presentan un largo dominio extracelular, seguido por una única región transmembrana y finalmente un corto dominio citoplásmico. La cristalización de los dominios extracelulares de la integrina $\alpha V\beta 3$ proporcionó información importante sobre la disposición de las subunidades α y β para

conformar el sitio de unión de los ligandos (Hynes, 2002; Xiong et al., 2001). Su estructura presenta en el extremo amino-terminal un dominio globular, que es el principal punto de contacto entre las dos subunidades. En la subunidad α , este dominio es conocido como β -propeller, y en la subunidad β como dominio β A. Estos dos dominios se mantienen asociados por interacciones no covalentes para formar una “cabeza” que constituye el sitio de unión del ligando. En 8 subunidades α ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 10$, $\alpha 11$, αL , αM , αX y αD) existe un dominio αA o dominio I, homólogo al dominio βA de la subunidad β , que se encuentra insertado en el dominio β -propeller y es el principal sitio de unión del ligando en estas integrinas. El dominio I posee un motivo denominado MIDAS, el cual une cationes divalentes que son requeridos para la unión de ligandos por la integrina. En el resto de integrinas que carecen del dominio αA , el ligando se une preferentemente al dominio βA (Shattil et al., 2010). El dominio extracelular de las integrinas está formado por dos barras semejantes a las “piernas” localizadas a continuación de la “cabeza”. En la subunidad α dicho dominio está formado por tres subdominios β -sandwich (llamados *thigh*, *calf-1* y *calf-2*). La subunidad β está compuesta por un dominio “hybrid” que se une al dominio βI , un dominio PSI (*plexin-semaphorin-integrin*), cuatro dominios EGF, y el dominio “ β -tail” (Figura 3) (Byron et al., 2009; Dong et al., 2012; Moser et al., 2009). El dominio citoplásmico de las integrinas juega un papel fundamental en la formación de heterodímeros α/β , constituyendo un nexo para la comunicación entre el interior y el exterior celular (Kinashi, 2007). En los dominios citoplásmicos de las subunidades β de las integrinas hay tres motivos bien caracterizados: el motivo de unión a fosfotirosinas (PTB), un motivo NPXY más próximo a la membrana y un motivo NXXP más distal (Calderwood et al., 2003). Estos motivos son sitios de unión para múltiples proteínas que se unen a las integrinas regulando su actividad.

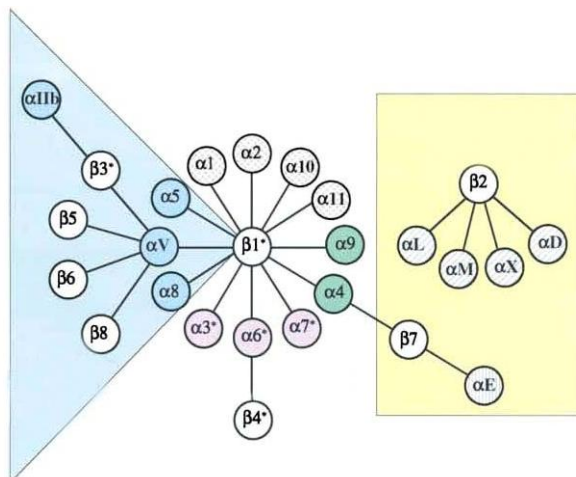


Figura 2. Esquema representativo de la familia de las integrinas, en el que se muestra las posibles combinaciones entre las subunidades α y β (Hynes, 2002).

2.2. Regulación de la actividad de las integrinas:

La actividad adhesiva de las integrinas puede ser inducida por cambios en su afinidad y/o en su avidéz por sus ligandos (Calderwood et al., 2013; Carman and Springer, 2004; Luo et al., 2007; Moser et al., 2009; Stewart and Hogg, 1996). Las variaciones en la afinidad son debidas a cambios en la conformación del dominio extracelular de las integrinas inducidos a partir de contactos de sus dominios citoplásmicos con diferentes moléculas intracelulares y que conducen finalmente a un incremento en la interacción integrina-ligando. Las integrinas pueden expresarse en la membrana celular en tres estados. En el estado de baja afinidad por el ligando, el dominio extracelular de unión al ligando presenta una conformación doblada y próximo a la membrana, mientras que los dominios citoplásmicos se encuentran interaccionando entre sí a través de un puente salino entre una arginina de la subunidad α y un aspártico de la subunidad β (Hughes et al., 1996; Shattil et al., 2010). En la integrina con afinidad intermedia, el ectodominio de la integrina se encuentra extendido, y en el estado de alta afinidad tiene lugar la separación de las colas citoplásmicas de las subunidades α y β de las integrinas (Kim et al., 2003; Luo et al., 2007; Shattil et al., 2010) (**Figura 3**). Diversas proteínas citoplásmicas, como talina y kindlin, son capaces de romper las interacciones entre las dos colas citoplásmicas, lo que provoca el cambio conformacional de la integrina a un estado de alta afinidad por el ligando (Moser et al., 2009; Shattil et al., 2010; Tadokoro et al., 2003). En secciones posteriores se detallará la activación de las integrinas por talina, mientras que el papel de las proteínas Kindlin en la activación de las integrinas ha sido descrito en recientes revisiones (Calderwood et al., 2013; Kim et al., 2011; Moser et al., 2009; Shattil et al., 2010).

Por otro lado, los cambios en la avidéz son principalmente debidos a la agrupación o *clustering* de integrinas. Dicha agrupación se produce gracias a la fluidez de la membrana plasmática (Kucik, 2002; Shattil et al., 2010), permitiendo la formación de interacciones adhesivas multivalentes entre las integrinas y sus ligandos (Kim et al., 2004; Li et al., 2003), dando como consecuencia una mayor fuerza adhesiva conjunta. Estas interacciones multivalentes entre las integrinas y sus ligandos dan como consecuencia un reforzamiento de la adhesión o *adhesion strengthening*. Este término podría definirse como el conjunto de eventos posteriores a la interacción inicial integrina/ligando, que conducen a un aumento de la fuerza de adhesión debido a la acumulación de receptores en la zona de contacto con el ligando. Para que se lleve a cabo la difusión de las

integrinas en la membrana plasmática son necesarias señales que liberen a las integrinas del citoesqueleto (Carman and Springer, 2003).

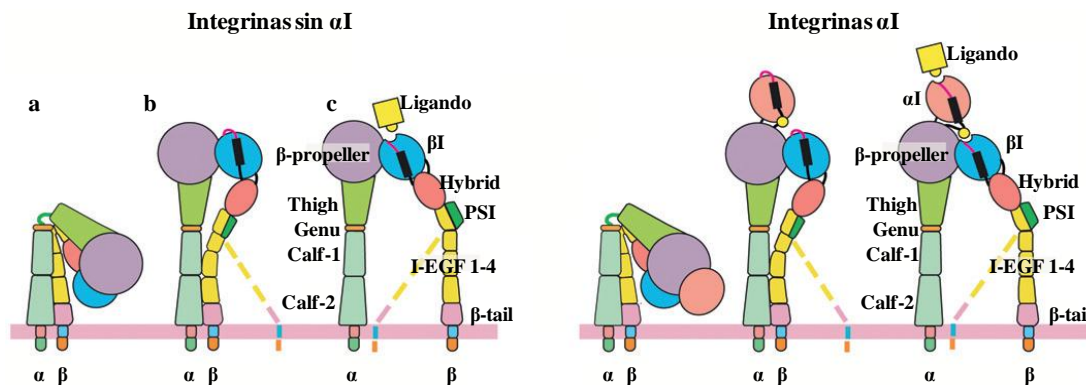


Figura 3. Cambios conformacionales asociados con la regulación de la afinidad de las integrinas. Modelo de regulación del estado de afinidad de las integrinas en el que se observa la transición desde un estado de baja afinidad o conformación “doblada” (a), a un estado de afinidad intermedia o conformación extendida con el dominio de unión al ligando cerrado (b), a un estado de alta afinidad o conformación “extendida” con las subunidades citoplásmicas separadas entre sí (c) (Springer and Dustin, 2012).

La activación de las integrinas puede proceder de estímulos recibidos desde receptores de superficie celular, como el receptor de células T (TCR) o el receptor de células B (BCR), así como de receptores de quimioquinas, dando lugar a señales intracelulares que activan las integrinas en un proceso conocido como señalización *inside-out*. Por otro lado, la unión del dominio extracelular de las integrinas a sus ligandos u otros agonistas, tales como anticuerpos estimuladores, PMA (*phorbol 12-myristate 13-acetate*), e iones como Mn^{2+} , Mg^{2+} o Ca^{2+} (Du et al., 1991; Kim et al., 2003; Shattil et al., 2010) pueden generar cambios conformacionales de las integrinas que producen señales bioquímicas y mecánicas al interior celular, regulando así múltiples vías de señalización. Este proceso se conoce como señalización *outside-in* (Alon and Ley, 2008; Friedland et al., 2009). Las señalizaciones *inside-out* y *outside-in* tienen consecuencias biológicas diferentes. La señalización *inside-out* contribuye a la activación de las integrinas y al reforzamiento de la adhesión, así como a la migración celular, mientras que la señalización *outside-in* está implicada en el control de la polaridad celular, la estructura del citoesqueleto y la expresión de genes de supervivencia celular y proliferación (Shattil et al., 2010). En células T, las señales bidireccionales de las integrinas desde el exterior al interior celular y viceversa, contribuyen a la formación de la sinapsis inmunológica, a la estabilización del contacto entre la célula T y la célula presentadora de antígeno (APC), y a la proliferación celular y secreción de citoquinas.

3.-Principales integrinas linfocitarias

3.1. Las integrinas $\alpha 4$ y sus ligandos:

Las integrinas $\alpha 4$ ($\alpha 4\beta 1$ y $\alpha 4\beta 7$) son críticas en el correcto funcionamiento del sistema inmune, estando implicadas en la hematopoyesis, en el tráfico leucocitario esencial en la vigilancia inmunitaria, y en la activación y supervivencia de leucocitos (Rose et al., 2002; Shimizu et al., 1999). Para llevar a cabo estas funciones las integrinas $\alpha 4$ actúan tanto como receptores de adhesión como de señalización (Rose et al., 2007; Rose et al., 2002). $\alpha 4\beta 1$ tiene un papel clave en la adhesión de progenitores hematopoyéticos al estroma de la médula ósea (Teixido et al., 1992), y la activación de estas integrinas se requiere para el correcto desarrollo de progenitores de linfocitos B y T en la médula ósea (Arroyo et al., 2000; Arroyo et al., 1996). En ratones con deficiencia condicional para la subunidad $\alpha 4$, se observa una acumulación de progenitores hematopoyéticos en sangre y bazo tras la delección de este gen (Scott et al., 2003). En ratones deficientes en la subunidad $\beta 7$ no se observan alteraciones en el desarrollo de células B y T (Wagner et al., 1996), aunque estos ratones presentan alteraciones en el desarrollo del tejido linfoide asociado al intestino. Asimismo, estudios usando ratones con delección de las integrinas $\beta 7$ y $\beta 1$ restringida a las células hematopoyéticas excluyen un papel esencial de estas integrinas durante la hematopoyesis, ya que no se observaron problemas en la diferenciación de linfocitos o mielocitos (Bungartz et al., 2006).

La integrina $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4 o CD69d/CD29) se expresa mayoritariamente en linfocitos T y B, monocitos y macrófagos, basófilos, eosinófilos, neutrófilos, células NK, mastocitos, timocitos, células dendríticas y progenitores hematopoyéticos (Lobb and Hemler, 1994; Luster et al., 2005; Rose et al., 2002). Además, se ha descrito su expresión en células de melanoma (Bednarczyk and McIntyre, 1992; Klemke et al., 2007). Dicha integrina contribuye al progreso de la leucemia linfocítica crónica B (Hartmann et al., 2009; Pleyer et al., 2009; Redondo-Munoz et al., 2006; Ugarte-Berzal et al., 2012) y del mieloma múltiple (Damiano et al., 1999; Garcia-Bernal et al., 2013; Sanz-Rodriguez et al., 1999).

La integrina $\alpha 4\beta 7$ se expresa constitutivamente, y a bajos niveles en células T naïve y células B (Erle et al., 1994), encontrándose también en células NK, monocitos activados, macrófagos y eosinófilos. Su expresión es elevada en células plasmáticas que secretan IgA y en células T CD4⁺ de memoria del intestino (Schweighoffer et al., 1993).

Tanto los linfocitos naïve como los efectores usan la integrina $\alpha 4\beta 7$ para extravasarse desde la sangre a la mucosa del intestino, a través de la interacción con la molécula de adhesión MadCAM-1 (*mucosal addressin cell adhesion molecule-1*) (Salmi and Jalkanen, 2005; Wagner et al., 1996).

Los principales ligandos de la integrina $\alpha 4\beta 1$ son VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) y el segmento conector-1 (CS-1) de la región III-CS de la molécula de fibronectina.

- **VCAM-1** es una glicoproteína de membrana perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas que se expresa en células endoteliales activadas de cordón umbilical (Osborn et al., 1989), en vénulas de endotelio alto de ganglios linfáticos periféricos y mesentéricos, en microvasculatura medular, en células estromales de médula ósea, en células epiteliales tímicas de la corteza y zona córtico-medular del timo, en células estromales y macrófagos del bazo, y en células dendríticas (Castro et al., 1997; Jacobsen et al., 1996; Salomon et al., 1997; Salomon et al., 1994). La expresión de VCAM-1 es inducible por TNF- α , IL-1, IL-4 e IL-13 (Neish et al., 1992; Osborn et al., 1989; Osborn et al., 1992; Sironi et al., 1994; Swerlick et al., 1992). Estructuralmente, está formada por 7 repeticiones de dominios de inmunoglobulina (**Figura 4A**), aunque se han descrito variantes de *splicing* alternativo que presentan 3, 6 u 8 dominios (Osborn et al., 1989; Polte et al., 1990). Los dominios 1 y 4 son los responsables de la unión de VCAM-1 a $\alpha 4\beta 1$. La interacción $\alpha 4\beta 1$ /VCAM-1 favorece la adhesión firme de los leucocitos sobre el endotelio, un factor crítico en la iniciación y/o perpetuación de los fenómenos de inflamación y autoinmunidad.

La expresión y función de VCAM-1 ha sido asociada con varias enfermedades como la arteroesclerosis, asma, esclerosis múltiple, y la artritis reumatoide (Baron et al., 1993; Carter and Wicks, 2001; Chin et al., 1997; Iiyama et al., 1999; van Dinther-Janssen et al., 1994). Ratones deficientes en la expresión de VCAM-1 mueren a los 10-12 días de gestación como consecuencia de un desarrollo anormal de la placenta (Gurtner et al., 1995). Los ratones con deficiencia condicional de esta glicoproteína presentan un número reducido de células B maduras en médula, así como una capacidad muy limitada para reclutar linfocitos B y T a la médula ósea, denotando así un papel fundamental de VCAM-1 en el desarrollo de células B y en los procesos de migración linfocitaria a la médula ósea (Koni et al., 2001).

- **La fibronectina** es una glicoproteína presente en la matriz extracelular y soluble en el plasma sanguíneo, y que es secretada por numerosos tipos celulares. La fibronectina

se expresa en el tejido conectivo de todos los órganos en diferentes proporciones, y está formada por dos cadenas polipeptídicas A y B unidas por puentes disulfuro, las cuales se originan por mecanismos de procesamiento alternativo a partir de un único gen. La fibronectina se compone de dominios estructurales y funcionales alineados a lo largo de la molécula, que participan en la interacción con distintos componentes de la matriz o con receptores de adhesión celular (Hynes, 1986).

El dominio III-CS o región variable V, que origina en humanos hasta 5 fragmentos distintos nombrados CS-1/5, se localiza en la región carboxi-terminal de la cadena A y contiene el fragmento CS-1, en el cual se encuentra la secuencia EILDVPST reconocida con alta afinidad por $\alpha 4\beta 1$ (Figura 4B) (Garcia-Pardo et al., 1990; Guan and Hynes, 1990). En el dominio III-CS se localiza asimismo el motivo CS-5, por el que $\alpha 4\beta 1$ presenta baja afinidad y para cuyo reconocimiento se requiere la activación de la integrina. En el centro de la cadena de la fibronectina existe un sitio de reconocimiento para $\alpha 5\beta 1$ con la secuencia RGD, que también es reconocida por la integrina $\alpha 4\beta 1$ activada (Sanchez-Aparicio et al., 1994).

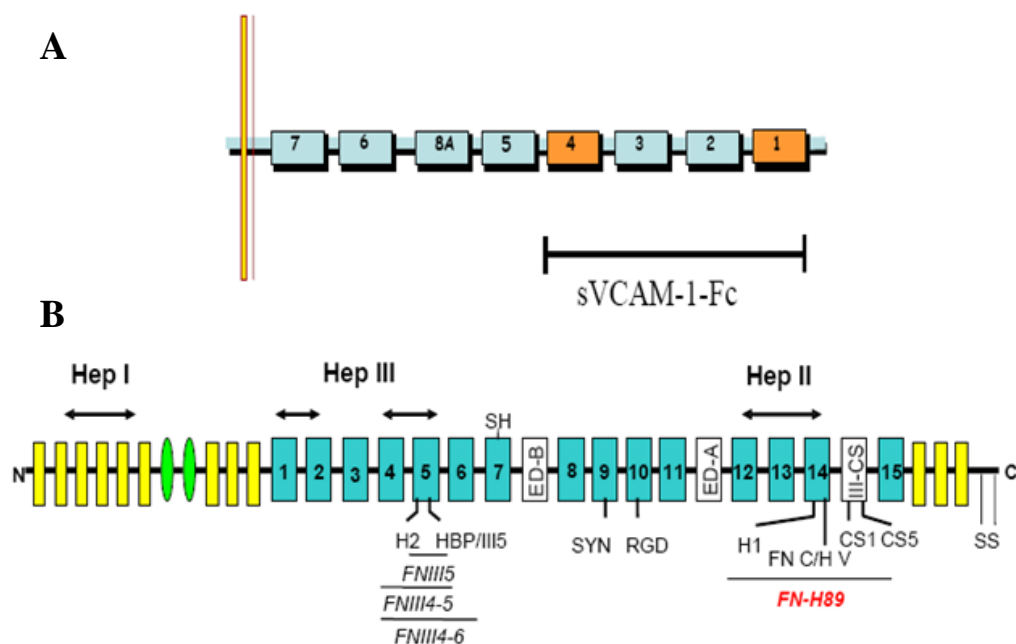


Figura 4. Estructura de VCAM-1 y fibronectina. (A) Aparece representada la forma transmembrana de VCAM-1, con 8 dominios de tipo inmunoglobulina, de los cuales los dominios 1 y 4, reconocidos por $\alpha 4\beta 1$, están resaltados en color naranja. En este trabajo se ha utilizado una forma recombinante soluble de VCAM-1 humano (VCAM-1-Fc) que contiene los dominios del 1 al 4, fusionados con la región Fc de la IgG1 humana. (B) Se representa una de las cadenas de la molécula de fibronectina, con sus distintos dominios estructurales. En el extremo carboxi-terminal de la cadena aparece el dominio III-CS en el que se encuentra el motivo CS-1 de alta afinidad para la unión de $\alpha 4\beta 1$. El fragmento recombinante FN-H89 (resaltado en color rojo), el cual ha sido utilizado en este trabajo, contiene el motivo CS-1 del dominio III-CS.

3.2. La integrina $\alpha\text{L}\beta\text{2}$ y sus ligandos:

La integrina $\alpha\text{L}\beta\text{2}$ (LFA-1 o CD11a/CD18), pertenece a la subfamilia de las integrinas β2 , que incluye también a Mac1 ($\alpha\text{M}\beta\text{2}$), p150, 95 ($\alpha\text{X}\beta\text{2}$) y $\alpha\text{D}\beta\text{2}$, y que se expresan exclusivamente en leucocitos (Evans et al., 2009; Luo et al., 2007; Stewart et al., 1995). $\alpha\text{L}\beta\text{2}$ se expresa en células T, células B, monocitos, macrófagos, células NK, células dendríticas, neutrófilos y eosinófilos. Dicha integrina juega un papel crítico en la migración leucocitaria a través de los vasos sanguíneos a tejidos y nódulos linfoides, y en la formación de la sinapsis inmunológica entre la célula T y la APC (Evans et al., 2009; Ley et al., 2007; Sims and Dustin, 2002; von Andrian and Mackay, 2000). Los linfocitos de sangre periférica expresan generalmente la forma de baja afinidad de $\alpha\text{L}\beta\text{2}$, siendo esto crucial para el mantenimiento de la homeostasis, ya que $\alpha\text{L}\beta\text{2}$ constitutivamente activa podría causar la agregación instantánea de células circulantes y la obstrucción de los vasos sanguíneos (Evans et al., 2009; Lub et al., 1995). Los principales ligandos de $\alpha\text{L}\beta\text{2}$ son las moléculas de adhesión intercelular ICAM (ICAM 1-5) (Mor et al., 2007; Smith et al., 2007).

Ratones deficientes en $\alpha\text{L}\beta\text{2}$ muestran que esta integrina es esencial en la migración de linfocitos T a nódulos linfáticos periféricos (Berlin-Rufenach et al., 1999). Notablemente, $\alpha\text{4}\beta\text{1}$ compensa parcialmente la falta de $\alpha\text{L}\beta\text{2}$ en la migración de estos linfocitos a los nódulos periféricos. Asimismo, la ausencia de $\alpha\text{L}\beta\text{2}$ afecta el *rolling* de neutrófilos en vasos mesentéricos (Henderson et al., 2001). Al igual que en linfocitos T, se observó que en estos ratones deficientes en $\alpha\text{L}\beta\text{2}$, la integrina $\alpha\text{4}\beta\text{1}$ era la responsable de llevar a cabo la extravasación de los neutrófilos, lo que indica que estas células poseen dos vías dependientes de integrinas para realizar la extravasación desde la circulación sanguínea. Además, la pérdida de la expresión de las integrinas β2 (CD18) se asocia a la deficiencia de adhesión leucocitaria (LAD I), una enfermedad caracterizada por infecciones bacterianas recurrentes debidas a la imposibilidad por parte de los leucocitos de migrar a los tejidos (Hogg and Bates, 2000). La adhesión mediada por $\alpha\text{L}\beta\text{2}$ durante la extravasación de linfocitos T reduce la adhesión dependiente de $\alpha\text{4}\beta\text{1}$ a VCAM-1 (Porter and Hogg, 1997), lo que sugiere una coordinación funcional de estas integrinas durante su transmigración a tejidos inflamados.

- **ICAM.** Las glicoproteínas de superficie ICAM-1 y -2 se expresan en el endotelio y están formadas por 5 y 2 dominios inmunoglobulina, respectivamente, siendo los dominios 1 y 2 de ICAM-1 los encargados de la unión a $\alpha\text{L}\beta\text{2}$. ICAM-1 presenta una

expresión ubicua, expresándose tanto en células de origen hematopoyético como no hematopoyético, incluyendo leucocitos, monocitos, fibroblastos, células epiteliales y células endoteliales. Su expresión es muy baja en tejidos normales y es inducida por IL-1 e IFN- γ , aumentando su expresión en tejidos inflamados y en ganglios linfáticos que drenan sitios de inflamación (Dustin et al., 1986), de modo que tiene un papel esencial en la migración y extravasación de los leucocitos a sitios de inflamación (Alon and Dustin, 2007; Butcher and Picker, 1996; Springer, 1994).

Las integrinas $\alpha 4$ y $\alpha L\beta 2$ son atractivas dianas para el uso de inhibidores para el tratamiento de enfermedades inflamatorias o autoinmunes (Staunton et al., 2006). Las integrinas $\alpha 4$ están involucradas en patologías inflamatorias crónicas como el asma, la esclerosis múltiple, la hipersensibilidad por contacto, y la artritis reumatoide (Lobb and Hemler, 1994; Rose et al., 2002; Yednock et al., 1992). Algunos ejemplos de inhibidores de $\alpha 4$ son el Natalizumab, un anticuerpo monoclonal humanizado dirigido contra $\alpha 4$, que bloquea la transmigración de linfocitos T CD4⁺ al parénquima del cerebro, siendo muy eficaz en el tratamiento de la esclerosis múltiple (Miller et al., 2003; Polman et al., 2006). El Vedolizumab es un anticuerpo monoclonal dirigido contra $\alpha 4\beta 7$, el cual bloquea el tráfico linfocitario en el intestino pero no en el cerebro, y es usado en el tratamiento de la enfermedad de Crohn (Sandborn et al., 2013). Otro ejemplo sería el Efalizumab, que se usa en el tratamiento de la psoriasis al bloquear la unión de ICAM-1 a $\alpha L\beta 2$ (Lebwohl et al., 2003).

4.-Las quimioquinas y sus receptores

Las quimioquinas son una familia de citoquinas de bajo peso molecular (6 a 14 kDa) que inicialmente fueron descritas por su función quimioatrayente para diferentes poblaciones leucocitarias (Gerard and Rollins, 2001; Proudfoot, 2002; Rossi and Zlotnik, 2000). Se ha descrito su implicación en angiogénesis (Belperio et al., 2000; Campbell et al., 1998), hematopoyesis (Moser et al., 2004), modulación de la adhesión celular (Campbell et al., 1998; Grabovsky et al., 2000; Hidalgo et al., 2001; Peled et al., 1999; von Andrian and Mackay, 2000), regulación de la diferenciación de linfocitos T y modulación de la respuesta Th1/Th2 (Sallusto et al., 1998), estimulación de señales intracelulares implicadas en activación celular (Mellado et al., 2001; Sallusto et al., 1998), e invasión y metástasis de células tumorales (Gerard and Rollins, 2001; Robledo et al., 2001; Rossi and Zlotnik, 2000).

Las quimioquinas poseen entre sí una alta homología estructural, presentando cuatro residuos de cisteína altamente conservados en su extremo amino-terminal, los cuales forman un puente disulfuro entre la primera y tercera cisteína, y otro puente entre la segunda y cuarta cisteína (Rossi and Zlotnik, 2000). La posición relativa de las dos cisteínas más próximas al extremo amino-terminal se ha tomado como criterio para clasificar las quimioquinas en cuatro familias (**Tabla 1**): CC, las cuales presentan ambas cisteínas contiguas; CXC, tienen un aminoácido entre las cisteínas; C, en las que se encuentra un único residuo de cisteína; y CX3C, con tres aminoácidos entre las cisteínas (Rossi and Zlotnik, 2000; Zlotnik and Yoshie, 2000; Zlotnik and Yoshie, 2012). Las quimioquinas CXC se han subdividido a su vez en ELR⁺ (CXCL1 a 8) y ELR⁻ (CXCL9 a 16), según la presencia del motivo Glu-Leu-Arg en el extremo N-terminal. Adicionalmente, las quimioquinas y sus receptores se pueden clasificar a su vez en homeostáticas (o constitutivas) e inflamatorias (o inducibles). Las homeostáticas, entre las que se encuentra CXCL12, principal quimioquina utilizada en este trabajo, se expresan constitutivamente en un elevado número de tejidos, controlando de este modo procesos de homeostasis y el desarrollo y maduración de células del sistema inmune. Por otro lado, las quimioquinas inducibles se expresan principalmente en condiciones inflamatorias, posibilitando el reclutamiento y activación de determinadas poblaciones leucocitarias (Proudfoot, 2002). Esta última clasificación no es estricta, ya que la expresión de ciertas quimioquinas constitutivas puede ser regulada por diversos estímulos, participando algunas de ellas durante procesos inflamatorios. Además, las quimioquinas y sus receptores se caracterizan por su promiscuidad en cuanto a que una determinada quimioquina puede unirse a distintos receptores de una determinada familia, y asimismo, distintos ligandos pueden unirse a un mismo receptor, aunque siempre manteniendo la especificidad de familia (Zlotnik and Yoshie, 2000).

Las quimioquinas se componen de tres dominios bien definidos: el dominio N-terminal está involucrado en señalización, y junto con el dominio central, participa en la interacción con los receptores de quimioquinas. El dominio C-terminal está implicado en el reconocimiento de glicosaminoglicanos, lo que es esencial para la función de las quimioquinas (Proudfoot et al., 2003).

Nombre sistemático	Nombre común	Receptor	Nombre sistemático	Nombre común	Receptor
Familia CC			Familia CXC		
CCL1	I-309	CCR8	CXCL1	GRO- α	CXCR2, CXCR1
CCL2	MCP-1	CCR2	CXCL2	GRO- β	CXCR2
CCL3	MIP-1 α	CCR1, CCR5	CXCL3	GRO- γ	CXCR2
CCL4	MIP-1 β	CCR5	CXCL4	PF4	CXCR3 β
CCL5	RANTES	CCR1, CCR3, CCR5	CXCL4L	PF4V1	CXCR3
CCL7	MCP-3	CCR1, CCR2, CCR3	CXCL5	ENA-78	CXCR2
CCL8	MCP-2	CCR3	CXCL6	GCP-2	CXCR1, CXCR2
CCL11	Eoxatin	CCR3	CXCL7	NAP-2	CXCR2
CCL13	MCP-4	CCR2	CXCL8	IL-8	CXCR1, CXCR2
CCL14	HCC-1	CCR2, CCR3	CXCL9	MIG	CXCR3
CCL15	HCC-2	CCR1, CCR2, CCR3	CXCL10	IP-10	CXCR3
CCL16	LEC	CCR1	CXCL11	ITAC	CXCR3, CXCR7
CCL17	TARC	CCR4	CXCL12	SDF-1 α , SDF-1 β , SDF-1 γ	CXCR4, CXCR7
CCL18	PARC	Desconocido	CXCL13	BLC	CXCR5
CCL19	ELC	CCR7	CXCL14	BRAK	Desconocido
CCL20	MIP-3 α	CCR6	CXCL16	SR-PSOX	CXCR6
CCL21	SLC	CCR7	CXCL17	DMC	Desconocido
CCL22	MSD	CCR4	Familia C		
CCL23	MPIF-1	CCR1	XCL1	Lymphotactin	XCR1
CCL24	Eoxatin-2	CCR3	XCL2	SCM-1 β	XCR1
CCL25	TECK	CCR9	Familia CX3C		
CCL26	Eoxatin-3	CCR3	CX3CL1	Fractalkine	CX3CR1
CCL27	ILC	CCR10			
CCL28	MEC	CCR3, CCR10			

Tabla 1. Clasificación de las quimioquinas en diferentes familias, en función de la posición relativa de las dos cisteínas del extremo amino-terminal. Asimismo se han clasificado en criterio a su función, diferenciándose en **homeostáticas**, **inflamatorias**, con **función dual** o de expresión en **plasma o plaquetas** (Nomiyama et al., 2013) En este trabajo se ha estudiado principalmente el papel de la quimioquina CXCL12 y su receptor CXCR4 (recuadrados en rojo) en la adhesión de células T dependiente de las integrinas $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha L\beta 2$.

Los receptores de quimioquinas pertenecen a la superfamilia de receptores de siete dominios transmembrana (7TM) acoplados a proteínas G heterotriméricas ($G\alpha\beta\gamma$) (GPCR: *G-protein coupled receptor*) (Pierce et al., 2002; Proudfoot, 2002). Estos receptores constan de una única cadena proteica de alrededor de 350 amino ácidos que cruza 7 veces la membrana celular, de modo que en la unión al ligando intervienen el

dominio N-terminal y los 3 bucles extracelulares, mientras que el extremo C-terminal y los bucles intracelulares intervienen en el acoplamiento de moléculas transductoras de señalización (Allen et al., 2007; Murdoch, 2000). La cristalización de CXCR4 ha permitido describir, por primera vez, la estructura cuaternaria de un receptor de quimioquinas con una alta resolución molecular (Wu et al., 2010). En ella se destaca que en el segundo bucle intracelular existe un motivo (DRY) implicado en la activación de la señalización intracelular, y que actúa como gatillo exponiéndose la tirosina tras la unión del ligando, posibilitando la activación de la proteína G α_i (Oldham and Hamm, 2008).

Los receptores de quimioquinas presentan cuatro cisteínas altamente conservadas: las dos primeras están involucradas en la formación de un puente disulfuro entre los bucles extracelulares 1 y 2, y las otras dos originan un puente disulfuro entre el extremo N-terminal y el tercer bucle extracelular. Estos dos puentes disulfuro permiten el correcto plegamiento de la proteína, lo que determina tanto la correcta unión del ligando como el acoplamiento de las proteínas señalizadoras. Actualmente se conocen 23 receptores de quimioquinas humanos, agrupados en 4 familias: CCR, CXCR, CX3CR y XCR (Allen et al., 2007; Zlotnik and Yoshie, 2012). Asimismo, existe un grupo de receptores atípicos (D6, DARC, CCRL1 y CXCR7) que no señalizan vía G α_i y que participan en el control de los niveles de quimioquinas en los tejidos, conociéndose también como receptores *scavenger o decoy* (Graham et al., 2012). Una vez que el ligando se une al receptor se inicia la transducción de señales, lo cual supone un cambio conformacional de las regiones intracelulares del receptor, facilitando así la interacción con las proteínas G heterotriméricas. De este modo, la subunidad G α intercambia GDP por GTP, lo que produce su activación y disociación de las subunidades G $\beta\gamma$, permitiendo la interacción de G α y G $\beta\gamma$ con sus respectivas moléculas efectoras. La señalización finaliza cuando la actividad GTPasa intrínseca de la subunidad G α hidroliza el GTP a GDP, lo que causa su inactivación y la asociación de nuevo al dímero G $\beta\gamma$ (Marinissen and Gutkind, 2001; Offermanns, 2003; Oldham and Hamm, 2008; Pierce et al., 2002).

Las diferentes rutas de señalización originadas tras la activación de los GPCRs dependen de la subunidad G α acoplada al receptor, las cuales se clasifican en cuatro familias: G α_s , G α_i , G α_q , and G α_{12} . Algunas de estas rutas activadas son las vías Jak/Stat, MAP quinasas, la activación de la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI $_3$ K) y de la fosfolipasa C β (PLC β), así como de diversos miembros de la familia de las Rho-GTPasas (Laudanna et al., 1996; Mellado et al., 2001; Rossi and Zlotnik, 2000; Vicente-Manzanares et al.,

1999). Asimismo, los receptores de quimioquinas están regulados por procesos de internalización y degradación lisosomal. Así, los dominios intracelulares de los GPCRs son fosforilados por GRK (*G-protein associated kinase*) permitiendo la unión de las β -arrestinas a los receptores fosforilados, lo cual conduce finalmente a la internalización y degradación de los GPCRs en lisosomas (Ferguson, 2001; Luttrell and Gesty-Palmer, 2010) (**Figura 5**).

La unión de las quimioquinas a sus receptores desencadena asimismo la activación de las integrinas, mediante un mecanismo de señalización “*inside-out*”, produciéndose un aumento de la afinidad y de la avidéz de las integrinas (Butcher et al., 1999; Constantin et al., 2000; Grabovsky et al., 2000; Hidalgo et al., 2001; Luster et al., 2005; Springer, 1995).

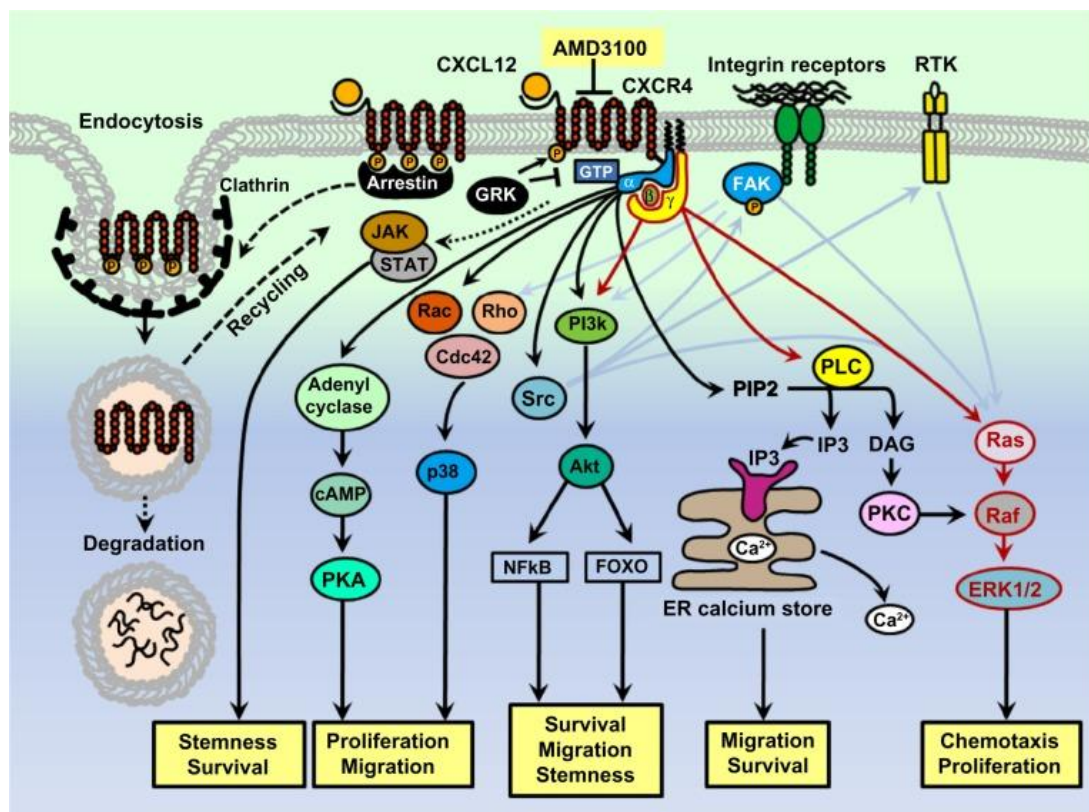


Figura 5. Vías de señalización intracelular estimuladas por receptores de quimioquinas.

4.1.-La quimioquina CXCL12 y su receptor CXCR4:

CXCL12, también denominada SDF-1 (*stromal cell-derived factor-1*), es una quimioquina CXC ELR- que consta de 67-71 aminoácidos y cuya expresión es constitutiva y de amplia distribución. El gen que codifica para CXCL12 tiene cuatro

exones, y su ARN mensajero puede dar origen a varias isoformas por *splicing* alternativo (Shirozu et al., 1995). Inicialmente se describieron CXCL12 α y CXCL12 β , presentando esta última forma cuatro residuos adicionales en el extremo C-terminal. La isoforma CXCL12 α se expresa preferentemente en ganglios linfáticos, pulmón, hígado y médula ósea, aunque también se ha descrito su expresión en el intestino delgado, riñones o piel (Bleul et al., 1996b; Bleul et al., 1998; D'Apuzzo et al., 1997; Pablos et al., 1999). Posteriormente se han descrito las isoformas CXCL12 γ , CXCL12 δ , CXCL12 ϵ y CXCL12 ϕ (Altenburg et al., 2007). Estas isoformas comparten los tres primeros exones con las isoformas α y β , pero difieren en el cuarto exón.

En este trabajo hemos utilizado la isoforma CXCL12 α , a la que a partir de ahora se referirá como CXCL12. Estructuralmente es un polipéptido con una región N-terminal que contiene el motivo CXC, seguido de un *loop* o lazo, tres láminas β antiparalelas y finalmente una α -hélice en el extremo C-terminal (Crump et al., 1997). Los ocho primeros residuos N-terminales, junto con los residuos 12 a 17 del lazo, componen el dominio de unión al receptor, siendo los residuos 1 y 2 de la región N-terminal los involucrados directamente en la activación del receptor (Dealwis et al., 1998). Funcionalmente, CXCL12 es un potente quimioatrayente para diversos tipos celulares, entre los que destacan linfocitos B y T, monocitos y precursores hematopoyéticos, lo cual sugiere su implicación en la homeostasis del sistema inmune. Aunque la expresión de CXCL12 sea principalmente constitutiva, se ha demostrado que ésta puede ser regulada. Trabajos previos muestran que TGF- β 1 reduce la expresión de CXCL12 de células estromales de la médula ósea, lo que se traduce en alteraciones en la adhesión y migración de progenitores hematopoyéticos y células de mieloma múltiple (Wright et al., 2003). Asimismo, TNF- α e IL-1 β disminuyen la expresión de CXCL12 en la médula ósea, lo cual contribuye a la movilización de linfocitos B y al aumento en la población de granulocitos (Ueda et al., 2004). Por el contrario, se ha observado que el G-CSF, así como agentes causantes de daño en el ADN como la irradiación con luz UV, aumentan transitoriamente la expresión de CXCL12 en osteoblastos de médula ósea y en bazo (Petit et al., 2002; Ponomaryov et al., 2000).

CXCL12 se une preferentemente a CXCR4 (CD184), una proteína de amplia expresión, que también sirve como co-receptor para el virus del VIH-1 (Bleul et al., 1996a; Nagasawa et al., 1996b; Oberlin et al., 1996). La interacción de CXCL12 con CXCR4 tiene una gran importancia durante la hematopoyesis. Ratones deficientes para la

expresión de CXCL12 o CXCR4 muestran fenotipos similares, con alteraciones en el septo ventricular, en el desarrollo de la vasculatura y en la arquitectura del cerebelo, así como graves deficiencias en linfopoyesis y mielopoyesis debido a la dificultad de los progenitores hematopoyéticos para colonizar la médula (Ara et al., 2003; Kawabata et al., 1999; Nagasawa et al., 1996a; Tachibana et al., 1998; Zou et al., 1998).

La señalización por CXCR4 es mayoritariamente dependiente de $G\alpha_i$. La unión de CXCL12 a CXCR4 permite la activación de quinasas JAK (Vila-Coro et al., 1999), y la transfosforilación en tirosinas de éstas y del propio receptor, lo que conlleva el reclutamiento de STAT y la exposición de motivos que permiten la unión de proteínas G heterotriméricas (Mellado et al., 2001). La unión CXCL12-CXCR4 activa numerosas cascadas de señalización, entre las que se encuentra la fosforilación de Erk1/2, así como de diversos componentes de las adhesiones focales, como p130Cas, FAK (*Focal Adhesion Kinase*) y paxilina (Davis et al., 1997; Ganju et al., 1998). Del mismo modo, CXCL12 estimula la activación de la PI3-K (Vicente-Manzanares et al., 1999), ZAP-70 y Vav1 (García-Bernal et al., 2005b; Ticchioni et al., 2002; Vicente-Manzanares et al., 2005), e induce reorganización del citoesqueleto de actina a través de la activación de las GTPasas Rho (Bartolome et al., 2004; Vicente-Manzanares et al., 2002). Un proceso altamente regulado por CXCL12 es la actividad adhesiva de las integrinas $\alpha L\beta 2$, $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha 4\beta 7$ (Butcher and Picker, 1996; Grabovsky et al., 2000; Hidalgo et al., 2001; Sanz-Rodríguez et al., 2001; Springer, 1994; von Andrian and Mackay, 2000; Wright et al., 2002), lo cual tiene importantes consecuencias en la migración transendotelial de linfocitos T.

Por otro lado se ha demostrado la importancia del eje CXCL12-CXCR4 en la invasión y proliferación de células tumorales (Bartolome et al., 2004; Muller et al., 2001; Robledo et al., 2001), de modo que dicha interacción representa una importante diana en terapias antitumorales (Balkwill, 2004; Epstein, 2004). Uno de estos agentes es el AMD3100, un antagonista de la interacción CXCL12/CXCR4, el cual inhibe la invasión y metástasis tumorales (Kim et al., 2010; Rubin et al., 2003; Scotton et al., 2002; Smith et al., 2004).

Existe un receptor alternativo para CXCL12, denominado RDC1 o CXCR7 (Balabanian et al., 2005; Infantino et al., 2006; Shimizu et al., 2000), el cual señala a través de la vía de la β -arrestina pero independientemente del acoplamiento a proteínas G heterotriméricas (Graham et al., 2012). Esto se traduce en que la interacción CXCL12-CXCR7 no estimula movilización de calcio, quimiotaxis, o la activación de Erk1/2

(Naumann et al., 2010). Ratones deficientes en CXCR7 presentan alteraciones en el desarrollo cardíaco, pero su hematopoyesis no está afectada (Sierro et al., 2007). Estudios con modelos de Zebra fish y en análisis de la arquitectura de la zona marginal (MZ) del bazo han indicado que CXCR7 secuestraría CXCL12, lo que se traduciría en alteraciones en migración celular hacia dicha quimioquina (Boldajipour et al., 2008; Wang et al., 2008). CXCR7 es reciclado activamente desde la membrana al interior celular, un proceso que regula los niveles de CXCL12 extracelular, la expresión de CXCR4 y la vía de señalización CXCL12/CXCR4/proteína G (Luker et al., 2012). Análisis del papel de CXCR7 en la adhesión de linfocitos T y células CD34⁺ en respuesta a CXCL12 han mostrado una falta de implicación de este receptor en dichas adhesiones (Hartmann et al., 2008). Aun así, CXCR7 puede heterodimerizar con CXCR4, regular señalización dependiente de G α_i en respuesta a CXCL12 (Levoye et al., 2009), así como modular la migración de células tumorales hacia dicha quimioquina (Luker et al., 2012; Sanchez-Martin et al., 2013; Zabel et al., 2009).

5. Proteínas implicadas en la señalización “inside-out”

5.1-Las GTPasas:

Las GTPasas son proteínas G monoméricas que regulan una amplia variedad de respuestas celulares. Existen más de 100 GTPasas que forman la denominada superfamilia Ras. Esta superfamilia se divide a su vez en 5 familias: Ras, Rho, Rab, Sar1/Arf y Ran (Bar-Sagi and Hall, 2000; Heasman and Ridley, 2008; Jaffe and Hall, 2005). Las GTPasas ciclan entre un estado inactivo en el que se encuentran unidas a nucleótidos de guanosina difosfato (GDP), y un estado activo en el que unen nucleótidos de guanosina trifosfato (GTP) (**Figura 6**). La transición entre estos dos estados está regulada por tres clases de proteínas: las GEF (*guanine nucleotide exchange factor*), las cuales catalizan el intercambio de GDP por GTP, que conduce a la activación de la GTPasa; las proteínas GAP (*GTPase-activating protein*), que hidrolizan el GTP al estimular la actividad GTPasa intrínseca de las GTPasas, inactivando la proteína; y las proteínas GDIs (*GDP-dissociation inhibitor*), que inhiben el intercambio de GDP por GTP, manteniendo a la GTPasa en la conformación inactiva con GDP unido (Raftopoulou and Hall, 2004; Rossman et al., 2005).

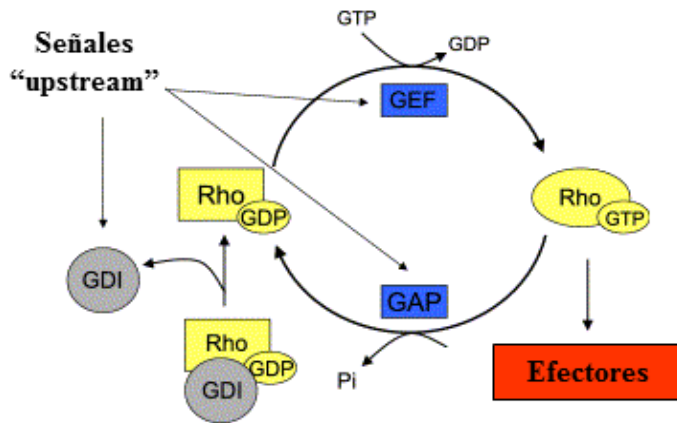


Figura 6. Ciclo de activación y desactivación de las GTPasas de la familia Rho. Las proteínas GEF favorecen el intercambio de GDP por GTP, llevando a la activación de la GTPasa, la cual actuará sobre efectores *downstream*. Las proteínas con actividad GAP hidrolizan el GTP, conduciendo a la inactivación de las GTPasas, mientras que las proteínas GDI inhiben el intercambio de GDP por GTP. Las proteínas que regulan la actividad de las GTPasas Rho pueden a su vez ser activadas por moléculas *upstream* (Raftopoulou y Hall, 2004).

5.1.1.-Las Rho GTPasas:

La familia Rho está formada por 22 miembros distintos, siendo los más estudiados las proteínas Rho, Rac y Cdc42 (**Figura 7**). En base a sus funciones y secuencias, los miembros de la familia Rho se han clasificado en 5 subfamilias y 3 miembros independientes. Las proteínas de esta familia contribuyen a la regulación de la contractibilidad celular, a la formación de fibras de estrés, así como a la generación de protusiones en el frente de avance (como filopodios y lamelipodios) y de adhesiones focales. Todas estas funciones contribuyen a la regulación de la migración y adhesión celular dependiendo de la reorganización del citoesqueleto de actina (Burrige and Wennerberg, 2004; D'Souza-Schorey et al., 1998; del Pozo et al., 1999; Heasman and Ridley, 2008; Tybulewicz and Henderson, 2009). Los miembros de la subfamilia Rac (Rac1, Rac2, Rac3, RhoG) participan en la extensión del frente de avance celular y estimulan la formación de lamelipodios y ondulaciones de la membrana tras la interacción con sus efectores, como WASP o WAVE, mientras que la interacción con PAK (p-21 *Activated kinase*) regula la estabilidad de los filamentos de actina modulando la actividad del complejo Arp2/3 (Ridley, 2001; Ridley and Hall, 1992; Sells et al., 1997). La falta de Rac1 y Rac2 conduce a una salida masiva de progenitores hematopoyéticos desde médula ósea a sangre (Gu et al., 2003). Asimismo, dichas GTPasas están implicadas en la diferenciación de linfocitos T y B (Dumont et al., 2009; Guo et al., 2008), y en la migración y adhesión leucocitaria (del Pozo et al., 1999; Garcia-Bernal et al., 2005b; Guo et al., 2008; Vicente-Manzanares and Sanchez-Madrid, 2004).

La asociación de las proteínas Cdc42 activadas con sus efectores promueven la formación de filopodios (Kumar et al., 2009; Peng et al., 2003), mientras que RhoA

ejerce preferentemente sus funciones en la parte posterior de la célula, induciendo un aumento de la contractibilidad que contribuye a la retracción y al desplazamiento neto del cuerpo celular (Heasman and Ridley, 2008; Parsons, 2003).

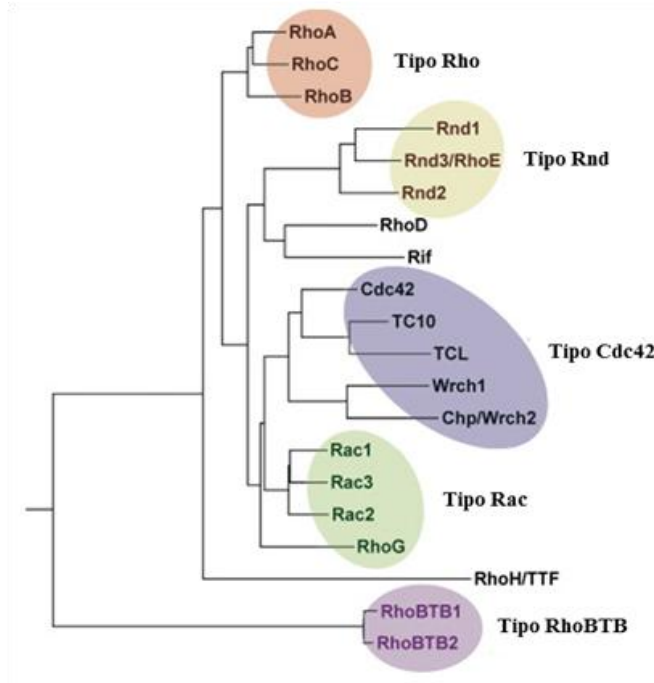


Figura 7. Dendrograma que representa la distribución de los miembros de la familia de GTPasas Rho (Burridge and Wennerberg, 2004).

Diversos estímulos pueden desencadenar la activación de las GTPasas Rho, entre los que se incluyen las quimioquinas (del Pozo et al., 1999; Fukui et al., 2001; Jimenez et al., 2000; Laudanna et al., 1996; Weber et al., 1998). Asimismo, las GTPasas están implicadas en diversas respuestas celulares como son la regulación de la transcripción, la progresión del ciclo celular, la proliferación celular y el tráfico de membranas. Adicionalmente controlan procesos de gran importancia fisiológica como el desarrollo embrionario, reparación de heridas, inflamación, fagocitosis, contracción muscular, mantenimiento de la morfología celular, y participan en situaciones patológicas como la invasión tumoral o la artritis reumatoide (Etienne-Manneville and Hall, 2002).

5.1.2.-GEF de las GTPasas Rho:

Como se ha mencionado anteriormente, las proteínas GEF facilitan la unión de GTP a las GTPasas, induciendo la activación de éstas. La unión del GEF a la GTPasa-GDP produce una alteración conformacional del sitio de unión del GDP, aumentando drásticamente su tasa de liberación. Posteriormente, una molécula de GTP se une inmediatamente a la GTPasa vacía, promoviendo así la liberación del GEF (Boriack-

Sjodin et al., 1998; Rossman et al., 2005; Schmidt and Hall, 2002). En células eucariotas se han descrito 3 familias de GEFs para las GTPasas de la familia Rho: Dbl, DOCK y SWAP70, aunque algunos miembros de familias de GEFs de las GTPasas Ras pueden actuar sobre varias GTPasas Rho (Cook et al., 2013; Rossman and Sondek, 2005; Schmidt and Hall, 2002).

La familia Dbl consta de 69 proteínas diferentes, que se caracterizan por la presencia de dos dominios contiguos denominados DH (de homología a Dbl) y PH (de homología a pleckstrina) (**Figura 8**) (Rossman and Sondek, 2005; Schmidt and Hall, 2002; Soisson et al., 1998). El dominio DH es el dominio catalítico que media el intercambio de GDP por GTP. Para el dominio PH se han descrito diversas funciones, como son potenciar la actividad del dominio DH, favorecer la unión a las GTPasas, facilitar el anclaje a la membrana celular y modular la actividad de estas proteínas por unión de fosfolípidos de membrana, tales como PIP₂ y PIP₃ (Rossman and Sondek, 2005). La familia Dbl comprende 33 subfamilias clasificadas en función de su composición en dominios y la homología que presentan en su dominio DH. Una de estas subfamilias, Vav, ha sido objeto de extensos estudios en cuanto a su estructura, especificidad de substratos, funcionalidad biológica y señalización en la que está implicada.

5.2.-Las proteínas Vav:

Vav1 fue el primer miembro identificado de la subfamilia de las proteínas Vav (Katzav et al., 1989). Vav1 se expresa mayoritariamente en células de origen hematopoyético (Bustelo, 1996), mientras que Vav2 y Vav3 tienen una expresión más ubicua (Movilla and Bustelo, 1999; Schuebel et al., 1996).

Estructuralmente las proteínas Vav se componen de varios dominios (**Figura 8**): CH (homología a calponina); un dominio rico en residuos acídicos (Ac) formado por tres tirosinas precedidas por varios residuos cargados negativamente; un dominio de homología a Dbl (DH) con actividad GEF hacia las GTPasas de la familia Rho; el dominio PH (homología a pleckstrina) que interacciona con polifosfoinosítidos; un dominio rico en dedos de Zinc (ZF) con gran número de cisteínas; un motivo rico en prolina (PR) que permite la unión con proteínas con dominios SH3; y finalmente los dominios SH2 y SH3 en el extremo C-terminal, los cuales proporcionan a Vav el potencial para participar en diferentes interacciones con tirosinas fosforiladas o motivos ricos en prolina en proteínas efectoras.

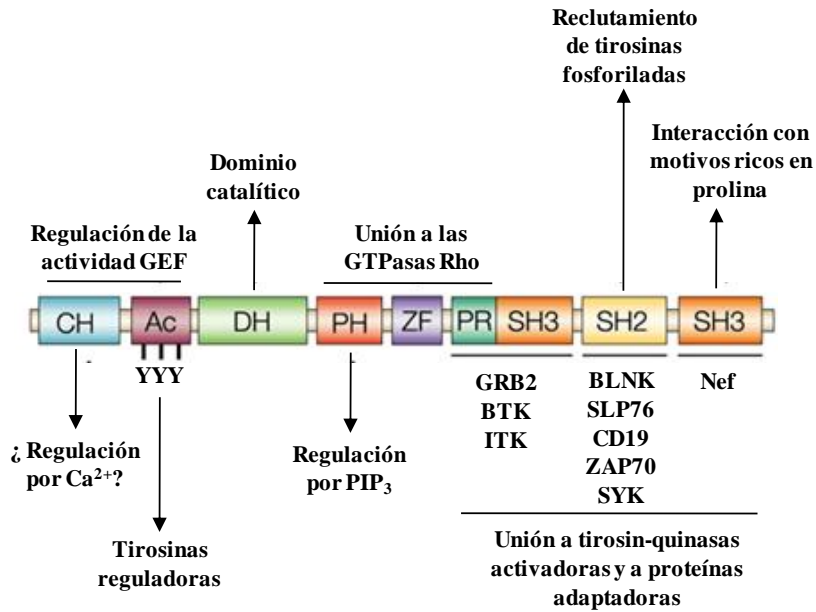


Figura 8. Estructura de las proteínas de la familia Vav, basado en Bustelo, 2000; Zugaza et al., 2002; Turner and Billadeau 2002.

En la conformación inactiva de Vav, los dominios DH y Ac interaccionan entre sí, bloqueando alostericamente el sitio catalítico en el dominio DH. La fosforilación de la Y¹⁷⁴ del dominio Ac en Vav1 interrumpe esta interacción, restaurando la actividad GEF (Aghazadeh et al., 2000). Mutaciones en esta tirosina por una fenilalanina, o deleciones del dominio Ac (Δ 1-132) o los dominios CH-Ac (Δ 1-186) de Vav1 se traducen en una proteína constitutivamente activa, con actividad intercambiadora de nucleótidos independiente de fosforilación, y que causa un incremento del potencial oncogénico y de la regulación transcripcional celular (Billadeau et al., 2000; Lopez-Lago et al., 2000). Se ha propuesto que el dominio CH de Vav puede estar relacionado con la movilización de calcio y la regulación de la actividad GEF de la proteína. Los dominios PH, ZF y PR podrían estar involucrados en favorecer la unión a la GTPasa, mientras que PH interviene en la modulación de la actividad GEF a través de la unión a los fosfolípidos PIP₂ y PIP₃ (Turner and Billadeau, 2002). Adicionalmente, el grado de activación de Vav es modulado por segundos mensajeros derivados de la actividad enzimática de la PI₃K (Han et al., 1998). El dominio ZF une y/o estabiliza la interacción GEF-GTPasa durante la reacción de intercambio de nucleótidos (Movilla and Bustelo, 1999), y finalmente, los 3 dominios del extremo C-terminal de las proteínas Vav (SH₃-SH₂-SH₃) interaccionan con tirosin-quinasas que las activan, así como con proteínas adaptadoras (Bustelo, 2000; Turner and Billadeau, 2002). A su vez, las tirosinas del dominio Ac son susceptibles de

ser fosforiladas por quinasas de la familia Src y Syk, tales como ZAP-70, Lck, Fyn y Syk (Deckert et al., 1996; Han et al., 1998; Michel et al., 1998; Schuebel et al., 1998). Vav1 actúa como GEF principalmente para Rac1, Rac2 y RhoG, mientras que Vav2 y Vav3 presentan actividad catalítica especialmente sobre RhoA y RhoG (Crespo et al., 1997; Tybulewicz, 2005).

Vav1 juega un importante papel en el desarrollo y actividad de los linfocitos (Tybulewicz, 2005). Los ratones Vav1^{-/-} tienen alterada la selección de linfocitos T en el timo, disminuyendo el número de los mismos en periferia, así como su capacidad de proliferar en respuesta a antígenos (Tybulewicz, 2005). Asimismo, los linfocitos T de los ratones Vav1^{-/-} presentan una disminución considerable en la activación de Rac (Reynolds et al., 2002), y se ha demostrado que la expresión de formas constitutivamente activas de Rac subsana los defectos del desarrollo de las células T en estos ratones (Gomez et al., 2000). Adicionalmente, células deficientes en Vav1 presentan defectos en la regulación de los niveles de calcio intracelulares, secreción de citoquinas y en la reorganización del citoesqueleto de actina en respuesta a TCR y otros estímulos externos (Fischer et al., 1995; Tarakhovsky et al., 1995; Tybulewicz et al., 2003; Zhang et al., 1995). A su vez, se ha observado en dichas células una disminución de la adhesión celular, el *spreading* y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROI) en respuesta a la estimulación de las integrinas por sus ligandos en la señalización *outside-in* (Tybulewicz et al., 2003).

Vav1 es fosforilado en tirosinas tras la estimulación por TCR (Bustelo et al., 1992; Margolis et al., 1992) y por CXCL12 (Garcia-Bernal et al., 2005b; Okabe et al., 2005; Ticchioni et al., 2002; Vicente-Manzanares et al., 2005). Estudios previos de nuestro laboratorio han puesto de manifiesto la importancia de la activación por CXCL12 de la vía de señalización Vav-Rac en la estimulación de la adhesión de linfocitos T dependiente de la integrina $\alpha 4\beta 1$ (Garcia-Bernal et al., 2005b).

5.3.- ZAP-70:

ZAP-70 es una proteína citoplásmica perteneciente a la familia de las tirosinquininas Syk. Se expresa principalmente en células T y juega un papel importante en la iniciación de la respuesta a la activación del TCR, y a su vez, en el desarrollo de las células T (Chan et al., 1991; Kadlecik et al., 1998; Negishi et al., 1995; Ticchioni et al., 2002; Wang et al., 2010). ZAP-70 está formada por dos dominios SH₂ en su extremo N-terminal que están separados por una región de unión conocida como interdominio A, y

un dominio quinasa carboxi-terminal que se encuentra conectado con el dominio SH₂ central a través del interdominio B (**Figura 9**). Los dominios SH₂ son los encargados de unirse a los motivos de activación basados en tirosinas (ITAMs) doblemente fosforilados de la cadena ζ del TCR (Chan et al., 1992).

En células T inactivas, ZAP-70 está en un equilibrio dinámico, presentando transiciones a partir de su conformación auto-inhibida. En dichas células, ZAP-70 se distribuye en el citoplasma, pero es rápidamente reclutado a la membrana plasmática tras la estimulación del TCR y la fosforilación de los ITAMs (Shoa-Lancaster et al., 1997, 1998), localizándose en *microclusters* que contienen TCR. Cuando el TCR interacciona con el antígeno unido a MHC en células presentadoras de antígeno, Lck fosforila tirosinas del complejo CD3 en los ITAMs (Weiss, 1993), provocando el reclutamiento de ZAP-70 que se une a los ITAMs fosforilados (Hatada et al., 1995; Sloan-Lancaster et al., 1998). Esta unión se traduce en la activación de ZAP-70 desde su conformación auto-inhibida, exponiendo residuos para la fosforilación mediada por Lck. Así, ZAP-70 contiene varias tirosinas que son fosforiladas tras la estimulación del TCR, que son importantes en la activación de esta quinasa y en su asociación con otras proteínas señalizadoras. La fosforilación de las tirosinas Y²⁹², Y³¹⁵ y Y³¹⁹ localizadas en el interdominio B sirven de sitios de unión de otras proteínas. Asimismo, la tirosina Y⁴⁹³ presente en el dominio *loop* de activación de ZAP-70 es fosforilada por Lck o por la misma ZAP-70 para estimular su actividad catalítica (Kong et al., 1996; Watts et al., 1994). Varias proteínas adaptadoras, entre las que se incluyen LAT y SLP-76, son posteriormente fosforiladas por ZAP-70 (Wang et al., 2010). A su vez, LAT y SLP-76 activadas reclutan otras proteínas de señalización, como es el caso de Vav1, cuyo dominio SH₂ interacciona con la tirosina Y³¹⁵ de ZAP-70 (Katzav et al., 1994). La importancia de esta tirosina se ha demostrado por el hecho de que tras la activación del TCR, mutaciones en esta tirosina Y³¹⁵ impiden la unión de ZAP-70 a Vav1, causando una disminución en la fosforilación en tirosinas de Vav1, así como de SLP-76, Shc y de la misma ZAP-70 (Wu et al., 1997). La mutación de la tirosina Y²⁹² en ZAP-70 se traduce en un aumento de la actividad de esta quinasa tras la estimulación del TCR (Rao et al., 2000), y en la migración de las células T en respuesta a CXCL12 (Ottoson et al., 2001).

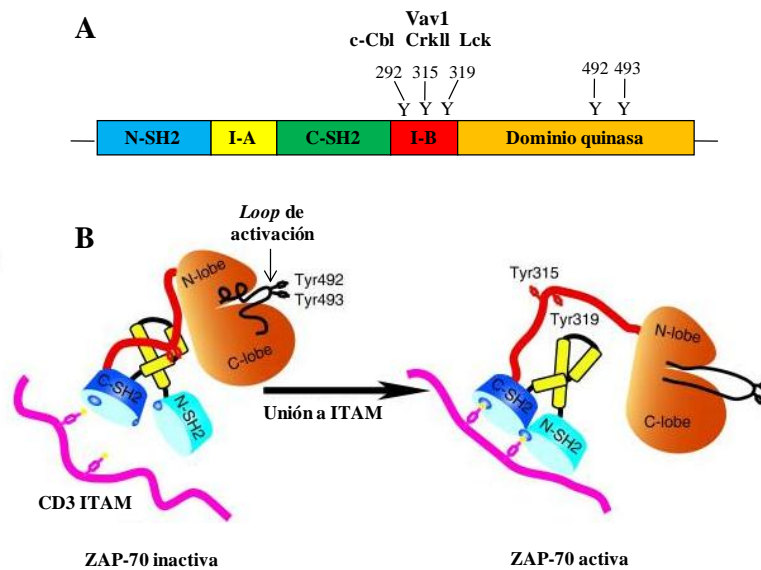


Figura 9. Organización estructural de ZAP-70 y modelo de activación tras unión a los dominios ITAMs fosforilados. (A) Esquema de los dominios de ZAP-70 y los residuos de tirosinas fosforilados con las moléculas que se unen a ellos. (B) Modelo de activación de ZAP-70 tras la unión a los ITAMs Adaptado de Wang et al., 2010.

La ausencia de expresión o la falta de activación de ZAP-70 se traduce en una carencia de células T funcionales en sangre periférica y en una inmunodeficiencia combinada severa (SCID) (Arpaia et al., 1994; Elder et al., 1994; Toyabe et al., 2001). Estos enfermos presentan un número normal de células T CD4⁺, aunque éstas no son funcionales (Gelfand et al., 1995). Asimismo, la inmunodeficiencia SCID se traduce en una ausencia de células T CD8⁺ en sangre periférica (Elder et al., 1994). Los ratones deficientes en ZAP-70 presentan un bloqueo en la transición del estadio de doble positivos CD4⁺/CD8⁺ hacia la selección positiva de células CD8⁺ (Arpaia et al., 1994). Asimismo, las células Jurkat P116, las cuales carecen de ZAP-70, presentan una deficiente señalización celular tras la estimulación del TCR (Williams et al., 1998), así como una reducción en la migración en respuesta a CXCL12 (Ottoson et al., 2001).

Adicionalmente, se ha observado que ZAP-70 está implicada en la regulación de la migración dependiente de α L β 2 de células T (Soede et al., 1998), y participa en la señalización desde α L β 2 hacia la generación de formas de alta afinidad de esta integrina (Evans et al., 2011), y en la fosforilación de SLP-76 tras la estimulación de células Jurkat con CXCL12 (Ottoson et al., 2001). Por otra parte, se ha propuesto que CXCL12 estimula en células T la asociación entre CXCR4 y TCR a través de ZAP-70 (Kremer et al., 2011), y se ha demostrado que el aumento en la activación de Erk1/2 por CXCL12 requiere la fosforilación en tirosinas de SLP-76 por parte de ZAP-70 (Kremer et al., 2003).

5.4.-*Talina*:

Talina es una proteína de 250-270 kDa que se podría considerar como un nexo de unión entre las integrinas, los filamentos de actina y diversas proteínas que unen actina, como vinculina y FAK (Calderwood et al., 2013; Campbell and Ginsberg, 2004). La talina juega un papel esencial en la activación de las integrinas y en la formación de las adhesiones focales, además de regular una variedad de procesos celulares como el *spreading*, migración y proliferación celular (Moser et al., 2009). La talina se une al motivo NPxY/F y a un residuo Asp, ambos sitios de unión altamente conservados en el dominio citoplásmico de las subunidades β de las integrinas, lo cual tiene un papel clave en la regulación de la activación de estas moléculas de adhesión (Anthis et al., 2009; Calderwood et al., 2013). Así, se ha demostrado previamente que la unión de talina a los dominios citoplásmicos de las subunidades $\beta 1$ y $\beta 3$ (Tadokoro et al., 2003) se traduce en la activación de estas integrinas.

En vertebrados se expresan dos isoformas de talina: talina 1 y talina 2, las cuales son codificadas por distintos genes. La talina 1 está implicada en adhesión celular y *spreading* (Priddle et al., 1998), y en fibroblastos embrionarios de ratones deficientes en talina 1, se ha observado un incremento en la expresión de talina 2 que compensa la pérdida de talina 1 (Zhang et al., 2008). La talina es requerida para la agregación plaquetaria y formación de trombos (Nieswandt et al., 2007; Petrich et al., 2007), así como para la angiogénesis embrional (Monkley et al., 2011). La talina 2 se expresa principalmente en corazón (Monkley et al., 2001), y al igual que la talina 1, se requiere para la fusión de mioblastos (Conti et al., 2009).

La talina 1 está formada por un dominio globular N-terminal (*Talin Head Domain*, THD) (amino ácidos 1-434, 50 kDa) que contiene los subdominios: F1, F2 y F3, formando el dominio FERM, seguido de un largo dominio C-terminal (amino ácidos 434-2541, 220 kDa) (**Figura 10**). En ocasiones, el subdominio F1 es precedido por un subdominio F0, el cual no presenta homología con otros dominios proteicos (Elliott et al., 2010). El subdominio F3 incluye una región PTB (*phosphotyrosine-binding domain*) de unión de fosfotirosinas, la cual reconoce el motivo Asn-Pro-X-Tyr (NPxY) de los dominios citoplásmicos de las subunidades β de las integrinas (Calderwood et al., 2002; Garcia-Alvarez et al., 2003). Mutaciones en el motivo NPxY (Bouaouina et al., 2008; Tadokoro et al., 2003) o en el dominio PTB de talina (Wegener et al., 2007) inhiben la unión de talina a la integrina y disminuyen la afinidad de la integrina por su ligando. El

dominio PTB es suficiente para activar las integrinas, aunque otras regiones del THD incrementan la activación, siendo F0 y F1 requeridos asimismo para la activación óptima de la integrina $\beta 1$ (Calderwood et al., 2003; Calderwood et al., 2002; Elliott et al., 2010; Goult et al., 2010; Legate and Fassler, 2009). En el estado inactivo de las integrinas, la secuencia HDRK en el dominio citoplásmico de la subunidad β de las integrinas se une a los dominios citoplasmáticos de las subunidades α , formando un puente salino entre el Asp de HDRK y un residuo Arg en el motivo GFFKR de la subunidad α (Hughes et al., 1996; Vinogradova et al., 2002). Se ha demostrado que la talina interrumpe la interacción entre el residuo Arg de la subunidad α y el Asp de la subunidad β del dominio citoplásmico de las integrinas (Anthis et al., 2009), lo cual podría contribuir a la activación de las integrinas (Imai et al., 2008). Sin embargo, esto parece depender del tipo de integrina, ya que la ausencia del Asp de la secuencia HDRK no se traduce en alteraciones en la activación de integrinas (Fassler et al., 1995). La unión del dominio citoplásmico de las integrinas con el dominio FERM de talina induce cambios conformacionales en los dominios extracelulares de las integrinas que conducen a la estabilización de su conformación de alta afinidad, incrementando la afinidad por sus ligandos, lo que constituye un mecanismo de activación *inside-out* (Kim et al., 2011).

La talina puede unir asimismo el fosfolípido fosfatidil-inositol 4,5-bisfosfato (PIP_2), lo que se traduce en un aumento de la interacción talina-integrina (Martel et al., 2001). Posteriormente se ha demostrado que el subdominio F3 de talina también se une a la fosfatidilinositol-4, 5 fosfato quinasa γ tipo I ($\text{PIPKI}\gamma$) a través de una región cuya secuencia solapa con la que se encuentra en el dominio citoplásmico de la subunidad β de las integrinas, siendo estas uniones mutuamente excluyentes (Barsukov et al., 2003). Adicionalmente, se ha observado que PIP_2 es esencial para el *clustering* de integrinas mediante la formación de un complejo entre las integrinas activadas, sus ligandos, talina y PIP_2 . Tanto el dominio FERM como el filamentososo C-terminal poseen sitios de unión para actina. En el dominio filamentososo de la talina existen motivos de interacción con vinculina (Gilmore and Burridge, 1996; Gingras et al., 2008; Patel et al., 2006) y un motivo involucrado en una segunda interacción con integrinas (Xing et al., 2001; Yan et al., 2001). Se ha demostrado que dicho dominio está involucrado en el *clustering* de integrinas en las adhesiones focales (Legate et al., 2009).

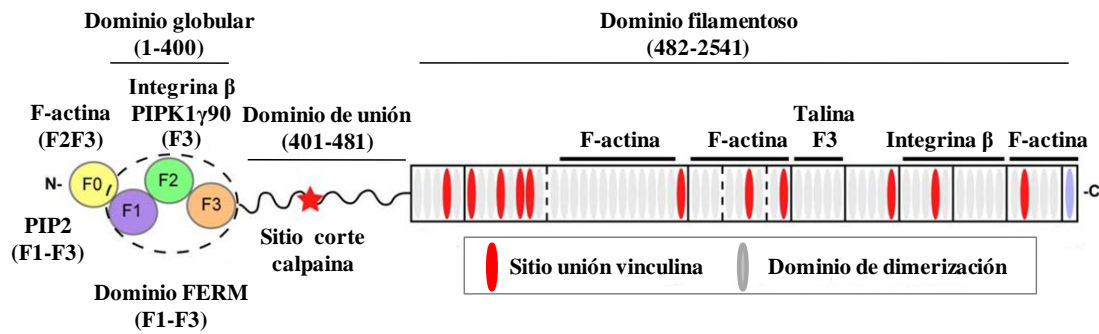


Figura 10. Estructura de talina (Adaptado de Bate et al., 2012).

Se han descrito diversos mecanismos de regulación de la actividad de la talina y, como consecuencia, del control de la activación de las integrinas. En primer lugar, la región C-terminal y el motivo PTB de talina interactúan entre sí, adoptando una conformación auto-inhibida que causa un bloqueo del dominio de unión con la integrina (Goksoy et al., 2008). Dicho bloqueo se libera por la unión de PIP_2 al dominio FERM (Martel et al., 2001). Dicha unión es favorecida por la $\text{PIPKI}\gamma 90$ (Ling et al., 2006), cuya actividad quinasa aumenta por la asociación con talina (Di Paolo et al., 2002). Asimismo, la talina es susceptible de regulación por fosforilación, lo que causa un enmascaramiento de su región que se une a integrinas, y de al menos un sitio de unión a vinculina (Ratnikov et al., 2005). Por otra parte, la fosforilación en tirosinas del motivo NPxY de la subunidad β de las integrinas provoca una reducción de la unión con talina, ya que la interacción PTB-NPxY ocurre a través de interacciones acídicas e hidrofóbicas que no pueden acomodar la introducción de un grupo fosfato (García-Alvarez et al., 2003). Otro nivel de regulación de la actividad de la talina procede de su susceptibilidad a proteólisis por calpaina (Beckerle et al., 1987), lo cual ocurre entre el dominio globular y el filamentososo (Nayal et al., 2004). Tras dicho corte, la talina presenta mayor afinidad de unión con la región citoplásmica de la subunidad β de las integrinas (Yan et al., 2001), y es esencial para el reciclaje de las adhesiones focales (Franco et al., 2004).

En células no activadas la talina se localiza en el citoplasma, pero tras la activación a través de trombina o TCR, se dispone en la parte citoplásmica de la membrana plasmática (Beckerle et al., 1989; Nolz et al., 2007). En células hematopoyéticas, la GTPasa Rap1 está implicada en el reclutamiento de talina hacia las colas citoplásmicas de las integrinas, mediante la formación del complejo ternario Rap1-RIAM-talina (Watanabe et al., 2008).

5.5.-Pyk2:

La proteína Pyk2 (*proline-rich tyrosine kinase 2*), también conocida como CAK β (*cell adhesion kinase β*), RAFTK (*related adhesion focal tyrosine kinase*) o CADTK (*calcium-dependent protein tyrosine kinase*), es una tirosín-quinasa homóloga a FAK (*focal adhesion kinase*) (Avraham et al., 2000). Pyk2 se expresa predominantemente en el sistema nervioso central, en células derivadas de linaje hematopoyético y en células epiteliales (Avraham et al., 2000; Avraham et al., 1995; Dikic and Schlessinger, 1998; Lev et al., 1995; Sasaki et al., 1995; Xiong et al., 1998). Pyk2 responde a estímulos que conducen al aumento de la concentración de calcio intracelular y a señales de estrés, entre los que se encuentran las quimioquinas, las integrinas y el TCR (Astier et al., 1997; Berg and Ostergaard, 1997; Della Rocca et al., 1997; Dikic and Schlessinger, 1998; Ganju et al., 1997; Gismondi et al., 1997; Gismondi et al., 2003; Shi et al., 2000).

Estructuralmente, Pyk2 está formada por un dominio tirosín-quinasa flanqueado por una región N-terminal que contiene el dominio FERM homólogo a FAK, y dos regiones ricas en prolina en el dominio C-terminal (Schaller, 2010) (**Figura 11**). En el extremo C-terminal se encuentra el dominio FAT, que presenta homología con el dominio FAT de FAK, el cual es responsable de la interacción FAK-talina (Schaller, 2010). Varias de las tirosinas en Pyk2 son sitios de unión para los dominios SH₂ de Src, Fyn y Grb2, mientras que las secuencias ricas en prolina unen proteínas con dominios SH₃, como p130^{cas} y Crk (Avraham et al., 2000; Blaukat et al., 1999; Dikic et al., 1996). El dominio C-terminal une, asimismo, las proteínas Hic-5, PAP y paxilina, mientras que el N-terminal se asocia con la proteína Nirs (Andreev et al., 1999; Lev et al., 1999; Matsuya et al., 1998). Pyk2 se asocia a Vav1 en células T (Katagiri et al., 2000; Okabe et al., 2005), y se ha propuesto que Pyk2 actuaría como un puente entre Vav1 y la integrina α V β 3 (Gao and Blystone, 2009). La diferencia en el dominio C-terminal entre Pyk2 y FAK es responsable de su diferente distribución celular, localizándose FAK en los contactos y adhesiones focales, mientras que Pyk2 se localiza en el citoplasma, principalmente en la región perinuclear (Avraham et al., 2000).

Existen varias isoformas de Pyk2: una forma de 110 kDa (Pyk2) expresada en células neuronales, plaquetas, células mastocíticas y células epiteliales (Avraham et al., 1995; Lev et al., 1995; Sasaki et al., 1995); una isoforma de 105 kDa, llamada Pyk-H, a la cual le faltan 42 amino ácidos (738-780) entre las dos secuencias ricas en prolina dentro de la región C-terminal, y que se expresa específicamente en células hematopoyéticas

(Dikic and Schlessinger, 1998); y una tercera isoforma, referida como PRNK (*PYK2-related non-kinase*) que codifica sólo 238 amino ácidos de la región C-terminal, faltando los dominios catalíticos y la región N-terminal, y que se expresa mayoritariamente en bazo y en menor medida en ciertas regiones del cerebro (Xiong et al., 1998). A diferencia de Pyk-2, Pyk2-H es activada rápidamente en respuesta a quimioquinas y por activación de los receptores BCR y TCR, sugiriendo un papel para Pyk2-H en la respuesta inmune.

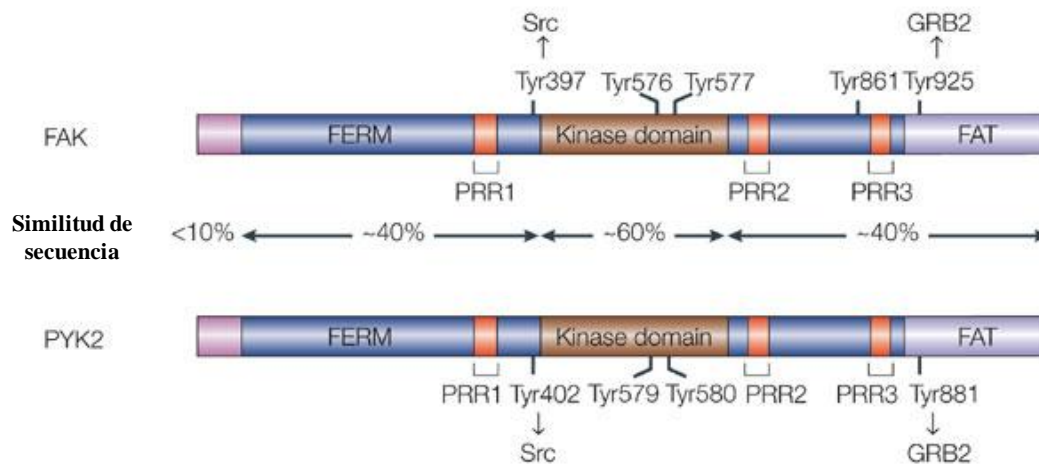


Figura 11. Estructura de FAK y Pyk2. Se indican los dominios principales de ambas proteínas, así como la homología que comparten. Asimismo, se muestran las tirosinas que son fosforiladas en ambas proteínas (Schaller, 2010).

Pyk2 se autofosforila en la tirosina Y⁴⁰², permitiendo la asociación a los dominios SH₂ de quinasas de la familia Src (Dikic et al., 1996). Posteriormente estas quinasas fosforilan los residuos Y⁵⁷⁹ e Y⁵⁸⁰ presentes en el dominio quinasa de Pyk2, lo que conduce a la máxima actividad quinasa de Pyk2 (Avraham et al., 2000; Dikic et al., 1996; Li et al., 1999). La fosfatasa PTP-PEST es capaz de desfosforilar a Pyk2, controlando su actividad y regulando así la activación de células T (Davidson et al., 2010). Pyk2 acopla la señalización desencadenada por receptores de quimioquinas e integrinas con una variedad de efectores como son GTPasas de las familias Ras y Rho, MAP quinasas, p38 y PKC (Gismondi et al., 2003; Lim et al., 2008; Litvak et al., 2000; Shi et al., 2000).

En ratones deficientes en Pyk2 se han observado defectos en la migración de macrófagos y falta de la zona marginal B esplénica, asociada a una disminución de la motilidad de linfocitos B en respuesta a quimioquinas (Guinamard et al., 2000; Okigaki et al., 2003). Adicionalmente los macrófagos de ratones Pyk2^{-/-} presentan defectos en la polarización, formación de *ruffles* y en la migración en respuesta a quimioquinas

(Okigaki et al., 2003), mientras que los linfocitos T CD8⁺ tienen inhibida su activación y la adhesión mediada por α L β 2 (Beinke et al., 2010).

5.6.- SLP-76:

SLP-76 (*SH2-domain-containing leukocyte protein of 76 kDa*) es una proteína de 533 amino ácidos expresada exclusivamente en células del sistema inmune y que tiene una función adaptadora que es esencial para la activación de linfocitos T. SLP-76 ejerce un papel regulador positivo para el desarrollo de estas células y para la activación celular en respuesta al TCR (Koretzky et al., 2006). SLP-76 fue inicialmente descrita como una proteína que se unía a Grb2 y que era fosforilada por tirosin-quinazas tras la activación del TCR (Jackman et al., 1995; Reif et al., 1994). Está compuesta de cuatro dominios: un “motivo α estéril” (SAM) N-terminal; un dominio ácido que incluye tres residuos de tirosinas susceptibles de ser fosforiladas, Y¹¹³, Y¹²⁸, y Y¹⁴⁵; un dominio central con una región rica en prolina, y un dominio SH₂ en la región C-terminal (**Figura 12**). Las tirosinas de SLP-76 son fosforiladas principalmente por ZAP-70 (Brands et al., 1997; Bubeck Wardenburg et al., 1996), y se ha demostrado que la fosforilación de las tirosinas Y¹¹² e Y¹²⁸ es esencial para que se lleve a cabo la diferenciación tímica y la activación de las células T (Fang et al., 1996; Jordan et al., 2008; Myung et al., 2001). Esta fosforilación induce asociaciones con moléculas que contienen dominios SH₂ como Vav1, la proteína adaptadora Nck e Itk, una quinasa de la familia Tec (Barda-Saad et al., 2010; Tuosto et al., 1996; Wu et al., 1996). Notablemente, se ha demostrado que Vav1 se asocia a *microclusters* de SLP-76 más que a complejos de TCR (Sylvain et al., 2011). Las secuencias ricas en prolina del dominio central interactúan con proteínas con dominios SH₃, como Gads, y con PLC γ 1, mientras que el dominio SH₂ C-terminal recluta a la proteína fosforilada ADAP y a la serín-treonín quinasa HPK-1 (Boerth et al., 2000; Coppolino et al., 2001; Geng et al., 1999; Koretzky et al., 2006; Sauer et al., 2001).

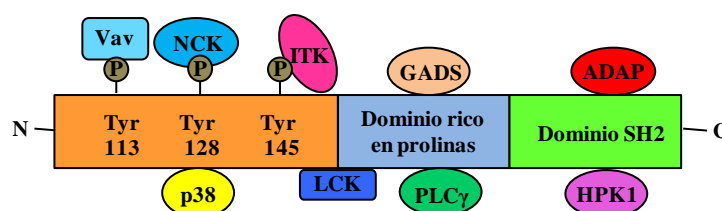


Figura 12. Estructura de SLP-76 humana. Esquema de los dominios de SLP-76 y las moléculas que se unen a ellos.

Más del 60% de los ratones deficientes en SLP-76 mueren perinatalmente, observándose hemorragias subcutáneas en el estadio fetal. Asimismo, los ratones adultos deficientes en SLP-76 tienen el timo muy pequeño y muestran una ausencia de células T periféricas y de nódulos linfoides (Clements et al., 1998; Pivniouk et al., 1998). Por el contrario, presentan un número normal de macrófagos y células NK, así como un desarrollo normal de las células B. Estudios en la línea celular Jurkat J14, deficiente en SLP-76, muestran que la activación de Lck y ZAP-70 está intacta tras la estimulación del TCR en estas células. Sin embargo, la subsiguiente fosforilación de PLC γ 1 y Erk1/2, el flujo de calcio y la activación de NFAT y AP-1 se encuentran disminuidas (Yablonski et al., 1998), de manera similar a lo que ocurre cuando se delecciona el dominio N-terminal de SLP-76.

SLP-76 no es sólo fosforilado en respuesta a la activación del TCR, sino que CXCL12 induce asimismo su fosforilación en tirosinas, lo cual es dependiente de ZAP-70 (Kremer et al., 2003; Ottoson et al., 2001). SLP-76 ha sido implicada en la regulación de la adhesión por integrinas en respuesta a activación del TCR mediante señalización *inside-out*, así como en la señalización *outside-in* desde las integrinas. Así, se ha mostrado que la activación de α L β 2 y la adhesión mediada por esta integrina en respuesta a la estimulación por TCR está inhibida en células deficientes en SLP-76 (Baker et al., 2009b; Horn et al., 2009). En cuanto a la implicación de SLP-76 en la señalización *outside-in* se ha demostrado que dicha proteína es fosforilada en tirosinas tras la estimulación a través de α 4 β 1 (Hunter et al., 2000; Nguyen et al., 2008).

5.7.-ADAP:

La proteína adaptadora promotora de la degranulación y adhesión (ADAP/SLAP-130/Fyb) se expresa en células T, células NK, mastocitos, macrófagos, precursores de osteoclastos, células mieloides y plaquetas (da Silva et al., 1997a; Musci et al., 1997). ADAP aparece en un estadio temprano del desarrollo de las células B en la médula ósea, pero no se expresa en células B maduras (Dluzniewska et al., 2007). Existen dos isoformas de ADAP: una de 120 kDa y otra de 130 kDa, que se diferencian entre sí por la presencia de 46 amino ácidos adicionales en el extremo C-terminal de ADAP-130 (Veale et al., 1999). Ambas isoformas se localizan preferentemente en el citoplasma y el núcleo, y presentan distinto patrón de expresión. Mientras que la isoforma ADAP-130 se expresa

principalmente en células T periféricas, la isoforma ADAP-120 se expresa preferentemente en timocitos (Veale et al., 1999).

A nivel estructural, ADAP presenta una región central rica en prolinas a la que se unen la proteína de 55 kDa asociada a la quinasa Src (SKAP-55), y la proteína de expresión ubícua SKAP-HOM; un dominio de unión homólogo a Ena/VASP 1 (EVH1) que une proteínas de la familia Ena/VASP (Krause et al., 2000); tres motivos de fosforilación en tirosinas que son los responsables de la unión a los dominios SH₂ de Fyn y de SLP-76, como se ha mencionado anteriormente; dos sitios putativos de localización nuclear; y dos dominios SH₃ en la región C-terminal (**Figura 13**).

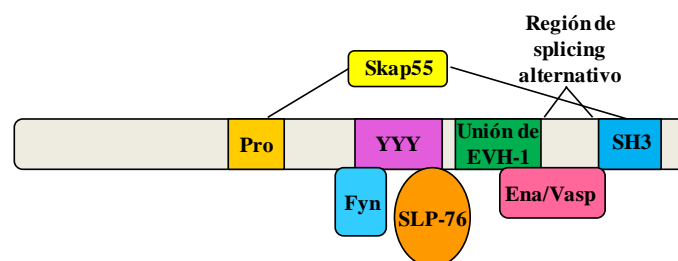


Figura 13. Estructura de ADAP. Representación de la isoforma ADAP-130 con sus diferentes dominios, las proteínas que une y la región de splicing alternativo para la isoforma ADAP-120.

Los ratones deficientes en ADAP son viables, fértiles y muestran crecimiento normal (Griffiths et al., 2001; Peterson et al., 2001). Asimismo, el desarrollo linfocitario en estos ratones muestra mínimas alteraciones. Sin embargo, sus células T presentan una marcada reducción en su capacidad proliferativa y producción de IL-2 en respuesta a estimulación por TCR, aunque no presentan alteraciones en las respuestas tempranas de activación como consecuencia de la estimulación del TCR.

De modo similar a SLP-76, ADAP regula la señalización *inside-out* y *outside-in* desde el TCR e integrinas. Así, se describió inicialmente que anticuerpos frente a la subunidad $\alpha 4$ de las integrinas era capaz de inducir la fosforilación de ADAP (Hunter et al., 2000). Posteriormente, la caracterización de los linfocitos T de ratones ADAP^{-/-} reveló que ADAP ejerce una regulación positiva de la adhesión mediada por integrinas $\beta 1$ y $\beta 2$ en respuesta a activación por TCR, y que existía una reducción del *clustering* de integrinas, así como de la formación de conjugados célula T-APC (Griffiths et al., 2001; Peterson et al., 2001). Adicionalmente, se ha observado que la interrupción de la interacción entre SLP-76 y ADAP bloquea el *spreading* y migración en superficies tapizadas con ICAM-1 (Baker et al., 2009a; Wang et al., 2009).

La unión de ADAP con SKAP55 es crítica para la activación de $\alpha\text{L}\beta\text{2}$ en respuesta a estimulación *inside-out* por TCR (Huang et al., 2005; Kliche et al., 2006; Wang et al., 2007; Wang et al., 2003). Adicionalmente, la identificación de la interacción de RIAM con el módulo ADAP-SKAP55 condujo a la hipótesis por la cual RIAM conectaría ADAP-SKAP55 desde la activación del TCR a la estimulación de las integrinas a través de la asociación de RIAM con Rap1 (Menasche et al., 2007). Notablemente, ha sido recientemente descrito que el complejo ADAP-SKAP55-RIAM-Rap1 puede ser reclutado a la membrana celular en respuesta a estimulación por CXCL12 (Horn et al., 2009).

5.8.-La familia de proteínas RGS: RGS10

La señal desencadenada por la mayoría de los receptores de estímulos quimiotácticos involucra a las proteínas G heterotriméricas. La activación de estos receptores se traduce en el cambio de GDP por GTP en la subunidad $G\alpha$ de la proteína G heterotrimérica, lo que conduce a la disociación de ésta del heterodímero $\beta\gamma$ (Neer, 1995). Esto provoca la activación de proteínas efectoras tanto de $G\alpha$ -GTP como de $G\beta\gamma$, lo que finalmente conduce a diversas respuestas celulares, entre las que se incluye la migración celular (Offermanns, 2001; Pierce et al., 2002). Las proteínas G han sido clasificadas en cuatro subfamilias: G_s , $G_{i/o}$, $G_{q/11}$ y $G_{12/13}$, dependiendo de la subunidad $G\alpha$ presente en el complejo.

Varios mecanismos pueden limitar la permanencia del GTP unido a $G\alpha$, controlando así la duración por la cual $G\alpha$ -GTP puede activar a sus efectores *downstream*. Un mecanismo es la propia actividad GTPasa intrínseca que poseen las subunidades $G\alpha$ y que supone la hidrólisis del GTP unido, llevando a la reasociación del heterotrímero $G\alpha\beta\gamma$ y el cese de la señalización (Neer, 1995). Otro mecanismo es el que tiene lugar a través de los miembros de la familia de reguladores de la señalización de la proteína G (RGS), los cuales aceleran la actividad GTPasa intrínseca de la subunidad $G\alpha$, una propiedad que las define como GAPs (Druey, 2009; Kehrl, 1998) (**Figura 14**).

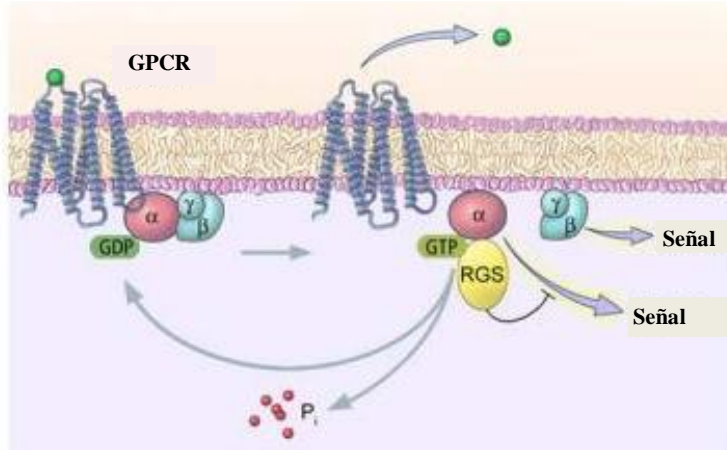


Figura 14. Las proteínas RGS activan la actividad GTPasa de las proteínas G heterotriméricas. La activación de los GPCR provoca un cambio conformacional en la subunidad G_{α} que induce el cambio de GDP por GTP. La forma activada de G_{α} unida a GTP activa a efectores *downstream*. La señal se termina debido a la actividad GTPasa intrínseca de G_{α} , la cual facilita su reasociación con el heterodímero $\beta\gamma$. Las proteínas RGS se unen a G_{α} -GTP acelerando la reacción de hidrólisis del GTP (Druey K., 2009).

La familia de las proteínas RGS consta de al menos 25 miembros divididos en 6 subfamilias, basadas en el alineamiento del dominio RGS y la secuencia de aminoácidos (Willars, 2006) (**Figura 15**). Todas las proteínas RGS poseen un dominio RGS conservado de 120 aminoácidos que es responsable de la unión de las proteínas G_{α} . La mayoría tienen actividad GAPs para las subunidades α de las subfamilias G_{α_i} y G_{α_q} .

En linfocitos, las proteínas RGS expresadas pertenecen principalmente a las subfamilias R4 y R12, e incluyen RGS1, RGS2, RGS10, RGS13, RGS14 y RGS16. Otras dos proteínas de la subfamilia R4 expresadas en linfocitos, pero a niveles más bajos son RGS3 y RGS18 (Moratz et al., 2004). La actividad GAP de las RGS atenúa la respuesta de los GPCR, por lo que la sobreexpresión de proteínas RGS podría hipotéticamente inhibir la quimiotaxis y la respuesta proadhesiva de linfocitos.

RGS10, una de las proteínas de estudio en la presente tesis, pertenece a la subfamilia D/R12, regula específicamente las subunidades $G_{\alpha_{13}}$, G_{α_z} , and G_{α_0} , pero no G_{α_s} (Hunt et al., 1996). RGS10 se expresa abundantemente en cerebro y sistema inmune, estando implicada en la modulación de la señalización pre- y postsináptica mediada por proteínas G, así como en la regulación de expresión génica (Chatterjee and Fisher, 2000; Popov et al., 1997). RGS10 puede localizarse en el núcleo y se ha mostrado que su función es regulada mediante la fosforilación la quinasa A dependiente de cAMP (PKA) (Burgon et al., 2001). Dicha fosforilación provoca la translocación de RGS10 desde la membrana o el citosol al núcleo, provocando el secuestro de RGS10 de manera que no puede interactuar con la subunidad G_{α_i} activada en la membrana plasmática (Burgon et al., 2001).

En ratón, RGS10 se expresa diferencialmente durante el desarrollo de linfocitos B (Haller et al., 2002). Ratones knockout para RGS10 presentan osteopetrosis y fallos en la diferenciación de osteoclastos. Asimismo, se ha observado una posible implicación de

RGS10 en enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson y la esquizofrenia (Rivero et al., 2012; Tansey and Goldberg, 2010).

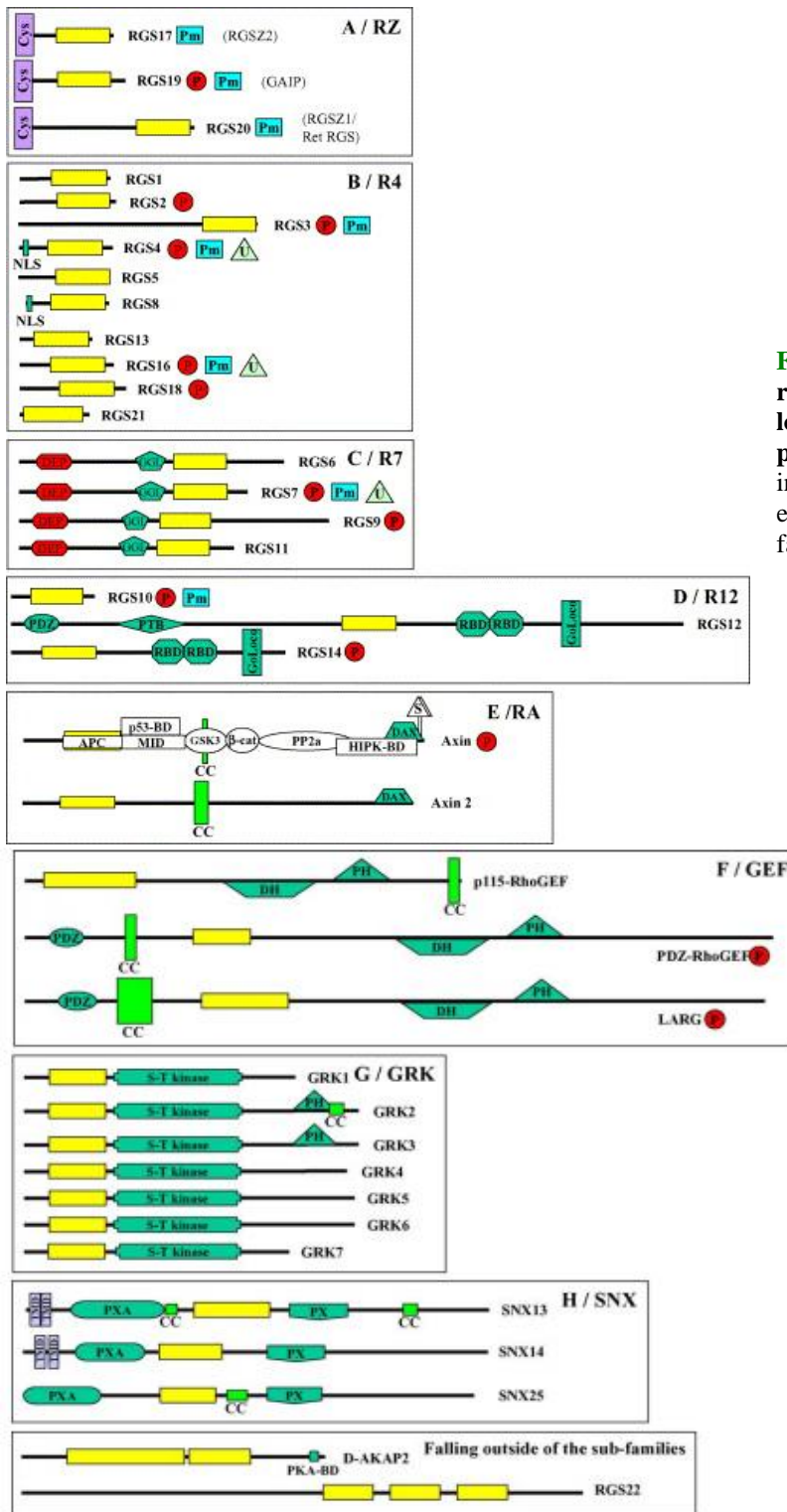


Figura 15. Esquema que representa la distribución de los miembros de la familia de proteínas RGS. En amarillo se indica el dominio RGS común en todas las proteínas de esta familia (Willars, 2006).

Objetivos

1. El primer objetivo de esta tesis consistió en **estudiar el papel de la tirosin-quinasa ZAP-70 en la estimulación por quimioquinas de la adhesión de células T dependiente de la integrina $\alpha 4\beta 1$.**
2. En el segundo objetivo **se analizó la posible implicación de las proteínas adaptadoras SLP-76 y ADAP, y de la tirosin-quinasa Pyk2 durante la adhesión de células T mediada por $\alpha 4\beta 1$ en respuesta a quimioquinas.**
3. El tercer objetivo de esta tesis consistió en **determinar si la adhesión dependiente de $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha L\beta 2$ en células T tras estimulación por quimioquinas estaba regulada por la proteína RGS10.**

Materiales y Métodos

Cultivos celulares y purificación de células T

Las líneas celulares humanas Molt-4 y Jurkat se cultivaron en medio RPMI 1640 (Gibco Invitrogen, Paisley, Reino Unido) suplementado con 7-10% de suero fetal bovino (FBS) (Gibco Invitrogen, Paisley, Reino Unido), 100 U/ml de penicilina y 100 U/ml de estreptomycin (Gibco Invitrogen) (medio completo). La línea celular J14 fue cedida por los Drs. Balbino Alarcón y Aldo J. Borroto (Centro de Biología Molecular, CSIC, Madrid), procedente originalmente del Dr. Gary A. Koretzky (University of Pennsylvania, Philadelphia, EEUU), y fue cultivada en medio completo. Las líneas celulares Jurkat E6.1 y Jurkat-ZAP-70-YFP (transfectantes estables con la construcción ZAP-70-YFP) fueron cedidas por el Dr. Lawrence E. Samelson (NCI, NIH, Bethesda, MD), donde la doctoranda realizó una estancia de dos meses.

Los linfocitos T de sangre periférica (PBL-T) se aislaron de la fracción mononuclear de *buffy coats* procedentes de donantes sanos, utilizando un gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque (1.077 g/ml, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia). Posteriormente las células T fueron aisladas mediante selección negativa usando *beads* magnéticas conjugadas con anticuerpos anti-CD14, anti-CD16, anti-CD19, anti-CD36, anti-CD56, anti-CD123 y anti-Glicoforina A (Pan T Cell Isolation Kit II, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania), y seleccionadas posteriormente bien mediante el sistema de separación magnética AUTOMACs™ (Miltenyi Biotec) o mediante el uso de columnas LS (Miltenyi Biotec).

Anticuerpos

Los anticuerpos utilizados para el desarrollo del presente trabajo se presentan en la siguiente tabla:

ANTICUERPO	ESPECIFICIDAD	TIPO	PROCEDENCIA
P3X63	Ag8 de la proteína murina P3X63 (Control)	IgG1 de ratón	Dr. F. Sánchez-Madrid (Hospital la Princesa, Madrid)
Anti-ADAP	ADAP	IgG1 de ratón	BD Biosciences Pharmingen (San Diego, CA, EEUU)
Anti-Akt	Akt	Policlonal de conejo	Cell Signalling Tech (Danvers, MA)
Anti-Fosfo-Akt	Fosfo-Ser 473 de Akt	IgG de conejo	Cell Signalling Tech
Anti-β1A	Integrina β1	Policlonal de conejo	Dr. G. Tarone (Universidad de Turín, Italia)
TS2/16	Integrina β1	IgG1 de ratón	Dr. F. Sánchez-Madrid (Hospital la Princesa, Madrid)

15/7 β1	Integrina β 1 activa	IgG1 de ratón	Dr. R. Alon (Weizmann Science Institute, Israel)
Huts21	Integrina β 1 activa	IgG1 de ratón	Dr. Carlos Cabañas (CBM, Madrid)
MEM 148	Integrina β 2 activa	IgG1 de ratón	Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA, EEUU)
Anti-β-Actina	β -Actina	Ascites de ratón IgG1	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)
Anti-Cdc42	GTPasa Cdc42	Policlonal de conejo	Santa Cruz Biotechnologies
RP2/21	CD45	IgG1 de ratón	Dr. F. Sánchez-Madrid (Hospital la Princesa, Madrid)
Anti-Erk	Erk1/2	Policlonal de conejo	Cell Signalling Tech
Anti-Fosfo-Erk	Fosfo-Thr202, fosfo Tyr204 de Erk1/2	Policlonal de conejo	Cell Signalling Tech
Anti-G_{ai}	Anti-G _{ai}	Policlonal de cabra	Santa Cruz Biotechnologies
Anti-GFP	Green Fluorescent Protein	Policlonal de conejo	Molecular Probes/Invitrogen (Carlsbad, CA)
Anti-HA	Ag de la Hemaglutinina	Ascites de ratón IgG1	Sigma-Aldrich
Anti-PY20	Fosfo-Tirosina	IgG2b de ratón	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Vav1	Vav	IgG1 de ratón	Santa Cruz Biotechnologies
Anti-FosfoVav1	Vav1 fosforilado	Policlonal de conejo	Dr. X. Bustelo (Centro de Investigación del Cáncer, Salamanca)
Anti-Rac1	GTPasa Rac	IgG2b de ratón	BD Biosciences Pharmingen
Anti-Rap1	GTPasa Rap1	Policlonal de conejo	Santa Cruz Biotechnologies
Anti-RhoA	GTPasa RhoA	IgG1 de ratón	Santa Cruz Biotechnologies
Anti-RhoGDIα	GTPasa Rho GDI	Policlonal de conejo	Santa Cruz Biotechnologies
Anti-RGS10	RGS10	Policlonal de cabra	Santa Cruz Biotechnologies
Anti-Pyk2	Pyk2	Policlonal de conejo	Millipore (Billerica, MA)
Anti-SLP-76	SLP-76	Policlonal de conejo	Santa Cruz Biotechnologies
8D4	Talina	Ascites de ratón IgG1	Sigma-Aldrich
Anti-Vinculina	Vinculina	Ascites de ratón IgG1	Sigma-Aldrich
Anti-ZAP-70	ZAP-70	Policlonal de conejo	Dr. Jose María Rojo (CIB, Madrid)

Tabla 2. Lista de anticuerpos empleados en el presente trabajo.

Vectores de expresión y siRNAs

Vectores de expresión: Los vectores de expresión pEGFP-C1 codificante para GFP, y pcDNA3.1 usados como vectores control de transfección, fueron adquiridos a BD Biosciences Clontech (Palo Alto, CA, EEUU), e Invitrogen (Paisley, Reino Unido, respectivamente), mientras que el vector pSupershRNA procede del Dr. Reuven Agamí (National Cancer Institute, Amsterdam, Países Bajos). Los vectores de expresión que codifican para las formas no modificadas (*wild type*) y las formas dominante negativa (GFP-RacN17) y constitutivamente activa (GFP-RacV12) de Rac fueron donados por el Dr. Francisco Sánchez-Madrid. El vector de expresión PRNK procede del Dr. Ivan Dikic (Goethe University School of Medicine, Frankfurt, Alemania) y fue cedido por el Dr. José Luis Rodríguez-Fernández (CIB, Madrid). El vector de expresión pcDNA3.1-RGS10 fusionado a HA fue obtenido de Missouri S&T cDNA Resource Center (Rolla, MO), mientras que para generar el vector de expresión pSuper-shRNA-RGS10, se usó la secuencia del siRNA para RGS10.1 que se muestra en la Tabla 3. El DNA de esta secuencia fue clonado y se amplificó posteriormente mediante PCR, subclonándose finalmente entre las dianas HindIII y XhoI del vector pSuper-shRNA. Los vectores de expresión pYFP-Vav1 y pTQ-Talina se generaron a partir de los plásmidos pGFP-Talina y pGFP-Vav1 procedentes del Dr. Xosé Bustelo y la Dra. Anna Huttenlocher (Universidad de Wisconsin, Madison, EEUU) usando las dianas de restricción para las enzimas BsrGI y AgeI. A continuación las secuencias que codificaban para talina y Vav1 fueron ligadas en los plásmido pYFP y pTQ, cedidos por el Dr. Samelson, también cortados con las mismas enzimas anteriormente mencionadas.

- **siRNAs empleados:** En la **Tabla 3** se muestran las secuencias de las hebras sentido y complementaria de cada uno de los oligos de RNA empleados en este trabajo y sus bases diana en el gen correspondiente.

siRNA	HEBRA SENTIDO HEBRA COMPLEMENTARIA	BASES DIANA	PROCEDENCIA
CNTRL47	AUUGUAUGCGAUCGCAGAdTdT GUCUGCGAUCGCAUACAAUdTdT	-	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)
Talina-1 (#5552)	GGAAGUUCUUUACUCAGAdTdT UCUGAGUAAAAGAACUUCdTdT	938-956	Ambion Inc.(Austin, TX, EEUU)
ZAP-70	GCAACGUCCUGCUGGUUAAUdTdT UUAACCAGCAGGACGUUGCUdTdT	1601-1621	Dharmacon Inc. (Chicago, IL, EEUU)
ADAP	GAGAUUUC AAGUUUGCCUdTdT AGGGCAAACUUGAAAUCUCdTdT	873-891	Sigma-Aldrich
SLP-76	CAUAGCAAGUUAUAGCCGAdTdT UCGGCUAUAACUUGCUAUGdTdT	1805-1823	Sigma-Aldrich
Pyk2	GAUGUGGUCCUGAAUCGUAdTdT UACGAUUCAGGACCACAUCdTdT	2078-2096	Sigma-Aldrich
Rap1	GAUAGAAGAUUCCUACAGAdTdT UCUGUAGGAAUCUUCUAUCdTdT	378-399	Ambion Inc.
RGS10.1	CAAAGGAGAUCUACAUGACUdTdT GUCAUGUAGAUCUCCUUCUdTdT	341-361	Dharmacon Inc.
RGS10.2	GAACCGCACCCUCUGAUGUUdTdT ACAUCAGAGGGUGCGGUUCUdTdT	433-453	Dharmacon Inc.

Tabla 3. Relación de siRNAs empleados en la presente Tesis. Se indica sus secuencias sentido y complementaria, y las bases del mRNA diana con las que interaccionan.

Transfección celular

La línea celular Molt-4 fue transfectada de forma transitoria mediante nucleofección con los diferentes vectores de expresión u oligos de siRNA. En el caso de los vectores de expresión se utilizó 1.5 µg de cada uno de los vectores, mientras que los siRNAs fueron utilizados a una concentración final de 200 nM. Para ello, las células Molt-4 se cultivaron 48 h antes de la transfección a una confluencia de 2.5×10^5 células/ml, tras lo cual se nucleofectaron con el dispositivo Amaxa Nucleofector™ (Amaxa, Colonia, Alemania), utilizándose inicialmente el protocolo G-10 y posteriormente el C-05, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células Jurkat E6.1 y Jurkat-SLP-76-YFP se nucleofectaron usando el protocolo H-10. Para la nucleofección de linfocitos T humanos de sangre periférica, las células fueron lavadas previamente con PBS/EDTA 0.3 mM, y posteriormente transfectadas utilizando el protocolo U-14 (Amaxa). Las células Molt-4, Jurkat E6.1, Jurkat-ZAP-70 y PBL-T se incubaron a 37°C en medio completo tras su transfección, y tras 24 h las líneas celulares y

16 h las células primarias, se analizó la eficiencia de transfección por citometría de flujo o *western blot*, para evaluar los niveles de expresión de las proteínas de interés.

Western blotting

Las células Molt-4 o PBL-T se sometieron a *starving* privándose de suero durante 3 h antes de la lisis e incubándolas en medio de adhesión [RPMI 1640 / 0.5% BSA (Roche Applied Science, Indianapolis, EEUU)]. A continuación, las células se solubilizaron a 4°C en solución de lisis GST-FISH [1% Nonidet P-40, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 10% glicerol, 1 mM PMSF, 10 μM Na₃VO₄, 2 μM NaF (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO).y 1 μg/ml de cóctel de inhibidores de proteasas (Roche Applied Science)], centrifugándose los lisados (15 min a 4°C a velocidad máxima). A continuación, los sobrenadantes fueron cuantificados mediante Bradford (Protein Assay, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), midiéndose en un espectrofotómetro la cantidad de proteínas a 595 nm. Tras hervir las muestras (50-100 μg de proteína total) en solución de carga (2% SDS, 10% glicerol, 100 mM DTT, 100 mM Tris-HCl pH 6.8), las proteínas fueron separadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, utilizándose porcentajes de entre 7 y 15% (según el tamaño de las proteínas a analizar), en presencia de SDS (SDS-PAGE), y posteriormente electrotransferidas a membranas de PVDF (Bio-Rad Laboratories). Las membranas fueron bloqueadas durante 1 h con TBS al 5% de leche desnatada (o con 3% de BSA en el caso de análisis de proteínas fosforiladas), incubándose a continuación durante 2 h a temperatura ambiente con los anticuerpos primarios correspondientes en solución de bloqueo. Tras lavado (0,1% Tween-20 en TBS), las membranas fueron finalmente incubadas 1 h con anticuerpos secundarios conjugados con HRP (Jackson Immuno Research, West Grove, PA). Las proteínas se visualizaron usando el substrato quimioluminiscente Immobilon Western (Millipore, Billerica, MA). Las bandas así obtenidas fueron densitometradas para su cuantificación en un escáner GS-800 de Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA). Para posteriores análisis, las membranas fueron sometidas a un proceso de *stripping* (30 min a 50°C en una solución que contenía 100 mM 2-β-mercaptoetanol, 2% SDS y 62,5 mM Tris-HCl pH 6,7) para liberar los anticuerpos unidos. A continuación, las membranas fueron lavadas y bloqueadas de nuevo para ser incubadas con distintos anticuerpos, siguiendo el método indicado más arriba.

- **Inmunoprecipitación:** Para llevar a cabo las inmunoprecipitaciones se siguió un protocolo ya descrito (Ticchioni et al., 2002). Las células ($1.5-3 \times 10^7$ por condición para Molt-4 y PBL-T, respectivamente) se sometieron a *starving* 3 h, antes de ser preincubadas en presencia o ausencia de CXCL12, tras lo cual se lisaron con solución de lisis A [(20 mM trietanolamina pH 8.0, 300 mM NaCl, 2 mM EDTA, 20% glicerol, 1 mM PMSF, 1 μ g/ml Leupeptina, 1 μ g/ml Aprotinina, 10 μ M Na_3VO_4 , 2 μ M NaF, 1 μ g/ml de inhibidores de proteasas y un 1% de digitonina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO)]. Los lisados fueron pre-incubados durante 1 h a 4°C con proteína A o proteína G sefarosa (GE Healthcare Bio.Sciences AB, Uppsala, Suecia), dependiendo de la especie y del isotipo del anticuerpo a utilizar, con el fin de inhibir interacciones inespecíficas. Posteriormente, los sobrenadantes se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes durante 16 h a 4°C, seguido del acoplamiento específico de dichos anticuerpos a *beads* de proteína A o proteína G sefarosa durante al menos 2 h. Finalmente, las proteínas unidas fueron eluídas en solución de carga, resueltas por SDS-PAGE y analizadas por *western blot*. En algunos experimentos se utilizó el inhibidor piceatannol (Calbiochem, Darmstadt, Alemania), un inhibidor de la actividad de ZAP-70. Dicho inhibidor fue incubado con las células en medio de adhesión durante 3 h a 25 μ M, una condición que no resultó citotóxica, tal y como mostraron ensayos de ciclo celular analizados por citometría de flujo (datos no mostrados). Como reactivo control de incubación con piceatannol se usó DMSO (Sigma-Aldrich), el cual fue incubado en las mismas condiciones que el inhibidor.
- **Ensayos de actividad GTPasa:** Las proteínas de fusión GST-PAK-CD, GST-C21 (cedidas por el Dr. John G. Collard, The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, Países Bajos) y Ral-GDS (donada por el Dr. Johannes L. Bos, Universidad de Utrecht, Países Bajos), las cuales reconocen formas activas de Rac1, RhoA y Rap1, respectivamente, fueron preparadas como se ha descrito previamente (Sander et al., 1998). En el caso de GST-PAK-CD, ésta puede ser usada tanto para unir formas activas de Rac1 como de Cdc42. Las células Molt-4 (3×10^7 por condición) fueron mantenidas durante 2 h en medio de adhesión, y a continuación, las suspensiones celulares se incubaron a 37°C durante distintos tiempos con CXCL12 (200 ng/ml), seguido de un rápido lavado con PBS frío para detener la reacción. Posteriormente, las células fueron lisadas en 400 μ l de solución de lisis GST-FISH, y tras la clarificación de los sobrenadantes, una alícuota (15 μ l) de cada muestra fue recogida como control del lisado total. El resto del sobrenadante fue incubado durante 16 h a 4°C con las proteínas de fusión en presencia de glutation-sefarosa

(GE Healthcare). Tras centrifugar y lavar las *beads*, estas se hirvieron en solución de carga para eluir las proteínas unidas. Las proteínas se resolvieron en geles de poliacrilamida al 12% en presencia de SDS, y se transfirieron a membranas de PVDF, las cuales fueron incubadas con anticuerpos anti-Rac1, anti-Cdc42, anti-Rap1 o anti-RhoA.

- **Ensayos de fraccionamiento celular:** Se sometieron a *starving* a las células Molt-4 (3×10^6 de células por condición), tras lo cual fueron expuestas a CXCL12 durante los diferentes tiempos. A continuación se resuspendieron en 500 μ l de buffer hipotónico de extracción (5 mM Tris pH 7.5, 10 mM NaCl, 0.5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 40 μ g/ml digitonina, 5 μ g/ml aprotinina, 10 μ g/ml leupeptina, 1 mM PMSF, 1 mM Na₃VO₄), incubándose en hielo durante 10-15 min. A continuación los lisados fueron centrifugados (30 min a 4°C a velocidad máxima) recogiendo el sobrenadante (fracción citosólica). El pellet (fracción membranal) se incubó en hielo durante 20 min con 50-100 μ l de solución de lisis B (10 mM Tris pH 7.5, 40 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0,2% NP-40, 5 μ g/ml aprotinina, 10 μ g/ml leupeptina, 1 mM PMSF, 1 mM Na₃VO₄), tras lo cual se centrifugó 30 min a velocidad máxima, recogiendo el sobrenadante (fracción de membrana). Las proteínas de cada fracción se analizaron mediante *western blot* utilizando RhoGDI y CD45 como controles de la fracción citosólica y de membranas, respectivamente.

Ensayos de adhesión celular estática

Las proteínas recombinantes que se usaron para los ensayos de adhesión en la presente Tesis fueron el fragmento recombinante FN-H89 de la fibronectina, que contiene la región CS-1 (Mould et al., 1994) y las proteínas recombinante humana solubles VCAM-1 formada por los dominios 1-4 (Munoz et al., 1996) y ICAM-1 (Marlin et al., 1990), fusionadas a la porción Fc de IgG1. La FN-H89 se obtuvo a partir de bacterias DH5- α transformadas con el vector pGEX-2T conteniendo el inserto codificante para FN-H89. Tras crecer las bacterias estas fueron lisadas por sonicación con solución de lisis bacteriana (150 mM NaCl pH 7.5, 50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 1% TritónX-100, 2mM PMSF, 2.5 μ g/ml leupeptina y 10 μ g/ml aprotinina) y tras centrifugar el sobrenadante se paso por una columna de glutatión-agarosa, donde quedó retenida la proteína de fusión GST-FN-H89, que se eluyó usando la solución de elución A (5 mM glutatión (Sigma-Aldrich), 50 mM Tris-HCl y 0.2 M PMSF). Una vez obtenida la proteína purificada se digirió con trombina (15 unidades/g proteína obtenido) (Sigma-

Aldrich) y la digestión se pasó por una columna de heparina-sepharosa (GE Healthcare) donde quedó retenida la FN-H89 que se eluyó con solución de elución B (500 mM NaCl pH 7.4, 10 mM Tris-HCl y 1mM PMSF). Por último la FN-H89 se dializó en PBS. Para la obtención del VCAM-1-Fc las células COS7 fueron transfectadas con el plásmido pVCAM4D+Fc recogiendo el sobrenadante de las células tras 3 días de cultivo en DMEN (Gibco Invitrogen) completo (10% FBS). La construcción ICAM-1-Fc fue obtenida del sobrenadante de crecer la línea celular CHO-ICAM-1-Fc en DMEN completo. Las proteínas de adhesión se purificaron de los sobrenadantes usando columnas de proteína sefarosa-A. Una vez obtenidas las proteínas, estas fueron tapizadas en placas de 96 pocillos (High Binding, Costar, Cambridge, MA) en solución de tapizado (0.1 M NaHCO₃, pH 8.8) a una concentración final de 5 µg/ml en el caso de FN-H89, 3 µg/ml para el VCAM-1-Fc y 5-7 µg/ml para el ICAM-1-Fc. Previamente a la adhesión, las células no transfectadas o transfectadas con los distintos siRNA o con los vectores de expresión, fueron marcadas con 2', 7'-bis (carboxietil)-5 (6')-carboxifluorescein-acetoximetilester (BCECF-AM) (Molecular Probes, Leiden, Países Bajos) durante 30 min a 37°C. Posteriormente, las células se resuspendieron en medio de adhesión, y fueron añadidas por triplicado (7.5x10⁴ para Molt-4, Jurkat y J14, y 1.25x10⁵ para PBL-T, respectivamente), en un volumen final de 100 µl a los pocillos que contenían VCAM-1, FN-H89 o ICAM-1, inmovilizados en ausencia o presencia de las quimioquinas CXCL12 (650 ng/ml) (R&D Systems, Inc. Minneapolis, MN) o CCL21 (Peprotech, London, UK). Tras una breve centrifugación de 15 seg para favorecer el decantamiento de las células al fondo del pocillo, las placas se incubaron durante 2 min a 37°C, seguido de varios lavados con medio RPMI 1640 sin suero para eliminar las células no adheridas. Posteriormente las células adheridas fueron lisadas con 0.1% SDS en PBS, y la adhesión se determinó mediante un analizador de fluorescencia para placas (Polar Star Galaxy, BMG Labtechnologies, Offenburg, Alemania). En los ensayos realizados con células transfectadas con GFP, tras la adhesión de 2 min a 37°C y los subsiguientes lavados, las células adheridas fueron despegadas, contadas y analizadas mediante citometría de flujo para determinar el porcentaje de células transfectadas con GFP adheridas. En algunos ensayos de adhesión se utilizó piceatannol a la misma concentración y tiempo anteriormente indicados, o la toxina *pertussica* (Calbiochem, Darmstadt, Alemania), la cual inhibe a la proteína G α_i , y que fue añadida a las células (16 h, 100 ng/ml) en medio de adhesión antes de realizar el ensayo de adhesión.

Ensayos de adhesión celular en cámaras de flujo

Los ensayos de adhesión celular en cámaras de flujo con células T humanas transfectadas se realizaron siguiendo el método descrito (Stein et al., 2003). Para ello se tapizaron placas petri con 15 μl de una solución de PBS con VCAM-1-Fc (1 $\mu\text{g/ml}$) (R&D Systems) en presencia o ausencia de CXCL12 (650 ng/ml), y posteriormente las placas fueron incorporadas como pared inferior de una cámara de flujo (**Figura 16**). Las diferentes suspensiones celulares fueron perfundidas a 1 ml/min antes de ajustar el flujo a 1 dina/cm² (0.204 ml/min). El campo estudiado fue observado con el objetivo 10x de un microscopio invertido, usando contraste de fase, y las interacciones celulares se grabaron durante 4 min para su posterior análisis. En los distintos tipos de transfectantes estudiados, se procedió a filmar el mismo campo visual para así excluir posibles diferencias originadas por una diferente densidad del ligando tapizado. Asimismo, los diferentes transfectantes fueron perfundidos en orden alternativo para controlar un posible efecto de lavado de los ligandos provocado por una perfusión prolongada durante el experimento. Se definió *adhesión estable* a aquellas células que inicialmente hicieron *rolling* y que posteriormente llevaron a cabo un proceso de adhesión firme al menos durante 20 segundos. Por otro lado, al grupo de células que interaccionaron y se adhirieron de forma transitoria y que a continuación hicieron *rolling* de nuevo se les denominó con el término de *adhesión transitoria* (células que se adhirieron un máximo de 5 segundos), mientras que a la fracción de células que interaccionaron pero que no se adhirieron firmemente en ningún momento se les denominó con el término de *rolling*. Para evaluar la resistencia al flujo, las células fueron sometidas a una fase de decantamiento sin flujo de 4 min para permitir así su adhesión. Tras ello se aplicó un flujo de 1 dina/cm², que se fue aumentando de forma creciente en 1 dina/cm² cada 30 segundos hasta alcanzar 10 dinas/cm². El número de células que permanecieron adheridas en cada incremento de flujo se determinó como el porcentaje referido al número total de células adheridas tras el periodo inicial de adhesión de 4 min.

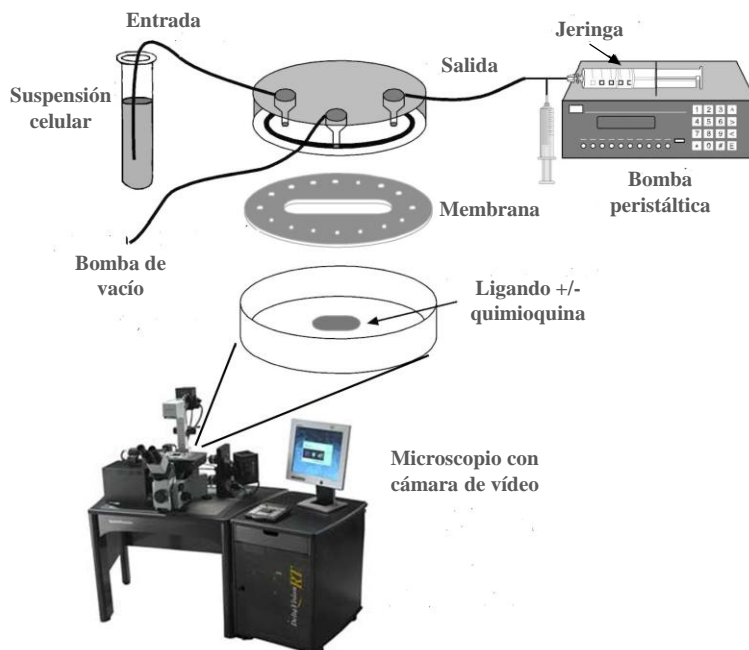


Figura 16. Sistema *in vitro* de adhesión en cámara de flujo y dispositivo de videomicroscopía utilizado para la grabación a tiempo real de la adhesión de células T en condiciones que simulan el flujo sanguíneo fisiológico.

Citometría de flujo

Las células transfectadas con construcciones GFP fueron analizadas en un citómetro Coulter Epics XL (Beckman-Coulter, Brea, CA) a una concentración de 5×10^5 células/ml. En células no transfectadas o transfectadas transitoriamente, éstas fueron incubadas durante 30 min en hielo con los anticuerpos primarios (10 $\mu\text{g/ml}$) en PBS y en presencia de gammaglobulinas humanas (10 $\mu\text{g/ml}$). Tras un paso de lavado mediante centrifugación en PBS frío, las células se incubaron durante 30 min a 4°C en oscuridad con los anticuerpos secundarios conjugados con fluoresceína (FITC, Jackson Immunoresearch Lab., West Grove, PA) o Alexa 488 (Dako Denmark A/S, Glostrup, Dinamarca), analizándose finalmente en el mismo citómetro de flujo indicado anteriormente.

- **Ensayos de unión soluble de VCAM-1 y ICAM-1:** Para los ensayos de unión soluble de VCAM-1 se utilizó el procedimiento anteriormente descrito (García-Bernal et al., 2005b). Las células Molt-4 nucleofectadas con distintos siRNA fueron sometidas a *starving* y posteriormente se resuspendieron en 25 μl de solución de unión A (HBSS, Gibco Invitrogen, suplementado con 2% FBS) a una concentración de 2×10^6 células/ml, pre-incubándose a continuación durante 20 min a 37°C en presencia o ausencia de anticuerpos (10 $\mu\text{g/ml}$). Posteriormente, las células fueron incubadas durante 45 segundos

a 37°C en solución de unión, en ausencia o presencia de CXCL12 (200 ng/ml), tras lo cual se añadió VCAM-1-Fc a concentraciones previamente conocidas como saturantes (20 µg/ml), procediéndose finalmente a una incubación durante 75 segundos a 37°C. En las condiciones que implicaban exposición a Mn²⁺, tras la pre-incubación con anticuerpos, las células se incubaron directamente con VCAM-1-Fc en solución de unión suplementado con 1 mM de MnCl₂. La unión de VCAM-1-Fc fue detenida mediante lavado con solución de unión A fría (conteniendo 0.5 mM de MnCl₂ en el caso de las células estimuladas con Mn²⁺). Cuando se realizaron ensayos de unión de ICAM-1 soluble, los transfectantes fueron resuspendidos en solución de unión B (20 mM HEPES pH 7.2, 140 mM NaCl, 2 g/l de glucosa, con 0,1% de BSA en HBSS), añadiéndose 20 µl de células (2 x 10⁵/pocillo) en placas de 96 pocillos en presencia o ausencia de 5 mM Mg²⁺ y 1 mM EGTA. A continuación se añadió ICAM-1-Fc (R&D Systems) (200 µg/ml), incubándose con las células durante 30 min a 37°C, tras lo cual las células fueron estimuladas durante 60 segundos con CXCL12 (650 ng/ml). La unión de ICAM-1-Fc fue detenida mediante lavado con solución de unión B fría. Tanto el VCAM-1-Fc como el ICAM-1-Fc unidos fueron detectados mediante citometría de flujo usando un anticuerpo anti-fragmento F(ab')₂ humano conjugado con ficoeritrina (Jackson Immuno Research Lab., West Grove, Pennsylvania).

- **Detección de integrinas β1 y β2 activas:** Para detectar la activación de la integrina β1, las células Molt-4 nucleofectadas con distintos siRNA fueron sometida previamente a *starving*. Posteriormente se resuspendieron en 25 µl de solución de unión a una concentración de 2x10⁶ células/ml. A continuación, las células fueron incubadas durante 45 segundos a 37°C con CXCL12 (200 ng/ml), o solamente en solución de unión, tras lo cual se añadieron los anticuerpos anti-β1 15/7 o HUTS-21, ambos capaces de reconocer epítomos de activación en integrinas β1. Estos anticuerpos fueron utilizados a una concentración final de 10 µg/ml, y se incubaron durante 30 min a 4°C. En los experimentos que implicaban exposición a Mn²⁺, las células se incubaron directamente con los mencionados anticuerpos anti-β1 en solución de unión suplementado con 1 mM de MnCl₂. La unión del anticuerpo fue detenida mediante lavado con solución de unión fría (conteniendo 0.5 mM de MnCl₂ en el caso de las células estimuladas con Mn²⁺). Para la detección de la activación de integrinas β2, tras *starving* las células Molt-4 transfectadas con distintos siRNA y resuspendidas en buffer HEPES, se incubaron con el anticuerpo anti-β2 MEM148 (10 µg/ml), capaz de reconocer la conformación de alta

afinidad de la subunidad $\beta 2$ de la integrina, durante 10 min a 37°C, seguido de estimulación con CXCL12 (650 ng/ml) durante 5 min. Tras lavar con buffer HEPES frío, las muestras se incubaron durante 30 min a 4°C en oscuridad con los anticuerpos secundarios conjugados con fluoresceína (FITC) (Jackson ImmunoResearch Lab), analizándose finalmente en el citómetro de flujo.

- **Ensayos de polimerización de actina:** Para determinar el contenido de actina polimerizada (F-actina) inducida por CXCL12, se realizó un *starving* previo a las células Molt-4 en medio de adhesión. A continuación, las células (1×10^6 células/ml por condición) fueron expuestas a dicha quimioquina (200 ng/ml) durante 0.5 y 1 min, incubándose posteriormente durante 10 min a temperatura ambiente con la solución de tinción [100 μ g/ml Faloidina-FITC, 7.4% formaldehído, 1 mg/ml L- α -lisofosfatidil colina (Sigma-Aldrich)]. Tras el periodo de incubación las células fueron lavadas con PBS y analizadas con un citómetro de flujo.

- **Ensayos de movilización de calcio:** Las células nucleofectadas con distintos siRNA se sometieron a *starving* y posteriormente fueron lavadas dos veces en medio HBSS en presencia de 1% FBS, 1 mM CaCl_2 y 1 mM MgCl_2 , tras lo cual fueron incubadas durante 45 min a 37°C con los reactivos fluorescentes sensibles a Ca^{2+} Fluo3-AM (4 μ M) y FuraRed-AM (10 μ M) (Molecular Probes). A continuación las células se incubaron con CXCL12 (200 ng/ml) durante distintos tiempos, midiéndose posteriormente la relación de fluorescencia Fluo3-AM/FuraRed-AM por citometría de flujo. Como control positivo de movilización de Ca^{2+} se utilizó ionomicina (1 μ M) (Sigma-Aldrich).

- **Ensayos de quimiotaxis:** Los transfectantes (3×10^5 por condición) fueron resuspendidos en medio de adhesión y añadidos a la parte superior de los filtros de cámaras Transwell (Costar) de 5 μ m de tamaño de poro. Los compartimentos inferiores se llenaron con 600 μ l de medio de adhesión con o sin CXCL12 (200 ng/ml), procediéndose a una incubación de 4 h a 37°C. El grado de quimiotaxis celular fue analizado en un citómetro de flujo, para lo cual se pasó cada muestra en las mismas condiciones de tiempo y velocidad de flujo.

Microscopía confocal

Los ensayos de microscopía confocal fueron realizados durante la estancia de la doctoranda en el laboratorio del Dr. Lawrence E. Samelson (NCI, NIH, Bethesda, MD),

siguiéndose un protocolo ya establecido en dicho laboratorio para la visualización de *clusters* de proteínas (Bunnell et al., 2003). Para dichos experimentos se usaron las líneas celulares Jurkat E6.1 y Jurkat-ZAP-70-YFP, las cuales se transfectaron con diferentes vectores de expresión. Después de 24 h desde la transfección, las células fueron añadidas a cámaras de 4 pocillos (Lab-Tek II Chambered #1.5 German Coverglass System, Thermo Fisher Scientific Inc., NY, USA) tapizadas previamente con anti-CD3 (10 µg/ml). Tras distintos tiempos de incubación, las células se fijaron con PBS al 2.4% de paraformaldehído (Sigma-Aldrich) durante 30 min a 37°C y se permeabilizaron con tritón X-100 0.1%. A continuación, las células se incubaron con anticuerpos primarios durante 1 h a temperatura ambiente y tras lavarse con PBS se añadió el anticuerpo secundario, incubándose asimismo 1 h a temperatura ambiente. Por último, se procedió a la captura de las distintas imágenes utilizando el objetivo de inmersión 60x de un microscopio confocal ZEISS LSM 510 (Oberkochen, Alemania). Las imágenes obtenidas se analizaron usando el programa ZEISS LSM Image Browser.

- **Ensayos de *spreading* celular:** Para analizar el *spreading* celular, los transfectantes fueron adheridos durante distintos tiempos a cubres tapizados con VCAM-1 en presencia o ausencia de CXCL12. A continuación, las células fueron fijadas con PBS/4% paraformaldehído durante 15 min, lavadas y montadas con mowiol. Las células fueron analizadas por microscopía confocal mediante visualización por Nomarski e IRM, representándose el porcentaje de *spreading* celular tras el análisis de diversos campos representativos.

Análisis estadístico

La prueba T de Student fue utilizada para analizar las diferencias estadísticamente significativas entre medias de pares de datos. Para tres o más condiciones, los datos fueron analizados mediante análisis de la varianza (ANOVA) seguido de un análisis de comparación múltiple de Tukey-Kramer. En ambos tipos de análisis, el nivel de significación fue $p < 0,05$. Las diferencias significativas fueron representadas como *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ y * $p < 0,05$.

Resultados

1. PAPEL DE ZAP-70 EN LA ESTIMULACIÓN POR QUIMIOQUINAS DE LA ADHESIÓN DE CÉLULAS T DEPENDIENTE DE LA INTEGRINA $\alpha 4\beta 1$.

La disociación del complejo Vav1-talina en respuesta a quimioquinas es dependiente de ZAP-70.

Se ha descrito anteriormente que Vav1 y talina interaccionan entre sí (Fischer et al., 1998). Estudios previos de nuestro grupo indican que las quimioquinas CXCL12 y CCL21 inducen una disociación del complejo Vav1-talina en células T, lo que es esencial para la estimulación de la adhesión dependiente de la integrina $\alpha 4\beta 1$ (García-Bernal et al., 2009). Dichos estudios revelaron asimismo que CXCL12 promueve una coimmunoprecipitación gradual de Vav1 y ZAP-70 en paralelo a la disminución de la asociación entre Vav1 y talina (Figura 17). Al mismo tiempo se observó que la inducción de la asociación Vav1-ZAP-70 estaba asociada a la estimulación de la fosforilación de Vav1 por CXCL12.

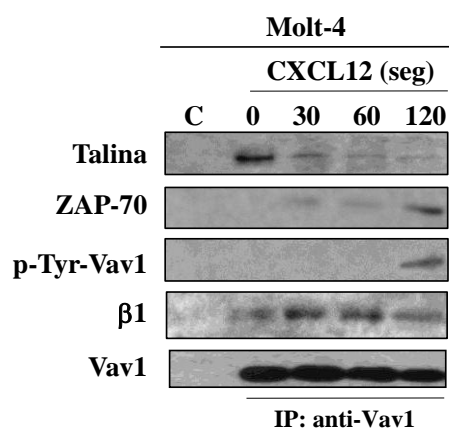


Figura 17. Dinámica de las asociaciones entre Vav1-talina y ZAP-70, y de la fosforilación de Vav1 en respuesta a CXCL12 en células T. Las células Molt-4 fueron incubadas con CXCL12 durante los tiempos indicados y tras lisarlas, los extractos fueron inmunoprecipitados con anticuerpos anti-Vav1 o control (C) seguido de *western blot* utilizando los anticuerpos frente a las proteínas mostradas.

Estos resultados sugirieron la posibilidad de que si la disociación Vav1-talina estuviera basada en la actividad de ZAP-70, podría ocurrir que al inhibir dicha quinasa, ésto pudiera traducirse en una alteración del desensamblaje entre Vav1 y talina tras estimulación con CXCL12. Cuando incubamos las células Molt-4 con piceatannol, un inhibidor de ZAP-70, observamos que dichas células presentaban una resistencia a la disociación del complejo Vav1-talina en comparación con las células preincubadas con el solvente control DMSO (Figura 18A). De modo similar, el silenciamiento de ZAP-70 mediante RNA de interferencia se tradujo en una reducción de la disociación Vav-talina en respuesta a CXCL12 en relación con células transfectadas con siRNA control (Figura 18B). En paralelo a la resistencia a la disociación del complejo Vav-talina cuando se

inhibió ZAP-70, la fosforilación en tirosinas de Vav1 se vio inhibida, tanto en células Molt-4 como en linfocitos T de sangre periférica (PBL-T), al tratar las células con picetannol o al deplecionar la expresión de ZAP-70 (Figura 18A-C). Sin embargo, la asociación entre Vav1 y ZAP-70 no sufrió alteraciones al inhibir la actividad de esta quinasa (Figura 18C).

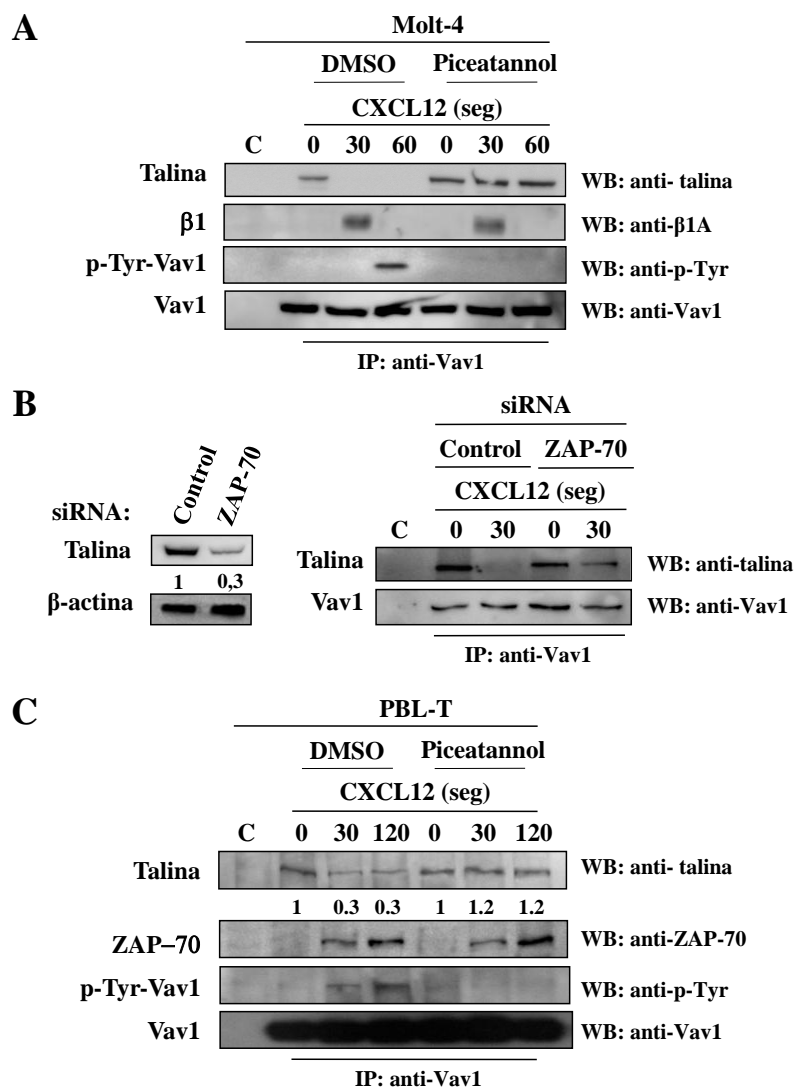


Figura 18. ZAP-70 es esencial para la disociación Vav1-talina en respuesta a CXCL12 en células T. Las células Molt-4 (A) y PBL-T (C) fueron pretratadas durante 3 horas con picetannol (25 μ M) o con el solvente control DMSO. Asimismo, se transfectaron las células Molt-4 con siRNA ZAP-70 o control (B). Posteriormente las células tratadas o transfectadas se incubaron con CXCL12 durante los tiempos mostrados y tras lisarlas, los extractos fueron inmunoprecipitados con anticuerpos anti-Vav1, seguido de *western blot* utilizando los anticuerpos indicados.

Para estudiar si la asociación entre Vav1 y ZAP-70 requería la formación previa del complejo Vav1-talina, silenciamos talina y estudiamos el grado de co-precipitación entre Vav1 y ZAP-70 en ensayos de inmunoprecipitación utilizando anticuerpos anti-

Vav1. Los resultados mostraron que las células deficientes en talina tenían impedida la asociación Vav1-Zap-70 (**Figura 19A**). Junto con la ausencia de fosforilación de Vav1 en células deficientes en talina (Garcia-Bernal et al., 2009), los presentes resultados sugieren que la fosforilación de Vav1 dependiente de ZAP-70, pero no la asociación inicial Vav1-ZAP-70, es requerida para el desensamblaje del complejo Vav1-talina. Contrario al defecto en la disociación entre Vav1-talina en células silenciadas para ZAP-70, la asociación talina- β 1 estimulada por CXCL12 no se vio afectada, indicando que la formación de este complejo no depende del desensamblaje de Vav1-talina (**Figura 19B**).

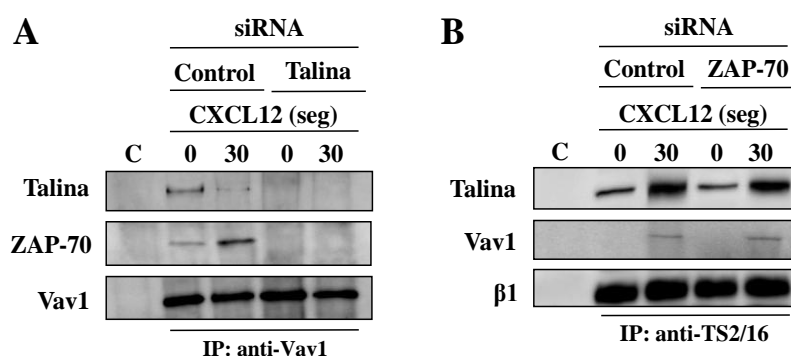


Figura 19. La unión de ZAP-70 a Vav1 depende de la asociación previa entre Vav1 y talina. Las células Molt-4 se transfectaron con siRNA de talina (**A**) o ZAP-70 (**B**), y posteriormente los transfectantes se incubaron con CXCL12 durante los tiempos indicados. Tras lisis celular, los extractos fueron inmunoprecipitados con anticuerpos anti-Vav1 o anti- β 1 (TS2/16), seguido de *western blot* utilizando los anticuerpos frente a las proteínas mostradas.

ZAP-70 es esencial en la adhesión de células T dependiente de α 4 β 1 en respuesta a quimioquinas.

Con el fin de analizar el papel de ZAP-70 en la adhesión de células T dependiente de α 4 β 1 en respuesta a CXCL12, utilizamos células Molt-4 pre-incubadas con picetannol o transfectantes silenciados en ZAP-70 en ensayos de adhesión a VCAM-1. Los resultados mostraron que ambos tratamientos causaron un bloqueo de dicha adhesión estimulada por CXCL12 (**Figura 20**). Dicha inhibición fue debida tanto a un defecto en la adquisición de conformaciones activas de α 4 β 1, como a un deficiente reforzamiento de la adhesión mediada por esta integrina en células deficientes en ZAP-70. Estos parámetros fueron detectados mediante citometría de flujo utilizando el anticuerpo anti- β 1 15/7 (**Figura 21A**), el cual reconoce formas de alta afinidad de α 4 β 1 (Picker et al., 1993), y en experimentos de unión soluble de VCAM-1-Fc (**Figura 21B**), que mide el reforzamiento de la interacción α 4 β 1-VCAM-1 en ausencia de *spreading* celular. En experimentos

control se observó que los transfectantes siRNA control y ZAP-70 unieron niveles similares del anticuerpo 15/7 y de VCAM-1-Fc tras la estimulación con Mn^{2+} , el cual constituye un control positivo de la regulación de la afinidad. En conjunto, estos datos indican que CXCL12 promueve la unión de ZAP-70 a Vav1 cuando este GEF está unido a talina. Posteriormente se produce la estimulación de la fosforilación de Vav1 dependiente de ZAP-70, lo que se traduce en una reducción de la asociación Vav1-talina, un paso esencial para la progresión de la adhesión de células T estimulada por quimioquinas y mediada por la integrina $\alpha4\beta1$.

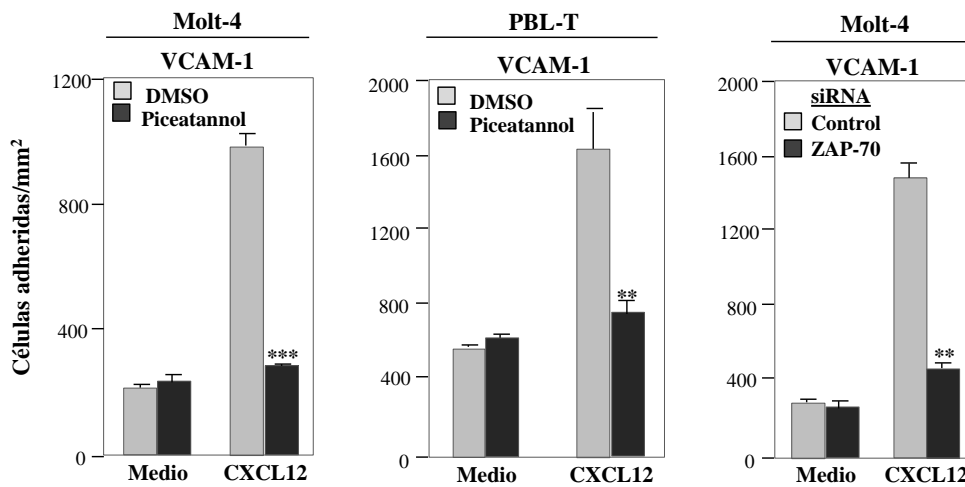


Figura 20. ZAP-70 es requerido en la adhesión dependiente de $\alpha4\beta1$ en respuesta a CXCL12. Las células se incubaron con piceatannol o DMSO (izquierda y centro, respectivamente), o fueron transfectadas con siRNA control o ZAP-70 (derecha), y posteriormente sometidas a ensayos de adhesión a VCAM-1 en presencia o ausencia de CXCL12. La adhesión fue significativamente inhibida (***) $p < 0.001$, ** $p < 0.01$).

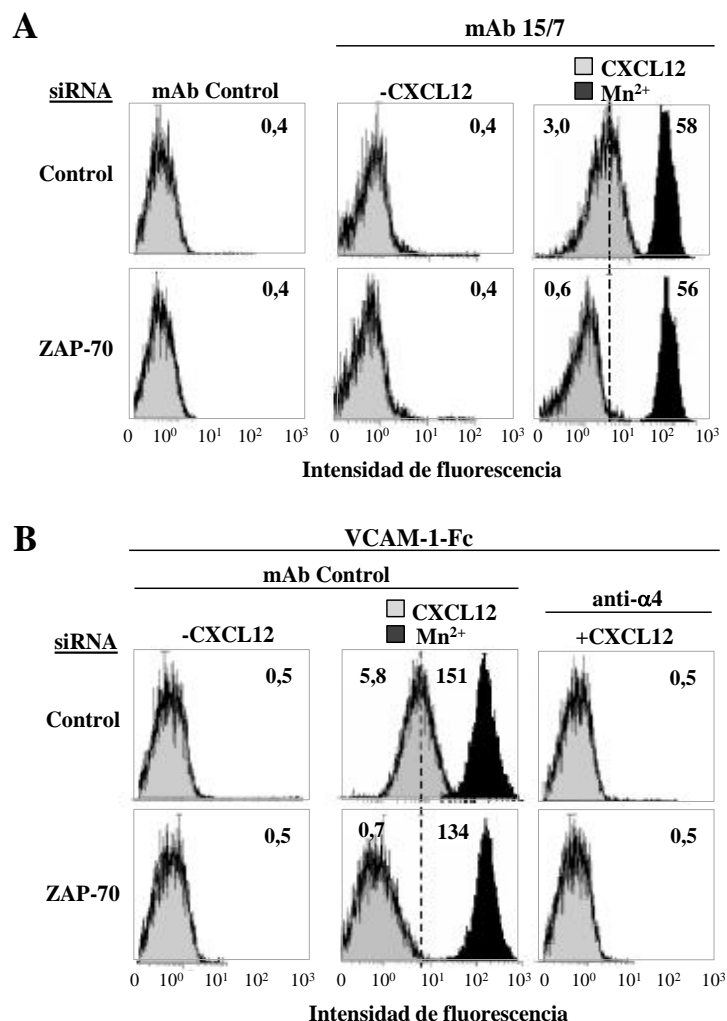


Figura 21. El silenciamiento de ZAP-70 en células T reduce la unión del anticuerpo 15/7 y de VCAM-1-Fc tras estimulación con CXCL12. Las células Molt-4 transfectadas con siRNA control o ZAP-70 fueron pre-incubadas con anticuerpos control o anti- α 4, y posteriormente tratadas en ausencia o presencia de CXCL12 o Mn²⁺, antes de añadir el anticuerpo 15/7 (A) o VCAM-1-Fc (B). La unión de estos reactivos fue detectada por citometría de flujo. Los números insertados en cada panel representan los valores de la intensidad media de fluorescencia. Se muestra un resultado representativo de 3 experimentos independientes.

Papel de ZAP-70 en la asociación Vav1-talina en células T dependiente de TCR.

Tal y como se ha indicado anteriormente, estudios previos indican que la talina está asociada de forma constitutiva con Vav1 en células T, y que la formación del complejo Vav1-talina es independiente de activación del TCR (Fischer et al., 1998). Por otro lado, nuestros resultados muestran la importancia de la asociación Vav1-talina en la adhesión dependiente de α 4 β 1 de células T en respuesta a CXCL12 (García-Bernal et al., 2009). Durante su estancia de 10 semanas en el laboratorio del Dr. Larry Samelson (NIH, Bethesda, USA), un investigador con gran experiencia en el estudio por microscopía

confocal de la señalización implicada en la activación del TCR de linfocitos T, la autora de la presente Tesis analizó si la asociación Vav1-talina puede ser regulada asimismo tras la estimulación del TCR. Los resultados se muestran a continuación y representan un estudio preliminar de esta hipótesis. Los experimentos de microscopía confocal revelaron que en células Jurkat transfectadas con los vectores de expresión Vav1-YFP y talina-TQ, existía una clara co-localización entre Vav1 y talina tras 2 min de incubación con anti-CD3, perdiéndose dicha asociación transitoriamente, ya que se pudo detectar de nuevo a los 5 min de incubación (**Figura 22**). Asimismo, se observó que los *clusters* Vav1-talina co-localizaban con el marcaje de fosforilación en tirosinas.

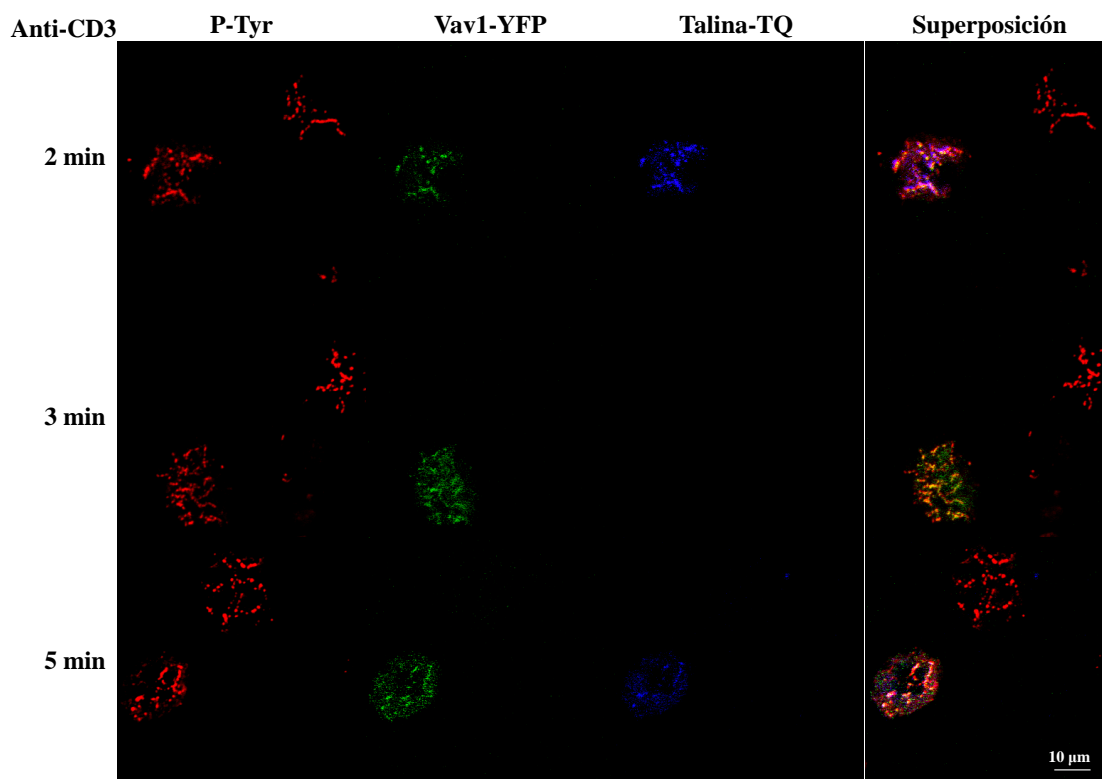


Figura 22. La estimulación del TCR induce alteraciones en la co-localización entre Vav1 y talina. Las células Jurkat E6.1 transfectadas con los vectores pEYFP-Vav1 y pTQ-talina fueron estimuladas durante los tiempos indicados con anti-CD3 y analizadas mediante microscopía confocal. Se muestran asimismo la tinción con anticuerpos anti-fosfotirosinas.

En la figura 17 de la presente tesis se muestra la asociación entre talina y ZAP-70 tras la estimulación con CXCL12. Empleando células Jurkat transfectadas establemente con la construcción ZAP-70-YFP, observamos que cuando transfectamos el vector de expresión talina-TQ y estimulamos las células con anti-CD3, se observa una co-localización entre talina y ZAP-70 tras 2-3 min de estimulación del TCR, perdiéndose

esta co-localización tras 5 min de estimulación (**Figura 23**). En conjunto estos datos sugieren que la estimulación del TCR favorece cambios dinámicos en los complejos entre Vav1, talina y ZAP-70, e indica la presencia de marcaje fosfotirosina asociada a los *clusters* de talina. Estas observaciones serán posteriormente estudiadas en experimentos de co-inmunoprecipitación.

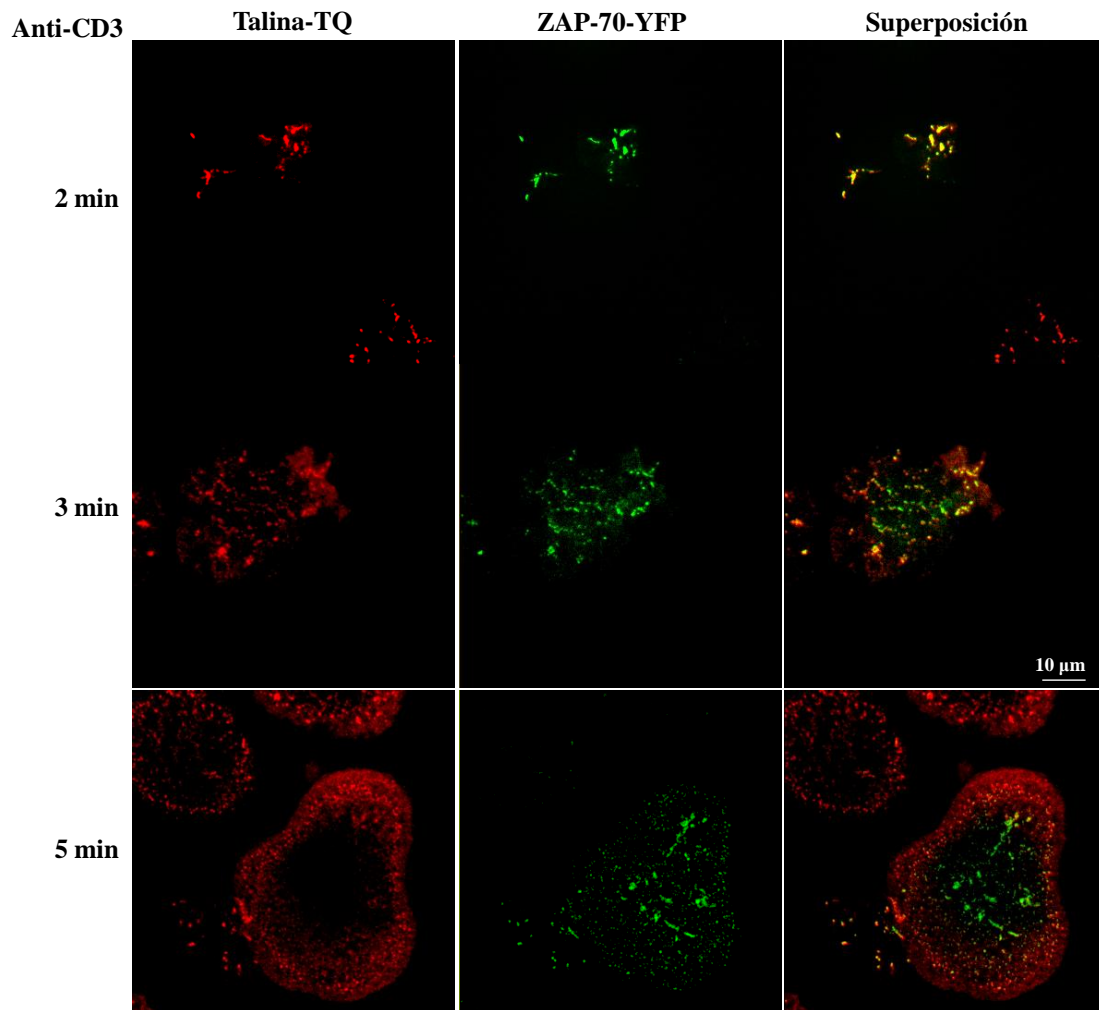


Figura 23. Dinámica de la asociación entre talina y ZAP-70 tras la estimulación del TCR. Las células Jurkat ZAP-70-YFP fueron transfectadas con el vector de expresión pTQ-talina, estimuladas con antiCD3 y analizadas mediante microscopía confocal.

2. PAPEL DE SLP-76, ADAP Y PYK2 EN LA REGULACIÓN DE LA ADHESIÓN DE CÉLULAS T DEPENDIENTE DE $\alpha 4\beta 1$ EN RESPUESTA A QUIMIOQUINAS.

Dado que Vav1 es una proteína que ejerce un fuerte control sobre la estimulación por quimioquinas de la adhesión de células T mediada por $\alpha 4\beta 1$ (Garcia-Bernal et al., 2009; Garcia-Bernal et al., 2005b), estudiamos el papel en dicha adhesión de proteínas que se unen a Vav1. Este es el caso de SLP-76 y Pyk2, así como de ADAP, una proteína que se asocia a SLP-76 y que regula la adhesión de células T mediada por integrinas $\beta 1$ y $\beta 2$ en respuesta a TCR (Kliche et al., 2006).

Papel de SLP-76 y ADAP en la adhesión de células T dependiente de $\alpha 4\beta 1$ en respuesta a quimioquinas.

Una de las respuestas que tienen lugar tras la activación del TCR es la fosforilación por ZAP-70 de varias proteínas adaptadoras, entre las que se encuentra SLP-76 (Weiss, 1993). Una vez activada, SLP-76 sirve de anclaje para otras proteínas como son Vav1 y ADAP. Para analizar si CXCL12 podía estimular la formación de complejos entre SLP-76, Vav1 y ADAP, realizamos ensayos de inmunoprecipitación utilizando células Molt-4, los cuales revelaron que dicha quimioquina promueve un incremento rápido y transitorio en la asociación de SLP-76 con Vav1 y ADAP (**Figura 24A, B**). Asimismo, la unión SLP-76-ZAP-70 fue transitoriamente aumentada por CXCL12, y detectamos adicionalmente que SLP-76 es capaz de asociarse a talina. Por el contrario, no se observó unión de la subunidad $\beta 1$ con SLP-76 (datos no mostrados).

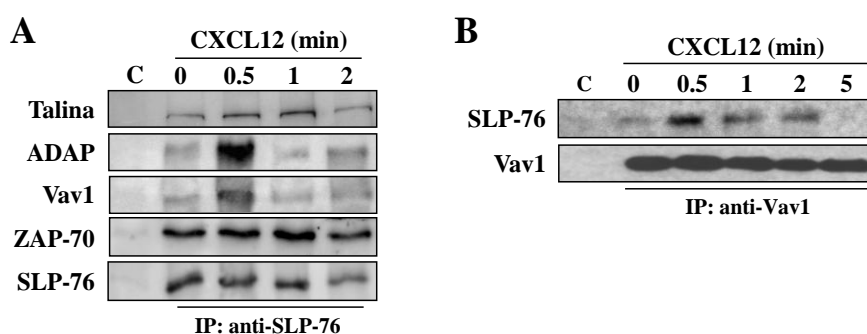


Figura 24. Dinámica de las asociaciones de SLP-76 con Vav1 y ADAP en respuesta a CXCL12. Las células Molt-4 fueron incubadas con CXCL12 durante los tiempos indicados, y tras lisarlas, los extractos fueron inmunoprecipitados con anticuerpos anti-SLP-76 (**A**) o anti-Vav1 (**B**), seguido de *western blot* utilizando anticuerpos frente a las proteínas mostradas.

Para estudiar la distribución celular de SLP-76 y ADAP se realizaron ensayos de fraccionamiento celular seguido de análisis por *western blot*. Estos experimentos indicaron que SLP-76 se encuentra principalmente en la fracción membranal y su localización no se vio significativamente alterada por la exposición de las células a CXCL12. Por el contrario, ADAP posee una distribución predominantemente citosólica en células no estimuladas, pero tras la incubación con CXCL12, dicha proteína es reclutada de manera rápida y transitoria a la fracción de membrana, coincidiendo con la estimulación por esta quimioquina de la asociación SLP-76-ADAP (**Figura 25**).

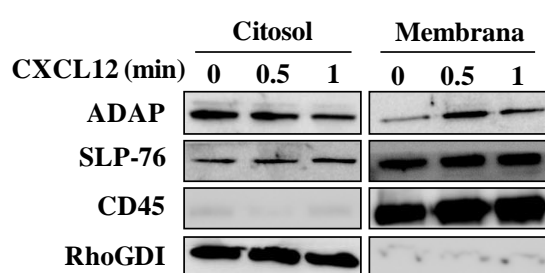


Figura 25. Distribución de SLP-76 y ADAP en células T activadas por CXCL12. Las células Molt-4 fueron incubadas con CXCL12 durante los tiempos indicados y sometidas posteriormente a ensayos de fraccionamiento celular y *western blotting* utilizando anticuerpos anti-SLP-76 y anti-ADAP. Como marcadores de las fracciones citosólica y de membrana se usaron las proteínas RhoGDI y CD45, respectivamente.

Con el fin de analizar el papel de SLP-76 y ADAP en la adhesión estimulada por CXCL12 de células T dependiente de $\alpha 4\beta 1$, silenciamos dichas proteínas mediante siRNA en células Molt-4 y en PBL-T (**Figura 26A**), y analizamos la capacidad adhesiva de los transfectantes. Resultados preliminares indicaron que la inhibición de la expresión de SLP-76 y ADAP no afectó a la viabilidad celular o a la expresión de CXCR4, $\alpha 4$ o $\beta 1$ (datos no mostrados). Los ensayos de adhesión realizados en condiciones estáticas a FN-H89 y VCAM-1 revelaron que la depleción de SLP-76 en dichas células se traducía en una modesta disminución en la adhesión a FN-H89, y una tendencia a una menor adhesión a VCAM-1, en relación a la adhesión observada con los transfectantes control (**Figura 26B**). Cuando se utilizaron células silenciadas para ADAP se observó una disminución sustancial de la adhesión estimulada por CXCL12 en comparación con transfectantes control. De forma similar a las células Molt-4, las células Jurkat J14 deficientes en SLP-76 presentaron una adhesividad a VCAM-1 similar a las células Jurkat parentales (**Figura 26C**).

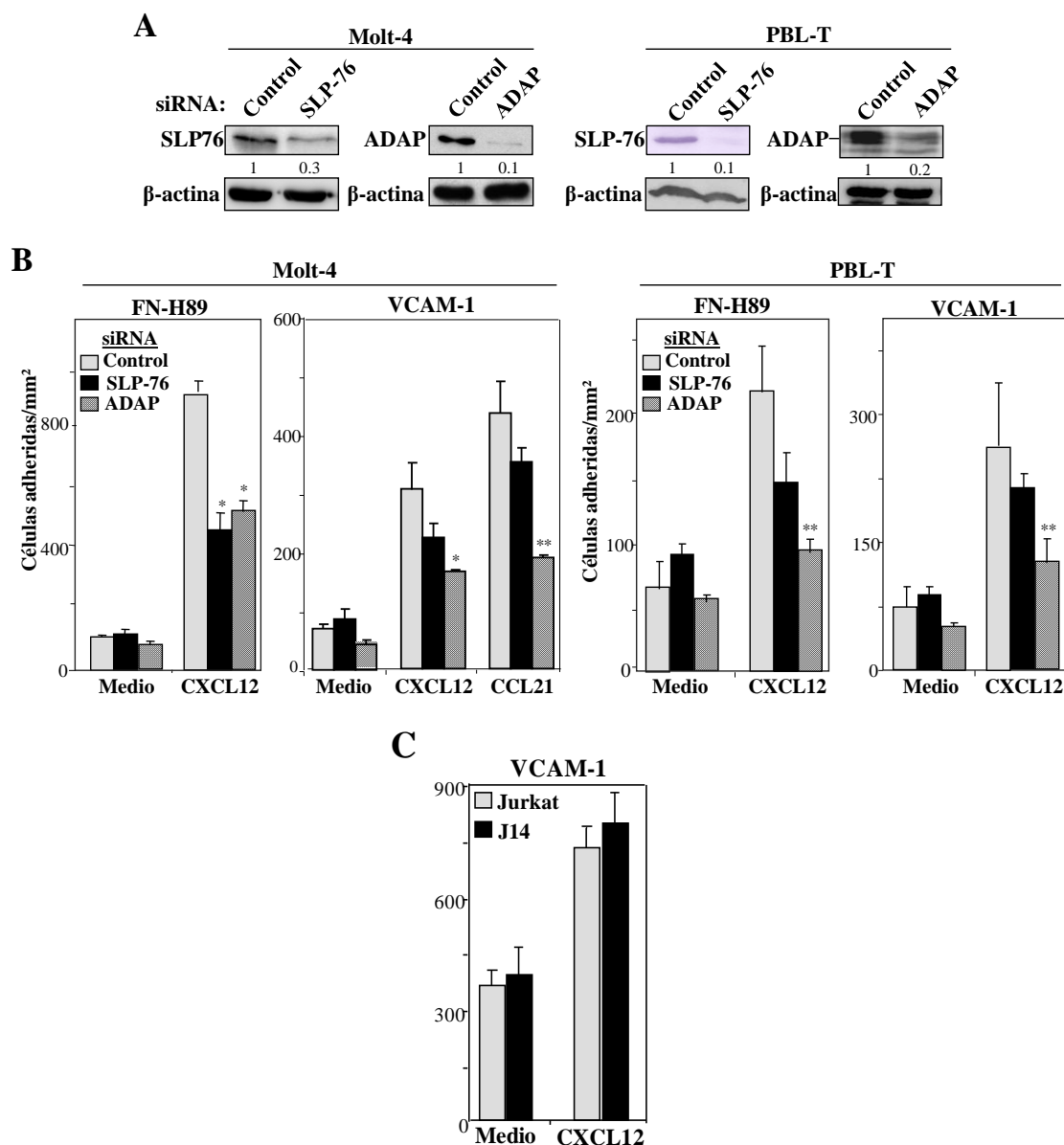


Figura 26. Papel de SLP-76 y ADAP en la adhesión de células T dependiente de $\alpha 4\beta 1$ en respuesta a quimioquinas. Las células fueron transfectadas con siRNA control, SLP-76 o ADAP, y posteriormente analizadas por *western blot* (A), o sometidas a ensayos de adhesión estática a FN-H89 o VCAM-1 en ausencia (Medio) o presencia de CXCL12 o CCL21 (B). (C) Las células Jurkat y J14 se utilizaron en ensayos de adhesión a VCAM-1 inmovilizado en ausencia o presencia de CXCL12. Los datos representan la media \pm SD de triplicados de tres experimentos independientes. La adhesión fue significativamente inhibida, ** $p < 0.01$ o * $p < 0.05$.

Pyk2 regula la adhesión de células T dependiente de $\alpha 4\beta 1$ en respuesta a quimioquinas.

Estudios previos utilizando células Jurkat han mostrado que la quinasa Pyk2 se asocia a Vav1 (Katagiri et al., 2000), por lo que estudiamos si dicha asociación estaba regulada por CXCL12 en células Molt-4. Los resultados indicaron que esta quimioquina

induce un leve y transitorio incremento del ensamblaje Vav1-Pyk2 (**Figura 27A, C**), siendo esta asociación independiente de SLP-76, tal y como mostraron los experimentos realizados con transfectantes silenciados en SLP-76 (**Figura 27B**). Asimismo detectamos la asociación entre Pyk2 y SLP-76, siendo este ensamblaje independiente de la estimulación por CXCL12 (**Figura 27C**). Notablemente, anticuerpos anti-talina co-precipitaron a Pyk2 además de Vav1, tanto en células Molt-4 como en PBL-T (**Figura 28A**). Para analizar la especificidad de la asociación entre talina y Pyk2, así como para estudiar una posible implicación de Pyk2 en la adhesión dependiente de $\alpha 4\beta 1$ en células T, utilizamos células Molt-4 y PBL-T silenciadas para Pyk2 (**Figura 28B**). Los resultados indicaron que la asociación Pyk2-talina estaba claramente disminuida en las células deficientes en Pyk2, tanto en ausencia como en presencia de CXCL12 (**Figura 28C**), lo que confirma la especificidad del ensamblaje entre talina y Pyk2. Además, el silenciamiento de Pyk2 no afectó la asociación Vav1-SLP-76 o la formación del complejo Vav1-talina, que como se ha mencionado es necesario durante las etapas iniciales de la adhesión de células T mediada por $\alpha 4\beta 1$ en respuesta a quimioquinas (Garcia-Bernal et al., 2009) (**Figura 28D**). Sorprendentemente, el silenciamiento de Pyk2 condujo a un incremento adicional de la adhesión de células Molt-4 y PBL-T a FN-H89 y VCAM-1 que había sido estimulada por CXCL12 (**Figura 29**).

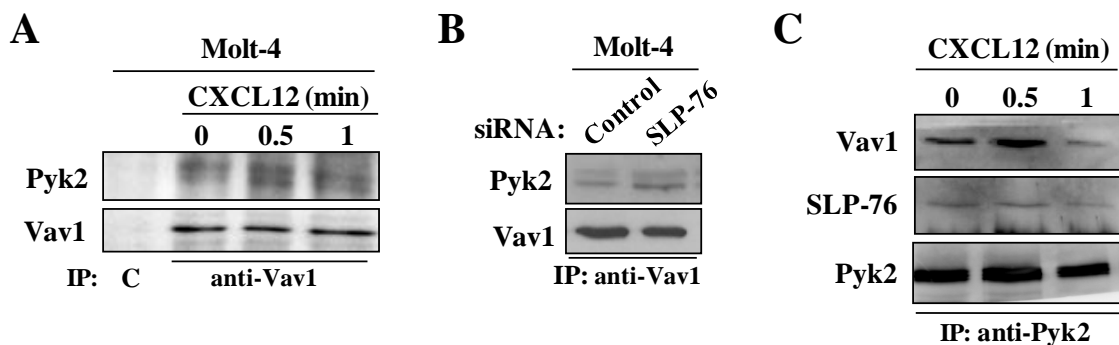


Figura 27. Pyk2 se asocia con Vav1 y SLP-76, siendo la asociación Vav1-Pyk2 independiente de SLP-76. (A) Las células Molt-4 no transfectadas (A, C), o transfectadas con siRNA control o SLP-76 (B) fueron sometidas a inmunoprecipitación y *western blot* con anticuerpos para las proteínas mostradas.

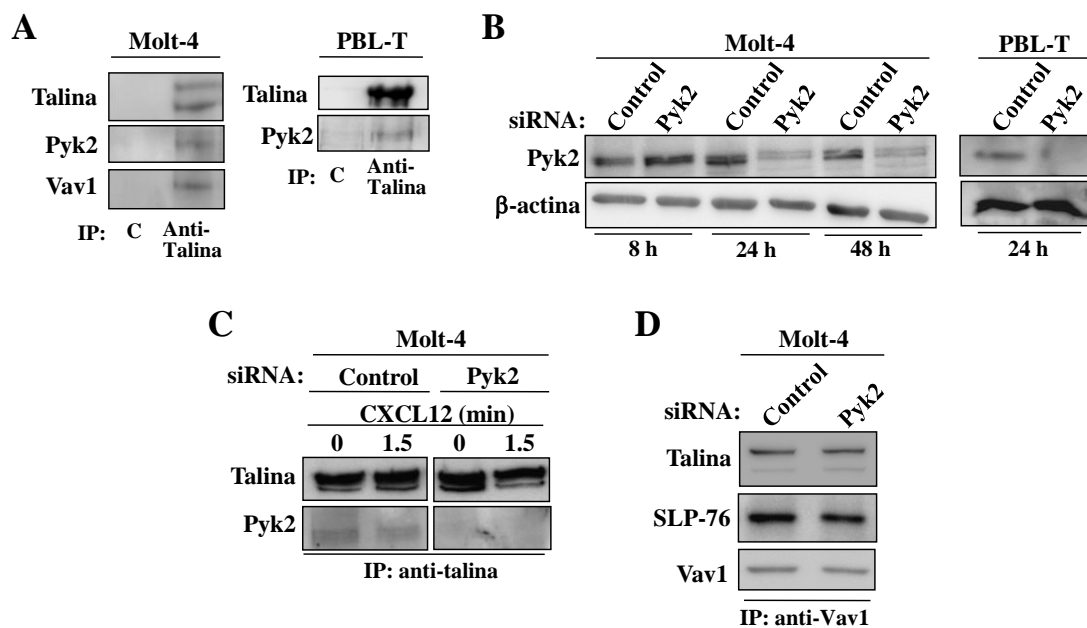


Figura 28. Pyk2 se asocia con talina en células T. **(A)** Las células se inmunoprecipitaron con anticuerpos control o anti-talina, seguido de *western blot* utilizando anticuerpos contra las proteínas indicadas. **(B)** Las células se transfectoron con siRNA control o Pyk2, y tras los tiempos mostrados, los transfectantes fueron analizados mediante *western blot*. **(C, D)** Transfectantes siRNA control o Pyk2 fueron sometidas a inmunoprecipitación y *western blot*.

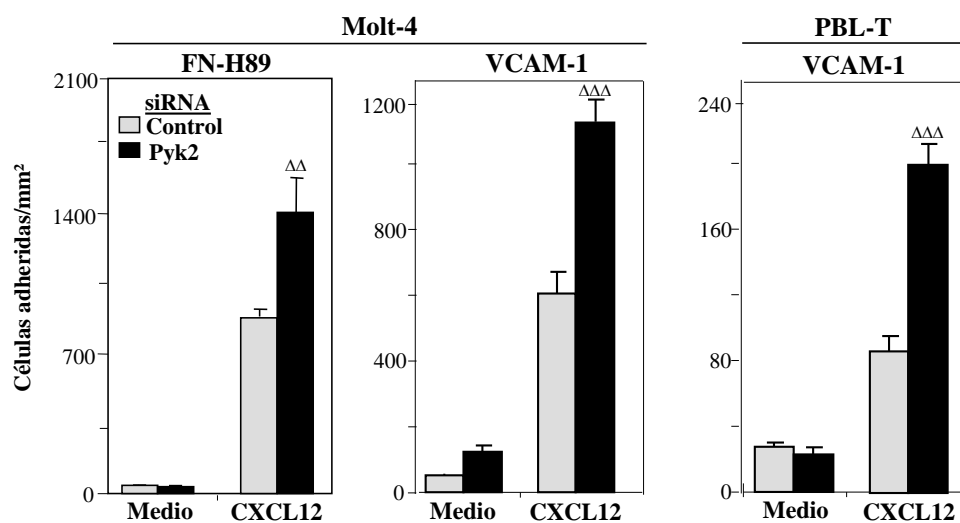


Figura 29. El silenciamiento de Pyk2 se traduce en un aumento de la adhesión de células T dependiente de $\alpha 4\beta 1$ en respuesta a quimioquinas. Las células transfectadas con siRNA control o Pyk2 fueron sometidas a ensayos de adhesión estática a FN-H89 o VCAM-1, en ausencia (Medio) o presencia de CXCL12 (n = 3). La adhesión fue significativamente aumentada, ^{ΔΔΔ}p<0.001 o ^{ΔΔ}p<0.01.

Confirmando el importante papel de Pyk2 en la regulación de la adhesión de células T dependiente de $\alpha 4\beta 1$, observamos que la sobreexpresión de PRNK, una isoforma dominante negativa de la región C-terminal de Pyk2 que carece del dominio

quinasa (Dikic and Schlessinger, 1998), condujo a un aumento de la adhesión de células T estimulada por CXCL12 y dependiente de $\alpha 4\beta 1$ (Figura 30).

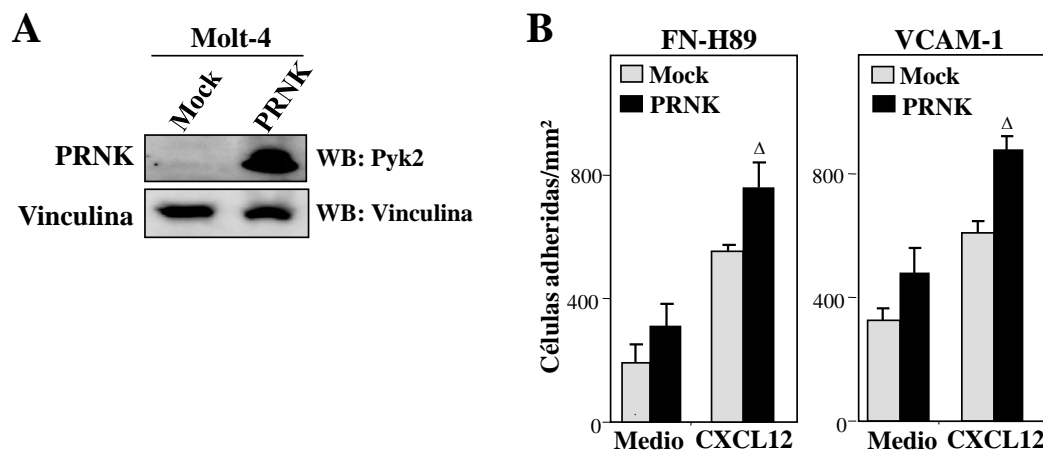


Figura 30. La expresión de PRNK provoca un aumento de la adhesión de células T dependiente de $\alpha 4\beta 1$ en respuesta a quimioquinas. Las células Molt-4 transfectadas con el vector PRNK o con un vector vacío (Mock), fueron analizadas mediante *western blot* (A), o fueron sometidas a ensayos de adhesión estática a FN-H89 o VCAM-1, en ausencia (Medio) o presencia de CXCL12 (B) (n = 3). La adhesión fue significativamente aumentada, Δ p<0.05.

El silenciamiento de SLP-76/ADAP y Pyk2 no afecta a la activación inicial de $\alpha 4\beta 1$.

El proceso de adhesión dependiente de integrinas en linfocitos puede ser dividido en varias etapas. Inicialmente se generan conformaciones de alta afinidad de las integrinas que favorecen una interacción firme con su ligando, seguido de una subsiguiente fase de incremento de la avidéz que incluye un aumento de la valencia de las adhesiones, y finalmente tiene lugar un reforzamiento de la adhesión como paso previo al *spreading* celular final (Ley et al., 2007). Para estudiar cual de estos pasos estaba regulado por SLP-76, ADAP o Pyk2, llevamos a cabo en primer lugar ensayos de adhesión en cámaras de flujo para mimetizar las fases iniciales de la adhesión que tienen lugar durante la unión de los linfocitos al endotelio en condiciones de flujo. Para ello se utilizaron células T transfectadas con siRNA control, SLP-76, ADAP o Pyk2, las cuales fueron analizadas en cámaras de flujo que contenían VCAM-1 co-inmovilizado con CXCL12. Los transfectantes fueron perfundidos a una intensidad inicial de flujo de 1 dina/cm², determinándose posteriormente los niveles de *rolling* (rodamiento) y adhesión firme. Tanto los transfectantes silenciados para SLP-76 como para ADAP mostraron una disminución de la adhesión estable a VCAM-1/CXCL12 (adhesión durante más de 20 segundos), en comparación con los transfectantes siRNA control (Figura 31A). Esta

inhibición de la adhesión estable fue mayor en PBL-T que en células Molt-4, lo cual fue debido a un incremento del *rolling* en los transfectantes PBL-T deficientes en SLP-76 y ADAP. Confirmando la implicación de SLP-76 en la adhesión mediada por $\alpha 4\beta 1$, experimentos en cámaras de flujo utilizando las células J14 deficientes en SLP-6 mostraron una menor adhesión estable que las células Jurkat parentales (**Figura 31B**). Al contrario que SLP-76 y ADAP, el silenciamiento de Pyk2 se tradujo en un aumento de la adhesión firme a VCAM-1/CXCL12 en comparación con los transfectantes siRNA control (**Figura 31C**). En experimentos control observamos que la adhesión firme inducida por la quimioquina fue abolida mediante el pre-tratamiento celular con toxina pertúsica (no mostrado).

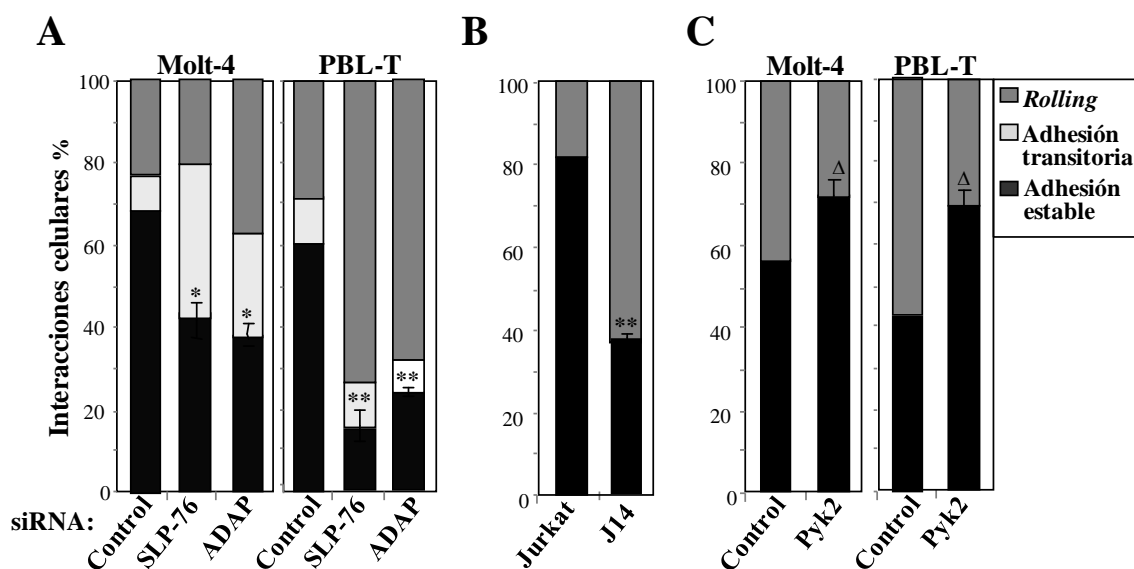


Figura 31. Papel de SLP-76, ADAP y Pyk2 en la adhesión de células T a VCAM-1 en respuesta a CXCL12 analizada en condiciones de flujo. Células Molt-4 o PBL-T transfectadas con siRNA para SLP-76 o ADAP (**A**), para Pyk2 (**C**), o células Jurkat parentales o J14 (**B**), fueron perfundidas en cámaras de flujo que contenían VCAM-1 coimmobilizado con CXCL12, analizándose el *rolling* y la adhesión estable (n = 3). Los datos representan la media \pm SD del porcentaje de células que realizaron *rolling* y adhesión estable, respecto de la población total de células que llevaron a cabo alguno de estos tipos de interacciones.

Alteraciones en la adhesión dependiente de $\alpha 4\beta 1$ en células T tras la delección de SLP-76, ADAP o Pyk2 podrían surgir por una deficiente adquisición de conformaciones de alta afinidad de $\alpha 4\beta 1$ tras la estimulación con quimioquinas, o por defectos posteriores tales como el reforzamiento de la adhesión y/o el *spreading* celular. Para estudiar si el silenciamiento de estas proteínas afectaba a la generación de conformaciones de alta afinidad de $\alpha 4\beta 1$, usamos el anticuerpo anti- $\beta 1$ HUTS-21, el cual reconoce epítomos de activación de las integrinas $\beta 1$ (Gonzalez-Alvaro et al., 1998). Asimismo utilizamos

VCAM-1-Fc en ensayos de unión soluble a células, como una prueba para determinar la eficiencia de los primeros pasos de la interacción $\alpha 4\beta 1$ -VCAM-1 en ausencia de *spreading* celular. Los experimentos de citometría de flujo revelaron que no existían alteraciones significativas en la unión de HUTS-21 y de VCAM-1-Fc a los transfectantes deficientes en SLP-76 y ADAP tras la incubación con CXCL12, comparado con los transfectantes control (**Figura 32A, B**).

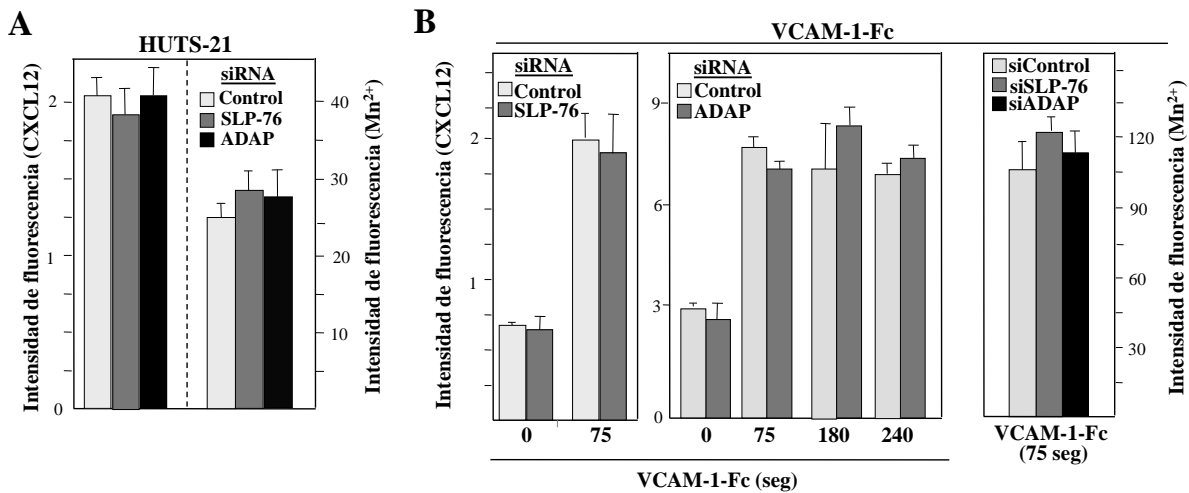


Figura 32. El silenciamiento de SLP-76 y ADAP no afecta la activación de $\alpha 4\beta 1$ en respuesta a quimioquinas. Las células Molt-4 transfectadas con siRNA SLP-76, ADAP o control, fueron incubadas en ausencia o presencia de CXCL12 o Mn^{2+} antes de añadir el anticuerpo HUTS-21 (**A**) o VCAM-1-Fc (**B**). La unión de los reactivos fue detectada por citometría de flujo.

Mientras que los transfectantes para Pyk2 no mostraron alteraciones significativas en la unión del anticuerpo HUTS-21 (**Figura 33A**), o en la dinámica de la asociación talina- $\beta 1$ en respuesta a CXCL12 (**Figura 33B**), una medida adicional de la activación de las integrinas (Moser et al., 2009), dichos transfectantes mostraron una mayor unión a VCAM-1-Fc a los tiempos más largos de incubación analizados que los transfectantes control (**Figura 33C**). En estos experimentos comprobamos que todos los transfectantes siRNA poseían grados similares de unión del anticuerpo HUTS-21 y de VCAM-1-Fc tras la exposición a Mn^{2+} . Estos datos sugieren que SLP-76, ADAP y Pyk2 no tienen un papel significativo en la generación de conformaciones de alta afinidad de $\alpha 4\beta 1$ en respuesta a quimioquinas, e indican que Pyk2 es capaz de regular la avidéz de esta integrina.

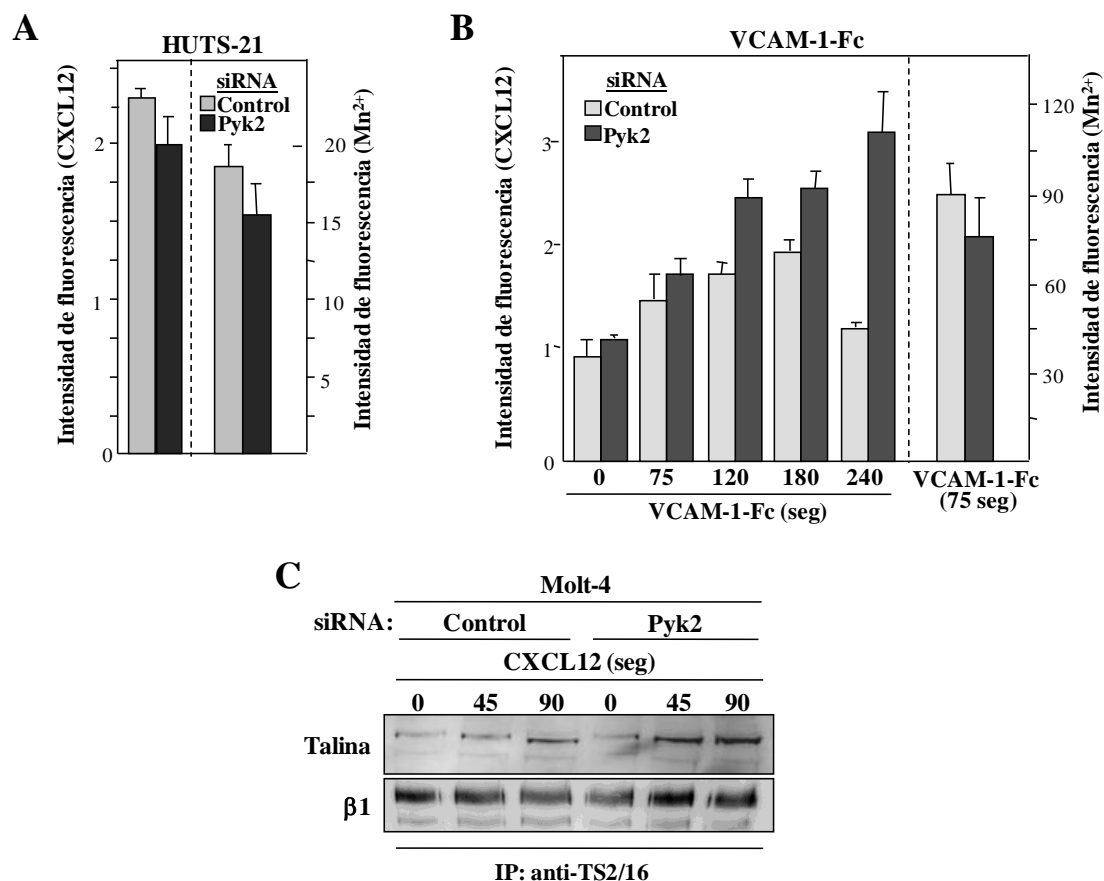


Figura 33. El silenciamiento de Pyk2 no afecta la activación de $\alpha 4\beta 1$ en respuesta a quimioquinas, pero altera la avidéz de la integrina. Las células Molt-4 transfectadas con siRNA Pyk2 o control fueron pre-incubadas en ausencia o presencia de CXCL12 o Mn^{2+} , antes de añadir el anticuerpo HUTS-21 (A) o VCAM-1-Fc (B). La unión de los reactivos fue detectada por citometría de flujo. (C) Los transfectantes fueron pre-incubados con CXCL12 durante los tiempos indicados, y tras lisarlos, los extractos celulares fueron sometidos a inmunoprecipitación y *western blot*.

Papel de SLP-76, ADAP y Pyk2 en el reforzamiento de la adhesión y el *spreading* de células T mediada por $\alpha 4\beta 1$ en respuesta a CXCL12.

Para estudiar la posible implicación de SLP-76, ADAP o Pyk2 en las etapas de reforzamiento de la adhesión y el posterior *spreading* celular dependiente de $\alpha 4\beta 1$, se analizó la resistencia de la adhesión al flujo en cámaras de flujo, y se llevaron asimismo a cabo ensayos de *spreading* celular. Con el fin de evaluar la resistencia de la adhesión, se permitió que los transfectantes se unieran a VCAM-1/CXCL12 a 1 dina/cm^2 , y a continuación se fue incrementando progresivamente la intensidad de flujo desde 1 hasta 10 dinas/cm^2 , analizándose posteriormente el porcentaje de células que permanecieron adheridas en cada incremento del flujo. Mientras que los transfectantes de Molt-4 y PBL-T deficientes en ADAP mostraban una disminución de su resistencia a la adhesión por

aumento de flujo, las células Molt-4 silenciadas para SLP-76 presentaron una resistencia al despegado similar a los transfectantes control, y ligeramente menor en los transfectantes PBL-T (**Figura 34A**). Asimismo, cuando analizamos la resistencia al flujo de las células J14, observamos que presentaban una resistencia al despegado parecida a la línea Jurkat parental (**Figura 34B**). De manera opuesta al silenciamiento de ADAP, los transfectantes deficientes en Pyk2 desarrollaron una mayor resistencia al despegado por aumento de flujo con respecto a los transfectantes siRNA control (**Figura 34C**).

Correlacionado con su disminución de la fuerza de adhesión a VCAM-1, los transfectantes deficientes en ADAP mostraron una notable reducción en su *spreading* sobre VCAM-1 en respuesta a CXCL12 (**Figura 35A**). Asimismo, una inhibición moderada pero estadísticamente significativa del *spreading* sobre VCAM-1 de los transfectantes silenciados para SLP-76 pudo ser detectada especialmente tras 10 minutos de incubación en comparación con los transfectantes control (**Figura 35A**). Por el contrario, las células deplecionadas para Pyk2 mostraron un grado mayor de *spreading* celular sobre VCAM-1 en comparación con transfectantes siRNA control, y dicho aumento estaba asociado a una mayor polimerización de actina detectada tras 2 min de incubación con CXCL12 (**Figura 35B**). Estos datos, junto con los resultados observados en el análisis de la resistencia al flujo mostrada por las células T deplecionadas en SLP-76, ADAP y Pyk2, indican que los pasos de reforzamiento y *spreading* de la adhesión celular mediada por $\alpha 4\beta 1$ tras la estimulación por quimioquinas están regulados por ADAP y Pyk2, mientras que SLP-76 está involucrado en la regulación del *spreading* celular.

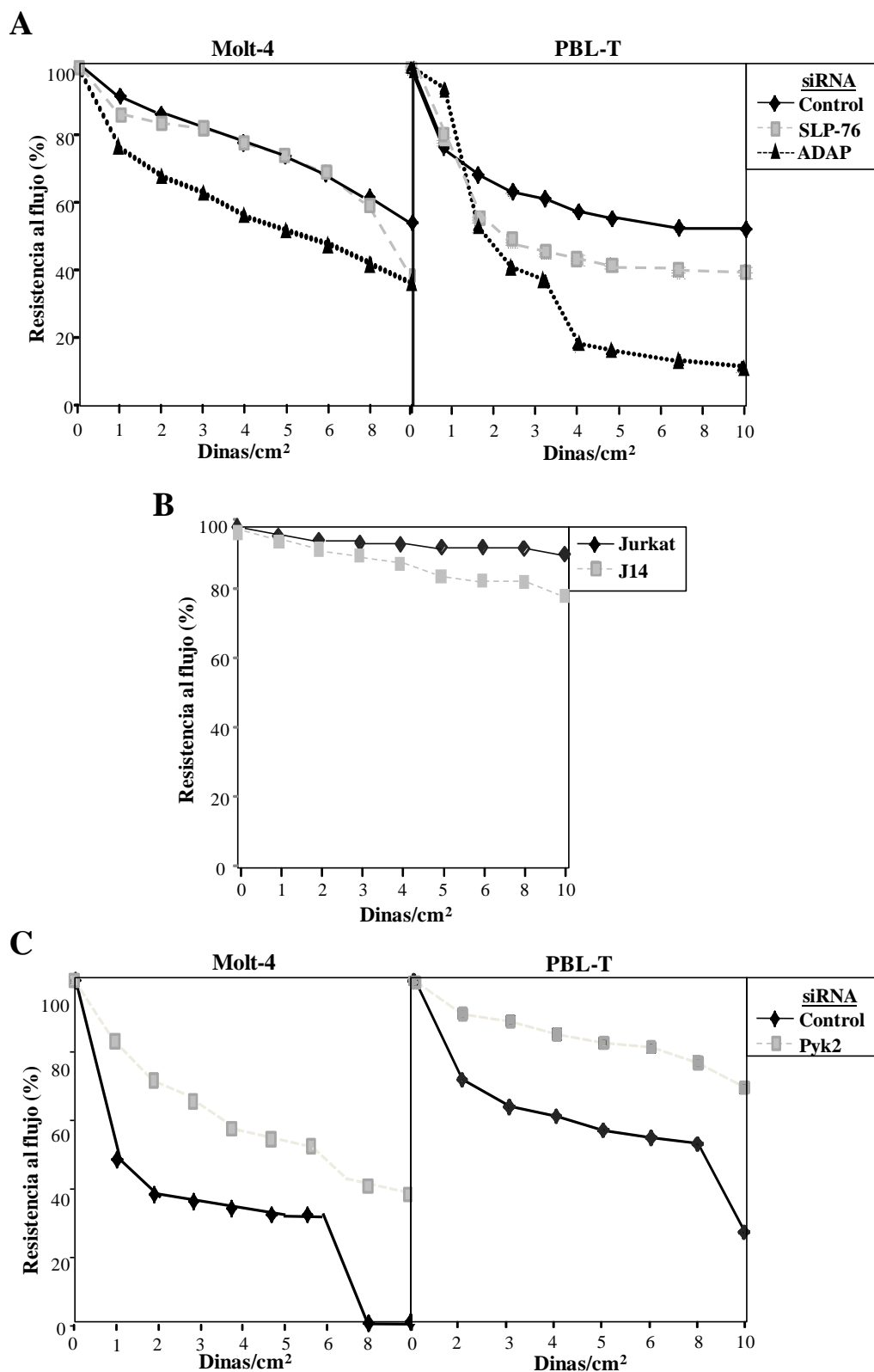


Figura 34. Papel de SLP-76, ADAP y Pyk2 en el reforzamiento de la adhesión de linfocitos T a VCAM-1 en respuesta a CXCL12. Los transfectantes silenciados en SLP-76, ADAP o Pyk2 (**A**, **C**), o células Jurkat parentales o J14 (**B**), fueron perfundidos a en cámaras de flujo que contenían VCAM-1 coimmobilizado con CXCL12. Tras detener el flujo y permitir sedimentar a las células, se determinó a continuación la resistencia de la adhesión celular tras incrementar progresivamente la intensidad de flujo. Los datos representan la media \pm SD del porcentaje de células que permanecieron adheridas en cada incremento de flujo, respecto del número inicial de células adheridas antes de aplicar el flujo.

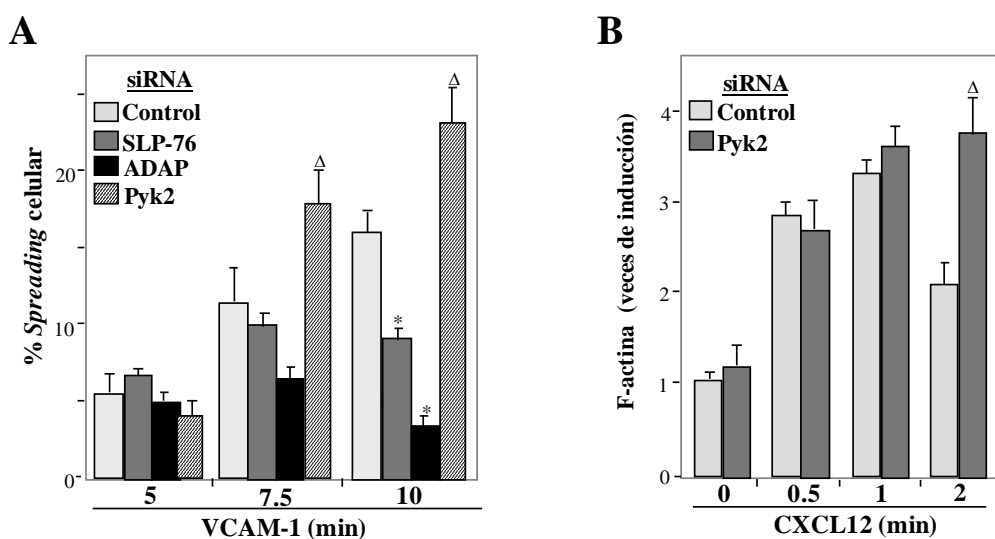


Figura 35. Papel de SLP-76, ADAP y Pyk2 en *spreading* celular y en polimerización de actina en respuesta a CXCL12. **(A)** Las células Molt-4 transfectadas con los siRNA indicados fueron depositadas sobre superficies tapizadas con VCAM-1, y sometidas a ensayos de *spreading* celular en respuesta a CXCL12. Se representa el porcentaje de *spreading* celular tras el análisis de diversos campos representativos. **(B)** Los transfectantes silenciados para Pyk2 fueron incubados durante los tiempos indicados con CXCL12 y el contenido celular de F-actina fue analizado mediante citometría de flujo.

La regulación por Pyk2 de la adhesión de células T dependiente de $\alpha 4\beta 1$ es mediada por la activación de Rac.

Dado que Rac controla la polimerización de actina y es activada por CXCL12, y al mismo tiempo su función es requerida para el reforzamiento de la adhesión y el *spreading* mediado por $\alpha 4\beta 1$ en células T (Garcia-Bernal et al., 2005b), quisimos estudiar en primer lugar el papel de Pyk2 en la activación de esta GTPasa en respuesta a CXCL12. Notablemente, el silenciamiento de Pyk2 en células Mol-4 se asoció con una mayor y sostenida activación de Rac en respuesta a esta quimioquina, en comparación con células transfectadas con siRNA control (**Figura 36A**). A continuación, para estudiar la posible relación entre la activación de Rac1 por CXCL12 regulada por Pyk2 y la adhesión mediada por $\alpha 4\beta 1$, expresamos en dichas células una forma dominante negativa de Rac1 fusionada a GFP (GFP-RacDN) junto con siRNA para Pyk2 (**Figura 36B, izquierda**). Los resultados indicaron que el aumento adicional de la adhesión a VCAM-1 tras el silenciamiento de Pyk2 fue significativamente inhibido por la expresión de GFP-Rac1DN (**Figura 36B, derecha**).

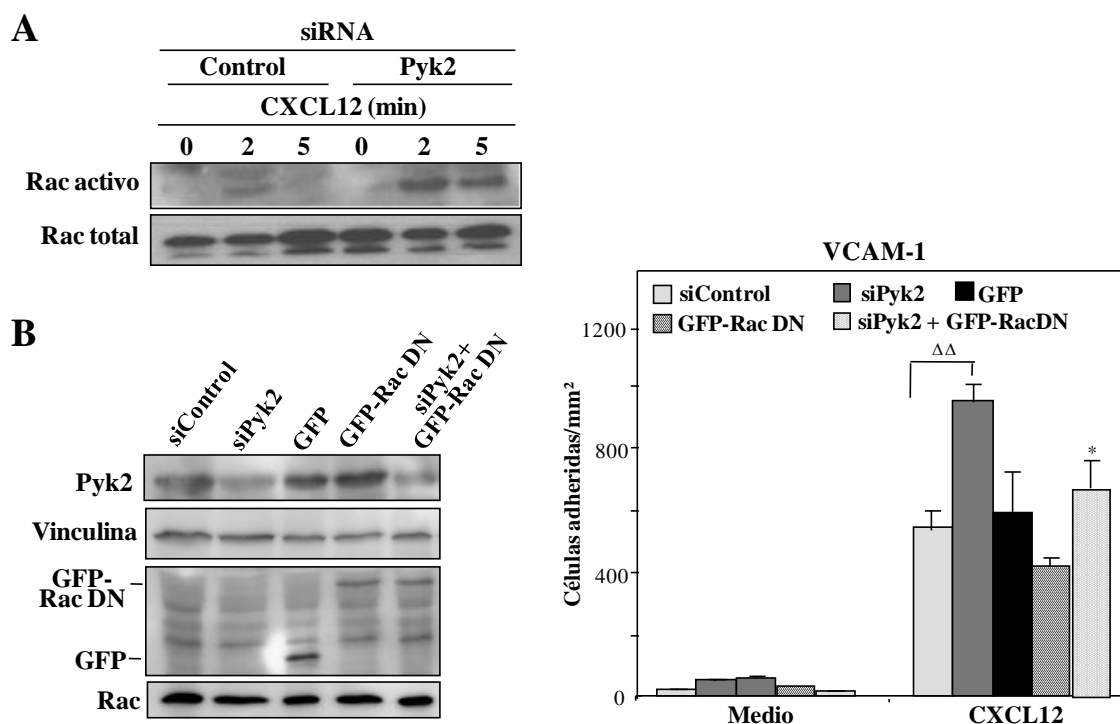


Figura 36. La regulación por Pyk2 de la adhesión de células T dependiente de $\alpha 4\beta 1$ es mediada por la activación de Rac. **(A)** Las células Molt-4 transfectadas con siRNAcontrol o Pyk2 fueron expuestas a CXCL12 durante los tiempos indicados, y analizadas en ensayos GTPasa para detectar la activación de Rac1. **(B)** Dichas células se transfectaron con los siRNA y vectores indicados, y posteriormente fueron analizados mediante *western blot* (**izquierda**), o sometidos a adhesión estática a VCAM-1 coinmovilizado en ausencia o presencia de CXCL12 (**derecha**) (n = 3). La adhesión fue significativamente aumentada $\Delta\Delta$ $p < 0.01$, o inhibida * $p < 0.05$.

Relaciones funcionales entre Pyk2 y ADAP en la activación de Rac y en la adhesión de células T dependiente de $\alpha 4\beta 1$ en respuesta a quimioquinas.

Dado que ADAP y Pyk2 regulan la activación de Rac1 y la adhesión de células T dependiente de $\alpha 4\beta 1$ en respuesta a quimioquinas, estudiamos a continuación si existían relaciones funcionales entre estas proteínas durante la activación de Rac y la mencionada adhesión. Para ello co-transfectamos los siRNA para Pyk2 y ADAP, y comprobamos el efecto sobre la adhesión a VCAM-1 y la activación por CXCL12 de Rac1. Los resultados indicaron que el silenciamiento de Pyk2 rescató en parte la reducción de la adhesión a VCAM-1 provocada por la depleción de ADAP (**Figura 37A**). Asimismo, se observó una activación más sostenida de Rac en respuesta a CXCL12 en los transfectantes deplecionados en Pyk2 y ADAP, en comparación con los transfectantes control (**Figura 37B**). Estos resultados indican que la deficiente activación de Rac1 por CXCL12 que ocurre en células deplecionadas en ADAP puede ser rescatada mediante el silenciamiento de Pyk2. Por lo tanto, estos datos sugieren que la regulación de la activación de Rac1 por

ADAP y Pyk2 constituye un punto común en la adhesión mediada por $\alpha 4\beta 1$ en respuesta a CXCL12.

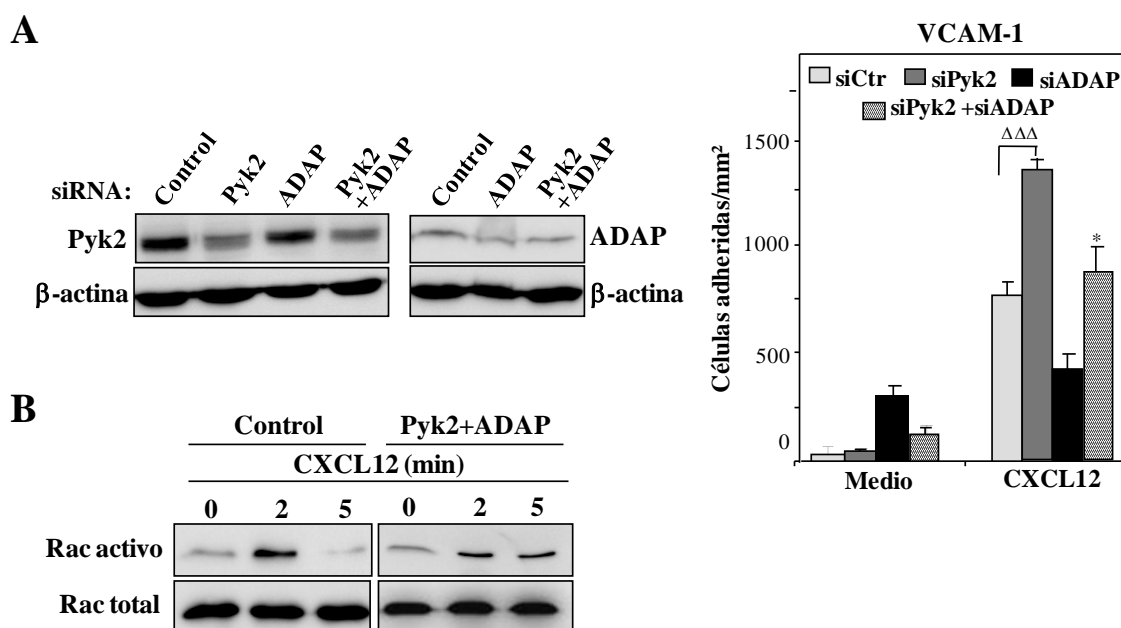


Figura 37. Relaciones funcionales entre Pyk2 y ADAP en la activación de Rac y en la adhesión de células T dependiente de $\alpha 4\beta 1$ en respuesta a quimioquinas. (A) Las células Molt-4 transfectadas con los siRNA indicados fueron analizadas mediante *western blot* (izquierda), o sometidas a ensayos de adhesión estática a VCAM-1 coinmovilizado en ausencia o presencia de CXCL12 (derecha) (n = 3). La adhesión fue significativamente aumentada $\Delta\Delta\Delta$ p<0.01, o inhibida * p<0.05. (B) Las células Molt-4 transfectadas con los siRNA mostrados fueron expuestas a CXCL12 durante los tiempos indicados, y posteriormente analizadas en ensayos GTPasa para medir la activación de Rac.

Papel de Pyk2 en la fosforilación de Erk1/2 y Akt en respuesta a CXCL12.

La MAP quinasa Erk1/2 y el efector de la PI 3-quinasa Akt representan dianas de activación de las quimioquinas (Gouwy et al., 2013). La fosforilación de Erk1/2 en respuesta a CXCL12 se vio inhibida en células silenciadas para Pyk2 (Figura 38A), mientras que no se observaron variaciones significativas en la fosforilación de Akt (Figura 38B).

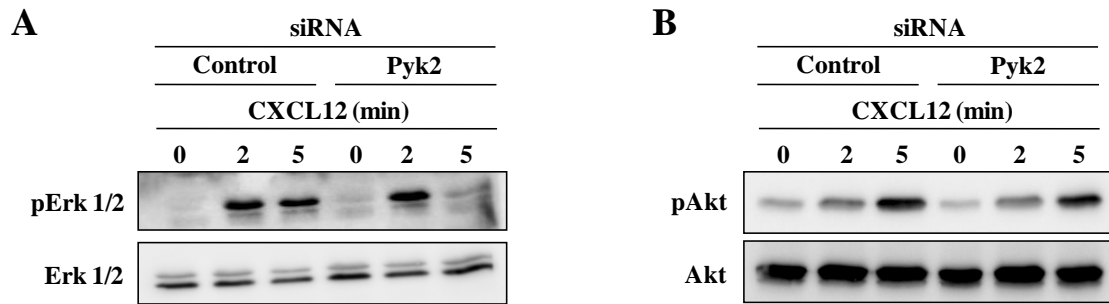


Figura 38. Análisis de la activación de Erk1/2 y Akt en respuesta a CXCL12 en células deficientes en Pyk2. **(A, B)** Las células Molt-4 transfectadas con siRNA Pyk2 o control fueron incubadas con CXCL12 durante los tiempos indicados, y tras lizarlas, los extractos fueron sometidos a *western blot* con anticuerpos contra Erk1/2, fosfo-Erk1/2, Akt y fosfo-Akt.

3. PAPEL DE RGS10 EN LA REGULACIÓN POR QUIMIOQUINAS DE LA ADHESIÓN DEPENDIENTE DE $\alpha 4\beta 1$ Y $\alpha L\beta 2$ EN CÉLULAS T HUMANAS.

La estimulación por CXCL12 de la adhesión de células T mediada por la integrina $\alpha 4\beta 1$ está regulada por RGS10.

Linfocitos PBL-T y la subpoblación PBL-T $CD4^+$, así como las líneas celulares T humanas Molt-4 y Jurkat, expresan cantidades notables de la proteína RGS10 (**Figura 39A**). Para estudiar la distribución celular de RGS10 se realizó un ensayo de fraccionamiento celular seguido de análisis por *western blot* utilizando células Molt-4. Pudimos observar que CXCL12 inducía un leve aumento de RGS10 en la fracción de membrana en comparación con células no expuestas a esta quimioquina (**Figura 39B**).

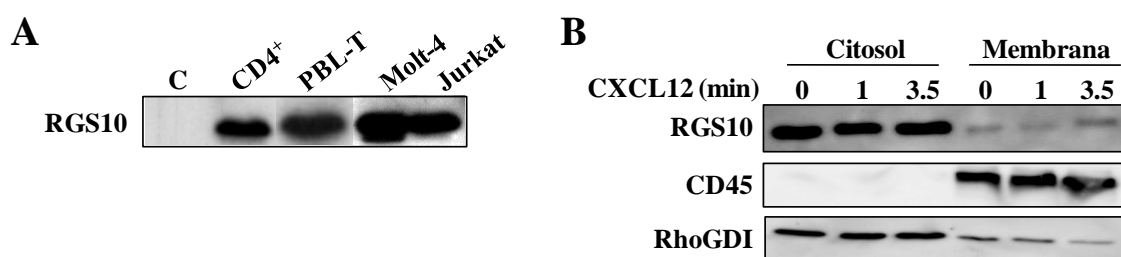


Figura 39. Expresión y distribución de RGS10 en células T. (A) Determinación por *western blot* de la expresión de RGS10 en células T utilizando anticuerpos anti-RGS10. (B) Las células Molt-4 fueron incubadas con CXCL12 durante los tiempos indicados y sometidas posteriormente a ensayos de fraccionamiento celular y *western blot* utilizando anticuerpos anti-RGS10. Como marcadores de las fracciones citosólica y de membrana se usaron las proteínas RhoGDI y CD45, respectivamente.

Ensayos de inmunoprecipitación utilizando anticuerpos anti- $G\alpha_i$ indicaron que CXCL12 estimula transitoriamente la asociación de RGS10 con $G\alpha_i$ en células Molt-4 (**Figura 40**), sugiriendo que RGS10 pudiera estar regulando la vía de señalización dependiente de $G\alpha_i$ en células T.

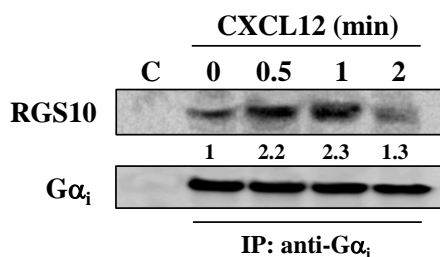


Figura 40. CXCL12 estimula transitoriamente la asociación de RGS10 con la subunidad $G\alpha_i$. Las células Molt-4 fueron incubadas con CXCL12 durante los tiempos indicados, y tras lisarlas, los extractos celulares fueron sometidos a inmunoprecipitación utilizando anticuerpos anti- $G\alpha_i$ o control (C), seguido de *western blot* con anticuerpos para las proteínas mostradas.

Para investigar si el aumento de adhesión de células T a ligandos de la integrina $\alpha 4\beta 1$ en respuesta a quimioquinas (Garcia-Bernal et al., 2005b) puede ser regulado por RGS10, se silenció su expresión en células Molt-4 y en PBL-T mediante siRNA, y posteriormente se determinó la capacidad adhesiva de los transfectantes. La transfección del siRNA RGS10.1 redujo la expresión de la proteína en un 70-90% en las células Molt-4 y PBL-T, respectivamente, en comparación con su expresión en células transfectadas con siRNA control, mientras que las células transfectadas con siRNA RGS10.2 mostraron una reducción en la expresión del 50% (**Figura 41A**). Los ensayos de adhesión celular realizados en condiciones estáticas revelaron que el silenciamiento de RGS10 se traduce en un incremento significativo de la adhesión a VCAM-1 y CS-1/FN (FN-H89) en respuesta a CXCL12, en relación a la adhesión observada con los transfectantes control (**Figura 41B**).

Asimismo, quisimos determinar si la regulación por RGS10 de la adhesión dependiente de $\alpha 4\beta 1$ en células T podía detectarse con alguna otra quimioquina distinta de CXCL12. Para ello usamos CCL21, la cual se une a su receptor CCR7 expresado en la superficie de linfocitos T, y que activa la adhesión mediada por integrinas (Stein et al., 2000; Stein et al., 2003). Los resultados mostraron un aumento en la adhesión a VCAM-1 en respuesta a CCL21 en células Molt-4 silenciadas para RGS10 en comparación con células control (**Figura 41C**). Estos datos indican que RGS10 controla la adhesión de células T dependiente de $\alpha 4\beta 1$ en respuesta a múltiples receptores de quimioquinas acoplados a $G\alpha_i$. En experimentos control de citometría de flujo utilizando células silenciadas para RGS10, no se observaron alteraciones significativas en los niveles de expresión de $\alpha 4$, $\beta 1$ o CXCR4 con respecto a las células transfectadas con siRNA control (no mostrado).

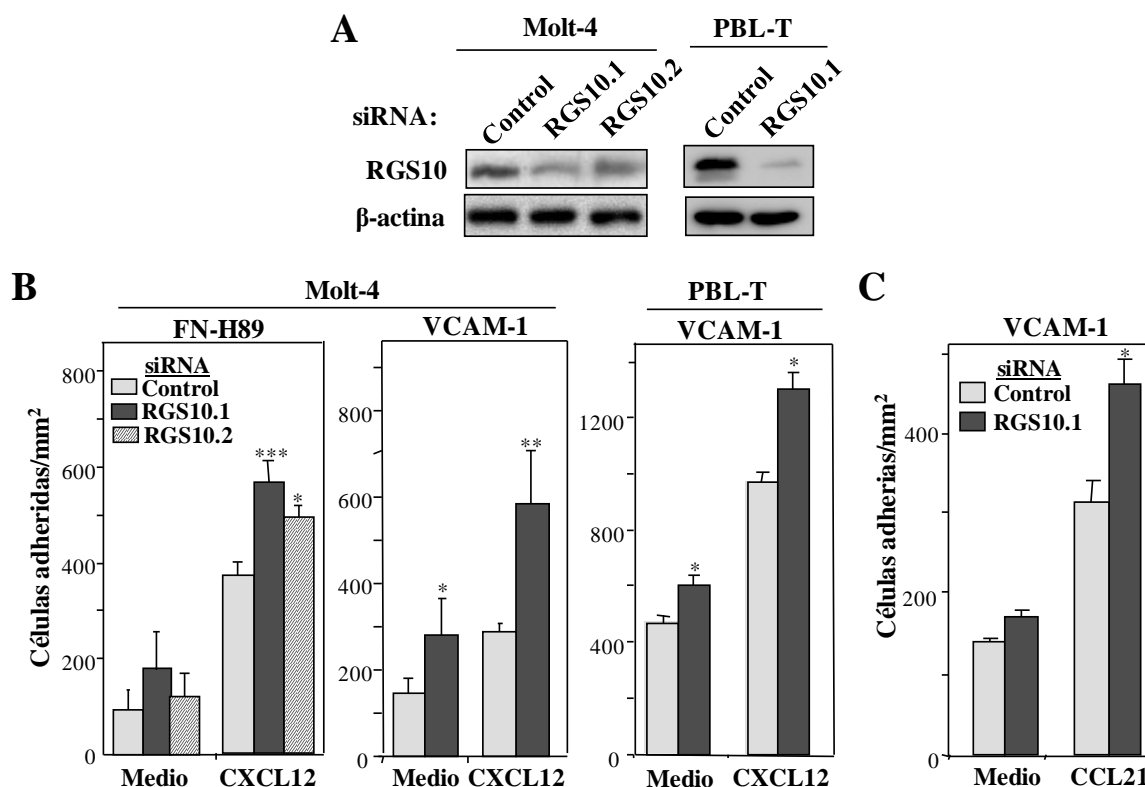


Figura 41. El silenciamiento de RGS10 con siRNA se traduce en un aumento de la adhesión de células T dependiente de $\alpha 4\beta 1$ en respuesta a quimioquinas. Las células Molt-4 y PBL-T fueron transfectadas con siRNA para RGS10 o control, y posteriormente analizadas por *western blot* (A), o sometidas a ensayos de adhesión estática a FN-H89 o VCAM-1, en ausencia (Medio) o presencia de CXCL12 (B). (C) Los transfectantes en células Molt-4 se utilizaron en ensayos de adhesión a VCAM-1 inmovilizado en ausencia o presencia de CCL21 (n = 3). La adhesión fue significativamente aumentada, *** p<0.001, ** p<0.01 o * p<0.05.

Para reforzar aún más estos resultados, las células Molt-4 fueron transfectadas con un vector shRNA para RGS10 (pSuper-shRGS10), o con un vector vacío. Tras observar una disminución del 50% de los niveles de expresión de RGS10 (Figura 42A), los transfectantes se sometieron a ensayos de adhesión a VCAM-1, observándose de nuevo un incremento de la adhesión tras estimular con CXCL12 (Figura 42B). En condiciones basales (sin estimulación por CXCL12), la adhesión a VCAM-1 o FN-H89 de las células T deficientes en RGS10 fue ligeramente mayor que la observada con transfectantes siRNA o shRNA control, si bien este incremento fue siempre menor que el observado con células deficientes en RGS10 e incubadas con CXCL12.

La toxina pertusica, un inhibidor de la señalización desencadenada por la subunidad $G\alpha_i$, bloqueó tanto la adhesión a VCAM-1 estimulada por CXCL12 en transfectantes siRNA control, como el posterior incremento de adhesión obtenido en las

células silenciadas para RGS10 (**Figura 42C**), indicando que RGS10 regula la adhesión a través de $G\alpha_i$.

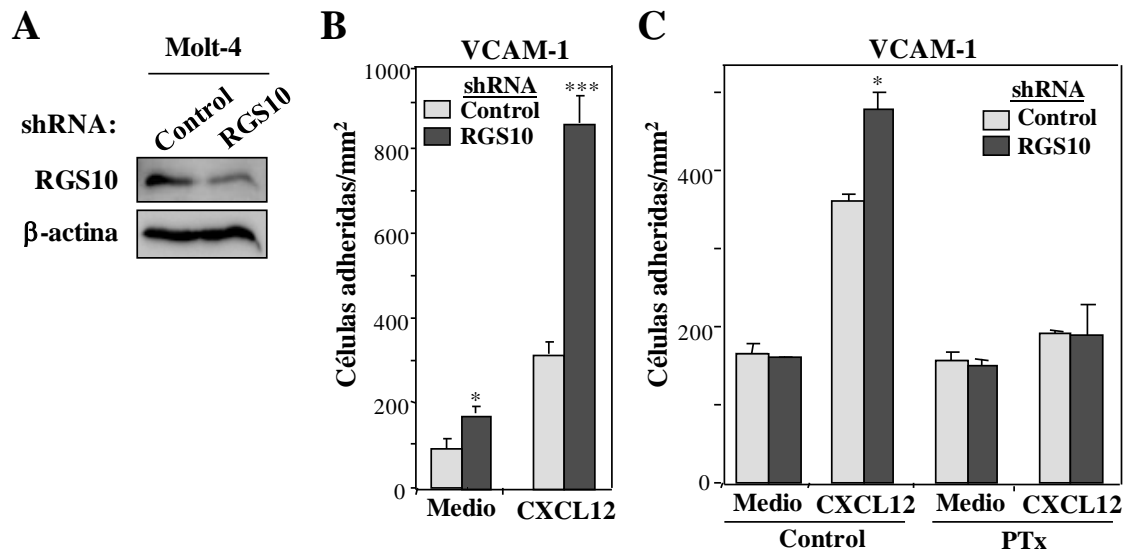


Figura 42. El silenciamiento RGS10 con shRNA se traduce en un aumento de la adhesión de células T dependiente de $\alpha 4\beta 1$ en respuesta a quimioquinas. Las células Molt-4 transfectadas con vectores shRNA control o RGS10 se analizaron por *western blot* (**A**), o fueron testadas en ensayos de adhesión a VCAM-1 inmovilizado en ausencia o presencia de CXCL12 (**B**). (**C**) Los diferentes transfectantes fueron incubados en solvente control o con toxina pertuxica (PTx; 16 h, 100 ng/ml), y posteriormente sometidos a ensayos de adhesión a VCAM-1 como se indica más arriba. (n = 3). La adhesión fue significativamente aumentada, *** p<0.001, * p<0.05.

Para estudiar a continuación el efecto de la sobre-expresión de RGS10 en la adhesión mediada por la integrina $\alpha 4\beta 1$ en respuesta a CXCL12, las células Molt-4 fueron transfectadas con un vector vacío (Mock) o con el vector RGS10-HA. Tras verificar la expresión de RGS10-HA mediante *western blot* (**Figura 43A**), los transfectantes fueron sometidos a ensayos de adhesión celular a ligandos de $\alpha 4\beta 1$. Estos ensayos revelaron que la sobre-expresión de RGS10 promueve una reducción significativa de la adhesión a VCAM-1 y FN-H89 en respuesta a CXCL12 en comparación con células control (**Figura 43B**).

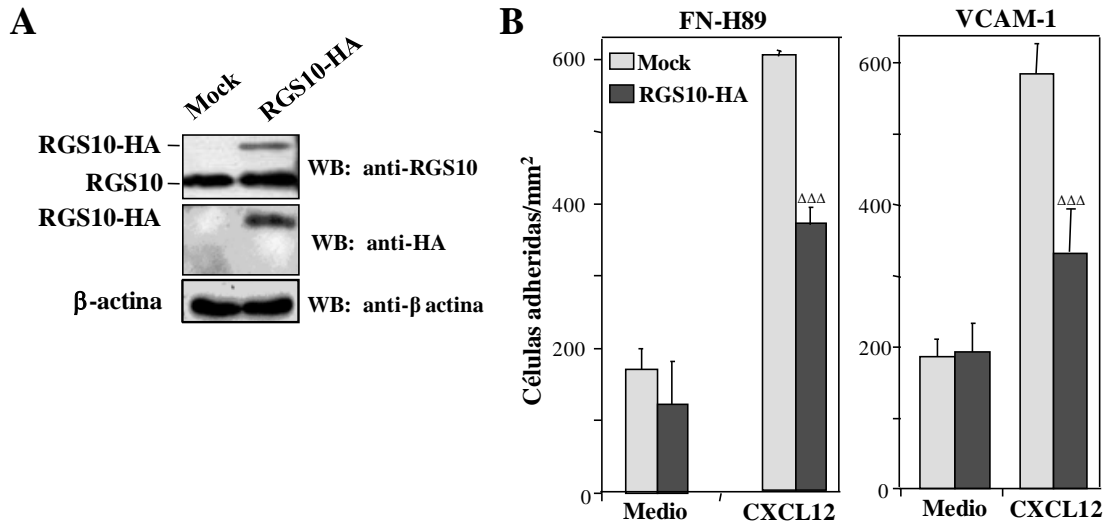


Figura 43. La sobre-expresión de RGS10 restringe la estimulación por CXCL12 de la adhesión de células T dependiente de $\alpha 4\beta 1$. Las células Molt-4 transfectadas con el vector RGS10-HA o con un vector vacío (Mock), fueron analizadas mediante *western blot* utilizando los anticuerpos indicados (A), o sometidas a ensayos de adhesión a FN-H89 o VCAM-1 inmovilizados en ausencia o presencia de CXCL12 (B). Los datos representan la media \pm SD de triplicados de dos experimentos independientes. La adhesión fue significativamente inhibida, $\Delta\Delta\Delta$ p < 0.001.

RGS10 regula la adhesión de células T dependiente de $\alpha L\beta 2$ en respuesta a quimioquinas.

Para analizar si RGS10 podía regular otras adhesiones de células T además de la dependiente de $\alpha 4\beta 1$, estudiamos el efecto del silenciamiento y la sobre-expresión de RGS10 en la adhesión mediada por la integrina $\alpha L\beta 2$. De modo similar a lo que ocurría con los ligandos de $\alpha 4\beta 1$, el silenciamiento de RGS10 se tradujo en un incremento en la adhesión estimulada por CXCL12 a ICAM-1, un ligando de la integrina $\alpha L\beta 2$ (Figura 44A, B). Asimismo, el silenciamiento de RGS10 provocó un aumento adicional de la adhesión a ICAM-1 en respuesta a CCL21 en comparación con células control (Figura 44C). Por el contrario, la sobre-expresión de RGS10 supuso una disminución significativa de la estimulación de la adhesión en respuesta a CXCL12, en comparación con transfectantes control (Figura 44D). En suma, estos resultados indican que RGS10 controla la adhesión de células T activada por quimioquinas y dependiente de las integrinas $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha L\beta 2$.

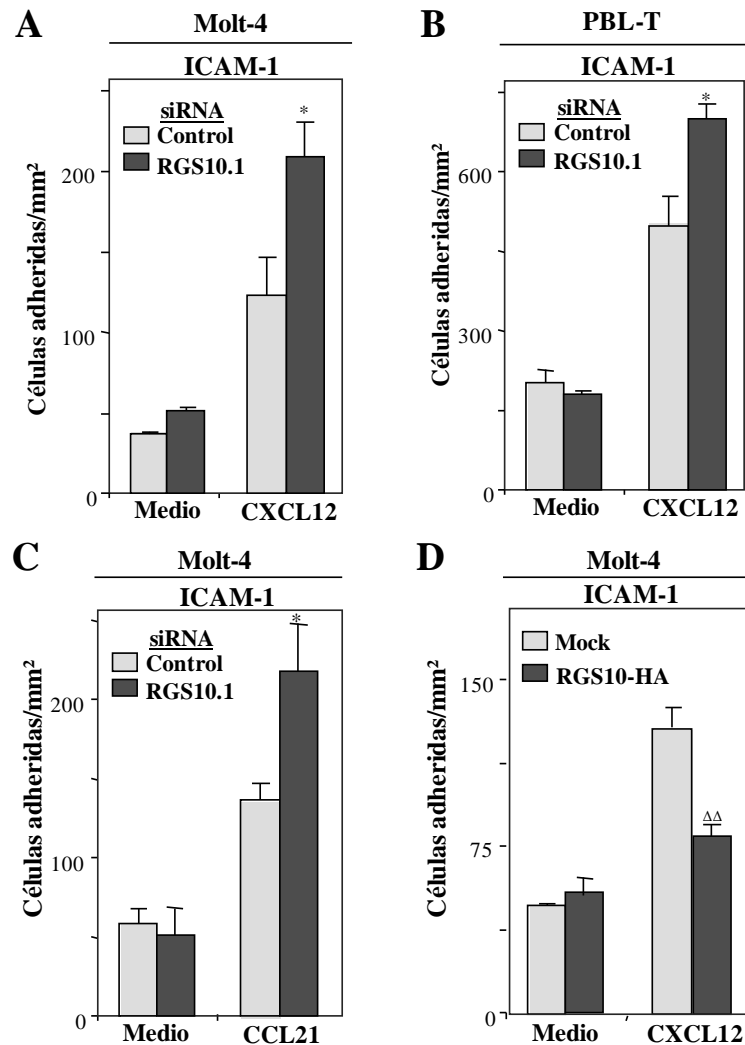


Figura 44. Papel de RGS10 en la adhesión dependiente de $\alpha\text{L}\beta\text{2}$ en respuesta a quimioquinas. Las células fueron transfectadas con siRNA RGS10 o control y sometidas a ensayos de adhesión a ICAM-1 inmovilizado en ausencia o presencia de CXCL12 (A, B), o de CCL21 (C). (D) Las células transfectadas con el vector RGS10-HA o con el vector vacío se sometieron a ensayos de adhesión a ICAM-1 en ausencia o presencia de CXCL12. Los datos representan la media \pm SD de triplicados de dos experimentos independientes. La adhesión fue significativamente aumentada, * $p < 0.05$, o inhibida, $\Delta\Delta$ $p < 0.01$.

El silenciamiento de RGS10 no afecta la activación inicial de $\alpha\text{4}\beta\text{1}$ y $\alpha\text{L}\beta\text{2}$ en respuesta a quimioquinas.

Para determinar qué etapas del proceso de adhesión celular estaban reguladas por RGS10, llevamos a cabo en primer lugar ensayos de adhesión en condiciones de flujo utilizando cámaras de flujo en las que se analizó la adhesión a VCAM-1 estimulada por CXCL12 de células T silenciadas para RGS10. Así, los transfectantes de células Molt-4 y PBL-T fueron perfundidos a una intensidad inicial de flujo de 1 dina/cm^2 , determinándose posteriormente los niveles de *rolling* y adhesión firme. Los transfectantes deficientes en

RGS10 mostraron un aumento moderado y estadísticamente no significativo ($p > 0.05$) de la adhesión estable a VCAM-1 coinmovilizado con CXCL12 en comparación con los transfectantes siRNA control (**Figura 45A, B**). En experimentos previos observamos que la adhesión firme inducida por la quimioquina fue abolida mediante el pre-tratamiento celular con toxina pertúsica (no mostrado).

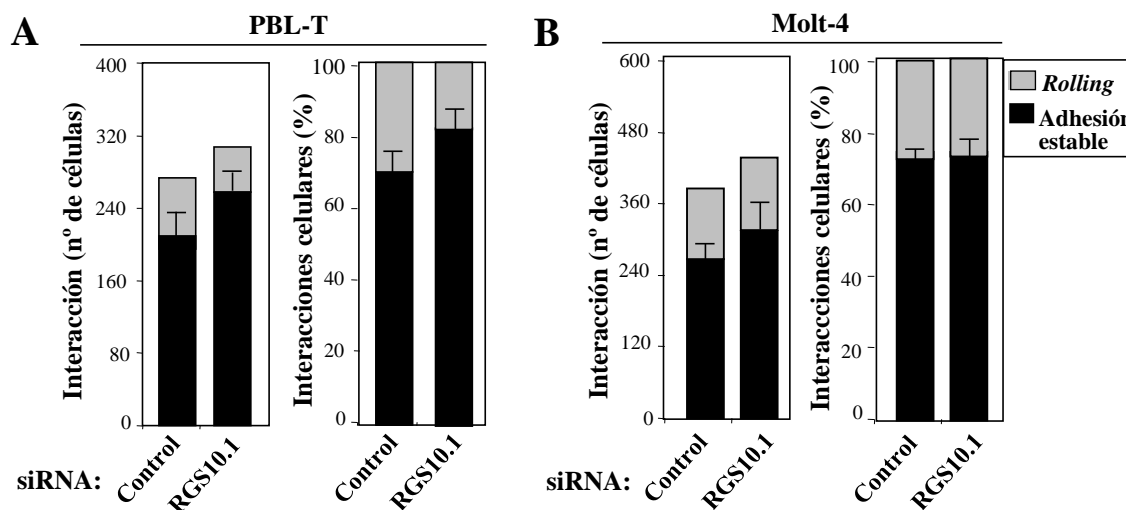


Figura 45. Papel de RGS10 en la adhesión a VCAM-1 en respuesta a CXCL12 analizada en condiciones de flujo. PBL-T (**A**) o células Molt-4 (**B**) fueron transfectadas con los siRNA indicados y perfundidas en cámaras de flujo que contenían VCAM-1 coinmovilizado con CXCL12, analizándose el *rolling* y la adhesión estable ($n = 3$). Los datos representan la media \pm SD del número de células adheridas y los porcentajes de células que realizaron *rolling* y adhesión estable, respecto de la población total de células que llevaron a cabo alguno de estos tipos de interacciones.

La disociación entre Vav1 y talina y el incremento de asociación entre talina y $\beta 1$ en respuesta a quimioquinas forman parte de los eventos tempranos que conducen a la activación de $\alpha 4\beta 1$ (García-Bernal et al., 2009). Experimentos de co-inmunoprecipitación revelaron que ni la disociación Vav1-talina, ni el aumento del ensamblaje talina- $\beta 1$ inducido por CXCL12 fueron significativamente afectados tras el silenciamiento de RGS10 (**Figura 46A, B**). Asimismo, para analizar la posible implicación de RGS10 durante los eventos iniciales de la adhesión de células T y mediada por $\alpha 4\beta 1$ en ausencia de *spreading*, se analizó por citometría de flujo la unión soluble de VCAM-1-Fc. El nivel de unión de VCAM-1-Fc inducido por CXCL12 a las células Molt-4 transfectadas con siRNA RGS10 fue similar al de los transfectantes siRNA control (**Figura 46C**), y en ambos casos la unión fue bloqueada mediante anticuerpos anti- $\alpha 4$.

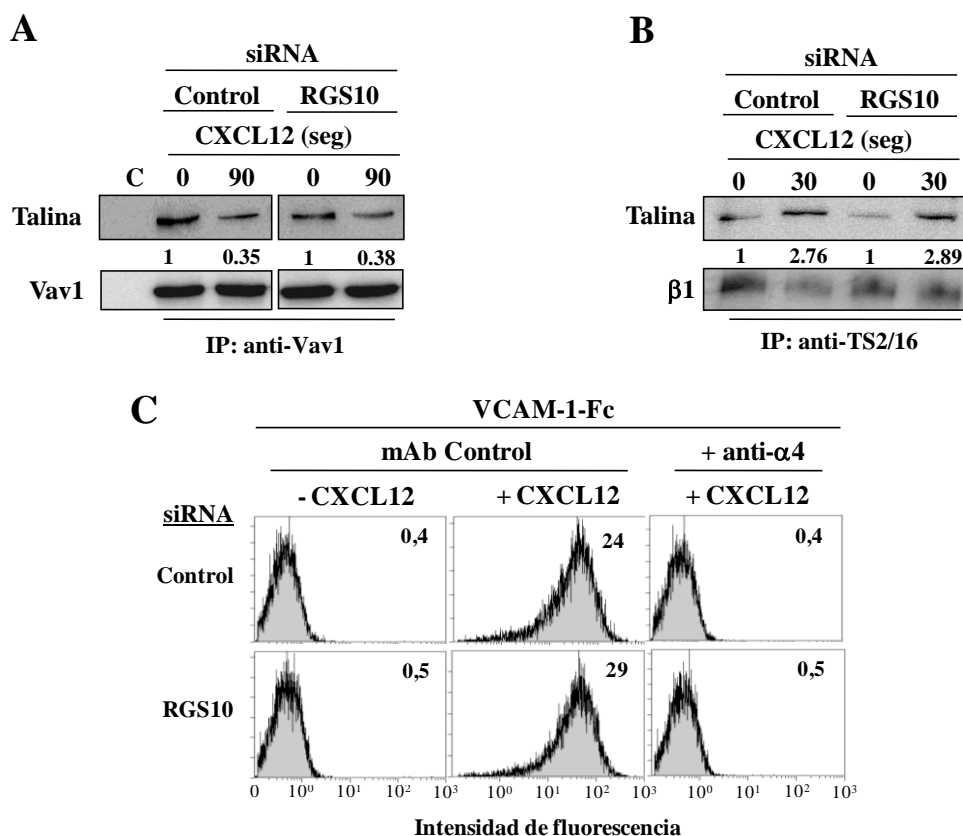


Figura 46. El silenciamiento de RGS10 no afecta la activación de $\alpha 4\beta 1$ en respuesta a quimioquinas. (A, B) Las células Molt-4 fueron transfectadas con siRNA RGS10 o control, y posteriormente incubadas con CXCL12 durante los tiempos indicados. Tras lisarlas, los extractos celulares fueron sometidos a inmunoprecipitación seguido de *western blot* utilizando anticuerpos frente a las proteínas indicadas. (C) Las células Molt-4 transfectadas con siRNA control o RGS10 fueron pre-incubadas con anticuerpos control o anti- $\alpha 4$, y posteriormente estimuladas en ausencia o presencia de CXCL12, añadiéndose finalmente VCAM-1-Fc. La cuantificación de la unión de VCAM-1-Fc se determinó mediante citometría de flujo. Los números insertados representan el valor medio de intensidad de fluorescencia, mostrándose un resultado representativo de tres experimentos diferentes.

Para determinar si RGS10 es capaz de regular la activación de $\alpha L\beta 2$ en respuesta a quimioquinas, se llevaron a cabo ensayos de citometría de flujo utilizando tanto el anticuerpo anti- $\beta 2$ MEM-148, el cual reconoce estados de alta afinidad de $\alpha L\beta 2$ (Tang et al., 2005), como ICAM-1-Fc. Los resultados indicaron que las células Molt-4 silenciadas en RGS10 no presentaban alteraciones significativas en la unión de MEM-148 (Figura 47A) o de ICAM-1-Fc (Figura 47B) tras estimulación con CXCL12, en comparación con la unión a transfectantes control. En conjunto, estos datos sugieren que RGS10 no tiene un papel significativo en la generación de conformaciones de alta afinidad de las integrinas $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha L\beta 2$ en respuesta a la estimulación por quimioquinas.

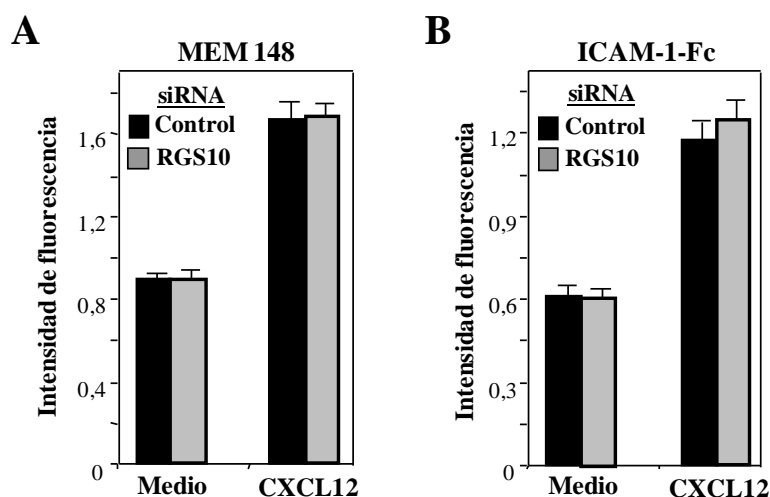


Figura 47. El silenciamiento de RGS10 no afecta a la generación de formas de alta afinidad de $\alpha\text{L}\beta\text{2}$ en respuesta a quimioquinas. Los transfectantes incubados en presencia o ausencia de CXCL12 fueron analizados por citometría de flujo utilizando anticuerpos control o MEM 148 (A), o ICAM-1-Fc (B). Se muestra un resultado representativo de tres experimentos realizados de forma independiente.

RGS10 regula el reforzamiento de la adhesión y el *spreading* de células T mediada por $\alpha\text{4}\beta\text{1}$ en respuesta a CXCL12.

Para estudiar si las etapas de reforzamiento de la adhesión mediada por $\alpha\text{4}\beta\text{1}$ y el posterior *spreading* celular estaban reguladas por RGS10, se analizó la resistencia a dicha adhesión en cámaras de flujo, y se llevaron a cabo ensayos de *spreading* celular. Tal y como se realizó con los transfectantes silenciados en SLP-76, ADAP o Pyk2 con el fin de evaluar la resistencia de la adhesión al flujo se permitió que los transfectantes deficientes en RGS10 se unieran a VCAM-1/CXCL12, y a continuación se fue incrementando la intensidad de flujo desde 1 hasta 10 dinas/cm², analizándose posteriormente el porcentaje de células adheridas en cada incremento del flujo. De forma notable, se observó que los transfectantes siRNA RGS10 desarrollaron una mayor resistencia al despegado por aumento de flujo con respecto a los transfectantes siRNA control (Figura 48). Las diferencias fueron detectadas en mayor grado en los PBL-T que en las células Molt-4, observándose que a intensidades de flujo entre 5 y 10 dinas/cm² permanecían adheridas aproximadamente el doble de transfectantes siRNA RGS10 que siRNA control (Figura 48, izquierda).

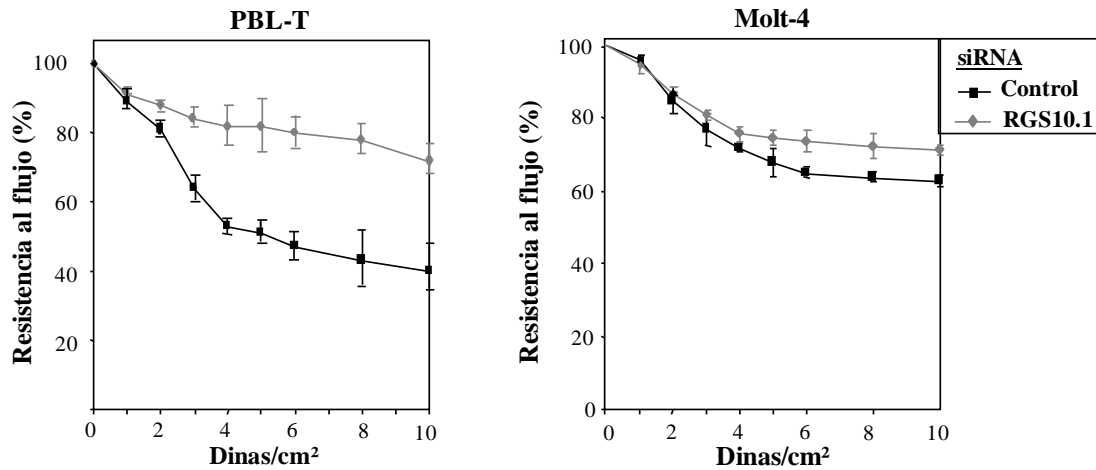


Figura 48. El silenciamiento de RGS10 se traduce en un reforzamiento de la adhesión de linfocitos T a VCAM-1 en respuesta a CXCL12. Las células se transfectaron con los siRNA indicados y fueron posteriormente perfundidas en cámaras de flujo que contenían VCAM-1 coimmobilizado con CXCL12. A continuación se determinó la resistencia de la adhesión celular tras incrementar progresivamente la intensidad de flujo. Los datos representan la media \pm SD del porcentaje de células que permanecieron adheridas en cada incremento de flujo, respecto del número inicial de células adheridas antes de aplicar el flujo.

Asociado al reforzamiento de la adhesión observado en los transfectantes deficientes en RGS10, pudimos comprobar que estos desarrollaron un grado mayor de *spreading* sobre VCAM-1 en comparación con los transfectantes siRNA control (**Figura 49**). Asimismo, análisis por microscopía de interferencia de reflexión mostró que el plano focal de unión al ligando de las células deficientes en RGS10 tenía un área mayor que la de los transfectantes control. Estos datos, junto con la mayor resistencia al flujo mostrada por las células deficientes en RGS10 indican que los pasos de reforzamiento y *spreading* de la adhesión de células T mediada por $\alpha 4\beta 1$ tras la estimulación por quimioquinas son dependientes de RGS10.

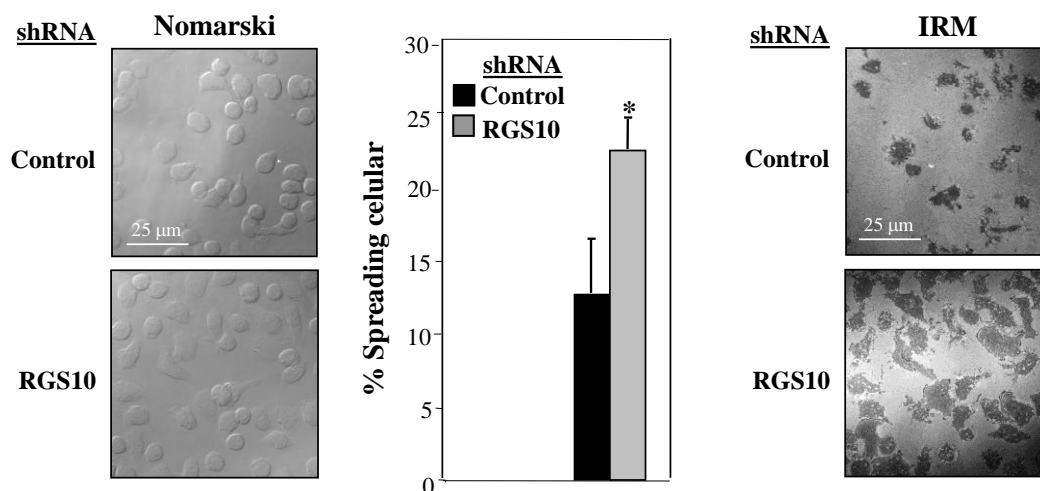


Figura 49. Papel de RGS10 en el desarrollo de *spreading* celular. Las células Molt-4 transfectadas con siRNA RGS10 o control fueron depositadas sobre cubres tapizados con VCAM-1 coimmobilizado con CXCL12, y posteriormente sometidas a ensayos de *spreading* celular. Las imágenes de Nomarski (izquierda) muestran células redondeadas y otras realizando *spreading* en diversos campos representativos. El porcentaje de células en *spreading* se determinó a partir de células en diferentes campos de visión (n=2500-3000) (centro). El *spreading* fue significativamente aumentado, * p<0.05. Se muestran asimismo las imágenes por microscopía de interferencia por reflexión (derecha).

El control por RGS10 de la adhesión de células T dependiente de $\alpha 4\beta 1$ es mediado por la activación de Vav1-Rac en respuesta a CXCL12.

La activación por quimioquinas de la vía de señalización Vav-Rac1 es requerida para el reforzamiento de la adhesión mediado por $\alpha 4\beta 1$ en células T (García-Bernal et al., 2005b). Notablemente, el silenciamiento de RGS10 en células Molt-4 se correlacionó con un aumento en la fosforilación en tirosinas de Vav1 y en una mayor activación de Rac en respuesta a CXCL12, en comparación con células transfectadas con siRNA control (**Figura 50A, B**). Por el contrario, la sobreexpresión de RGS10 se tradujo en una notable reducción de la fosforilación en tirosinas de Vav1 (**Figura 50C**), así como en una disminución de la activación de Rac1 en relación a los transfectantes control (**Figura 50D**).

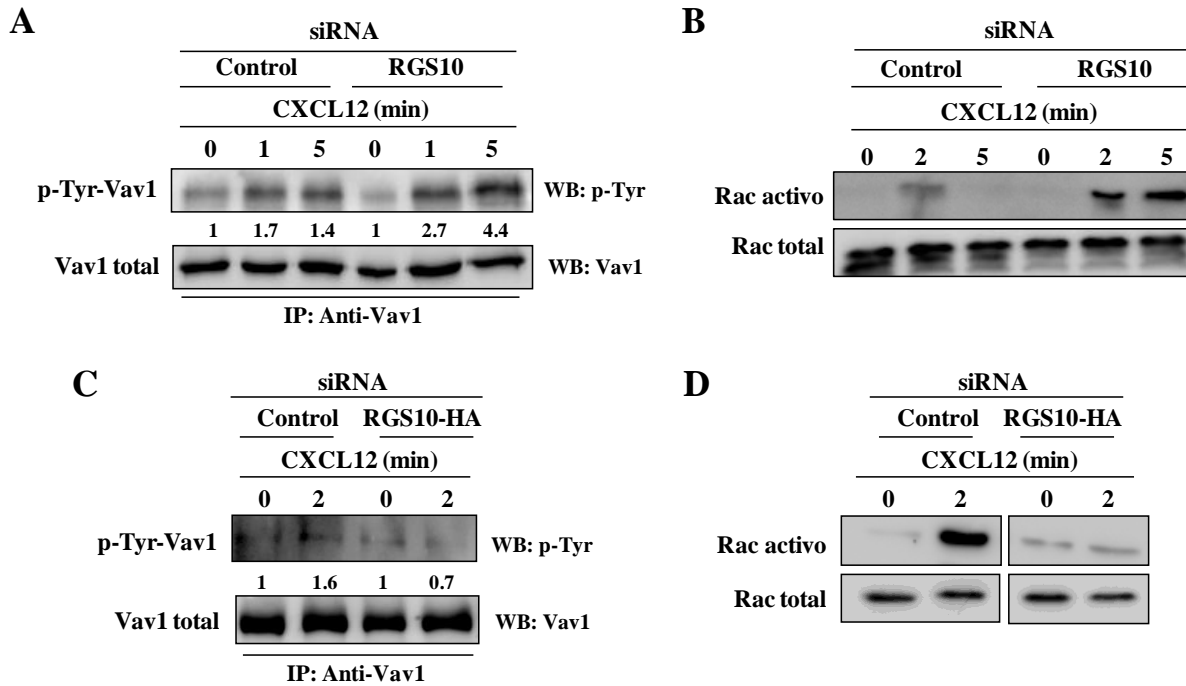


Figura 50. Papel de RGS10 en la activación por CXCL12 de la vía de señalización Vav1-Rac1. (A, B) Las células Molt-4 transfectadas con siRNA RGS10 o control fueron expuestas a CXCL12 durante los tiempos indicados, y tras solubilización celular, los extractos se analizaron para detectar la fosforilación en tirosinas de Vav1 (A), o para analizar la activación de Rac1 (B). (C, D) Las células Molt-4 transfectadas con el vector RGS10-HA o con un vector vacío (Mock) se incubaron con CXCL12, y fueron posteriormente procesadas y analizadas como en (A) y (B), respectivamente.

Estudios previos de nuestro laboratorio indicaron que el silenciamiento de Rac1 produce un bloqueo de la adhesión estimulada por CXCL12 a VCAM-1 (Garcia-Bernal et al., 2005b). De manera destacada, la menor estimulación por CXCL12 de la adhesión a VCAM-1 tras la sobreexpresión de RGS10 pudo ser significativamente rescatada mediante la co-expresión de una forma activa de Rac1 (V12) fusionada a GFP. Este rescate se produjo tanto en condiciones de adhesión estática como en condiciones de flujo (Figura 51).

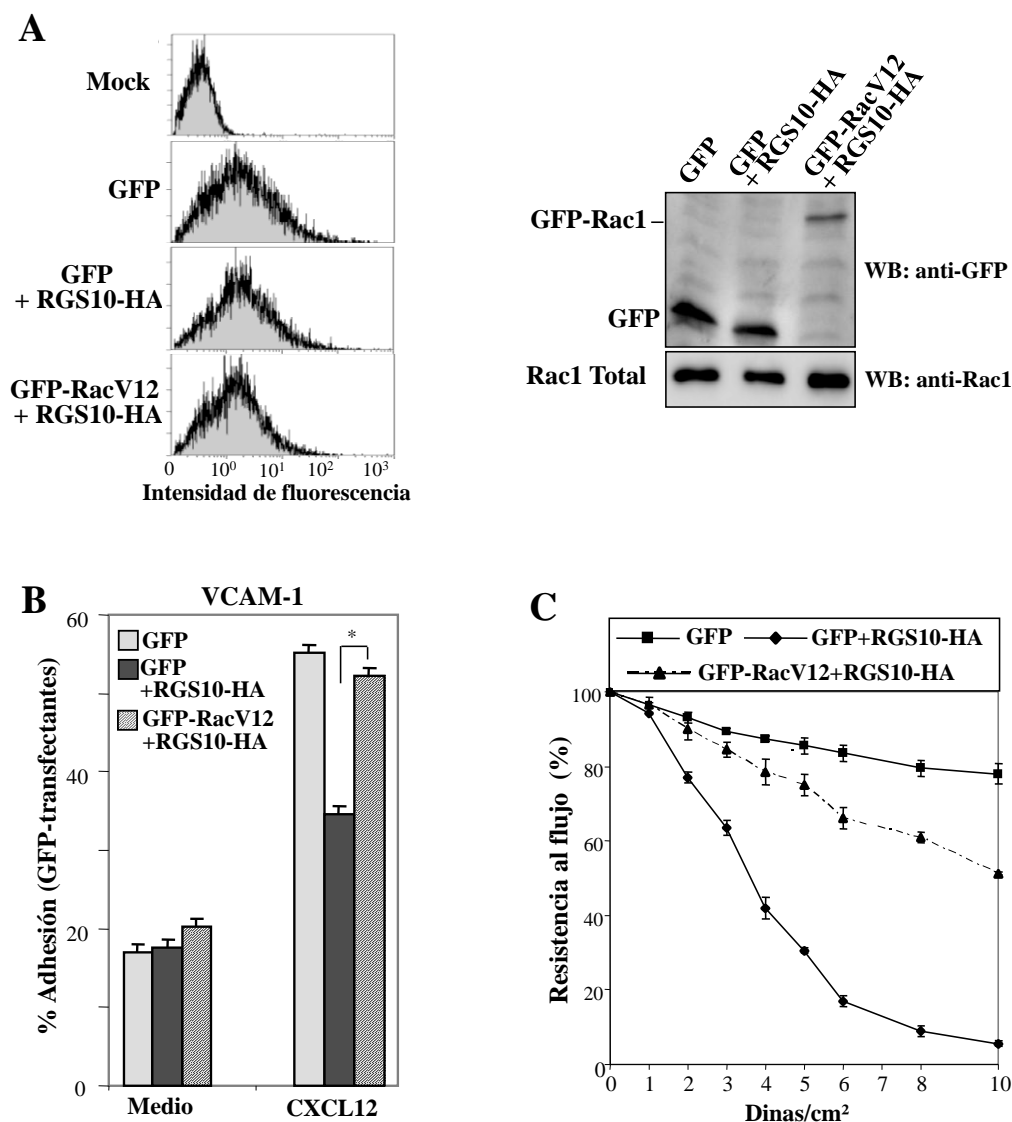


Figura 51. El control por RGS10 de la adhesión de células T dependiente de $\alpha 4\beta 1$ es mediado por la activación de Rac. **(A)** Las células Molt-4 se transfectaron con un vector vacío (Mock), con el vector GFP, o fueron co-transfectadas con los vectores GFP y RGS10-HA, o con GFP-RacV12 y RGS10-HA. Los transfectantes fueron analizados mediante citometría de flujo para determinar los niveles de expresión de GFP (izquierda), o mediante *western blot* utilizando los anticuerpos indicados (derecha). **(B)** Las células Molt-4 transfectadas con dichos vectores fueron sometidas a adhesión estática a VCAM-1 coinmovilizado en ausencia o presencia de CXCL12. Los porcentajes de transfectantes GFP adheridos representan la media \pm SD de tres experimentos independientes. La adhesión fue significativamente rescatada, * $p < 0.05$. **(C)** Dichos transfectantes fueron perfundidos a 1 dina/cm² en cámaras de flujo sobre una placa tapizada con VCAM-1 coinmovilizado con CXCL12, analizándose posteriormente la resistencia de la adhesión al flujo.

La activación de la GTPasa Rap1 ha sido relacionada previamente con la estimulación por quimioquinas de la adhesión dependiente de integrinas leucocitarias (Bos, 2005; Ghandour et al., 2007; Shimonaka et al., 2003). Las células Molt-4 silenciadas para RGS10 no mostraron alteraciones significativas de la activación de Rap1 en respuesta a CXCL12 (Figura 52A). Adicionalmente, la delección de Rap1 en células

Molt-4 causó una inhibición parcial (40%) de la adhesión a VCAM-1 estimulada por CXCL12 (**Figura 52B**). En conjunto, estos datos indican que una de las principales consecuencias de la acción de RGS10 es la limitación de la activación de la vía Vav-Rac en respuesta a quimioquinas, lo que se traduce en una menor estimulación de la adhesión mediada por $\alpha4\beta1$.

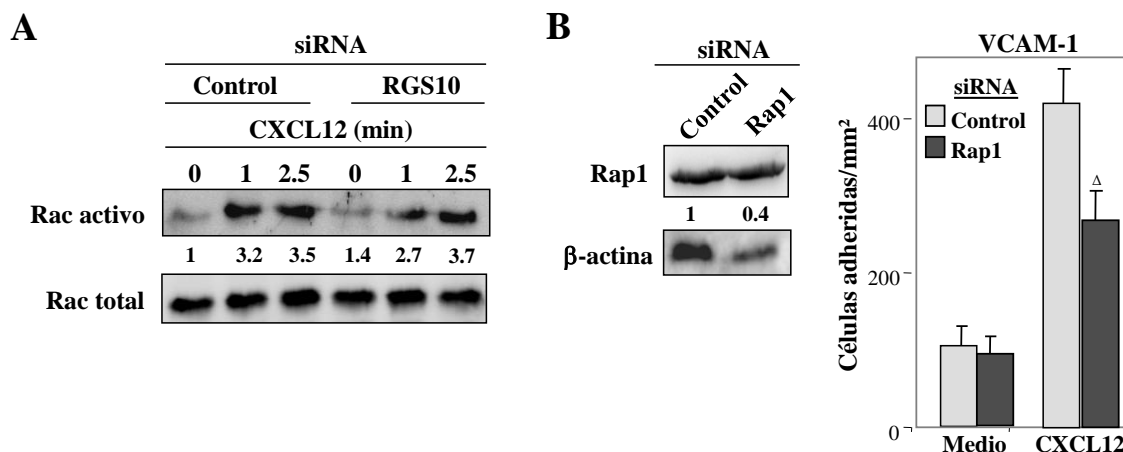


Figura 52. La activación por CXCL12 de Rap1 no depende de RGS10. (A) Las células Molt-4 transfectadas con siRNA RGS10 o control fueron incubadas con o sin CXCL12, y los transfectantes posteriormente sometidos a ensayos GTPasa para analizar la activación de Rap1. (B) Las células Molt-4 transfectadas con siRNA Rap1 o control fueron analizadas en ensayos de adhesión a VCAM-1 inmovilizado en ausencia o presencia de CXCL12. Los datos representan la media \pm SD de triplicados de 3 experimentos independientes. La adhesión fue significativamente inhibida, ^Δ $p < 0.05$.

RGS10 regula la quimiotaxis y la activación de Cdc42 en células T.

Finalmente, investigamos si RGS10 pudiera controlar otras respuestas de las células T a quimioquinas, adicionalmente de la adhesión celular. Así, se observó que el silenciamiento de RGS10 en células Molt-4 se tradujo en una mayor quimiotaxis hacia CXCL12, mientras que la sobreexpresión de RGS10 resultó en una menor migración, en comparación con los transfectantes control (**Figura 53A**). Asimismo, células deficientes en RGS10 mostraron mayor activación de Cdc42 en respuesta a CXCL12 que las células control (**Figura 53B**). Por el contrario, no se detectaron cambios significativos en la activación de la GTPasa RhoA entre ambos transfectantes (**Figura 53C**).

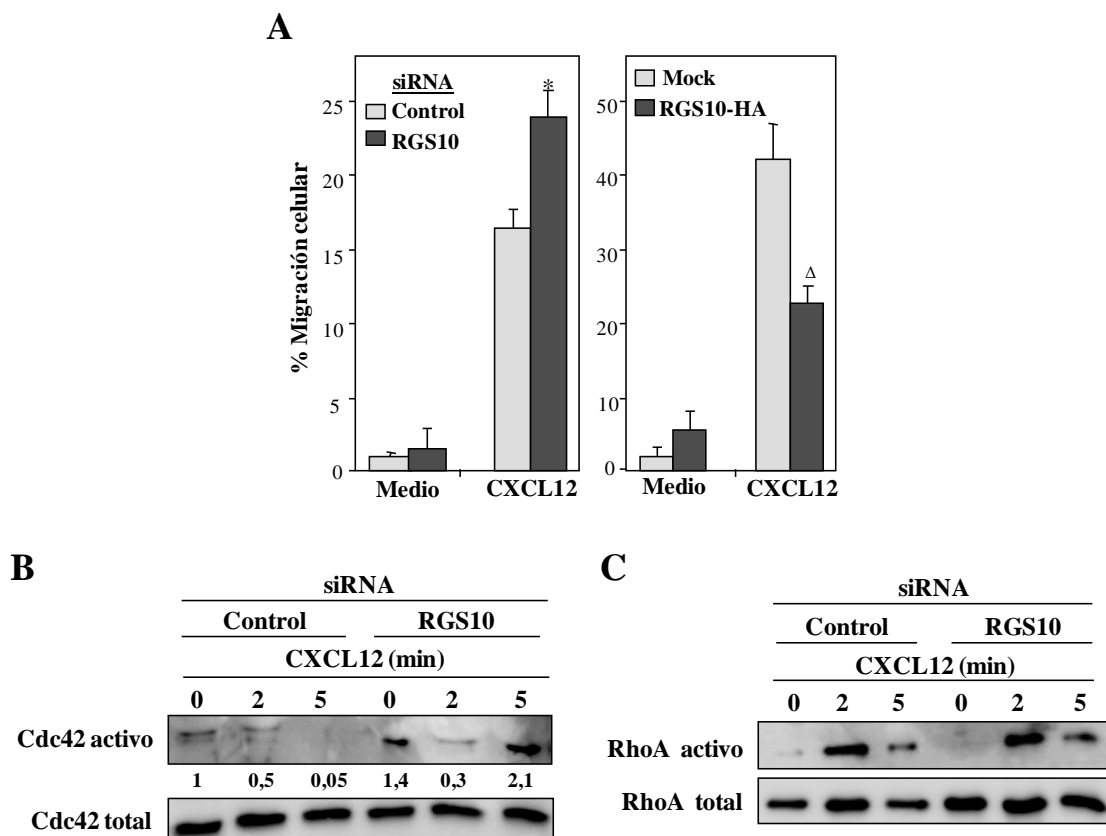


Figura 53. Papel de RGS10 en la quimiotaxis y activación de Cdc42 en respuesta a CXCL12. (A) Las células Molt-4 transfectadas con siRNA RGS10 o control (izquierda), o con el vector RGS10-HA o el vector vacío (Mock), se analizaron en ensayos de quimiotaxis hacia CXCL12. Los datos representan la media \pm SD de duplicados de dos experimentos independientes. La migración fue significativamente estimulada, * $p < 0.05$, o inhibida, $\Delta p < 0.05$. (B, C) Las células Molt-4 transfectadas con siRNA RGS10 o control fueron incubadas con o sin CXCL12, seguido de ensayos GTPasa para detectar activación de Cdc42 (B) o de RhoA (C).

La fosforilación de Erk1/2 en respuesta a CXCL12 fue modestamente incrementada en células silenciadas para RGS10 (Figura 54A), mientras que no se observaron variaciones significativas en la activación de Akt (Figura 54B). Por último, la depleción de RGS10 no tuvo efectos significativos sobre la movilización de calcio provocada por CXCL12 (Figura 54C). En conclusión, estos datos indican que RGS10 es capaz no sólo de regular la adhesión estimulada por quimioquinas de células T dependiente de $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha L\beta 2$, sino también la migración y activación de vías de señalización específicas.

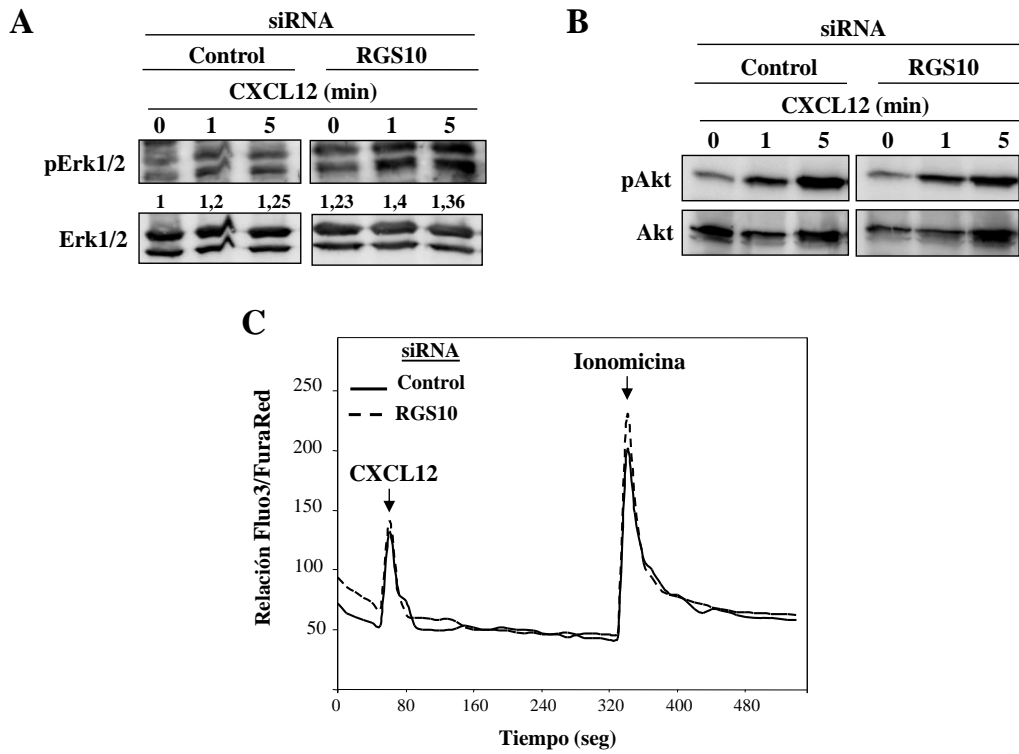


Figura 54. Análisis de la fosforilación de Erk1/2 y Akt, y de la movilización de calcio en respuesta a CXCL12 en células deficientes en RGS10. **(A, B)** Las células Molt-4 transfectadas con siRNA RGS10 o control fueron incubadas con CXCL12 durante los tiempos indicados, y tras lizarlas, los extractos fueron sometidos a *western-blot* con anticuerpos contra Erk1/2, fosfo-Erk1/2, Akt y fosfo-Akt. **(C)** Los mismos transfectantes fueron expuestos a CXCL12, analizándose a continuación la movilización de calcio mediante citometría de flujo.

Discusión

La quinasa ZAP-70 promueve la disociación del complejo Va1-talina, lo que es esencial para la estimulación por quimioquinas de la adhesión dependiente de $\alpha 4\beta 1$.

En esta tesis doctoral se ha abordado la identificación de moléculas implicadas en la señalización intracelular que regulan la adhesión de linfocitos T. Cuando estas células son expuestas a quimioquinas, se genera una señalización *inside-out* que converge en los dominios citoplásmicos de integrinas linfocitarias, llevando a su activación y finalmente a la estimulación de la adhesión celular (Ley et al., 2007). La talina interacciona directamente con el dominio citoplásmico de las subunidades β de las integrinas, regulando la activación de éstas (Tadokoro et al., 2003; Wegener et al., 2007). Esto hace que la talina sea una molécula candidata en la transmisión de las señales generadas por las quimioquinas y dirigidas a la estimulación de la adhesión celular. Confirmando esta hipótesis, trabajos previos (García-Bernal et al., 2009; Manevich et al., 2007) han demostrado que talina es esencial para la estimulación de la adhesión de células T mediada por $\alpha 4\beta 1$ en respuesta a quimioquinas. Asimismo, Vav1 es un componente clave de esta señalización ya que es requerido para la activación de la integrina $\alpha 4\beta 1$ (García-Bernal et al., 2005b). Nuestros estudios han demostrado que Vav1 y talina se asocian constitutivamente en linfocitos T humanos no estimulados (García-Bernal et al., 2009), y que tras la activación de estas células por quimioquinas, Vav1 y talina se disocian gradualmente, lo cual representa un evento clave para la activación de la adhesión celular mediada por $\alpha 4\beta 1$. Además de su asociación con Vav1, talina se une constitutivamente a $\beta 1$. La activación de $\alpha 4\beta 1$ por CXCL12 requiere cambios dinámicos en las asociaciones entre $\alpha 4\beta 1$, talina y Vav1, de modo que se produce un incremento en la unión talina- $\alpha 4\beta 1$ y la disociación de Vav1 de talina. Asimismo, el complejo Vav1-talina juega un papel importante en la asociación talina- $\beta 1$, si bien el ensamblaje entre talina y $\beta 1$ es independiente de la disociación de Vav1 y talina, sugiriendo que tiene lugar antes del desensamblaje Vav1-talina.

En la presente tesis mostramos que ZAP-70 es requerida para la activación de $\alpha 4\beta 1$ tras estimulación por CXCL12, ya que esta quinasa es necesaria para la disociación del complejo Vav1-talina. Este hecho quedó patente en los experimentos de citometría de flujo utilizando el anticuerpo anti- $\beta 1$ 15/7, en los que se obtuvo un menor nivel de activación de $\beta 1$ en las células silenciadas para ZAP-70 en comparación con los transfectantes control. Un potencial mediador de la activación de ZAP-70 tras la estimulación de receptores de quimioquinas es la quinasa Lck, la cual es una diana de la

señalización por CXCL12 (Inngjerdingen et al., 2002), siendo ésta responsable de la fosforilación de ZAP-70 en tirosinas. A su vez, ZAP-70 está involucrada en la fosforilación en tirosinas de Vav1 tras estimulación por CXCL12 (Ottoson et al., 2001). Nuestros datos sugieren que esta fosforilación provoca el debilitamiento de la asociación Vav1-talina. Asimismo, la fosforilación de Vav1 por ZAP-70 en respuesta a la quimioquina tiene lugar mientras Vav1 está asociada con talina, como indica el hecho de que la unión de ZAP-70 a Vav1 no ocurre en células silenciadas para talina. Estas conclusiones están basadas, en primer lugar, en el hecho de que el bloqueo de la formación del complejo Vav1-talina tras el silenciamiento de talina causa una subsiguiente inhibición de la fosforilación de Vav1. En segundo lugar, la depleción de la talina disminuye la unión Vav1-ZAP-70, y por último, la inhibición de la actividad de ZAP-70 impide la fosforilación de Vav1 dependiente de quimioquina, así como el desensamblaje del complejo Vav1-talina. Aunque la fosforilación de Vav1 es difícil de detectar a tiempos tempranos en células Molt-4, resultados con linfocitos PBL-T, junto con las observaciones anteriores, sugieren fuertemente que la fosforilación de Vav1 por ZAP-70 ocurre en el complejo Vav1-talina, actuando talina de este modo como un modulador de la fosforilación en tirosinas de Vav1. En conjunto, nuestros datos sugieren que Vav1 funciona como una molécula con capacidad represora de la talina que necesita ser fosforilada por ZAP-70 para ser liberada del complejo talina- $\alpha 4\beta 1$, y así dejar a la talina accesible para llevar a cabo la óptima activación de $\alpha 4\beta 1$.

Nuestros resultados preliminares obtenidos mediante ensayos de microscopía confocal muestran una co-localización de Vav1-talina en células Jurkat, la cual se pierde transitoriamente tras la activación del TCR. Asimismo, detectamos co-localización de ZAP-70 con talina, disminuyendo tras la activación con anticuerpos anti-CD3. Estos datos sugieren que la cascada de señalización desencadenada tras la activación del TCR es similar a la de receptores de quimioquinas, y apunta a que podría asimismo mediar la señalización *inside-out* que conduciría finalmente a la activación de las integrinas (Alon and Dustin, 2007; Horn et al., 2009; Shimizu et al., 1990).

Las proteínas SLP-76, ADAP y Pyk2 regula la adhesión de linfocitos T mediada por $\alpha 4\beta 1$ en respuesta a quimioquinas.

Las proteínas SLP-76 y Pyk2, al igual que ZAP-70, interaccionan con Vav1. La unión Vav1-SLP-76 aumenta tras la fosforilación de SLP-76 por ZAP-70 tras

estimulación por TCR (Raab et al., 1997; Tuosto et al., 1996; Wu et al., 1996), mientras que la unión Vav1-Pyk2 puede tener lugar independientemente de la activación del TCR (Katagiri et al., 2000). Por otra parte, ADAP se une al dominio SH₂ de SLP-76 (da Silva et al., 1997b; Musci et al., 1997) por lo que podría asociarse indirectamente con Vav1. Aunque SLP-76 carece de función catalizadora, tiene un papel fundamental al ejercer de soporte de unión para otras proteínas efectoras, situándolas próximas a la membrana y facilitando la respuesta de activación celular a través del TCR. En el presente trabajo mostramos que SLP-76 ejerce asimismo como proteína *scaffold* tras la activación de células T por CXCL12, al detectarse la formación de complejos que contienen SLP-76, Vav1, ADAP, ZAP-70 y talina. La asociación SLP-76-talina ha sido previamente descrita en timocitos de ratón, y dicha unión fue incrementada tras estimulación con anticuerpos anti-CD3 (Fischer et al., 1998). De manera similar, hemos observado que la asociación SLP-76 con talina en células T es ligeramente aumentada por CXCL12. Confirmando el papel de SLP-76 como proteína *scaffold*, hemos comprobado que SLP-76 se localiza en la membrana y que la estimulación con CXCL12 provoca la movilización transitoria de ADAP a la membrana, coincidiendo con el momento de asociación entre SLP-76 y ADAP.

CXCL12 estimula la fosforilación de Pyk2 en células T y la asociación de esta quinasa con Vav1 y ZAP-70 (Okabe et al., 2005). En el presente trabajo hemos confirmado la asociación Vav1-Pyk2, así como el aumento de esta unión en respuesta a CXCL12. Adicionalmente, ensayos de co-inmunoprecipitación revelaron que Pyk2 se asocia específicamente a talina, lo cual fue demostrado por el hecho de que esta unión fue inhibida en células silenciadas para Pyk2. Estos resultados indican que Pyk2, al igual que FAK, una proteína con elevada homología con Pyk2 y que interacciona con talina a través de su dominio C-terminal FAT, tiene la capacidad de unirse a talina. Estudios previos ha mostrado que Pyk2 co-localiza con talina, vinculina, paxilina en podosomas de macrófagos (Duong and Rodan, 2000). La posibilidad de que el dominio C-terminal de Pyk2 con homología con la región FAT de FAK pueda mediar la interacción con talina será objeto de futuros estudios. Observamos asimismo que Pyk2 puede asociarse con SLP-76, y que el silenciamiento de Pyk2 no altera la formación de complejos entre Vav1, SLP-76 y talina, lo que indicaría que Pyk2 no es requerida para la formación de estos complejos, y sugiere que podría estar formando parte de ellos mediante su unión a Vav1.

Utilizando ensayos de adhesión estática a FN-H89 y VCAM-1 inmovilizados con CXCL12, observamos que el silenciamiento de ADAP en células T redujo

significativamente el nivel de estimulación por CXCL12 de la adhesión a ambos ligandos, mientras que la depleción de SLP-76 indujo una disminución parcial de adhesión a FN-H89, pero no afectó la adhesión a VCAM-1. Por el contrario, el silenciamiento de Pyk2 se tradujo en un incremento significativo de la adhesión, tanto a FN-H89 como a VCAM-1. Los ensayos de adhesión en condiciones de flujo revelaron que el silenciamiento de SLP-76 o ADAP causa una disminución de la adhesión estable de células T a VCAM-1/CXCL12, asociado a un incremento de *rolling* celular. En el caso de SLP-76, esta observación se vio corroborada por la disminución de la adhesión firme de células J14 deficientes en SLP-76 en comparación con la línea Jurkat parental. De modo similar a la adhesión estática, células T deficientes en Pyk2 mostraron un aumento de su adhesión estable a VCAM-1 inmovilizado con CXCL12 en condiciones de flujo. La detección de la disminución de la adhesión en condiciones de flujo a VCAM-1 de células silenciadas para SLP-76 y la ausencia de esta disminución en ensayos de adhesión en condiciones estáticas es similar a lo que hemos observado previamente con células deficientes en DOCK2 (García-Bernal et al., 2006). Estos resultados sugieren que la presencia de un estrés como es el flujo, puede resaltar defectos funcionales que no pueden detectarse en condiciones más permisibles, como es el caso de la adhesión estática. Esto sugiere que sólo el silenciamiento de los componentes más importantes de la señalización *inside-out* activada por quimioquinas y requerida para la estimulación de la adhesión mediada por $\alpha 4\beta 1$, como Vav1, talina y ZAP-70, produce efectos suficientes como para ser detectados en adhesiones estáticas. En relación con estas observaciones, es importante destacar que se ha mostrado recientemente que la estimulación por CXCL12 de la adhesión a ICAM-1 de células deplecionadas mediante siRNA para SLP-76 o de células J14, fue observada en condiciones de flujo, pero no en adhesiones estáticas (Horn et al., 2009; Lee et al., 2012).

La reducción de la adhesión estimulada por CXCL12 de células T deficientes en SLP-76 o ADAP no fue debida a alteraciones en la generación de conformaciones de alta afinidad de $\alpha 4\beta 1$, puesto que dichas células unieron el anticuerpo anti- $\beta 1$ HUTS-21 y VCAM-1-Fc de modo comparable a los transfectantes control. Asimismo, el silenciamiento de Pyk2 no se tradujo en un aumento en la activación de $\alpha 4\beta 1$, lo cual fue confirmado utilizando HUTS-21 y VCAM-1-Fc, así como en experimentos de análisis de la asociación talina- $\beta 1$ en respuesta a CXCL12, lo cual constituye un evento temprano en la activación de dicha integrina. En cambio, la unión de VCAM-1-Fc a $\alpha 4\beta 1$ aumentó a tiempos más largos de incubación con este ligando en los transfectantes silenciados para Pyk2. Estos datos sugieren que SLP-76, ADAP y Pyk2 no tienen un papel significativo en

la generación de conformaciones de alta afinidad de $\alpha 4\beta 1$ en respuesta a quimioquinas. Asimismo, dado que los ensayos de unión de VCAM-1-Fc soluble no conllevan *spreading* celular, los resultados indican que Pyk2 es capaz de regular la avidéz de esta integrina.

Cuando analizamos el papel de SLP-76, ADAP y Pyk2 en la resistencia de la adhesión a VCAM-1/CXCL12 en experimentos en los que se incrementa secuencialmente la intensidad del flujo, observamos que mientras que el silenciamiento de ADAP provocaba una clara disminución en la fuerza de la adhesión, tanto los transfectantes deplecionados en SLP-76 como las células J14 mostraron diferencias mínimas en la resistencia al flujo comparado con células control. Por el contrario, el silenciamiento de Pyk2 generó una mayor resistencia al despegado en comparación con células control. El *spreading* celular es una etapa tardía en el proceso de adhesión, y es dependiente de polimerización de actina. El análisis del papel de SLP-76, ADAP y Pyk2 en estos dos procesos reveló un papel activador de las dos primeras proteínas, mientras que Pyk2 tendría una función reguladora negativa. En conjunto, todos estos datos indican que ADAP y Pyk2 regulan principalmente el reforzamiento y el *spreading* de células T mediado por $\alpha 4\beta 1$ en respuesta a quimioquinas, mientras que SLP-76 está implicado fundamentalmente en el proceso de *spreading*.

La GTPasa Rac1 regula la dinámica de los filamentos de actina y es activada por CXCL12. Asimismo, su función es requerida para el reforzamiento de la adhesión y para el *spreading* mediado por $\alpha 4\beta 1$ en células T (García-Bernal et al., 2005b). Notablemente, observamos que la activación de Rac1 inducida por CXCL12 en células silenciadas para Pyk2 fue de mayor intensidad y más sostenida en el tiempo en comparación con los transfectantes control. En correlación con esta observación pudimos comprobar que la expresión de una forma dominante negativa de Rac1 redujo el aumento adicional de la adhesión a VCAM-1 producido por el silenciamiento de Pyk2, indicando que dicho aumento es dependiente del incremento en la activación de Rac1. Por tanto, estos resultados indican que Pyk2 regula negativamente dicha adhesión mediante la inhibición de la activación de Rac1. La expresión de PRNK, una forma mutada de Pyk2 que carece de los dominios N-terminal FERM y quinasa, se traduce asimismo en un aumento de la adhesión mediada por $\alpha 4\beta 1$, tanto en ausencia como en presencia de CXCL12. Estos datos sugieren que dicha regulación negativa está contenida en los mencionados dominios FERM y quinasa. El papel del dominio FERM de Pyk2 en activación de Rac y en adhesión celular no ha sido todavía estudiado. Aunque hasta la fecha no se han realizado

ensayos GTPasa para determinar el grado de activación de Rac1 en células transfectadas con PRNK, nuestros datos podrían sugerir que el dominio tirosina quinasa de Pyk2 tendría una función que competiría negativamente con mecanismos estimuladores de la activación de Rac1 por quimioquinas. Los datos publicados sobre el papel de Pyk2 en la activación de Rac1 y en el *spreading* celular son algo contradictorios. Así, se ha mostrado que la expresión de PRNK se traduce en la inhibición del *spreading* de monocitos (Watson et al., 2001), mientras que macrófagos Pyk2^{-/-} muestran un aumento de su *spreading*, tanto en presencia como en ausencia de quimioquinas (Okigaki et al., 2003). Adicionalmente, estos macrófagos muestran un defecto en su polarización y un aumento en la extensión de *ruffles*, lo que podría indicar una activación de Rac. Asimismo, presentan una reducción en su capacidad migratoria en respuesta a quimioquinas, todo lo cual sugiere un aumento de la capacidad adhesiva de estas células. De modo similar, macrófagos FAK^{-/-} presentan elevada actividad protusiva en sus membranas, defectos migratorios y aumento de la activación de Rac1 (Owen et al., 2007). Finalmente, no se han observado diferencias de *spreading* entre neutrófilos *wt* o deficientes para Pyk2 (Kamen et al., 2011). Todos estos datos sugieren que el papel de Pyk2 en activación de Rac1, adhesión y *spreading* dependen del contexto celular, y probablemente de las vías de señalización reguladas por esta quinasa. Dado que CXCL12 estimula la asociación de Pyk2 con Vav1 y ZAP-70 (Okabe et al., 2005), una posible hipótesis sería que Pyk2 podría oponerse a la fosforilación de Vav1 por parte de ZAP-70 en respuesta a CXCL12. Esto pudiera traducirse en una limitación de la activación de Vav1-Rac1, lo que reduciría la fuerza de la adhesión a VCAM-1 estimulada por CXCL12, asociado a un menor grado de *spreading* celular.

Hemos observado recientemente que las células T silenciadas en ADAP muestran una activación deficiente de Rac en respuesta a CXCL12 (no mostrado). Esto nos llevó a estudiar el papel de Rac en las vías de señalización reguladas por ADAP y Pyk2 durante la adhesión de células T dependiente de $\alpha 4\beta 1$. Dado que los resultados con transfectantes deplecionados para Pyk2 y ADAP indicaron que el silenciamiento de Pyk2 rescata la reducción de la adhesión a VCAM-1 provocada por la depleción de ADAP, asociado a una activación más sostenida de Rac1 en respuesta a CXCL12, estos datos sugieren que la activación de Rac en respuesta a CXCL12 representa un punto común de regulación por parte de Pyk2 y ADAP de la adhesión mediada por $\alpha 4\beta 1$. Los resultados apuntan asimismo a que la regulación por parte de Pyk2 de dicha adhesión podría ser

jerárquicamente más importante que la de ADAP. Las relaciones funcionales entre ambas proteínas serán estudiadas con más detalle en futuros estudios.

El silenciamiento de ADAP en células T no sólo afecta la adhesión a ligandos de $\alpha 4\beta 1$ en respuesta a quimioquinas, tal y como se muestra en este trabajo, sino que inhibe de modo similar la adhesión dependiente de integrinas $\beta 1$ y $\beta 2$ en respuesta a activación por TCR (Griffiths et al., 2001; Peterson et al., 2001). Se ha demostrado previamente que ADAP regula esta adhesión mediante su asociación con la proteína SKAP-55 (Wang et al., 2003), que se asocia a su vez con RIAM. Adicionalmente, RIAM se une al complejo Rap1-RapL (Menasche et al., 2007), dirigiendo el complejo multiproteico a la membrana celular en respuesta a estimulación por CXCL12, e independientemente de la actividad de SLP-76 (Horn et al., 2009). Adicionalmente, RIAM se asocia a proteínas implicadas en reorganización del citoesqueleto de actina como son la profilina y las proteínas Ena/VASP, así como a talina (Lafuente et al., 2004). Este efecto en la dinámica del citoesqueleto de actina, junto con el hecho de que talina se asocie con el dominio citoplásmico de las subunidades β provoca la activación de las integrinas (Lee et al., 2009). De este modo, un posible escenario alternativo por el cual ADAP pudiera regular la estimulación por quimioquinas de la adhesión de células T dependiente de $\alpha 4\beta 1$ podría proceder de su unión con SKAP-55, una posibilidad que se estudiara en el futuro utilizando transfectantes en los que se inhiba la interacción ADAP-SKAP-55.

Al igual que ADAP, SLP-76 interacciona con proteínas que regulan la reorganización del citoesqueleto de actina. La asociación de SLP-76 con Vav1 y Nck permite a Rho GTPasas activadas la regulación de efectores que interaccionan con Nck (Bubeck Wardenburg et al., 1998). Así, el complejo tri-molecular SLP-76-Vav-Nck media la activación del efector de Rac1 denominado Pak, facilitando posteriormente la polimerización de actina (Barda-Saad et al., 2005; Barda-Saad et al., 2010; Bubeck Wardenburg et al., 1998). Asimismo, en células T activadas, ADAP se asocia con Ena/VASP en un complejo multimolecular que incluye además a Nck, WASP y SLP-76, y que regula la dinámica del citoesqueleto de actina en respuesta a TCR (Coppolino et al., 2001; Krause et al., 2000; Pauker et al., 2011). El hecho de que SLP-76 y ADAP interaccionen con proteínas implicadas en la reorganización del citoesqueleto de actina podría representar un mecanismo implicado en el defecto del *spreading* sobre VCAM-1 de células deplecionadas para estas proteínas que se ha demostrado en el presente trabajo.

RGS10 restringe la señalización para la adhesión mediada por las integrinas $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha L\beta 2$ en células T generada por las quimioquinas.

La activación de las integrinas $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha L\beta 2$ en respuesta a quimioquinas durante la extravasación linfocitaria a tejidos dañados u órganos linfoides (Ley et al., 2007; Luster et al., 2005) tiene que ser rápida, para permitir a la célula unirse al endotelio vascular y así poder resistir el flujo sanguíneo, pero también transitoria, para permitir el movimiento del linfocito y su diapédesis a través de la capa endotelial.

La naturaleza transitoria de la activación de las integrinas por quimioquinas indica que debe existir una maquinaria molecular que limite e inhiba finalmente la señalización generada desde la subunidad $G\alpha$ de las proteínas G heterotriméricas acoplada a los receptores de quimioquinas. Para limitar y terminar esta señalización, las células usan diferentes mecanismos entre los que se incluyen la actividad de las proteínas RGS, las cuales aceleran la actividad GTPasa intrínseca de la subunidad $G\alpha$ (Kehrl, 1998; Willars, 2006). En el presente trabajo mostramos que RGS10 restringe la señalización para la adhesión mediada por $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha L\beta 2$ en células T generada por las quimioquinas. Esta observación está apoyada por el hecho de que el silenciamiento de RGS10 produce un aumento significativamente mayor de la adhesión a los ligandos de $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha L\beta 2$ en respuesta a CXCL12 y CCL21, en comparación con transfectantes control. Por el contrario, cuando se sobreexpresa RGS10, la estimulación de la adhesión por estas quimioquinas se reduce. En células T, RGS10 se asocia transitoriamente a $G\alpha_i$ tras la exposición a CXCL12, siendo capaz la toxina pertussica de bloquear el aumento de adhesión a VCAM-1 estimulado por la quimioquina, tanto en transfectantes control como en transfectantes silenciados para RGS10. Por lo tanto, estos datos sugieren que RGS10 inhibe la adhesión mediada por $\alpha 4\beta 1$ al reprimir la señalización procedente de $G\alpha_i$.

Los ensayos de adhesión en condiciones de flujo que permiten una medida de adhesión rápida de células sometidas a estrés por flujo, revelaron que el silenciamiento de RGS10 causa un incremento moderado y estadísticamente no significativo de la adhesión firme de las células T a VCAM-1, tras la etapa de *rolling*. Asimismo, el incremento en la asociación talina- $\beta 1$ estimulado por la quimioquina, un evento temprano que como hemos comentado conduce a la generación de una conformación de alta afinidad de $\alpha 4\beta 1$ necesaria para la unión a VCAM-1 (García-Bernal et al., 2009), no se vio alterado por la depleción de RGS10. Correlacionado con estas observaciones, tanto la unión de VCAM-1-Fc como la de ICAM-1-Fc a sus receptores $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha L\beta 2$, respectivamente, fue similar

en los transfectantes control y silenciados para RGS10, indicando que RGS10 no juega un papel importante en el proceso de reforzamiento de la adhesión. Adicionalmente, la generación de la conformación de alta afinidad de $\alpha\text{L}\beta\text{2}$, medida mediante el anticuerpo MEM148, el cual se une a la subunidad β2 activada, no se vio afectada por el silenciamiento de RGS10.

Por otro lado, dado que la activación de la GTPasa Rac1 en respuesta a quimioquinas es un proceso que regula el reforzamiento de la adhesión mediado por $\alpha\text{4}\beta\text{1}$ (Garcia-Bernal et al., 2005a), se investigó el papel que podía tener RGS10 sobre la activación de Rac. Los resultados indicaron que la activación de esta GTPasa fue más sostenida en el tiempo y de mayor intensidad en células deplecionadas para RGS10 que los transfectantes control, mientras que esta activación se vio inhibida cuando se sobre-expresaba RGS10. De manera notable, la expresión de una forma constitutivamente activa de Rac1 en células que sobre-expresaban RGS10 llevó a un rescate de la adhesión a VCAM-1 en respuesta a CXCL12, a niveles similares a los observados en transfectantes control. La regulación de la activación de Rac1 por RGS10 fue principalmente consecuencia del control en la fosforilación en tirosinas de Vav1, ya que observamos un incremento en la fosforilación en tirosinas de Vav1 en respuesta a CXCL12 en células silenciadas para RGS10, mientras que la sobre-expresión de RGS10 provocó una reducción en dicha fosforilación. Hasta la fecha no tenemos datos experimentales que expliquen el control por parte de RGS10 de la fosforilación de Vav1 por CXCL12, pero basándonos en trabajos ya publicados, es posible que RGS10 pudiera controlar la duración y/o la intensidad de la activación dependiente de $\text{G}\alpha_i$ de la quinasa ZAP-70 en respuesta a CXCL12 (Ottoson et al., 2001; Ticchioni et al., 2002). Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la acción de RGS10 se opone principalmente al reforzamiento de la adhesión dependiente de Vav1-Rac1 y a los pasos de *spreading* mediado por $\alpha\text{4}\beta\text{1}$ en la adhesión de células T estimulado por quimioquinas, con poca o ninguna implicación por parte de RGS10 en las fases iniciales de la activación de dicha integrina.

Como ya hemos indicado, la unión $\alpha\text{4}\beta\text{1}$ -VCAM-1 promovida por quimioquinas es inhibida en células T silenciadas para Vav1 o talina. La disociación del complejo Vav1-talina unido al aumento de la unión de talina a $\alpha\text{4}\beta\text{1}$ en respuesta a quimioquinas involucra la fosforilación en tirosinas de Vav1 por ZAP-70. El hecho de que la fosforilación de Vav1 ocurra con mayor intensidad en células deficientes en RGS10 comparado con células control, sin estar asociado a un aumento de la unión talina- β1 ,

sugiere una mayor y sostenida activación dependiente de $G\alpha_i$ en células silenciadas para RGS10, sin que ocurra una alteración en la rápida y temprana activación de $\alpha4\beta1$.

La activación de Rap1 en respuesta a quimioquinas afecta a la adhesión de células T dependiente de integrinas leucocitarias (Bos, 2005; Ghandour et al., 2007; Shimonaka et al., 2003). En el presente trabajo mostramos que un silenciamiento de Rap1 afectó parcialmente a la adhesión de células T a VCAM-1 estimulada por CXCL12. Sin embargo, nuestros resultados indicaron que la activación de Rap1 por CXCL12 no se vio significativamente alterada en células T silenciadas para RGS10, sugiriendo un papel menor para Rap1 en el incremento de adhesión detectado en los transfectantes deficientes para RGS10.

Además de limitar el aumento por quimioquinas de la adhesión dependiente de $\alpha4\beta1$ y $\alpha L\beta2$ en células T, RGS10 inhibió asimismo la quimiotaxis independiente de adhesión celular y la activación de Cdc42 en respuesta a CXCL12. Los mecanismos que subyacen al control por parte de RGS10 de estos dos procesos no han sido estudiados en el presente trabajo, pero probablemente también involucran la terminación de la señalización *downstream* dependiente de la activación de $G\alpha_i$.

Con los presentes datos se podría proponer el siguiente modelo. La unión de la quimioquina a su receptor dispararía una señalización dependiente de $G\alpha_i$ que genera cambios en las asociaciones moleculares entre Vav1, talina y $\beta1$, lo que resulta en la activación inicial de $\alpha4\beta1$ (García-Bernal et al., 2009). Pero al mismo tiempo provocaría la asociación de RGS10 con $G\alpha_i$. Mientras los pasos iniciales de la adhesión dependiente de $\alpha4\beta1$ no serían diana directa de la asociación de RGS10 con $G\alpha_i$, la consecuencia de la formación de este complejo sería la terminación gradual de la activación de la vía Vav1-Rac1 que está implicada en el reforzamiento de la adhesión mediada por $\alpha4\beta1$ y estimulada por CXCL12.

Otras proteínas RGS como RGS2, RGS3, RGS4, RGS14 y RGS16 están expresadas en células T, tanto inactivas como activadas a través del TCR o por receptores de quimioquinas (Beadling et al., 1999; Cho et al., 2000; Heximer et al., 1997; Sato et al., 2002; Scheschonka et al., 2000). Por lo tanto, podría especularse que algunas de estas proteínas RGS pudieran contribuir, junto con RGS10, a la inhibición de la adhesión estimulada por quimioquinas de células T dependiente de $\alpha4\beta1$ y $\alpha L\beta2$. Así, un trabajo anterior mostró que la sobreexpresión de RGS1, RGS3 y RGS4 en una línea de células pre-B provocó una reducción en la adhesión a VCAM-1 tras la activación por quimioatrayentes (Bowman et al., 1998). Asimismo, la sobreexpresión de RGS16 se

tradijo en una inhibición de la migración inducida por CXCL12 y de la activación de la MAP quinasa Erk1/2 y de Akt en el modelo de línea celular progenitor Mo7e (Berthebaud et al., 2005). Además, RGS1 y RGS3 inhiben la quimiotaxis estimulada por CXCL12 en células B (Reif and Cyster, 2000). Por lo tanto, la función de las proteínas RGS en células linfoides parece tener una elevada relevancia fisiológica en la terminación de las señales generadas por quimioquinas que controlan importantes procesos como la adhesión, migración y activación celular.

También hay que tener en cuenta que las proteínas RGS no solo se asocian a las subunidades $G\alpha$ y aceleran su actividad GTPasa, sino que también son capaces de actuar como efectores agonistas al competir con moléculas efectoras por las subunidades $G\alpha$ unidas a GTP y pueden adicionalmente interactuar directamente con efectores (Abramow-Newerly et al., 2006; Neitzel and Hepler, 2006; Willars, 2006). Un ejemplo sería la proteína RGS2 que es capaz de unirse a la adenilato ciclasa (Salim et al., 2003), así como la RGS4 que interacciona con la fosfolipasa $C\beta$ y el ácido fosfatídico (Chidiac et al., 2002; Ouyang et al., 2003). Asimismo, RGS14 se une a las formas activadas tanto de H-Ras como de las quinasas Raf (Shu et al.; Willard et al., 2009), regulando su localización subcelular y actividad. Aunque RGS10 pertenece a la misma subfamilia D/R12 que RGS14, RGS10 carece del dominio RBD responsable de la unión de la forma activa de H-Ras. En trabajos futuros, sería importante determinar si existen relaciones estructurales y/o funcionales entre RGS10 y la señalización molecular requerida para la adhesión en células T mediada por $\alpha4\beta1$ en respuesta a quimioquinas.

Como conclusión de los resultados del trabajo realizado, podría clasificarse a ZAP-70, SLP-76 y Pyk2 como proteínas activadoras de la adhesión mediada por $\alpha4\beta1$ en células T en respuesta a CXCL12, y a Pyk2 y RGS10, como proteínas represoras de la misma.

Conclusiones

1. ZAP-70 es requerida para la activación de $\alpha 4\beta 1$ tras la estimulación por CXCL12 al ser necesaria para la disociación del complejo Vav1-talina.
2. La activación del TCR asimismo regula asimismo la dinámica de la asociación Vav1-talina.
3. SLP-76 y ADAP regulan positivamente la adhesión de células T dependiente de $\alpha 4\beta 1$ en respuesta a quimiquinas.
4. ADAP regula el reforzamiento de la adhesión y el *spreading* de linfocitos T sobre VCAM-1 tras la estimulación por quimiquinas, mientras que la función de SLP-76 es importante durante la etapa del *spreading* celular.
5. Pyk2 limita la activación de Rac1 por CXCL12, lo que se traduce en un menor reforzamiento de la adhesión y *spreading* $\alpha 4\beta 1$ tras estimulación por quimiquinas.
6. La estimulación por CXCL12 de la adhesión mediada por $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha L\beta 2$ es restringida por RGS10.
7. La actividad de RGS10 limita la estimulación de la vía Vav1-Rac1 por quimiquinas, lo que reduce el reforzamiento de la adhesión y el *spreading* celular mediado por $\alpha 4\beta 1$.

Abramow-Newerly, M., Roy, A. A., Nunn, C., and Chidiac, P. (2006). RGS proteins have a signalling complex: interactions between RGS proteins and GPCRs, effectors, and auxiliary proteins. *Cell Signal* *18*, 579-591.

Aghazadeh, B., Lowry, W. E., Huang, X. Y., and Rosen, M. K. (2000). Structural basis for relief of autoinhibition of the Dbl homology domain of proto-oncogene Vav by tyrosine phosphorylation. *Cell* *102*, 625-633.

Alon, R., and Dustin, M. L. (2007). Force as a facilitator of integrin conformational changes during leukocyte arrest on blood vessels and antigen-presenting cells. *Immunity* *26*, 17-27.

Alon, R., and Feigelson, S. W. (2012). Chemokine-triggered leukocyte arrest: force-regulated bi-directional integrin activation in quantal adhesive contacts. *Curr Opin Cell Biol* *24*, 670-676.

Alon, R., Grabovsky, V., and Feigelson, S. (2003). Chemokine induction of integrin adhesiveness on rolling and arrested leukocytes local signaling events or global stepwise activation? *Microcirculation* *10*, 297-311.

Alon, R., and Ley, K. (2008). Cells on the run: shear-regulated integrin activation in leukocyte rolling and arrest on endothelial cells. *Curr Opin Cell Biol* *20*, 525-532.

Altenburg, J. D., Broxmeyer, H. E., Jin, Q., Cooper, S., Basu, S., and Alkhatib, G. (2007). A naturally occurring splice variant of CXCL12/stromal cell-derived factor 1 is a potent human immunodeficiency virus type 1 inhibitor with weak chemotaxis and cell survival activities. *J Virol* *81*, 8140-8148.

Allen, S. J., Crown, S. E., and Handel, T. M. (2007). Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu Rev Immunol* *25*, 787-820.

Andreev, J., Simon, J. P., Sabatini, D. D., Kam, J., Plowman, G., Randazzo, P. A., and Schlessinger, J. (1999). Identification of a new Pyk2 target protein with Arf-GAP activity. *Mol Cell Biol* *19*, 2338-2350.

Anthis, N. J., Wegener, K. L., Ye, F., Kim, C., Goult, B. T., Lowe, E. D., Vakonakis, I., Bate, N., Critchley, D. R., Ginsberg, M. H., and Campbell, I. D. (2009). The structure of an integrin/talin complex reveals the basis of inside-out signal transduction. *EMBO J* *28*, 3623-3632.

Ara, T., Tokoyoda, K., Sugiyama, T., Egawa, T., Kawabata, K., and Nagasawa, T. (2003). Long-term hematopoietic stem cells require stromal cell-derived factor-1 for colonizing bone marrow during ontogeny. *Immunity* *19*, 257-267.

- Arpaia, E., Shahar, M., Dadi, H., Cohen, A., and Roifman, C. M. (1994). Defective T cell receptor signaling and CD8⁺ thymic selection in humans lacking zap-70 kinase. *Cell* 76, 947-958.
- Arroyo, A. G., Taverna, D., Whittaker, C. A., Strauch, U. G., Bader, B. L., Rayburn, H., Crowley, D., Parker, C. M., and Hynes, R. O. (2000). In vivo roles of integrins during leukocyte development and traffic: insights from the analysis of mice chimeric for alpha 5, alpha v, and alpha 4 integrins. *J Immunol* 165, 4667-4675.
- Arroyo, A. G., Yang, J. T., Rayburn, H., and Hynes, R. O. (1996). Differential requirements for alpha4 integrins during fetal and adult hematopoiesis. *Cell* 85, 997-1008.
- Astier, A., Avraham, H., Manie, S. N., Groopman, J., Canty, T., Avraham, S., and Freedman, A. S. (1997). The related adhesion focal tyrosine kinase is tyrosine-phosphorylated after beta1-integrin stimulation in B cells and binds to p130cas. *J Biol Chem* 272, 228-232.
- Avraham, H., Park, S. Y., Schinkmann, K., and Avraham, S. (2000). RAFTK/Pyk2-mediated cellular signalling. *Cell Signal* 12, 123-133.
- Avraham, S., Jiang, S., Ota, S., Fu, Y., Deng, B., Dowler, L. L., White, R. A., and Avraham, H. (1995). Structural and functional studies of the intracellular tyrosine kinase MATK gene and its translated product. *J Biol Chem* 270, 1833-1842.
- Baker, M. J., Webb, C. T., Stroud, D. A., Palmer, C. S., Frazier, A. E., Guiard, B., Chacinska, A., Gulbis, J. M., and Ryan, M. T. (2009a). Structural and functional requirements for activity of the Tim9-Tim10 complex in mitochondrial protein import. *Mol Biol Cell* 20, 769-779.
- Baker, R. G., Hsu, C. J., Lee, D., Jordan, M. S., Maltzman, J. S., Hammer, D. A., Baumgart, T., and Koretzky, G. A. (2009b). The adapter protein SLP-76 mediates "outside-in" integrin signaling and function in T cells. *Mol Cell Biol* 29, 5578-5589.
- Balabanian, K., Lagane, B., Infantino, S., Chow, K. Y., Harriague, J., Moepps, B., Arenzana-Seisdedos, F., Thelen, M., and Bachelier, F. (2005). The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *J Biol Chem* 280, 35760-35766.
- Balkwill, F. (2004). Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer* 4, 540-550.
- Bar-Sagi, D., and Hall, A. (2000). Ras and Rho GTPases: a family reunion. *Cell* 103, 227-238.
- Barda-Saad, M., Braiman, A., Titerence, R., Bunnell, S. C., Barr, V. A., and Samelson, L. E. (2005). Dynamic molecular interactions linking the T cell antigen receptor to the actin cytoskeleton. *Nat Immunol* 6, 80-89.

Barda-Saad, M., Shirasu, N., Pauker, M. H., Hassan, N., Perl, O., Balbo, A., Yamaguchi, H., Houtman, J. C., Appella, E., Schuck, P., and Samelson, L. E. (2010). Cooperative interactions at the SLP-76 complex are critical for actin polymerization. *EMBO J* 29, 2315-2328.

Baron, J. L., Madri, J. A., Ruddle, N. H., Hashim, G., and Janeway, C. A., Jr. (1993). Surface expression of alpha 4 integrin by CD4 T cells is required for their entry into brain parenchyma. *J Exp Med* 177, 57-68.

Barsukov, I. L., Prescott, A., Bate, N., Patel, B., Floyd, D. N., Bhanji, N., Bagshaw, C. R., Letinic, K., Di Paolo, G., De Camilli, P., *et al.* (2003). Phosphatidylinositol phosphate kinase type 1gamma and beta1-integrin cytoplasmic domain bind to the same region in the talin FERM domain. *The Journal of biological chemistry* 278, 31202-31209.

Bartolome, R. A., Galvez, B. G., Longo, N., Baleux, F., Van Muijen, G. N., Sanchez-Mateos, P., Arroyo, A. G., and Teixido, J. (2004). Stromal cell-derived factor-1alpha promotes melanoma cell invasion across basement membranes involving stimulation of membrane-type 1 matrix metalloproteinase and Rho GTPase activities. *Cancer Res* 64, 2534-2543.

Beadling, C., Druey, K. M., Richter, G., Kehrl, J. H., and Smith, K. A. (1999). Regulators of G protein signaling exhibit distinct patterns of gene expression and target G protein specificity in human lymphocytes. *J Immunol* 162, 2677-2682.

Beckerle, M. C., Burridge, K., DeMartino, G. N., and Croall, D. E. (1987). Colocalization of calcium-dependent protease II and one of its substrates at sites of cell adhesion. *Cell* 51, 569-577.

Beckerle, M. C., Miller, D. E., Bertagnolli, M. E., and Locke, S. J. (1989). Activation-dependent redistribution of the adhesion plaque protein, talin, in intact human platelets. *J Cell Biol* 109, 3333-3346.

Bednarczyk, J. L., and McIntyre, B. W. (1992). Expression and ligand-binding function of the integrin alpha 4 beta 1 (VLA-4) on neural-crest-derived tumor cell lines. *Clin Exp Metastasis* 10, 281-290.

Beinke, S., Phee, H., Clingan, J. M., Schlessinger, J., Matloubian, M., and Weiss, A. (2010). Proline-rich tyrosine kinase-2 is critical for CD8 T-cell short-lived effector fate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 16234-16239.

Belperio, J. A., Keane, M. P., Arenberg, D. A., Addison, C. L., Ehlert, J. E., Burdick, M. D., and Strieter, R. M. (2000). CXC chemokines in angiogenesis. *J Leukoc Biol* 68, 1-8.

Berg, N. N., and Ostergaard, H. L. (1997). T cell receptor engagement induces tyrosine phosphorylation of FAK and Pyk2 and their association with Lck. *J Immunol* 159, 1753-1757.

Berlin-Rufenach, C., Otto, F., Mathies, M., Westermann, J., Owen, M. J., Hamann, A., and Hogg, N. (1999). Lymphocyte migration in lymphocyte function-associated antigen (LFA)-1-deficient mice. *J Exp Med* 189, 1467-1478.

Berthebaud, M., Riviere, C., Jarrier, P., Foudi, A., Zhang, Y., Compagno, D., Galy, A., Vainchenker, W., and Louache, F. (2005). RGS16 is a negative regulator of SDF-1-CXCR4 signaling in megakaryocytes. *Blood* 106, 2962-2968.

Billadeau, D. D., Mackie, S. M., Schoon, R. A., and Leibson, P. J. (2000). Specific subdomains of Vav differentially affect T cell and NK cell activation. *Journal of immunology* 164, 3971-3981.

Blaukat, A., Ivankovic-Dikic, I., Gronroos, E., Dolfi, F., Tokiwa, G., Vuori, K., and Dikic, I. (1999). Adaptor proteins Grb2 and Crk couple Pyk2 with activation of specific mitogen-activated protein kinase cascades. *J Biol Chem* 274, 14893-14901.

Bleul, C. C., Farzan, M., Choe, H., Parolin, C., Clark-Lewis, I., Sodroski, J., and Springer, T. A. (1996a). The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* 382, 829-833.

Bleul, C. C., Fuhlbrigge, R. C., Casasnovas, J. M., Aiuti, A., and Springer, T. A. (1996b). A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J Exp Med* 184, 1101-1109.

Bleul, C. C., Schultze, J. L., and Springer, T. A. (1998). B lymphocyte chemotaxis regulated in association with microanatomic localization, differentiation state, and B cell receptor engagement. *J Exp Med* 187, 753-762.

Boerth, N. J., Judd, B. A., and Koretzky, G. A. (2000). Functional association between SLAP-130 and SLP-76 in Jurkat T cells. *J Biol Chem* 275, 5143-5152.

Boldajipour, B., Mahabaleshwar, H., Kardash, E., Reichman-Fried, M., Blaser, H., Minina, S., Wilson, D., Xu, Q., and Raz, E. (2008). Control of chemokine-guided cell migration by ligand sequestration. *Cell* 132, 463-473.

Boriack-Sjodin, P. A., Margarit, S. M., Bar-Sagi, D., and Kuriyan, J. (1998). The structural basis of the activation of Ras by Sos. *Nature* 394, 337-343.

Bos, J. L. (2005). Linking Rap to cell adhesion. *Curr Opin Cell Biol* 17, 123-128.

Bouaouina, M., Lad, Y., and Calderwood, D. A. (2008). The N-terminal domains of talin cooperate with the phosphotyrosine binding-like domain to activate beta1 and beta3 integrins. *J Biol Chem* 283, 6118-6125.

Bowman, E. P., Campbell, J. J., Druey, K. M., Scheschonka, A., Kehrl, J. H., and Butcher, E. C. (1998). Regulation of chemotactic and proadhesive responses to

chemoattractant receptors by RGS (regulator of G-protein signaling) family members. *J Biol Chem* 273, 28040-28048.

Brands, F., Monig, S. P., and Raab, M. (1997). Treatment and prognosis of gastric lymphoma. *Eur J Surg* 163, 803-813.

Bubeck Wardenburg, J., Fu, C., Jackman, J. K., Flotow, H., Wilkinson, S. E., Williams, D. H., Johnson, R., Kong, G., Chan, A. C., and Findell, P. R. (1996). Phosphorylation of SLP-76 by the ZAP-70 protein-tyrosine kinase is required for T-cell receptor function. *J Biol Chem* 271, 19641-19644.

Bubeck Wardenburg, J., Pappu, R., Bu, J. Y., Mayer, B., Chernoff, J., Straus, D., and Chan, A. C. (1998). Regulation of PAK activation and the T cell cytoskeleton by the linker protein SLP-76. *Immunity* 9, 607-616.

Bungartz, G., Stiller, S., Bauer, M., Muller, W., Schippers, A., Wagner, N., Fassler, R., and Brakebusch, C. (2006). Adult murine hematopoiesis can proceed without beta1 and beta7 integrins. *Blood* 108, 1857-1864.

Bunnell, S. C., Barr, V. A., Fuller, C. L., and Samelson, L. E. (2003). High-resolution multicolor imaging of dynamic signaling complexes in T cells stimulated by planar substrates. *Sci STKE* 2003, PL8.

Burton, P. G., Lee, W. L., Nixon, A. B., Peralta, E. G., and Casey, P. J. (2001). Phosphorylation and nuclear translocation of a regulator of G protein signaling (RGS10). *J Biol Chem* 276, 32828-32834.

Burridge, K., and Wennerberg, K. (2004). Rho and Rac take center stage. *Cell* 116, 167-179.

Bustelo, X. R. (1996). The VAV family of signal transduction molecules. *Critical reviews in oncogenesis* 7, 65-88.

Bustelo, X. R. (2000). Regulatory and signaling properties of the Vav family. *Molecular and cellular biology* 20, 1461-1477.

Bustelo, X. R., Ledbetter, J. A., and Barbacid, M. (1992). Product of vav proto-oncogene defines a new class of tyrosine protein kinase substrates. *Nature* 356, 68-71.

Butcher, E. C., and Picker, L. J. (1996). Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 272, 60-66.

Butcher, E. C., Williams, M., Youngman, K., Rott, L., and Briskin, M. (1999). Lymphocyte trafficking and regional immunity. *Adv Immunol* 72, 209-253.

- Byron, A., Humphries, J. D., Askari, J. A., Craig, S. E., Mould, A. P., and Humphries, M. J. (2009). Anti-integrin monoclonal antibodies. *J Cell Sci* *122*, 4009-4011.
- Calderwood, D. A., Campbell, I. D., and Critchley, D. R. (2013). Talins and kindlins: partners in integrin-mediated adhesion. *Nat Rev Mol Cell Biol* *14*, 503-517.
- Calderwood, D. A., Fujioka, Y., de Pereda, J. M., Garcia-Alvarez, B., Nakamoto, T., Margolis, B., McGlade, C. J., Liddington, R. C., and Ginsberg, M. H. (2003). Integrin beta cytoplasmic domain interactions with phosphotyrosine-binding domains: a structural prototype for diversity in integrin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 2272-2277.
- Calderwood, D. A., Yan, B., de Pereda, J. M., Alvarez, B. G., Fujioka, Y., Liddington, R. C., and Ginsberg, M. H. (2002). The phosphotyrosine binding-like domain of talin activates integrins. *J Biol Chem* *277*, 21749-21758.
- Campbell, I. D., and Ginsberg, M. H. (2004). The talin-tail interaction places integrin activation on FERM ground. *Trends Biochem Sci* *29*, 429-435.
- Campbell, J. J., Hedrick, J., Zlotnik, A., Siani, M. A., Thompson, D. A., and Butcher, E. C. (1998). Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science* *279*, 381-384.
- Carman, C. V., and Springer, T. A. (2003). Integrin avidity regulation: are changes in affinity and conformation underemphasized? *Curr Opin Cell Biol* *15*, 547-556.
- Carman, C. V., and Springer, T. A. (2004). A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them. *J Cell Biol* *167*, 377-388.
- Carter, R. A., and Wicks, I. P. (2001). Vascular cell adhesion molecule 1 (CD106): a multifaceted regulator of joint inflammation. *Arthritis Rheum* *44*, 985-994.
- Castro, A., Bono, M. R., Simon, V., Vargas, L., and Roseblatt, M. (1997). Spleen-derived stromal cells. Adhesion molecules expression and lymphocyte adhesion to reticular cells. *Eur J Cell Biol* *74*, 321-328.
- Clements, J. L., Yang, B., Ross-Barta, S. E., Eliason, S. L., Hrstka, R. F., Williamson, R. A., and Koretzky, G. A. (1998). Requirement for the leukocyte-specific adapter protein SLP-76 for normal T cell development. *Science* *281*, 416-419.
- Constantin, G., Majeed, M., Giagulli, C., Piccio, L., Kim, J. Y., Butcher, E. C., and Laudanna, C. (2000). Chemokines trigger immediate beta2 integrin affinity and mobility changes: differential regulation and roles in lymphocyte arrest under flow. *Immunity* *13*, 759-769.

Conti, F. J., Monkley, S. J., Wood, M. R., Critchley, D. R., and Muller, U. (2009). Talin 1 and 2 are required for myoblast fusion, sarcomere assembly and the maintenance of myotendinous junctions. *Development* 136, 3597-3606.

Cook, D. R., Rossman, K. L., and Der, C. J. (2013). Rho guanine nucleotide exchange factors: regulators of Rho GTPase activity in development and disease. *Oncogene*.

Coppolino, M. G., Krause, M., Hagedorff, P., Monner, D. A., Trimble, W., Grinstein, S., Wehland, J., and Sechi, A. S. (2001). Evidence for a molecular complex consisting of Fyb/SLAP, SLP-76, Nck, VASP and WASP that links the actin cytoskeleton to Fcγ receptor signalling during phagocytosis. *J Cell Sci* 114, 4307-4318.

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

Crump, M. P., Gong, J. H., Loetscher, P., Rajarathnam, K., Amara, A., Arenzana-Seisdedos, F., Virelizier, J. L., Baggiolini, M., Sykes, B. D., and Clark-Lewis, I. (1997). Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1. *EMBO J* 16, 6996-7007.

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

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

Chatterjee, T. K., and Fisher, R. A. (2000). Cytoplasmic, nuclear, and golgi localization of RGS proteins. Evidence for N-terminal and RGS domain sequences as intracellular targeting motifs. *J Biol Chem* 275, 24013-24021.

Chidiac, P., Gadd, M. E., and Hepler, J. R. (2002). Measuring RGS protein interactions with Gq alpha. *Methods Enzymol* 344, 686-702.

Chin, J. E., Hatfield, C. A., Winterrowd, G. E., Brashler, J. R., Vonderfecht, S. L., Fidler, S. F., Griffin, R. L., Kolbasa, K. P., Krzesicki, R. F., Sly, L. M., *et al.* (1997). Airway recruitment of leukocytes in mice is dependent on alpha4-integrins and vascular cell adhesion molecule-1. *Am J Physiol* 272, L219-229.

Cho, H., Kozasa, T., Takekoshi, K., De Gunzburg, J., and Kehrl, J. H. (2000). RGS14, a GTPase-activating protein for G1alpha, attenuates G1alpha- and G13alpha-mediated signaling pathways. *Mol Pharmacol* 58, 569-576.

- D'Apuzzo, M., Rolink, A., Loetscher, M., Hoxie, J. A., Clark-Lewis, I., Melchers, F., Baggiolini, M., and Moser, B. (1997). The chemokine SDF-1, stromal cell-derived factor 1, attracts early stage B cell precursors via the chemokine receptor CXCR4. *Eur J Immunol* 27, 1788-1793.
- D'Souza-Schorey, C., Boettner, B., and Van Aelst, L. (1998). Rac regulates integrin-mediated spreading and increased adhesion of T lymphocytes. *Mol Cell Biol* 18, 3936-3946.
- da Silva, A. J., Li, Z., de Vera, C., Canto, E., Findell, P., and Rudd, C. E. (1997a). Cloning of a novel T-cell protein FYB that binds FYN and SH2-domain-containing leukocyte protein 76 and modulates interleukin 2 production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 7493-7498.
- da Silva, A. J., Raab, M., Li, Z., and Rudd, C. E. (1997b). TcR zeta/CD3 signal transduction in T-cells: downstream signalling via ZAP-70, SLP-76 and FYB. *Biochem Soc Trans* 25, 361-366.
- Damiano, J. S., Cress, A. E., Hazlehurst, L. A., Shtil, A. A., and Dalton, W. S. (1999). Cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR): role of integrins and resistance to apoptosis in human myeloma cell lines. *Blood* 93, 1658-1667.
- Davidson, D., Shi, X., Zhong, M. C., Rhee, I., and Veillette, A. (2010). The phosphatase PTP-PEST promotes secondary T cell responses by dephosphorylating the protein tyrosine kinase Pyk2. *Immunity* 33, 167-180.
- Davis, C. B., Dikic, I., Unutmaz, D., Hill, C. M., Arthos, J., Siani, M. A., Thompson, D. A., Schlessinger, J., and Littman, D. R. (1997). Signal transduction due to HIV-1 envelope interactions with chemokine receptors CXCR4 or CCR5. *J Exp Med* 186, 1793-1798.
- Dealwis, C., Fernandez, E. J., Thompson, D. A., Simon, R. J., Siani, M. A., and Lolis, E. (1998). Crystal structure of chemically synthesized [N33A] stromal cell-derived factor 1 α , a potent ligand for the HIV-1 "fusin" coreceptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6941-6946.
- 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.
- del Pozo, M. A., Vicente-Manzanares, M., Tejedor, R., Serrador, J. M., and Sanchez-Madrid, F. (1999). Rho GTPases control migration and polarization of adhesion molecules and cytoskeletal ERM components in T lymphocytes. *Eur J Immunol* 29, 3609-3620.
- Della Rocca, G. J., van Biesen, T., Daaka, Y., Luttrell, D. K., Luttrell, L. M., and Lefkowitz, R. J. (1997). Ras-dependent mitogen-activated protein kinase activation by G

protein-coupled receptors. Convergence of Gi- and Gq-mediated pathways on calcium/calmodulin, Pyk2, and Src kinase. *J Biol Chem* 272, 19125-19132.

Di Paolo, G., Pellegrini, L., Letinic, K., Cestra, G., Zoncu, R., Voronov, S., Chang, S., Guo, J., Wenk, M. R., and De Camilli, P. (2002). Recruitment and regulation of phosphatidylinositol phosphate kinase type 1 gamma by the FERM domain of talin. *Nature* 420, 85-89.

Dikic, I., and Schlessinger, J. (1998). Identification of a new Pyk2 isoform implicated in chemokine and antigen receptor signaling. *J Biol Chem* 273, 14301-14308.

Dikic, I., Tokiwa, G., Lev, S., Courtneidge, S. A., and Schlessinger, J. (1996). A role for Pyk2 and Src in linking G-protein-coupled receptors with MAP kinase activation. *Nature* 383, 547-550.

Dluzniewska, J., Zou, L., Harmon, I. R., Ellingson, M. T., and Peterson, E. J. (2007). Immature hematopoietic cells display selective requirements for adhesion- and degranulation-promoting adaptor protein in development and homeostasis. *Eur J Immunol* 37, 3208-3219.

Dong, X., Mi, L. Z., Zhu, J., Wang, W., Hu, P., Luo, B. H., and Springer, T. A. (2012). alpha(V)beta(3) integrin crystal structures and their functional implications. *Biochemistry* 51, 8814-8828.

Druey, K. M. (2009). Regulation of G-protein-coupled signaling pathways in allergic inflammation. *Immunol Res* 43, 62-76.

Du, X. P., Plow, E. F., Frelinger, A. L., 3rd, O'Toole, T. E., Loftus, J. C., and Ginsberg, M. H. (1991). Ligands "activate" integrin alpha IIb beta 3 (platelet GPIIb-IIIa). *Cell* 65, 409-416.

Dumont, C., Corsoni-Tadrzak, A., Ruf, S., de Boer, J., Williams, A., Turner, M., Kioussis, D., and Tybulewicz, V. L. (2009). Rac GTPases play critical roles in early T-cell development. *Blood* 113, 3990-3998.

Duong, L. T., and Rodan, G. A. (2000). PYK2 is an adhesion kinase in macrophages, localized in podosomes and activated by beta(2)-integrin ligation. *Cell Motil Cytoskeleton* 47, 174-188.

Dustin, M. L., Rothlein, R., Bhan, A. K., Dinarello, C. A., and Springer, T. A. (1986). Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J Immunol* 137, 245-254.

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

- Elliott, P. R., Goult, B. T., Kopp, P. M., Bate, N., Grossmann, J. G., Roberts, G. C., Critchley, D. R., and Barsukov, I. L. (2010). The Structure of the talin head reveals a novel extended conformation of the FERM domain. *Structure* 18, 1289-1299.
- Epstein, R. J. (2004). The CXCL12-CXCR4 chemotactic pathway as a target of adjuvant breast cancer therapies. *Nat Rev Cancer* 4, 901-909.
- Erle, D. J., Briskin, M. J., Butcher, E. C., Garcia-Pardo, A., Lazarovits, A. I., and Tidswell, M. (1994). Expression and function of the MAdCAM-1 receptor, integrin alpha 4 beta 7, on human leukocytes. *J Immunol* 153, 517-528.
- Etienne-Manneville, S., and Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420, 629-635.
- Evans, R., Lellouch, A. C., Svensson, L., McDowall, A., and Hogg, N. (2011). The integrin LFA-1 signals through ZAP-70 to regulate expression of high-affinity LFA-1 on T lymphocytes. *Blood* 117, 3331-3342.
- Evans, R., Patzak, I., Svensson, L., De Filippo, K., Jones, K., McDowall, A., and Hogg, N. (2009). Integrins in immunity. *J Cell Sci* 122, 215-225.
- Fang, N., Motto, D. G., Ross, S. E., and Koretzky, G. A. (1996). Tyrosines 113, 128, and 145 of SLP-76 are required for optimal augmentation of NFAT promoter activity. *J Immunol* 157, 3769-3773.
- Fassler, R., Pfaff, M., Murphy, J., Noegel, A. A., Johansson, S., Timpl, R., and Albrecht, R. (1995). Lack of beta 1 integrin gene in embryonic stem cells affects morphology, adhesion, and migration but not integration into the inner cell mass of blastocysts. *J Cell Biol* 128, 979-988.
- Ferguson, S. S. (2001). Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev* 53, 1-24.
- Fischer, K. D., Kong, Y. Y., Nishina, H., Tedford, K., Marengere, L. E., Kozieradzki, 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.
- Fischer, K. D., Zmuldzinas, A., Gardner, S., Barbacid, M., Bernstein, A., and Guidos, C. (1995). Defective T-cell receptor signalling and positive selection of Vav-deficient CD4+ CD8+ thymocytes. *Nature* 374, 474-477.
- Franco, S. J., Rodgers, M. A., Perrin, B. J., Han, J., Bennin, D. A., Critchley, D. R., and Huttenlocher, A. (2004). Calpain-mediated proteolysis of talin regulates adhesion dynamics. *Nat Cell Biol* 6, 977-983.

Friedland, J. C., Lee, M. H., and Boettiger, D. (2009). Mechanically activated integrin switch controls alpha5beta1 function. *Science* 323, 642-644.

Fukui, Y., Hashimoto, O., Sanui, T., Oono, T., Koga, H., Abe, M., Inayoshi, A., Noda, M., Oike, M., Shirai, T., and Sasazuki, T. (2001). Haematopoietic cell-specific CDM family protein DOCK2 is essential for lymphocyte migration. *Nature* 412, 826-831.

Ganju, R. K., Brubaker, S. A., Meyer, J., Dutt, P., Yang, Y., Qin, S., Newman, W., and Groopman, J. E. (1998). The alpha-chemokine, stromal cell-derived factor-1alpha, binds to the transmembrane G-protein-coupled CXCR-4 receptor and activates multiple signal transduction pathways. *J Biol Chem* 273, 23169-23175.

Ganju, R. K., Hatch, W. C., Avraham, H., Ona, M. A., Druker, B., Avraham, S., and Groopman, J. E. (1997). RAFTK, a novel member of the focal adhesion kinase family, is phosphorylated and associates with signaling molecules upon activation of mature T lymphocytes. *J Exp Med* 185, 1055-1063.

Gao, C., and Blystone, S. D. (2009). A Pyk2-Vav1 complex is recruited to beta3-adhesion sites to initiate Rho activation. *Biochem J* 420, 49-56.

Garcia-Alvarez, B., de Pereda, J. M., Calderwood, D. A., Ulmer, T. S., Critchley, D., Campbell, I. D., Ginsberg, M. H., and Liddington, R. C. (2003). Structural determinants of integrin recognition by talin. *Mol Cell* 11, 49-58.

Garcia-Bernal, D., Pardo-Cabanas, M., Dios-Esponera, A., Samaniego, R., Hernan, P. d. I. O. D., and Teixido, J. (2009). Chemokine-induced Zap70 kinase-mediated dissociation of the Vav1-talin complex activates alpha4beta1 integrin for T cell adhesion. *Immunity* 31, 953-964.

Garcia-Bernal, D., Redondo-Munoz, J., Dios-Esponera, A., Chevre, R., Bailon, E., Garayoa, M., Arellano-Sanchez, N., Gutierrez, N. C., Hidalgo, A., Garcia-Pardo, A., and Teixido, J. (2013). Sphingosine-1-phosphate activates chemokine-promoted myeloma cell adhesion and migration involving alpha4beta1 integrin function. *J Pathol* 229, 36-48.

Garcia-Bernal, D., Sotillo-Mallo, E., Nombela-Arrieta, C., Samaniego, R., Fukui, Y., Stein, J. V., and Teixido, J. (2006). DOCK2 is required for chemokine-promoted human T lymphocyte adhesion under shear stress mediated by the integrin alpha4beta1. *J Immunol* 177, 5215-5225.

Garcia-Bernal, D., Wright, N., Sotillo-Mallo, E., Nombela-Arrieta, C., Stein, J. V., Bustelo, X. R., and Teixido, J. (2005a). Vav1 and Rac Control Chemokine-promoted T Lymphocyte Adhesion Mediated by the Integrin {alpha}4{beta}1. *Mol Biol Cell* 16, 3223-3235.

Garcia-Bernal, D., Wright, N., Sotillo-Mallo, E., Nombela-Arrieta, C., Stein, J. V., Bustelo, X. R., and Teixido, J. (2005b). Vav1 and Rac control chemokine-promoted T lymphocyte adhesion mediated by the integrin alpha4beta1. *Mol Biol Cell* 16, 3223-3235.

- Garcia-Pardo, A., Wayner, E. A., Carter, W. G., and Ferreira, O. C., Jr. (1990). Human B lymphocytes define an alternative mechanism of adhesion to fibronectin. The interaction of the alpha 4 beta 1 integrin with the LHGPEILDVPST sequence of the type III connecting segment is sufficient to promote cell attachment. *J Immunol* *144*, 3361-3366.
- Gelfand, E. W., Weinberg, K., Mazer, B. D., Kadlecsek, T. A., and Weiss, A. (1995). Absence of ZAP-70 prevents signaling through the antigen receptor on peripheral blood T cells but not on thymocytes. *J Exp Med* *182*, 1057-1065.
- Geng, L., Raab, M., and Rudd, C. E. (1999). Cutting edge: SLP-76 cooperativity with FYB/FYN-T in the Up-regulation of TCR-driven IL-2 transcription requires SLP-76 binding to FYB at Tyr595 and Tyr651. *J Immunol* *163*, 5753-5757.
- Gerard, C., and Rollins, B. J. (2001). Chemokines and disease. *Nat Immunol* *2*, 108-115.
- Ghandour, H., Cullere, X., Alvarez, A., Luscinskas, F. W., and Mayadas, T. N. (2007). Essential role for Rap1 GTPase and its guanine exchange factor CalDAG-GEFI in LFA-1 but not VLA-4 integrin mediated human T-cell adhesion. *Blood* *110*, 3682-3690.
- Gilmore, A. P., and Burridge, K. (1996). Regulation of vinculin binding to talin and actin by phosphatidyl-inositol-4-5-bisphosphate. *Nature* *381*, 531-535.
- Gingras, A. R., Bate, N., Goult, B. T., Hazelwood, L., Canestrelli, I., Grossmann, J. G., Liu, H., Putz, N. S., Roberts, G. C., Volkman, N., *et al.* (2008). The structure of the C-terminal actin-binding domain of talin. *EMBO J* *27*, 458-469.
- Gismondi, A., Bisogno, L., Mainiero, F., Palmieri, G., Piccoli, M., Frati, L., and Santoni, A. (1997). Proline-rich tyrosine kinase-2 activation by beta 1 integrin fibronectin receptor cross-linking and association with paxillin in human natural killer cells. *J Immunol* *159*, 4729-4736.
- Gismondi, A., Jacobelli, J., Strippoli, R., Mainiero, F., Soriani, A., Cifaldi, L., Piccoli, M., Frati, L., and Santoni, A. (2003). Proline-rich tyrosine kinase 2 and Rac activation by chemokine and integrin receptors controls NK cell transendothelial migration. *J Immunol* *170*, 3065-3073.
- Goksoy, E., Ma, Y. Q., Wang, X., Kong, X., Perera, D., Plow, E. F., and Qin, J. (2008). Structural basis for the autoinhibition of talin in regulating integrin activation. *Mol Cell* *31*, 124-133.
- Gomez, M., Tybulewicz, V., and Cantrell, D. A. (2000). Control of pre-T cell proliferation and differentiation by the GTPase Rac-I. *Nat Immunol* *1*, 348-352.
- Gonzalez-Alvaro, I., Munoz, C., Garcia-Vicuna, R., Sabando, P., Cabanas, C., Sanchez-Madrid, F., and Diaz-Gonzalez, F. (1998). Interference of nonsteroidal antiinflammatory drugs with very late activation antigen 4/vascular cells adhesion molecule 1-mediated lymphocyte-endothelial cell adhesion. *Arthritis Rheum* *41*, 1677-1688.

Goult, B. T., Bouaouina, M., Elliott, P. R., Bate, N., Patel, B., Gingras, A. R., Grossmann, J. G., Roberts, G. C., Calderwood, D. A., Critchley, D. R., and Barsukov, I. L. (2010). Structure of a double ubiquitin-like domain in the talin head: a role in integrin activation. *EMBO J* 29, 1069-1080.

Gouwy, M., Struyf, S., Leutenez, L., Portner, N., Sozzani, S., and Van Damme, J. (2013). Chemokines and other GPCR ligands synergize in receptor-mediated migration of monocyte-derived immature and mature dendritic cells. *Immunobiology*.

Grabovsky, V., Feigelson, S., Chen, C., Bleijs, D. A., Peled, A., Cinamon, G., Baleux, F., Arenzana-Seisdedos, F., Lapidot, T., van Kooyk, Y., *et al.* (2000). Subsecond induction of alpha4 integrin clustering by immobilized chemokines stimulates leukocyte tethering and rolling on endothelial vascular cell adhesion molecule 1 under flow conditions. *J Exp Med* 192, 495-506.

Graham, G. J., Locati, M., Mantovani, A., Rot, A., and Thelen, M. (2012). The biochemistry and biology of the atypical chemokine receptors. *Immunol Lett* 145, 30-38.

Griffiths, E. K., Krawczyk, C., Kong, Y. Y., Raab, M., Hyduk, S. J., Bouchard, D., Chan, V. S., Kozieradzki, I., Oliveira-Dos-Santos, A. J., Wakeham, A., *et al.* (2001). Positive regulation of T cell activation and integrin adhesion by the adapter Fyb/Slap. *Science* 293, 2260-2263.

Gu, Y., Filippi, M. D., Cancelas, J. A., Siefiring, J. E., Williams, E. P., Jasti, A. C., Harris, C. E., Lee, A. W., Prabhakar, R., Atkinson, S. J., *et al.* (2003). Hematopoietic cell regulation by Rac1 and Rac2 guanosine triphosphatases. *Science* 302, 445-449.

Guan, J. L., and Hynes, R. O. (1990). Lymphoid cells recognize an alternatively spliced segment of fibronectin via the integrin receptor alpha 4 beta 1. *Cell* 60, 53-61.

Guinamard, R., Okigaki, M., Schlessinger, J., and Ravetch, J. V. (2000). Absence of marginal zone B cells in Pyk-2-deficient mice defines their role in the humoral response. *Nat Immunol* 1, 31-36.

Guo, F., Cancelas, J. A., Hildeman, D., Williams, D. A., and Zheng, Y. (2008). Rac GTPase isoforms Rac1 and Rac2 play a redundant and crucial role in T-cell development. *Blood* 112, 1767-1775.

Gurtner, G. C., Davis, V., Li, H., McCoy, M. J., Sharpe, A., and Cybulsky, M. I. (1995). Targeted disruption of the murine VCAM1 gene: essential role of VCAM-1 in chorioallantoic fusion and placentation. *Genes Dev* 9, 1-14.

Haller, C., Fillatreau, S., Hoffmann, R., and Agenes, F. (2002). Structure, chromosomal localization and expression of the mouse regulator of G-protein signaling10 gene (mRGS10). *Gene* 297, 39-49.

Han, J., Luby-Phelps, K., Das, B., Shu, X., Xia, Y., Mosteller, R. D., Krishna, U. M., Falck, J. R., White, M. A., and Broek, D. (1998). Role of substrates and products of PI 3-kinase in regulating activation of Rac-related guanosine triphosphatases by Vav. *Science* 279, 558-560.

Hartmann, T. N., Grabovsky, V., Pasvolsky, R., Shulman, Z., Buss, E. C., Spiegel, A., Nagler, A., Lapidot, T., Thelen, M., and Alon, R. (2008). A crosstalk between intracellular CXCR7 and CXCR4 involved in rapid CXCL12-triggered integrin activation but not in chemokine-triggered motility of human T lymphocytes and CD34+ cells. *J Leukoc Biol* 84, 1130-1140.

Hartmann, T. N., Grabovsky, V., Wang, W., Desch, P., Rubenzer, G., Wollner, S., Binsky, I., Vallon-Eberhard, A., Sapozhnikov, A., Burger, M., *et al.* (2009). Circulating B-cell chronic lymphocytic leukemia cells display impaired migration to lymph nodes and bone marrow. *Cancer Res* 69, 3121-3130.

Hatada, M. H., Lu, X., Laird, E. R., Green, J., Morgenstern, J. P., Lou, M., Marr, C. S., Phillips, T. B., Ram, M. K., Theriault, K., and *et al.* (1995). Molecular basis for interaction of the protein tyrosine kinase ZAP-70 with the T-cell receptor. *Nature* 377, 32-38.

Heasman, S. J., and Ridley, A. J. (2008). Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 690-701.

Henderson, R. B., Lim, L. H., Tessier, P. A., Gavins, F. N., Mathies, M., Perretti, M., and Hogg, N. (2001). The use of lymphocyte function-associated antigen (LFA)-1-deficient mice to determine the role of LFA-1, Mac-1, and alpha4 integrin in the inflammatory response of neutrophils. *J Exp Med* 194, 219-226.

Heximer, S. P., Cristillo, A. D., and Forsdyke, D. R. (1997). Comparison of mRNA expression of two regulators of G-protein signaling, RGS1/BL34/1R20 and RGS2/G0S8, in cultured human blood mononuclear cells. *DNA Cell Biol* 16, 589-598.

Hidalgo, A., Sanz-Rodriguez, F., Rodriguez-Fernandez, J. L., Albella, B., Blaya, C., Wright, N., Cabanas, C., Prosper, F., Gutierrez-Ramos, J. C., and Teixido, J. (2001). Chemokine stromal cell-derived factor-1alpha modulates VLA-4 integrin-dependent adhesion to fibronectin and VCAM-1 on bone marrow hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol* 29, 345-355.

Hogg, N., and Bates, P. A. (2000). Genetic analysis of integrin function in man: LAD-1 and other syndromes. *Matrix Biol* 19, 211-222.

Horn, J., Wang, X., Reichardt, P., Stradal, T. E., Warnecke, N., Simeoni, L., Gunzer, M., Yablonski, D., Schraven, B., and Kliche, S. (2009). Src homology 2-domain containing leukocyte-specific phosphoprotein of 76 kDa is mandatory for TCR-mediated inside-out signaling, but dispensable for CXCR4-mediated LFA-1 activation, adhesion, and migration of T cells. *J Immunol* 183, 5756-5767.

Huang, Y., Norton, D. D., Precht, P., Martindale, J. L., Burkhardt, J. K., and Wange, R. L. (2005). Deficiency of ADAP/Fyb/SLAP-130 destabilizes SKAP55 in Jurkat T cells. *J Biol Chem* 280, 23576-23583.

Hughes, P. E., Diaz-Gonzalez, F., Leong, L., Wu, C., McDonald, J. A., Shattil, S. J., and Ginsberg, M. H. (1996). Breaking the integrin hinge. A defined structural constraint regulates integrin signaling. *J Biol Chem* 271, 6571-6574.

Hunt, T. W., Fields, T. A., Casey, P. J., and Peralta, E. G. (1996). RGS10 is a selective activator of G alpha i GTPase activity. *Nature* 383, 175-177.

Hunter, A. J., Ottoson, N., Boerth, N., Koretzky, G. A., and Shimizu, Y. (2000). Cutting edge: a novel function for the SLAP-130/FYB adapter protein in beta 1 integrin signaling and T lymphocyte migration. *J Immunol* 164, 1143-1147.

Hynes, R. O. (1986). Fibronectins. *Sci Am* 254, 42-51.

Hynes, R. O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110, 673-687.

Iiyama, K., Hajra, L., Iiyama, M., Li, H., DiChiara, M., Medoff, B. D., and Cybulsky, M. I. (1999). Patterns of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression in rabbit and mouse atherosclerotic lesions and at sites predisposed to lesion formation. *Circ Res* 85, 199-207.

Imai, Y., Park, E. J., Peer, D., Peixoto, A., Cheng, G., von Andrian, U. H., Carman, C. V., and Shimaoka, M. (2008). Genetic perturbation of the putative cytoplasmic membrane-proximal salt bridge aberrantly activates alpha(4) integrins. *Blood* 112, 5007-5015.

Infantino, S., Moepps, B., and Thelen, M. (2006). Expression and regulation of the orphan receptor RDC1 and its putative ligand in human dendritic and B cells. *J Immunol* 176, 2197-2207.

Inngjerdingen, M., Torgersen, K. M., and Maghazachi, A. A. (2002). Lck is required for stromal cell-derived factor 1 alpha (CXCL12)-induced lymphoid cell chemotaxis. *Blood* 99, 4318-4325.

Jackman, J. K., Motto, D. G., Sun, Q., Tanemoto, M., Turck, C. W., Peltz, G. A., Koretzky, G. A., and Findell, P. R. (1995). Molecular cloning of SLP-76, a 76-kDa tyrosine phosphoprotein associated with Grb2 in T cells. *J Biol Chem* 270, 7029-7032.

Jacobsen, K., Kravitz, J., Kincade, P. W., and Osmond, D. G. (1996). Adhesion receptors on bone marrow stromal cells: in vivo expression of vascular cell adhesion molecule-1 by reticular cells and sinusoidal endothelium in normal and gamma-irradiated mice. *Blood* 87, 73-82.

Jaffe, A. B., and Hall, A. (2005). Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21, 247-269.

Jimenez, C., Portela, R. A., Mellado, M., Rodriguez-Frade, J. M., Collard, J., Serrano, A., Martinez, A. C., Avila, J., and Carrera, A. C. (2000). Role of the PI3K regulatory subunit in the control of actin organization and cell migration. *J Cell Biol* 151, 249-262.

Johnson-Leger, C., Aurrand-Lions, M., and Imhof, B. A. (2000). The parting of the endothelium: miracle, or simply a junctional affair? *J Cell Sci* 113 (Pt 6), 921-933.

Jordan, M. S., Smith, J. E., Burns, J. C., Austin, J. E., Nichols, K. E., Aschenbrenner, A. C., and Koretzky, G. A. (2008). Complementation in trans of altered thymocyte development in mice expressing mutant forms of the adaptor molecule SLP76. *Immunity* 28, 359-369.

Kadlecek, T. A., van Oers, N. S., Lefrancois, L., Olson, S., Finlay, D., Chu, D. H., Connolly, K., Killeen, N., and Weiss, A. (1998). Differential requirements for ZAP-70 in TCR signaling and T cell development. *J Immunol* 161, 4688-4694.

Kamen, L. A., Schlessinger, J., and Lowell, C. A. (2011). Pyk2 is required for neutrophil degranulation and host defense responses to bacterial infection. *J Immunol* 186, 1656-1665.

Katagiri, T., Takahashi, T., Sasaki, T., Nakamura, S., and Hattori, S. (2000). Protein-tyrosine kinase Pyk2 is involved in interleukin-2 production by Jurkat T cells via its tyrosine 402. *J Biol Chem* 275, 19645-19652.

Katzav, S., Martin-Zanca, D., and Barbacid, M. (1989). vav, a novel human oncogene derived from a locus ubiquitously expressed in hematopoietic cells. *EMBO J* 8, 2283-2290.

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

Kawabata, K., Ujikawa, M., Egawa, T., Kawamoto, H., Tachibana, K., Iizasa, H., Katsura, Y., Kishimoto, T., and Nagasawa, T. (1999). A cell-autonomous requirement for CXCR4 in long-term lymphoid and myeloid reconstitution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 5663-5667.

Kehrl, J. H. (1998). Heterotrimeric G protein signaling: roles in immune function and fine-tuning by RGS proteins. *Immunity* 8, 1-10.

Kim, C., Ye, F., and Ginsberg, M. H. (2011). Regulation of integrin activation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 27, 321-345.

Kim, M., Carman, C. V., and Springer, T. A. (2003). Bidirectional transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins. *Science* 301, 1720-1725.

Kim, M., Carman, C. V., Yang, W., Salas, A., and Springer, T. A. (2004). The primacy of affinity over clustering in regulation of adhesiveness of the integrin $\{\alpha\}L\{\beta\}2$. *J Cell Biol* 167, 1241-1253.

Kim, M., Koh, Y. J., Kim, K. E., Koh, B. I., Nam, D. H., Alitalo, K., Kim, I., and Koh, G. Y. (2010). CXCR4 signaling regulates metastasis of chemoresistant melanoma cells by a lymphatic metastatic niche. *Cancer Res* 70, 10411-10421.

Kinashi, T. (2005). Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes. *Nat Rev Immunol* 5, 546-559.

Kinashi, T. (2007). Integrin regulation of lymphocyte trafficking: lessons from structural and signaling studies. *Adv Immunol* 93, 185-227.

Klemke, M., Weschenfelder, T., Konstandin, M. H., and Samstag, Y. (2007). High affinity interaction of integrin $\alpha4\beta1$ (VLA-4) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) enhances migration of human melanoma cells across activated endothelial cell layers. *J Cell Physiol* 212, 368-374.

Kliche, S., Breitling, D., Togni, M., Pusch, R., Heuer, K., Wang, X., Freund, C., Kasirer-Friede, A., Menasche, G., Koretzky, G. A., and Schraven, B. (2006). The ADAP/SKAP55 signaling module regulates T-cell receptor-mediated integrin activation through plasma membrane targeting of Rap1. *Mol Cell Biol* 26, 7130-7144.

Kong, G., Dalton, M., Bubeck Wardenburg, J., Straus, D., Kurosaki, T., and Chan, A. C. (1996). Distinct tyrosine phosphorylation sites in ZAP-70 mediate activation and negative regulation of antigen receptor function. *Mol Cell Biol* 16, 5026-5035.

Koni, P. A., Joshi, S. K., Temann, U. A., Olson, D., Burkly, L., and Flavell, R. A. (2001). Conditional vascular cell adhesion molecule 1 deletion in mice: impaired lymphocyte migration to bone marrow. *J Exp Med* 193, 741-754.

Koretzky, G. A., Abtahian, F., and Silverman, M. A. (2006). SLP76 and SLP65: complex regulation of signalling in lymphocytes and beyond. *Nat Rev Immunol* 6, 67-78.

Krause, M., Sechi, A. S., Konradt, M., Monner, D., Gertler, F. B., and Wehland, J. (2000). Fyn-binding protein (Fyb)/SLP-76-associated protein (SLAP), Ena/vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) proteins and the Arp2/3 complex link T cell receptor (TCR) signaling to the actin cytoskeleton. *J Cell Biol* 149, 181-194.

Kremer, K. N., Humphreys, T. D., Kumar, A., Qian, N. X., and Hedin, K. E. (2003). Distinct role of ZAP-70 and Src homology 2 domain-containing leukocyte protein of 76 kDa in the prolonged activation of extracellular signal-regulated protein kinase by the stromal cell-derived factor-1 α /CXCL12 chemokine. *J Immunol* 171, 360-367.

- Kremer, K. N., Kumar, A., and Hedin, K. E. (2011). G alpha i2 and ZAP-70 mediate RasGRP1 membrane localization and activation of SDF-1-induced T cell functions. *J Immunol* 187, 3177-3185.
- Kucik, D. F. (2002). Rearrangement of integrins in avidity regulation by leukocytes. *Immunol Res* 26, 199-206.
- Kumar, A., Molli, P. R., Pakala, S. B., Bui Nguyen, T. M., Rayala, S. K., and Kumar, R. (2009). PAK thread from amoeba to mammals. *J Cell Biochem* 107, 579-585.
- Lafuente, E. M., van Puijenbroek, A. A., Krause, M., Carman, C. V., Freeman, G. J., Berezovskaya, A., Constantine, E., Springer, T. A., Gertler, F. B., and Boussiotis, V. A. (2004). RIAM, an Ena/VASP and Profilin ligand, interacts with Rap1-GTP and mediates Rap1-induced adhesion. *Dev Cell* 7, 585-595.
- Laudanna, C., and Alon, R. (2006). Right on the spot. Chemokine triggering of integrin-mediated arrest of rolling leukocytes. *Thromb Haemost* 95, 5-11.
- Laudanna, C., Campbell, J. J., and Butcher, E. C. (1996). Role of Rho in chemoattractant-activated leukocyte adhesion through integrins. *Science* 271, 981-983.
- Lebwohl, M., Tying, S. K., Hamilton, T. K., Toth, D., Glazer, S., Tawfik, N. H., Walicke, P., Dummer, W., Wang, X., Garovoy, M. R., and Pariser, D. (2003). A novel targeted T-cell modulator, efalizumab, for plaque psoriasis. *N Engl J Med* 349, 2004-2013.
- Lee, D., Lee, H. W., Hong, S., Choi, B. I., Kim, H. W., Han, S. B., Kim, I. H., Bae, J. Y., Bae, Y. C., Rhyu, I. J., *et al.* (2012). Inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase A is a novel microtubule-associated protein: PKA-dependent phosphoregulation of microtubule binding affinity. *J Biol Chem* 287, 15981-15995.
- Lee, H. S., Lim, C. J., Puzon-McLaughlin, W., Shattil, S. J., and Ginsberg, M. H. (2009). RIAM activates integrins by linking talin to ras GTPase membrane-targeting sequences. *J Biol Chem* 284, 5119-5127.
- Legate, K. R., and Fassler, R. (2009). Mechanisms that regulate adaptor binding to beta-integrin cytoplasmic tails. *J Cell Sci* 122, 187-198.
- Legate, K. R., Wickstrom, S. A., and Fassler, R. (2009). Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling. *Genes Dev* 23, 397-418.
- Lev, S., Hernandez, J., Martinez, R., Chen, A., Plowman, G., and Schlessinger, J. (1999). Identification of a novel family of targets of PYK2 related to Drosophila retinal degeneration B (rdgB) protein. *Mol Cell Biol* 19, 2278-2288.

- Lev, S., Moreno, H., Martinez, R., Canoll, P., Peles, E., Musacchio, J. M., Plowman, G. D., Rudy, B., and Schlessinger, J. (1995). Protein tyrosine kinase PYK2 involved in Ca(2+)-induced regulation of ion channel and MAP kinase functions. *Nature* 376, 737-745.
- Levoye, A., Balabanian, K., Baleux, F., Bachelier, F., and Lagane, B. (2009). CXCR7 heterodimerizes with CXCR4 and regulates CXCL12-mediated G protein signaling. *Blood* 113, 6085-6093.
- Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M. I., and Nourshargh, S. (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 7, 678-689.
- Ley, K., Zakrzewicz, A., Hanski, C., Stoolman, L. M., and Kansas, G. S. (1995). Sialylated O-glycans and L-selectin sequentially mediate myeloid cell rolling in vivo. *Blood* 85, 3727-3735.
- Li, R., Mitra, N., Gratkowski, H., Vilaire, G., Litvinov, R., Nagasami, C., Weisel, J. W., Lear, J. D., DeGrado, W. F., and Bennett, J. S. (2003). Activation of integrin alphaIIb beta3 by modulation of transmembrane helix associations. *Science* 300, 795-798.
- Li, X., Dy, R. C., Cance, W. G., Graves, L. M., and Earp, H. S. (1999). Interactions between two cytoskeleton-associated tyrosine kinases: calcium-dependent tyrosine kinase and focal adhesion tyrosine kinase. *J Biol Chem* 274, 8917-8924.
- Lim, Y., Lim, S. T., Tomar, A., Gardel, M., Bernard-Trifilo, J. A., Chen, X. L., Uryu, S. A., Canete-Soler, R., Zhai, J., Lin, H., *et al.* (2008). PyK2 and FAK connections to p190Rho guanine nucleotide exchange factor regulate RhoA activity, focal adhesion formation, and cell motility. *The Journal of cell biology* 180, 187-203.
- Ling, K., Schill, N. J., Wagoner, M. P., Sun, Y., and Anderson, R. A. (2006). Movin' on up: the role of PtdIns(4,5)P(2) in cell migration. *Trends in cell biology* 16, 276-284.
- Litvak, V., Tian, D., Shaul, Y. D., and Lev, S. (2000). Targeting of PYK2 to focal adhesions as a cellular mechanism for convergence between integrins and G protein-coupled receptor signaling cascades. *J Biol Chem* 275, 32736-32746.
- Lobb, R. R., and Hemler, M. E. (1994). The pathophysiologic role of alpha 4 integrins in vivo. *J Clin Invest* 94, 1722-1728.
- Lopez-Lago, M., Lee, H., Cruz, C., Movilla, N., and Bustelo, X. R. (2000). Tyrosine phosphorylation mediates both activation and downmodulation of the biological activity of Vav. *Molecular and cellular biology* 20, 1678-1691.
- Lub, M., van Kooyk, Y., and Figdor, C. G. (1995). Ins and outs of LFA-1. *Immunol Today* 16, 479-483.

- Luker, K. E., Lewin, S. A., Mihalko, L. A., Schmidt, B. T., Winkler, J. S., Coggins, N. L., Thomas, D. G., and Luker, G. D. (2012). Scavenging of CXCL12 by CXCR7 promotes tumor growth and metastasis of CXCR4-positive breast cancer cells. *Oncogene* 31, 4750-4758.
- Luo, B. H., Carman, C. V., and Springer, T. A. (2007). Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu Rev Immunol* 25, 619-647.
- Luster, A. D., Alon, R., and von Andrian, U. H. (2005). Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat Immunol* 6, 1182-1190.
- Luttrell, L. M., and Gesty-Palmer, D. (2010). Beyond desensitization: physiological relevance of arrestin-dependent signaling. *Pharmacol Rev* 62, 305-330.
- Manevich, E., Grabovsky, V., Feigelson, S. W., and Alon, R. (2007). Talin 1 and paxillin facilitate distinct steps in rapid VLA-4-mediated adhesion strengthening to vascular cell adhesion molecule 1. *J Biol Chem* 282, 25338-25348.
- Margolis, B., Hu, P., Katzav, S., Li, W., Oliver, J. M., Ullrich, A., Weiss, A., and Schlessinger, J. (1992). Tyrosine phosphorylation of vav proto-oncogene product containing SH2 domain and transcription factor motifs. *Nature* 356, 71-74.
- Marinissen, M. J., and Gutkind, J. S. (2001). G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol Sci* 22, 368-376.
- Marlin, S. D., Staunton, D. E., Springer, T. A., Stratowa, C., Sommergruber, W., and Merluzzi, V. J. (1990). A soluble form of intercellular adhesion molecule-1 inhibits rhinovirus infection. *Nature* 344, 70-72.
- Martel, V., Racaud-Sultan, C., Dupe, S., Marie, C., Paulhe, F., Galmiche, A., Block, M. R., and Albiges-Rizo, C. (2001). Conformation, localization, and integrin binding of talin depend on its interaction with phosphoinositides. *J Biol Chem* 276, 21217-21227.
- Matsuya, M., Sasaki, H., Aoto, H., Mitaka, T., Nagura, K., Ohba, T., Ishino, M., Takahashi, S., Suzuki, R., and Sasaki, T. (1998). Cell adhesion kinase beta forms a complex with a new member, Hic-5, of proteins localized at focal adhesions. *J Biol Chem* 273, 1003-1014.
- McEver, R. P. (2002). Selectins: lectins that initiate cell adhesion under flow. *Curr Opin Cell Biol* 14, 581-586.
- Mellado, M., Rodriguez-Frade, J. M., Manes, S., and Martinez, A. C. (2001). Chemokine signaling and functional responses: the role of receptor dimerization and TK pathway activation. *Annu Rev Immunol* 19, 397-421.

Menasche, G., Kliche, S., Chen, E. J., Stradal, T. E., Schraven, B., and Koretzky, G. (2007). RIAM links the ADAP/SKAP-55 signaling module to Rap1, facilitating T-cell-receptor-mediated integrin activation. *Mol Cell Biol* 27, 4070-4081.

Michel, F., Grimaud, L., Tuosto, L., and Acuto, O. (1998). Fyn and ZAP-70 are required for Vav phosphorylation in T cells stimulated by antigen-presenting cells. *J Biol Chem* 273, 31932-31938.

Miller, D. H., Khan, O. A., Sheremata, W. A., Blumhardt, L. D., Rice, G. P., Libonati, M. A., Willmer-Hulme, A. J., Dalton, C. M., Miszkiel, K. A., and O'Connor, P. W. (2003). A controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 348, 15-23.

Monkley, S. J., Kostourou, V., Spence, L., Petrich, B., Coleman, S., Ginsberg, M. H., Pritchard, C. A., and Critchley, D. R. (2011). Endothelial cell talin1 is essential for embryonic angiogenesis. *Dev Biol* 349, 494-502.

Monkley, S. J., Pritchard, C. A., and Critchley, D. R. (2001). Analysis of the mammalian talin2 gene TLN2. *Biochem Biophys Res Commun* 286, 880-885.

Mor, A., Dustin, M. L., and Philips, M. R. (2007). Small GTPases and LFA-1 reciprocally modulate adhesion and signaling. *Immunol Rev* 218, 114-125.

Moratz, C., Harrison, K., and Kehrl, J. H. (2004). Regulation of chemokine-induced lymphocyte migration by RGS proteins. *Methods Enzymol* 389, 15-32.

Moser, B., Wolf, M., Walz, A., and Loetscher, P. (2004). Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol* 25, 75-84.

Moser, M., Legate, K. R., Zent, R., and Fassler, R. (2009). The tail of integrins, talin, and kindlins. *Science* 324, 895-899.

Mould, A. P., Askari, J. A., Craig, S. E., Garratt, A. N., Clements, J., and Humphries, M. J. (1994). Integrin alpha 4 beta 1-mediated melanoma cell adhesion and migration on vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and the alternatively spliced IIICS region of fibronectin. *J Biol Chem* 269, 27224-27230.

Movilla, N., and Bustelo, X. R. (1999). Biological and regulatory properties of Vav-3, a new member of the Vav family of oncoproteins. *Molecular and cellular biology* 19, 7870-7885.

Muller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M. E., McClanahan, T., Murphy, E., Yuan, W., Wagner, S. N., *et al.* (2001). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410, 50-56.

- Munoz, M., Serrador, J., Sanchez-Madrid, F., and Teixido, J. (1996). A region of the integrin VLA alpha 4 subunit involved in homotypic cell aggregation and in fibronectin but not vascular cell adhesion molecule-1 binding. *J Biol Chem* 271, 2696-2702.
- Murdoch, C. (2000). CXCR4: chemokine receptor extraordinaire. *Immunol Rev* 177, 175-184.
- Musci, M. A., Hendricks-Taylor, L. R., Motto, D. G., Paskind, M., Kamens, J., Turck, C. W., and Koretzky, G. A. (1997). Molecular cloning of SLAP-130, an SLP-76-associated substrate of the T cell antigen receptor-stimulated protein tyrosine kinases. *J Biol Chem* 272, 11674-11677.
- Myung, P. S., Derimanov, G. S., Jordan, M. S., Punt, J. A., Liu, Q. H., Judd, B. A., Meyers, E. E., Sigmund, C. D., Freedman, B. D., and Koretzky, G. A. (2001). Differential requirement for SLP-76 domains in T cell development and function. *Immunity* 15, 1011-1026.
- Nagasawa, T., Hirota, S., Tachibana, K., Takakura, N., Nishikawa, S., Kitamura, Y., Yoshida, N., Kikutani, H., and Kishimoto, T. (1996a). Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature* 382, 635-638.
- Nagasawa, T., Nakajima, T., Tachibana, K., Iizasa, H., Bleul, C. C., Yoshie, O., Matsushima, K., Yoshida, N., Springer, T. A., and Kishimoto, T. (1996b). Molecular cloning and characterization of a murine pre-B-cell growth-stimulating factor/stromal cell-derived factor 1 receptor, a murine homolog of the human immunodeficiency virus 1 entry coreceptor fusin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 14726-14729.
- Naumann, U., Cameroni, E., Pruenster, M., Mahabaleshwar, H., Raz, E., Zerwes, H. G., Rot, A., and Thelen, M. (2010). CXCR7 functions as a scavenger for CXCL12 and CXCL11. *PLoS One* 5, e9175.
- Nayal, A., Webb, D. J., and Horwitz, A. F. (2004). Talin: an emerging focal point of adhesion dynamics. *Curr Opin Cell Biol* 16, 94-98.
- Neer, E. J. (1995). Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell* 80, 249-257.
- Negishi, I., Motoyama, N., Nakayama, K., Senju, S., Hatakeyama, S., Zhang, Q., Chan, A. C., and Loh, D. Y. (1995). Essential role for ZAP-70 in both positive and negative selection of thymocytes. *Nature* 376, 435-438.
- Neish, A. S., Williams, A. J., Palmer, H. J., Whitley, M. Z., and Collins, T. (1992). Functional analysis of the human vascular cell adhesion molecule 1 promoter. *J Exp Med* 176, 1583-1593.

Neitzel, K. L., and Hepler, J. R. (2006). Cellular mechanisms that determine selective RGS protein regulation of G protein-coupled receptor signaling. *Semin Cell Dev Biol* 17, 383-389.

Nguyen, K., Sylvain, N. R., and Bunnell, S. C. (2008). T cell costimulation via the integrin VLA-4 inhibits the actin-dependent centralization of signaling microclusters containing the adaptor SLP-76. *Immunity* 28, 810-821.

Nieswandt, B., Moser, M., Pleines, I., Varga-Szabo, D., Monkley, S., Critchley, D., and Fassler, R. (2007). Loss of talin1 in platelets abrogates integrin activation, platelet aggregation, and thrombus formation in vitro and in vivo. *J Exp Med* 204, 3113-3118.

Nolz, J. C., Medeiros, R. B., Mitchell, J. S., Zhu, P., Freedman, B. D., Shimizu, Y., and Billadeau, D. D. (2007). WAVE2 regulates high-affinity integrin binding by recruiting vinculin and talin to the immunological synapse. *Mol Cell Biol* 27, 5986-6000.

Nomiyama, H., Osada, N., and Yoshie, O. (2013). Systematic classification of vertebrate chemokines based on conserved synteny and evolutionary history. *Genes Cells* 18, 1-16.

Oberlin, E., Amara, A., Bachelier, F., Bessia, C., Virelizier, J. L., Arenzana-Seisdedos, F., Schwartz, O., Heard, J. M., Clark-Lewis, I., Legler, D. F., *et al.* (1996). The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature* 382, 833-835.

Offermanns, S. (2001). In vivo functions of heterotrimeric G-proteins: studies in Galpha-deficient mice. *Oncogene* 20, 1635-1642.

Offermanns, S. (2003). G-proteins as transducers in transmembrane signalling. *Prog Biophys Mol Biol* 83, 101-130.

Okabe, S., Fukuda, S., Kim, Y. J., Niki, M., Pelus, L. M., Ohyashiki, K., Pandolfi, P. P., and Broxmeyer, H. E. (2005). Stromal cell-derived factor-1alpha/CXCL12-induced chemotaxis of T cells involves activation of the RasGAP-associated docking protein p62Dok-1. *Blood* 105, 474-480.

Okigaki, M., Davis, C., Falasca, M., Harroch, S., Felsenfeld, D. P., Sheetz, M. P., and Schlessinger, J. (2003). Pyk2 regulates multiple signaling events crucial for macrophage morphology and migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 10740-10745.

Oldham, W. M., and Hamm, H. E. (2008). Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 60-71.

Osborn, L., Hession, C., Tizard, R., Vassallo, C., Lühowskyj, S., Chi-Rosso, G., and Lobb, R. (1989). Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell* 59, 1203-1211.

Osborn, L., Vassallo, C., and Benjamin, C. D. (1992). Activated endothelium binds lymphocytes through a novel binding site in the alternately spliced domain of vascular cell adhesion molecule-1. *J Exp Med* 176, 99-107.

Ottoson, N. C., Pribila, J. T., Chan, A. S., and Shimizu, Y. (2001). Cutting edge: T cell migration regulated by CXCR4 chemokine receptor signaling to ZAP-70 tyrosine kinase. *J Immunol* 167, 1857-1861.

Ouyang, Y. S., Tu, Y., Barker, S. A., and Yang, F. (2003). Regulators of G-protein signaling (RGS) 4, insertion into model membranes and inhibition of activity by phosphatidic acid. *J Biol Chem* 278, 11115-11122.

Owen, K. A., Pixley, F. J., Thomas, K. S., Vicente-Manzanares, M., Ray, B. J., Horwitz, A. F., Parsons, J. T., Beggs, H. E., Stanley, E. R., and Bouton, A. H. (2007). Regulation of lamellipodial persistence, adhesion turnover, and motility in macrophages by focal adhesion kinase. *J Cell Biol* 179, 1275-1287.

Pablos, J. L., Amara, A., Bouloc, A., Santiago, B., Caruz, A., Galindo, M., Delaunay, T., Virelizier, J. L., and Arenzana-Seisdedos, F. (1999). Stromal-cell derived factor is expressed by dendritic cells and endothelium in human skin. *Am J Pathol* 155, 1577-1586.

Parsons, J. T. (2003). Focal adhesion kinase: the first ten years. *J Cell Sci* 116, 1409-1416.

Patel, B., Gingras, A. R., Bobkov, A. A., Fujimoto, L. M., Zhang, M., Liddington, R. C., Mazzeo, D., Emsley, J., Roberts, G. C., Barsukov, I. L., and Critchley, D. R. (2006). The activity of the vinculin binding sites in talin is influenced by the stability of the helical bundles that make up the talin rod. *J Biol Chem* 281, 7458-7467.

Pauker, M. H., Reicher, B., Fried, S., Perl, O., and Barda-Saad, M. (2011). Functional cooperation between the proteins Nck and ADAP is fundamental for actin reorganization. *Mol Cell Biol* 31, 2653-2666.

Peled, A., Grabovsky, V., Habler, L., Sandbank, J., Arenzana-Seisdedos, F., Petit, I., Ben-Hur, H., Lapidot, T., and Alon, R. (1999). The chemokine SDF-1 stimulates integrin-mediated arrest of CD34(+) cells on vascular endothelium under shear flow. *J Clin Invest* 104, 1199-1211.

Peng, J., Wallar, B. J., Flanders, A., Swiatek, P. J., and Alberts, A. S. (2003). Disruption of the Diaphanous-related formin Drf1 gene encoding mDial1 reveals a role for Drf3 as an effector for Cdc42. *Curr Biol* 13, 534-545.

Peterson, E. J., Woods, M. L., Dmowski, S. A., Derimanov, G., Jordan, M. S., Wu, J. N., Myung, P. S., Liu, Q. H., Pribila, J. T., Freedman, B. D., *et al.* (2001). Coupling of the TCR to integrin activation by Slap-130/Fyb. *Science* 293, 2263-2265.

Petit, I., Szyper-Kravitz, M., Nagler, A., Lahav, M., Peled, A., Habler, L., Ponomaryov, T., Taichman, R. S., Arenzana-Seisdedos, F., Fujii, N., *et al.* (2002). G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat Immunol* 3, 687-694.

Petrich, B. G., Marchese, P., Ruggeri, Z. M., Spiess, S., Weichert, R. A., Ye, F., Tiedt, R., Skoda, R. C., Monkley, S. J., Critchley, D. R., and Ginsberg, M. H. (2007). Talin is required for integrin-mediated platelet function in hemostasis and thrombosis. *J Exp Med* 204, 3103-3111.

Picker, L. J., Treer, J. R., Nguyen, M., Terstappen, L. W., Hogg, N., and Yednock, T. (1993). Coordinate expression of beta 1 and beta 2 integrin "activation" epitopes during T cell responses in secondary lymphoid tissue. *Eur J Immunol* 23, 2751-2757.

Pierce, K. L., Premont, R. T., and Lefkowitz, R. J. (2002). Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 639-650.

Pivniouk, V., Tsitsikov, E., Swinton, P., Rathbun, G., Alt, F. W., and Geha, R. S. (1998). Impaired viability and profound block in thymocyte development in mice lacking the adaptor protein SLP-76. *Cell* 94, 229-238.

Pleyer, L., Egle, A., Hartmann, T. N., and Greil, R. (2009). Molecular and cellular mechanisms of CLL: novel therapeutic approaches. *Nat Rev Clin Oncol* 6, 405-418.

Polman, C. H., O'Connor, P. W., Havrdova, E., Hutchinson, M., Kappos, L., Miller, D. H., Phillips, J. T., Lublin, F. D., Giovannoni, G., Wajgt, A., *et al.* (2006). A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 354, 899-910.

Polte, T., Newman, W., and Gopal, T. V. (1990). Full length vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1). *Nucleic Acids Res* 18, 5901.

Ponomaryov, T., Peled, A., Petit, I., Taichman, R. S., Habler, L., Sandbank, J., Arenzana-Seisdedos, F., Magerus, A., Caruz, A., Fujii, N., *et al.* (2000). Induction of the chemokine stromal-derived factor-1 following DNA damage improves human stem cell function. *J Clin Invest* 106, 1331-1339.

Popov, S., Yu, K., Kozasa, T., and Wilkie, T. M. (1997). The regulators of G protein signaling (RGS) domains of RGS4, RGS10, and GAIP retain GTPase activating protein activity in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 7216-7220.

Porter, J. C., and Hogg, N. (1997). Integrin cross talk: activation of lymphocyte function-associated antigen-1 on human T cells alters alpha4beta1- and alpha5beta1-mediated function. *J Cell Biol* 138, 1437-1447.

Priddle, H., Hemmings, L., Monkley, S., Woods, A., Patel, B., Sutton, D., Dunn, G. A., Zicha, D., and Critchley, D. R. (1998). Disruption of the talin gene compromises focal

adhesion assembly in undifferentiated but not differentiated embryonic stem cells. *J Cell Biol* 142, 1121-1133.

Proudfoot, A. E. (2002). Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets. *Nat Rev Immunol* 2, 106-115.

Proudfoot, A. E., Handel, T. M., Johnson, Z., Lau, E. K., LiWang, P., Clark-Lewis, I., Borlat, F., Wells, T. N., and Kosco-Vilbois, M. H. (2003). Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 1885-1890.

Raab, M., da Silva, A. J., Findell, P. R., and Rudd, C. E. (1997). Regulation of Vav-SLP-76 binding by ZAP-70 and its relevance to TCR zeta/CD3 induction of interleukin-2. *Immunity* 6, 155-164.

Raftopoulou, M., and Hall, A. (2004). Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol* 265, 23-32.

Rao, N., Lupher, M. L., Jr., Ota, S., Reedquist, K. A., Druker, B. J., and Band, H. (2000). The linker phosphorylation site Tyr292 mediates the negative regulatory effect of Cbl on ZAP-70 in T cells. *J Immunol* 164, 4616-4626.

Ratnikov, B., Ptak, C., Han, J., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., and Ginsberg, M. H. (2005). Talin phosphorylation sites mapped by mass spectrometry. *Journal of cell science* 118, 4921-4923.

Redondo-Munoz, J., Escobar-Diaz, E., Samaniego, R., Terol, M. J., Garcia-Marco, J. A., and Garcia-Pardo, A. (2006). MMP-9 in B-cell chronic lymphocytic leukemia is up-regulated by alpha4beta1 integrin or CXCR4 engagement via distinct signaling pathways, localizes to podosomes, and is involved in cell invasion and migration. *Blood* 108, 3143-3151.

Reif, K., Buday, L., Downward, J., and Cantrell, D. A. (1994). SH3 domains of the adapter molecule Grb2 complex with two proteins in T cells: the guanine nucleotide exchange protein Sos and a 75-kDa protein that is a substrate for T cell antigen receptor-activated tyrosine kinases. *J Biol Chem* 269, 14081-14087.

Reif, K., and Cyster, J. G. (2000). RGS molecule expression in murine B lymphocytes and ability to down-regulate chemotaxis to lymphoid chemokines. *J Immunol* 164, 4720-4729.

Reynolds, L. F., Smyth, L. A., Norton, T., Freshney, N., Downward, J., Kioussis, D., and Tybulewicz, V. L. (2002). Vav1 transduces T cell receptor signals to the activation of phospholipase C-gamma1 via phosphoinositide 3-kinase-dependent and -independent pathways. *J Exp Med* 195, 1103-1114.

Ridley, A. J. (2001). Rho GTPases and cell migration. *J Cell Sci* 114, 2713-2722.

Ridley, A. J., and Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 70, 389-399.

Rivero, G., Gabilondo, A. M., Garcia-Fuster, M. J., La Harpe, R., Garcia-Sevilla, J. A., and Meana, J. J. (2012). Differential regulation of RGS proteins in the prefrontal cortex of short- and long-term human opiate abusers. *Neuropharmacology* 62, 1044-1051.

Robledo, M. M., Bartolome, R. A., Longo, N., Rodriguez-Frade, J. M., Mellado, M., Longo, I., van Muijen, G. N., Sanchez-Mateos, P., and Teixido, J. (2001). Expression of functional chemokine receptors CXCR3 and CXCR4 on human melanoma cells. *J Biol Chem* 276, 45098-45105.

Rose, D. M., Alon, R., and Ginsberg, M. H. (2007). Integrin modulation and signaling in leukocyte adhesion and migration. *Immunol Rev* 218, 126-134.

Rose, D. M., Han, J., and Ginsberg, M. H. (2002). Alpha4 integrins and the immune response. *Immunol Rev* 186, 118-124.

Rosen, S. D. (2004). Ligands for L-selectin: homing, inflammation, and beyond. *Annu Rev Immunol* 22, 129-156.

Rossi, D., and Zlotnik, A. (2000). The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 18, 217-242.

Rossmann, K. L., Der, C. J., and Sondek, J. (2005). GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 167-180.

Rossmann, K. L., and Sondek, J. (2005). Larger than Dbl: new structural insights into RhoA activation. *Trends Biochem Sci* 30, 163-165.

Rubin, J. B., Kung, A. L., Klein, R. S., Chan, J. A., Sun, Y., Schmidt, K., Kieran, M. W., Luster, A. D., and Segal, R. A. (2003). A small-molecule antagonist of CXCR4 inhibits intracranial growth of primary brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 13513-13518.

Salim, S., Sinnarajah, S., Kehrl, J. H., and Dessauer, C. W. (2003). Identification of RGS2 and type V adenylyl cyclase interaction sites. *J Biol Chem* 278, 15842-15849.

Salmi, M., and Jalkanen, S. (2005). Lymphocyte homing to the gut: attraction, adhesion, and commitment. *Immunol Rev* 206, 100-113.

Salomon, D. R., Crisa, L., Mojcik, C. F., Ishii, J. K., Klier, G., and Shevach, E. M. (1997). Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed by cortical thymic epithelial cells and mediates thymocyte adhesion. Implications for the function of alpha4beta1 (VLA4) integrin in T-cell development. *Blood* 89, 2461-2471.

Salomon, D. R., Mojcik, C. F., Chang, A. C., Wadsworth, S., Adams, D. H., Coligan, J. E., and Shevach, E. M. (1994). Constitutive activation of integrin alpha 4 beta 1 defines a unique stage of human thymocyte development. *J Exp Med* 179, 1573-1584.

Sallusto, F., Lanzavecchia, A., and Mackay, C. R. (1998). Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunol Today* 19, 568-574.

Sanchez-Aparicio, P., Dominguez-Jimenez, C., and Garcia-Pardo, A. (1994). Activation of the alpha 4 beta 1 integrin through the beta 1 subunit induces recognition of the RGDS sequence in fibronectin. *J Cell Biol* 126, 271-279.

Sanchez-Martin, L., Sanchez-Mateos, P., and Cabanas, C. (2013). CXCR7 impact on CXCL12 biology and disease. *Trends Mol Med* 19, 12-22.

Sandborn, W. J., Feagan, B. G., Rutgeerts, P., Hanauer, S., Colombel, J. F., Sands, B. E., Lukas, M., Fedorak, R. N., Lee, S., Bressler, B., *et al.* (2013). Vedolizumab as induction and maintenance therapy for Crohn's disease. *N Engl J Med* 369, 711-721.

Sander, E. E., van Delft, S., ten Klooster, J. P., Reid, T., van der Kammen, R. A., Michiels, F., and Collard, J. G. (1998). Matrix-dependent Tiam1/Rac signaling in epithelial cells promotes either cell-cell adhesion or cell migration and is regulated by phosphatidylinositol 3-kinase. *J Cell Biol* 143, 1385-1398.

Sanz-Rodriguez, F., Hidalgo, A., and Teixido, J. (2001). Chemokine stromal cell-derived factor-1alpha modulates VLA-4 integrin-mediated multiple myeloma cell adhesion to CS-1/fibronectin and VCAM-1. *Blood* 97, 346-351.

Sanz-Rodriguez, F., Ruiz-Velasco, N., Pascual-Salcedo, D., and Teixido, J. (1999). Characterization of VLA-4-dependent myeloma cell adhesion to fibronectin and VCAM-1. *Br J Haematol* 107, 825-834.

Sasaki, H., Nagura, K., Ishino, M., Tobioka, H., Kotani, K., and Sasaki, T. (1995). Cloning and characterization of cell adhesion kinase beta, a novel protein-tyrosine kinase of the focal adhesion kinase subfamily. *J Biol Chem* 270, 21206-21219.

Sato, K., Kawasaki, H., Morimoto, C., Yamashima, N., and Matsuyama, T. (2002). An abortive ligand-induced activation of CCR1-mediated downstream signaling event and a deficiency of CCR5 expression are associated with the hyporesponsiveness of human naive CD4+ T cells to CCL3 and CCL5. *J Immunol* 168, 6263-6272.

Sauer, K., Liou, J., Singh, S. B., Yablonski, D., Weiss, A., and Perlmutter, R. M. (2001). Hematopoietic progenitor kinase 1 associates physically and functionally with the adaptor proteins B cell linker protein and SLP-76 in lymphocytes. *J Biol Chem* 276, 45207-45216.

Scott, L. M., Priestley, G. V., and Papayannopoulou, T. (2003). Deletion of alpha4 integrins from adult hematopoietic cells reveals roles in homeostasis, regeneration, and homing. *Mol Cell Biol* 23, 9349-9360.

Scotton, C. J., Wilson, J. L., Scott, K., Stamp, G., Wilbanks, G. D., Fricker, S., Bridger, G., and Balkwill, F. R. (2002). Multiple actions of the chemokine CXCL12 on epithelial tumor cells in human ovarian cancer. *Cancer Res* 62, 5930-5938.

Schaller, M. D. (2010). Cellular functions of FAK kinases: insight into molecular mechanisms and novel functions. *J Cell Sci* 123, 1007-1013.

Scheschonka, A., Dessauer, C. W., Sinnarajah, S., Chidiac, P., Shi, C. S., and Kehrl, J. H. (2000). RGS3 is a GTPase-activating protein for g(ialpha) and g(qalpha) and a potent inhibitor of signaling by GTPase-deficient forms of g(qalpha) and g(11alpha). *Mol Pharmacol* 58, 719-728.

Schmidt, A., and Hall, A. (2002). Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev* 16, 1587-1609.

Schuebel, K. E., Bustelo, X. R., Nielsen, D. A., Song, B. J., Barbacid, M., Goldman, D., and Lee, I. J. (1996). Isolation and characterization of murine vav2, a member of the vav family of proto-oncogenes. *Oncogene* 13, 363-371.

Schuebel, K. E., Movilla, N., Rosa, J. L., and Bustelo, X. R. (1998). Phosphorylation-dependent and constitutive activation of Rho proteins by wild-type and oncogenic Vav-2. *EMBO J* 17, 6608-6621.

Schweighoffer, T., Tanaka, Y., Tidswell, M., Erle, D. J., Horgan, K. J., Luce, G. E., Lazarovits, A. I., Buck, D., and Shaw, S. (1993). Selective expression of integrin alpha 4 beta 7 on a subset of human CD4+ memory T cells with Hallmarks of gut-tropism. *J Immunol* 151, 717-729.

Sells, M. A., Knaus, U. G., Bagrodia, S., Ambrose, D. M., Bokoch, G. M., and Chernoff, J. (1997). Human p21-activated kinase (Pak1) regulates actin organization in mammalian cells. *Curr Biol* 7, 202-210.

Shattil, S. J., Kim, C., and Ginsberg, M. H. (2010). The final steps of integrin activation: the end game. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 288-300.

Shi, C. S., Sinnarajah, S., Cho, H., Kozasa, T., and Kehrl, J. H. (2000). G13alpha-mediated PYK2 activation. PYK2 is a mediator of G13alpha-induced serum response element-dependent transcription. *J Biol Chem* 275, 24470-24476.

Shimizu, N., Soda, Y., Kanbe, K., Liu, H. Y., Mukai, R., Kitamura, T., and Hoshino, H. (2000). A putative G protein-coupled receptor, RDC1, is a novel coreceptor for human and simian immunodeficiency viruses. *J Virol* 74, 619-626.

Shimizu, Y., Rose, D. M., and Ginsberg, M. H. (1999). Integrins in the immune system. *Adv Immunol* 72, 325-380.

Shimizu, Y., van Seventer, G. A., Horgan, K. J., and Shaw, S. (1990). Roles of adhesion molecules in T-cell recognition: fundamental similarities between four integrins on resting human T cells (LFA-1, VLA-4, VLA-5, VLA-6) in expression, binding, and costimulation. *Immunol Rev* 114, 109-143.

Shimonaka, M., Katagiri, K., Nakayama, T., Fujita, N., Tsuruo, T., Yoshie, O., and Kinashi, T. (2003). Rap1 translates chemokine signals to integrin activation, cell polarization, and motility across vascular endothelium under flow. *J Cell Biol* 161, 417-427.

Shirozu, M., Nakano, T., Inazawa, J., Tashiro, K., Tada, H., Shinohara, T., and Honjo, T. (1995). Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene. *Genomics* 28, 495-500.

Shu, F. J., Ramineni, S., and Hepler, J. R. RGS14 is a multifunctional scaffold that integrates G protein and Ras/Raf MAPKinase signalling pathways. *Cell Signal* 22, 366-376.

Shulman, Z., Shinder, V., Klein, E., Grabovsky, V., Yeager, O., Geron, E., Montresor, A., Bolomini-Vittori, M., Feigelson, S. W., Kirchhausen, T., *et al.* (2009). Lymphocyte crawling and transendothelial migration require chemokine triggering of high-affinity LFA-1 integrin. *Immunity* 30, 384-396.

Sierro, F., Biben, C., Martinez-Munoz, L., Mellado, M., Ransohoff, R. M., Li, M., Woehl, B., Leung, H., Groom, J., Batten, M., *et al.* (2007). Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 14759-14764.

Sims, T. N., and Dustin, M. L. (2002). The immunological synapse: integrins take the stage. *Immunol Rev* 186, 100-117.

Sironi, M., Sciacca, F. L., Matteucci, C., Conni, M., Vecchi, A., Bernasconi, S., Minty, A., Caput, D., Ferrara, P., Colotta, F., and *et al.* (1994). Regulation of endothelial and mesothelial cell function by interleukin-13: selective induction of vascular cell adhesion molecule-1 and amplification of interleukin-6 production. *Blood* 84, 1913-1921.

Sloan-Lancaster, J., Presley, J., Ellenberg, J., Yamazaki, T., Lippincott-Schwartz, J., and Samelson, L. E. (1998). ZAP-70 association with T cell receptor zeta (TCRzeta): fluorescence imaging of dynamic changes upon cellular stimulation. *J Cell Biol* 143, 613-624.

Smith, A., Stanley, P., Jones, K., Svensson, L., McDowall, A., and Hogg, N. (2007). The role of the integrin LFA-1 in T-lymphocyte migration. *Immunol Rev* 218, 135-146.

Smith, M. C., Luker, K. E., Garbow, J. R., Prior, J. L., Jackson, E., Piwnica-Worms, D., and Luker, G. D. (2004). CXCR4 regulates growth of both primary and metastatic breast cancer. *Cancer Res* 64, 8604-8612.

Soede, R. D., Wijnands, Y. M., Van Kouteren-Cobzaru, I., and Roos, E. (1998). ZAP-70 tyrosine kinase is required for LFA-1-dependent T cell migration. *J Cell Biol* 142, 1371-1379.

Soisson, S. M., Nimnual, A. S., Uy, M., Bar-Sagi, D., and Kuriyan, J. (1998). Crystal structure of the Dbl and pleckstrin homology domains from the human Son of sevenless protein. *Cell* 95, 259-268.

Springer, T. A. (1994). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76, 301-314.

Springer, T. A. (1995). Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu Rev Physiol* 57, 827-872.

Springer, T. A., and Dustin, M. L. (2012). Integrin inside-out signaling and the immunological synapse. *Curr Opin Cell Biol* 24, 107-115.

Stein, J. V., Rot, A., Luo, Y., Narasimhaswamy, M., Nakano, H., Gunn, M. D., Matsuzawa, A., Quackenbush, E. J., Dorf, M. E., and von Andrian, U. H. (2000). The CC chemokine thymus-derived chemotactic agent 4 (TCA-4, secondary lymphoid tissue chemokine, 6Ckine, exodus-2) triggers lymphocyte function-associated antigen 1-mediated arrest of rolling T lymphocytes in peripheral lymph node high endothelial venules. *J Exp Med* 191, 61-76.

Stein, J. V., Soriano, S. F., M'Rini, C., Nombela-Arrieta, C., de Buitrago, G. G., Rodriguez-Frade, J. M., Mellado, M., Girard, J. P., and Martinez, A. C. (2003). CCR7-mediated physiological lymphocyte homing involves activation of a tyrosine kinase pathway. *Blood* 101, 38-44.

Stewart, M., and Hogg, N. (1996). Regulation of leukocyte integrin function: affinity vs. avidity. *J Cell Biochem* 61, 554-561.

Stewart, M., Thiel, M., and Hogg, N. (1995). Leukocyte integrins. *Curr Opin Cell Biol* 7, 690-696.

Swerlick, R. A., Lee, K. H., Li, L. J., Sepp, N. T., Caughman, S. W., and Lawley, T. J. (1992). Regulation of vascular cell adhesion molecule 1 on human dermal microvascular endothelial cells. *J Immunol* 149, 698-705.

Sylvain, N. R., Nguyen, K., and Bunnell, S. C. (2011). Vav1-mediated scaffolding interactions stabilize SLP-76 microclusters and contribute to antigen-dependent T cell responses. *Sci Signal* 4, ra14.

- Tachibana, K., Hirota, S., Iizasa, H., Yoshida, H., Kawabata, K., Kataoka, Y., Kitamura, Y., Matsushima, K., Yoshida, N., Nishikawa, S., *et al.* (1998). The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature* 393, 591-594.
- Tadokoro, S., Shattil, S. J., Eto, K., Tai, V., Liddington, R. C., de Pereda, J. M., Ginsberg, M. H., and Calderwood, D. A. (2003). Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation. *Science* 302, 103-106.
- Tang, R. H., Tng, E., Law, S. K., and Tan, S. M. (2005). Epitope mapping of monoclonal antibody to integrin alphaL beta2 hybrid domain suggests different requirements of affinity states for intercellular adhesion molecules (ICAM)-1 and ICAM-3 binding. *J Biol Chem* 280, 29208-29216.
- Tansey, M. G., and Goldberg, M. S. (2010). Neuroinflammation in Parkinson's disease: its role in neuronal death and implications for therapeutic intervention. *Neurobiol Dis* 37, 510-518.
- Tarakhovsky, A., Turner, M., Schaal, S., Mee, P. J., Duddy, L. P., Rajewsky, K., and Tybulewicz, V. L. (1995). Defective antigen receptor-mediated proliferation of B and T cells in the absence of Vav. *Nature* 374, 467-470.
- Teixido, J., Hemler, M. E., Greenberger, J. S., and Anklesaria, P. (1992). Role of beta 1 and beta 2 integrins in the adhesion of human CD34hi stem cells to bone marrow stroma. *J Clin Invest* 90, 358-367.
- Ticchioni, M., Charvet, C., Noraz, N., Lamy, L., Steinberg, M., Bernard, A., and Deckert, M. (2002). Signaling through ZAP-70 is required for CXCL12-mediated T-cell transendothelial migration. *Blood* 99, 3111-3118.
- Toyabe, S., Watanabe, A., Harada, W., Karasawa, T., and Uchiyama, M. (2001). Specific immunoglobulin E responses in ZAP-70-deficient patients are mediated by Syk-dependent T-cell receptor signalling. *Immunology* 103, 164-171.
- Tuosto, L., Michel, F., and Acuto, O. (1996). p95vav associates with tyrosine-phosphorylated SLP-76 in antigen-stimulated T cells. *J Exp Med* 184, 1161-1166.
- Turner, M., and Billadeau, D. D. (2002). VAV proteins as signal integrators for multi-subunit immune-recognition receptors. *Nat Rev Immunol* 2, 476-486.
- Tybulewicz, V. L. (2005). Vav-family proteins in T-cell signalling. *Curr Opin Immunol* 17, 267-274.
- Tybulewicz, V. L., Ardouin, L., Prisco, A., and Reynolds, L. F. (2003). Vav1: a key signal transducer downstream of the TCR. *Immunol Rev* 192, 42-52.

Tybulewicz, V. L., and Henderson, R. B. (2009). Rho family GTPases and their regulators in lymphocytes. *Nat Rev Immunol* 9, 630-644.

Ueda, Y., Yang, K., Foster, S. J., Kondo, M., and Kelsoe, G. (2004). Inflammation controls B lymphopoiesis by regulating chemokine CXCL12 expression. *J Exp Med* 199, 47-58.

Ugarte-Berzal, E., Bailon, E., Amigo-Jimenez, I., Vituri, C. L., del Cerro, M. H., Terol, M. J., Albar, J. P., Rivas, G., Garcia-Marco, J. A., and Garcia-Pardo, A. (2012). A 17-residue sequence from the matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) hemopexin domain binds alpha4beta1 integrin and inhibits MMP-9-induced functions in chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Biol Chem* 287, 27601-27613.

van Dinther-Janssen, A. C., Kraal, G., van Soesbergen, R. M., Scheper, R. J., and Meijer, C. J. (1994). Immunohistological and functional analysis of adhesion molecule expression in the rheumatoid synovial lining layer. Implications for synovial lining cell destruction. *J Rheumatol* 21, 1998-2004.

Veale, M., Raab, M., Li, Z., da Silva, A. J., Kraeft, S. K., Weremowicz, S., Morton, C. C., and Rudd, C. E. (1999). Novel isoform of lymphoid adaptor FYN-T-binding protein (FYB-130) interacts with SLP-76 and up-regulates interleukin 2 production. *J Biol Chem* 274, 28427-28435.

Vicente-Manzanares, M., Cabrero, J. R., Rey, M., Perez-Martinez, M., Ursa, A., Itoh, K., and Sanchez-Madrid, F. (2002). A role for the Rho-p160 Rho coiled-coil kinase axis in the chemokine stromal cell-derived factor-1alpha-induced lymphocyte actomyosin and microtubular organization and chemotaxis. *J Immunol* 168, 400-410.

Vicente-Manzanares, M., Cruz-Adalia, A., Martin-Cofreces, N. B., Cabrero, J. R., Dosil, M., Alvarado-Sanchez, B., Bustelo, X. R., and Sanchez-Madrid, F. (2005). Control of lymphocyte shape and the chemotactic response by the GTP exchange factor Vav. *Blood* 105, 3026-3034.

Vicente-Manzanares, M., Rey, M., Jones, D. R., Sancho, D., Mellado, M., Rodriguez-Frade, J. M., del Pozo, M. A., Yanez-Mo, M., de Ana, A. M., Martinez, A. C., *et al.* (1999). Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in stromal cell-derived factor-1 alpha-induced lymphocyte polarization and chemotaxis. *J Immunol* 163, 4001-4012.

Vicente-Manzanares, M., and Sanchez-Madrid, F. (2004). Role of the cytoskeleton during leukocyte responses. *Nat Rev Immunol* 4, 110-122.

Vila-Coro, A. J., Rodriguez-Frade, J. M., Martin De Ana, A., Moreno-Ortiz, M. C., Martinez, A. C., and Mellado, M. (1999). The chemokine SDF-1alpha triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway. *FASEB J* 13, 1699-1710.

- Vinogradova, O., Velyvis, A., Velyviene, A., Hu, B., Haas, T., Plow, E., and Qin, J. (2002). A structural mechanism of integrin alpha(IIB)beta(3) "inside-out" activation as regulated by its cytoplasmic face. *Cell* 110, 587-597.
- von Andrian, U. H., and Mackay, C. R. (2000). T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *N Engl J Med* 343, 1020-1034.
- Wagner, N., Lohler, J., Kunkel, E. J., Ley, K., Leung, E., Krissansen, G., Rajewsky, K., and Muller, W. (1996). Critical role for beta7 integrins in formation of the gut-associated lymphoid tissue. *Nature* 382, 366-370.
- Wang, H., Kadlecsek, T. A., Au-Yeung, B. B., Goodfellow, H. E., Hsu, L. Y., Freedman, T. S., and Weiss, A. (2010). ZAP-70: an essential kinase in T-cell signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a002279.
- Wang, H., Liu, H., Lu, Y., Lovatt, M., Wei, B., and Rudd, C. E. (2007). Functional defects of SKAP-55-deficient T cells identify a regulatory role for the adaptor in LFA-1 adhesion. *Mol Cell Biol* 27, 6863-6875.
- Wang, H., Moon, E. Y., Azouz, A., Wu, X., Smith, A., Schneider, H., Hogg, N., and Rudd, C. E. (2003). SKAP-55 regulates integrin adhesion and formation of T cell-APC conjugates. *Nat Immunol* 4, 366-374.
- Wang, H., Wei, B., Bismuth, G., and Rudd, C. E. (2009). SLP-76-ADAP adaptor module regulates LFA-1 mediated costimulation and T cell motility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 12436-12441.
- Wang, J., Shiozawa, Y., Wang, Y., Jung, Y., Pienta, K. J., Mehra, R., Loberg, R., and Taichman, R. S. (2008). The role of CXCR7/RDC1 as a chemokine receptor for CXCL12/SDF-1 in prostate cancer. *J Biol Chem* 283, 4283-4294.
- Watanabe, N., Bodin, L., Pandey, M., Krause, M., Coughlin, S., Boussiotis, V. A., Ginsberg, M. H., and Shattil, S. J. (2008). Mechanisms and consequences of agonist-induced talin recruitment to platelet integrin alphaIIb beta3. *J Cell Biol* 181, 1211-1222.
- Watson, J. M., Harding, T. W., Golubovskaya, V., Morris, J. S., Hunter, D., Li, X., Haskill, J. S., and Earp, H. S. (2001). Inhibition of the calcium-dependent tyrosine kinase (CADTK) blocks monocyte spreading and motility. *J Biol Chem* 276, 3536-3542.
- Watts, J. D., Affolter, M., Krebs, D. L., Wange, R. L., Samelson, L. E., and Aebersold, R. (1994). Identification by electrospray ionization mass spectrometry of the sites of tyrosine phosphorylation induced in activated Jurkat T cells on the protein tyrosine kinase ZAP-70. *J Biol Chem* 269, 29520-29529.
- Weber, K. S., Klickstein, L. B., Weber, P. C., and Weber, C. (1998). Chemokine-induced monocyte transmigration requires cdc42-mediated cytoskeletal changes. *Eur J Immunol* 28, 2245-2251.

Wegener, K. L., Partridge, A. W., Han, J., Pickford, A. R., Liddington, R. C., Ginsberg, M. H., and Campbell, I. D. (2007). Structural basis of integrin activation by talin. *Cell* 128, 171-182.

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

Willard, F. S., Willard, M. D., Kimple, A. J., Soundararajan, M., Oestreich, E. A., Li, X., Sowa, N. A., Kimple, R. J., Doyle, D. A., Der, C. J., *et al.* (2009). Regulator of G-protein signaling 14 (RGS14) is a selective H-Ras effector. *PLoS One* 4, e4884.

Willars, G. B. (2006). Mammalian RGS proteins: multifunctional regulators of cellular signalling. *Semin Cell Dev Biol* 17, 363-376.

Williams, B. L., Schreiber, K. L., Zhang, W., Wange, R. L., Samelson, L. E., Leibson, P. J., and Abraham, R. T. (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.

Wright, N., de Lera, T. L., Garcia-Moruja, C., Lillo, R., Garcia-Sanchez, F., Caruz, A., and Teixido, J. (2003). Transforming growth factor-beta1 down-regulates expression of chemokine stromal cell-derived factor-1: functional consequences in cell migration and adhesion. *Blood* 102, 1978-1984.

Wright, N., Hidalgo, A., Rodriguez-Frade, J. M., Soriano, S. F., Mellado, M., Pardo-Cabanas, M., Briskin, M. J., and Teixido, J. (2002). The chemokine stromal cell-derived factor-1 alpha modulates alpha 4 beta 7 integrin-mediated lymphocyte adhesion to mucosal addressin cell adhesion molecule-1 and fibronectin. *J Immunol* 168, 5268-5277.

Wu, B., Chien, E. Y., Mol, C. D., Fenalti, G., Liu, W., Katritch, V., Abagyan, R., Brooun, A., Wells, P., Bi, F. C., *et al.* (2010). Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. *Science* 330, 1066-1071.

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.

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

Xing, B., Jedsadayamata, A., and Lam, S. C. (2001). Localization of an integrin binding site to the C terminus of talin. *J Biol Chem* 276, 44373-44378.

Xiong, J. P., Stehle, T., Diefenbach, B., Zhang, R., Dunker, R., Scott, D. L., Joachimiak, A., Goodman, S. L., and Arnaout, M. A. (2001). Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3. *Science* 294, 339-345.

- Xiong, W. C., Macklem, M., and Parsons, J. T. (1998). Expression and characterization of splice variants of PYK2, a focal adhesion kinase-related protein. *J Cell Sci* *111* (Pt 14), 1981-1991.
- Yablonski, D., Kuhne, M. R., Kadlecsek, T., and Weiss, A. (1998). Uncoupling of nonreceptor tyrosine kinases from PLC-gamma1 in an SLP-76-deficient T cell. *Science* *281*, 413-416.
- Yan, B., Calderwood, D. A., Yaspan, B., and Ginsberg, M. H. (2001). Calpain cleavage promotes talin binding to the beta 3 integrin cytoplasmic domain. *J Biol Chem* *276*, 28164-28170.
- Yednock, T. A., Cannon, C., Fritz, L. C., Sanchez-Madrid, F., Steinman, L., and Karin, N. (1992). Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin. *Nature* *356*, 63-66.
- Zabel, B. A., Wang, Y., Lewen, S., Berahovich, R. D., Penfold, M. E., Zhang, P., Powers, J., Summers, B. C., Miao, Z., Zhao, B., *et al.* (2009). Elucidation of CXCR7-mediated signaling events and inhibition of CXCR4-mediated tumor cell transendothelial migration by CXCR7 ligands. *J Immunol* *183*, 3204-3211.
- Zhang, R., Alt, F. W., Davidson, L., Orkin, S. H., and Swat, W. (1995). Defective signalling through the T- and B-cell antigen receptors in lymphoid cells lacking the *vav* proto-oncogene. *Nature* *374*, 470-473.
- Zhang, X., Jiang, G., Cai, Y., Monkley, S. J., Critchley, D. R., and Sheetz, M. P. (2008). Talin depletion reveals independence of initial cell spreading from integrin activation and traction. *Nat Cell Biol* *10*, 1062-1068.
- Zlotnik, A., and Yoshie, O. (2000). Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* *12*, 121-127.
- Zlotnik, A., and Yoshie, O. (2012). The chemokine superfamily revisited. *Immunity* *36*, 705-716.
- Zou, Y. R., Kottmann, A. H., Kuroda, M., Taniuchi, I., and Littman, D. R. (1998). Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* *393*, 595-599.

Anexos

ANEXOS

Publicaciones del autor relacionadas con el trabajo de tesis:

- Garcia-Bernal, D., Pardo-Cabañas, M., **Dios-Esponera-A**, Samaniego, R., Hernán-P de la Ossa, D. and Teixidó, J. Chemokine-induced Zap70 kinase-mediated dissociation of the Vav1-Talin complex activates $\alpha 4\beta 1$ integrin for T cell adhesion. *Immunity*. Vol. 31, 953-964, 2009.....**ANEXO I**
- Garcia-Bernal D *, **Dios-Esponera A ***, Sotillo-Mallo E, García-Verdugo R, Arellano N and Teixido J. RGS10 represses the upregulation by chemokines of T cell adhesion mediated by $\alpha 4\beta 1$ and $\alpha L\beta 2$ integrins. 2011. *The Journal Immunology*. Vol. 187, 1264-72, 2011.....**ANEXO II**
- **Dios-Esponera A***, Isern de Val S*, García-Verdugo R, García-Bernal D, Arellano-Sánchez N, Cabañas C, Teixidó J. Vav1-interacting molecules as positive or negative regulators of chemokine-stimulated T lymphocyte adhesion mediated by integrin $\alpha 4\beta 1$. *En preparación*.....**ANEXO III**

Publicaciones en las que ha colaborado el autor:

-
- Garcia-Bernal D*, Redondo-Muñoz J*, **Dios-Esponera A**, Chèvre R, Bailón E, Garayoa M, Arellano-Sánchez N, Gutierrez NC, Hidalgo A, García-Pardo A, Teixidó J. Sphingosine-1-phosphate activates chemokine-promoted myeloma cell adhesion and migration involving $\alpha 4\beta 1$ integrin function. *The Journal Pathology*. Vol. 229, 36-48, 2013..... **ANEXO IV**

Chemokine-Induced Zap70 Kinase-Mediated Dissociation of the Vav1-Talin Complex Activates $\alpha 4\beta 1$ Integrin for T Cell Adhesion

David García-Bernal,¹ Marisa Pardo-Cabañas,¹ Ana Dios-Esponera,¹ Rafael Samaniego,² Dolores Hernán-P de la Ossa,^{1,3} and Joaquin Teixidó^{1,*}

¹Cellular and Molecular Medicine Program, Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), 28040 Madrid, Spain

²Unidad de Microscopía Confocal, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, 28009 Madrid, Spain

³Present address: Universidad Complutense de Madrid, Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, 28040 Madrid, Spain

*Correspondence: joaquin@cib.csic.es

DOI 10.1016/j.immuni.2009.09.021

SUMMARY

Lymphocyte integrins mediate cell arrest on endothelium during immune surveillance after activation by chemokine-stimulated inside-out signals. Here we show that a Vav1-talin complex in T cells is a key target for chemokine-triggered inside-out signaling leading to integrin $\alpha 4\beta 1$ activation. Thus, Vav1 dissociation from talin was required to generate high-affinity $\alpha 4\beta 1$ conformations. Assembly of the Vav1-talin complex required PtdIns(4,5)P₂, which was provided by talin-bound phosphatidylinositol phosphate kinase I γ . Chemokine-promoted Vav1 dissociation from talin followed an initial increase in talin binding to $\alpha 4\beta 1$. This process was dependent on ZAP-70, which binds to and phosphorylates Vav1 in the complex, leading to further $\alpha 4\beta 1$ activation and cell adhesion strengthening. Moreover, Vav1-talin dissociation was needed for Rac1 activation, thus indicating that $\alpha 4\beta 1$ and Rac1 activation can be coupled by chemokine-stimulated ZAP-70 function. Our data suggest that Vav1 might function as a repressive adaptor of talin that must dissociate from $\alpha 4\beta 1$ -talin complexes for efficient integrin activation.

INTRODUCTION

Chemokines promote the migration of immune cells from lymph and blood circulation into lymphoid tissues and sites of inflammation during immune surveillance (Campbell et al., 2003; Charo and Ransohoff, 2006; Rot and von Andrian, 2004). This process is achieved after rapid stimulation of $\alpha 4\beta 1$ and $\alpha L\beta 2$ integrin activity on T lymphocytes by chemokines presented on the endothelium. Thus, chemokine binding to G protein-coupled receptors induces rapid activation of effector molecules that lead to integrin-mediated upregulation of cell adhesion, a process called inside-out signaling (Kinashi, 2005; Ley et al., 2007; Luster et al., 2005). Integrin cytoplasmic regions are responsible for sensing and transmitting molecular information

originated by this signaling, to finally generate high-affinity conformations of the integrin extracellular domain.

Talin is a homodimer protein that physically links integrin β subunits with the actin cytoskeleton (Calderwood, 2004; Campbell and Ginsberg, 2004; Nayal et al., 2004). The talin N-terminal head domain contains the FERM (protein 4.1, ezrin, radixin, and moesin) region that binds to an NPXY or NPXF membrane-proximal motif in β -subunit cytoplasmic tails (Campbell and Ginsberg, 2004). The FERM region also interacts with the type I phosphatidylinositol phosphate kinase $\gamma 90$ (PIPKI $\gamma 90$) (Di Paolo et al., 2002) (also called PIPKI $\gamma 661$) (Ling et al., 2002), leading to local accumulation of its product phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate [PtdIns(4,5)P₂], a phosphoinositide that stimulates talin- $\beta 1$ integrin interaction (Martel et al., 2001) by disrupting the interaction between the head and the C-terminal rod domain of talin (Goksoy et al., 2008). The talin rod domain interacts with vinculin and actin, providing links to the actin cytoskeleton (Gilmore and Burridge, 1996). Talin is required for affinity regulation of $\beta 1$ and $\beta 3$ integrins (Calderwood et al., 1999; Nieswandt et al., 2007; Petrich et al., 2007; Tadokoro et al., 2003; Wegener et al., 2007), and overexpression of the talin head domain promotes separation of α and β subunit cytoplasmic domains (Kim et al., 2003), a key event leading to integrin activation (Carman and Springer, 2003). Moreover, the chemokine CXCL12 also causes spatial separation of these domains in $\alpha L\beta 2$ (Kim et al., 2003), suggesting that talin is a true candidate for regulation of integrin activation in response to chemokines.

Earlier work reported that talin associates with the guanine-nucleotide exchange factor (GEF) Vav on mouse T cells (Fischer et al., 1998), but the functional role of this association was not addressed. Vav1 is a key component of the inside-out signaling generated upon binding of CXCL12 to its receptor CXCR4 that leads to stimulation of $\alpha 4\beta 1$ integrin activation on T lymphocytes (García-Bernal et al., 2005). Vav1 is a multidomain protein that functions as GEF predominantly for Rac (Bustelo, 2000; Turner and Billadeau, 2002). Importantly, it has been demonstrated that Vav proteins play crucial roles in T cell activation and development (Tybulewicz, 2005). Activation of Vav GEF activity requires phosphorylation at tyrosine residues located on its acidic domain, whereas the Dbl-homology region is responsible for GEF activity and the SH2 and SH3 domains interact with autophosphorylated tyrosine kinases and with several adaptor proteins (Bustelo, 2000; Turner and Billadeau, 2002). ZAP70,

Lck, Fyn, and Syk have been linked to Vav phosphorylation by activated receptors in lymphocytes, including CXCR4 (Ottoson et al., 2001; Ticchioni et al., 2002; Tybulewicz, 2005).

In the present work we have studied the role of the Vav1-talin association in chemokine-stimulated T lymphocyte adhesion mediated by $\alpha 4\beta 1$. In addition, we have investigated the functional cross-talk between PtdIns(4,5)P₂ and the molecular machinery activated during inside-out signaling triggered by chemokines. We provide evidence that changes in Vav1-talin association, which are controlled by PtdIns(4,5)P₂, are required for regulation of T cell adhesion mediated by $\alpha 4\beta 1$.

RESULTS

CXCL12 Promotes Vav1-Talin Dissociation that Is Linked to Stimulation of Vav1 Phosphorylation

Vav1 and talin were found constitutively associated in nonstimulated human Molt-4 T cells and PBL-T lymphocytes (Figures 1A and 1B). Notably, Vav1-talin association was rapidly reduced upon cell exposure to CXCL12. Dissociation between Vav1 and talin was independent of a potential protease activity on talin (Figure S1A available online), and total talin amounts were unaltered in cells silenced for Vav1 expression by RNA interference (Figure 1B, right), indicating that absence of the Vav1-talin association does not lead to talin cleavage. More than 98% of Vav1 and talin proteins were present in the digitonin- or Triton X-100-soluble fraction after cell lysis (Figure S1B), indicating that changes in dynamic associations between these molecules were detected in a relevant fraction of their total cellular population. In addition, whereas talin showed a cortical distribution independently of cell exposure to CXCL12, Vav1 cortical localization was substantially reduced after incubation with the chemokine (Figure S1C), suggesting a change in Vav1 subcellular localization resulting from CXCL12 actions.

Vinculin coprecipitated with talin, and concomitant with chemokine-promoted Vav1-talin dissociation, vinculin gradually increased its binding to talin (Figure 1B, left). Talin binding to vinculin was independent of Vav1, as shown by the fact that Vav1 silencing did not affect the binding (Figure 1B, right). Also, although Vav1 antibodies coprecipitated talin, no vinculin was detected in these immunoprecipitates, and vinculin antibodies coprecipitated talin but not Vav1 (not shown), suggesting the unlikelihood of Vav1-vinculin interaction.

Vav1 tyrosine phosphorylation was difficult to detect in Vav1-talin complexes in nonstimulated T cells, and only when association decreased because of CXCL12 was a clear Vav1 phosphorylation observed (Figures 1A and 1D). Activation of this phosphorylation was preceded by a gradual increase in Vav1 coprecipitation with ZAP-70 (Figure 1A), a kinase involved in Vav1 phosphorylation (Ottoson et al., 2001; Ticchioni et al., 2002). In addition, we observed that CXCL12 stimulated a transient Vav1- $\beta 1$ association in Molt-4 and PBL-T cells (Figure 1A).

Interestingly, when we abolished Vav1-talin association by silencing talin expression with i-talin siRNA, we found a defective chemokine-promoted Vav1 tyrosine phosphorylation, as well as impairment in Rac activation (Figures 1C–1E; Figure S2A). To determine whether inhibition of Rac activation was directly dependent on impaired Vav1 activity, we expressed a constitutively active Vav1 form (Δ CH+Ac-GFP) (Lopez-Lago et al.,

2000) and analyzed whether Rac activation was restored. With Vav1 Δ CH+Ac-GFP transfection efficiencies ranging 35%–40%, we obtained a partial recovery of Rac activation in talin-silenced cells, as compared to control (WT) GFP transfectants (Figure 1F). These data suggest that impairment in Rac activation after targeting talin involves defective Vav1 phosphorylation, and possibly Vav1-independent mechanisms.

CXCL12 Stimulates Talin-Integrin $\beta 1$ Association

With similar kinetics as Vav1-talin disassembly, CXCL12 promoted in Molt-4 and PBL-T cells a rapid and transient increase in the association of talin with the $\beta 1$ subunit of $\alpha 4\beta 1$ (Figure 2A, left and middle). As expected, no talin- $\beta 1$ complexes were seen in talin-silenced cells (Figure 2A, right), although they had no alterations in $\alpha 4\beta 1$ heterodimer formation or in $\alpha 4\beta 1$ cell surface expression (Figure S2B). Importantly, no talin- $\beta 1$ complexes were detected in Vav1-silenced cells, and CXCL12 was unable to promote the association (Figure 2B), indicating that talin- $\beta 1$ binding was dependent on Vav1. Transient Vav1- $\beta 1$ association triggered by CXCL12 was also confirmed with $\beta 1$ antibodies, whereas this complex was not formed in Vav1-silenced cells.

We used CCL21 to investigate whether other chemokines can also influence Vav1, talin, and $\beta 1$ associations. CCL21 induced Vav1 release from talin, which was linked to increased talin- $\beta 1$ association (Figure 2C), indicating that these dynamic changes might represent common GPCR-mediated T cell responses with functional implications. Together, these data indicate that chemokines regulate associations between Vav1, talin, and $\beta 1$, which could have important consequences for $\alpha 4\beta 1$ -mediated T cell attachment.

Talin Is Required for Chemokine-Promoted $\alpha 4\beta 1$ -Dependent T Cell Adhesion

To study whether changes in associations between Vav1, talin, and $\beta 1$ could influence T cell attachment mediated by $\alpha 4\beta 1$, we silenced talin expression and tested transfectant adhesion to $\alpha 4\beta 1$ ligands. Talin-silenced T cells revealed a partial reduction in CXCL12-stimulated attachment to VCAM-1 and CS-1-FN under static conditions, relative to control and ni-talin 1 siRNA transfectants (Figure S2C).

Flow chamber adhesion assays under shear stress revealed that CXCL12 triggered a rapid firm attachment to VCAM-1 in 75%–85% of Molt-4 and PBL-T cells transfected with control or ni-talin 1 siRNA, while a minor transfectant population (5%–10%) displayed transient arrest (Figure 3A). Control experiments indicated blocking of adhesion by cell pretreatment with pertussis toxin or with $\alpha 4$ mAb (not shown). Instead, i-talin 1 siRNA transfectants predominantly rolled, displaying low stable arrest on VCAM-1 that was associated with increased transient attachment, suggesting that talin is required during initial events of chemokine-triggered $\alpha 4\beta 1$ -VCAM-1 interaction. Moreover, control and ni-talin 1 siRNA transfectants developed higher resistance to detachment at increased shear stress than i-talin 1 siRNA counterparts (Figure 3B). The potential involvement of talin at initial steps of adhesion was studied by measuring cell binding of 15/7, a mAb that recognizes a $\beta 1$ integrin activation epitope on $\alpha 4\beta 1$ (Yednock et al., 1995), as well as by analyzing binding of VCAM-1-Fc. 15/7 mAb and VCAM-1-Fc bound

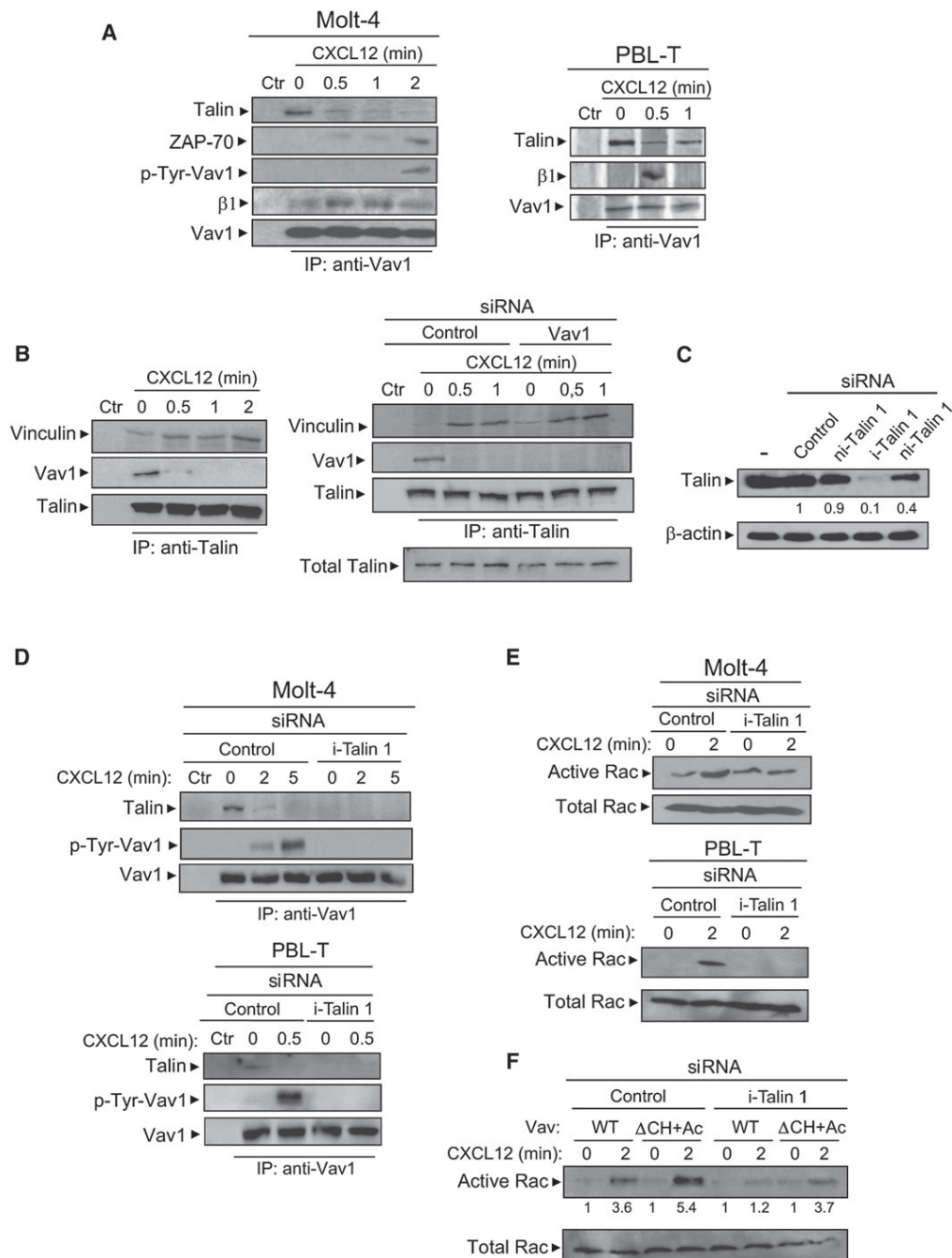


Figure 1. CXCL12 Promotes Vav-Talin Dissociation that Is Linked to Stimulation of Vav1 Phosphorylation

(A) Cells were incubated for the indicated times with CXCL12 (200 ng/ml) and subjected to immunoprecipitation with control (Ctr) or Vav1 antibodies, followed by immunoblotting with antibodies to the stated proteins.

(B) Lysates from nontransfected (left) or control or Vav1 siRNA-transfected (right) Molt-4 cells were subjected to immunoprecipitation and immunoblotting.

(C) Nontransfected (-) or Molt-4 cells transfected with the indicated noninterfering or interfering talin 1 (ni-talin 1 or i-talin 1, respectively) or with control siRNA were analyzed by immunoblotting with talin antibodies. Numbers below gels indicate values from densitometer analyses.

(D and E) Control or i-talin 1 siRNA transfectants were incubated with CXCL12 and tested in immunoprecipitation and immunoblotting assays or subjected to GTPase assays to detect active Rac.

(F) Molt-4 cells were cotransfected with control or i-talin 1 siRNA and wild-type (WT) or constitutively active (Δ CH+Ac) Vav1 forms and tested in Rac GTPase assays.

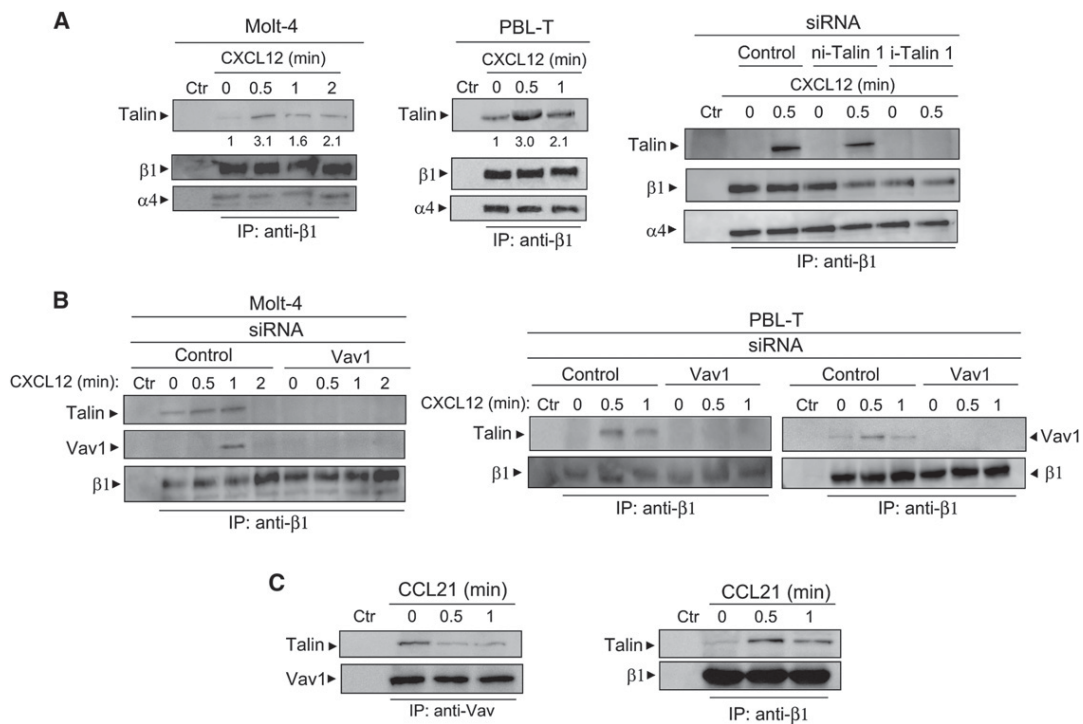


Figure 2. CXCL12 Stimulates Integrin β1-Talin Association on T Cells

(A and B) Molt-4 and PBL-T cells, or the indicated siRNA transfectants, were incubated with CXCL12 and subjected to immunoprecipitation with control (Ctr) or anti-β1 followed by immunoblotting with antibodies to the indicated proteins. Numbers below gels indicate values from densitometer analyses.

(C) PBL-T cells were incubated with CCL21 (200 ng/ml) and subjected to immunoprecipitation with anti-Vav1 or anti-β1 and immunoblotting to the stated proteins.

substantially less to CXCL12-incubated talin knockdown cells than control or ni-talin 1 siRNA transfectants (Figures 3C and 3D). Control experiments showed that all transfectants retained a similar degree of 15/7 mAb or VCAM-1-Fc binding upon exposure to Mn^{2+} , a positive control for integrin affinity regulation (Figures 3C and 3D). These data indicate that activation of α4β1 in response to CXCL12 is defective in talin-silenced cells, which probably accounts for reduced stable T cell tethers and impaired strengthening of α4β1-VCAM-1 interaction.

ZAP-70 Is Essential for Chemokine-Promoted Vav1-Talin Dissociation

CXCL12 induces gradual coprecipitation of Vav1 and ZAP-70 concomitant with weakening of Vav1-talin association and stimulation of Vav1 phosphorylation (Figure 1), so we reasoned that if dissociation involves ZAP-70 function, perhaps by inhibiting its activity or its expression, we could affect the rate of Vav1-talin disassembly. Therefore, we incubated T cells with the ZAP-70 inhibitor piceatannol, or targeted ZAP-70 expression with siRNA, and we analyzed Vav1-talin complexes in coimmunoprecipitation experiments. Whereas cells preincubated with carrier DMSO or control siRNA transfectants displayed Vav1-talin dissociation by CXCL12, those exposed to piceatannol or ZAP-70-silenced cells showed resistance to disassembly of this complex, which was associated to inhibition by piceatannol of Vav1 tyrosine phosphorylation without affecting Vav1-ZAP-70 coprecipitation (Figures 4A and 4B). Furthermore, association

between Vav1 and ZAP-70 required a preformed Vav1-talin complex, as indicated by the fact that silencing talin prevented Vav1-ZAP-70 association (Figure 4C). Together with lack of Vav1 phosphorylation in talin-knockdown cells (Figure 1D), these results strongly suggest that ZAP-70-dependent Vav1 phosphorylation, but not the earlier Vav1-ZAP-70 association, is required for Vav1 release from talin. Contrary to defective Vav1-talin dissociation in ZAP-70-silenced cells, talin-β1 or Vav1-β1 associations stimulated by CXCL12 were not affected by ZAP-70 knocking down (Figure 4D), indicating that they do not depend on Vav1-talin disassembly.

Notably, piceatannol-treated or ZAP-70 knockdown T cells showed a blockade of CXCL12-stimulated adhesion to VCAM-1 (Figure 4E), which arose from defective acquisition of α4β1 active conformations leading to reduced adhesion strengthening, as visualized in 15/7 mAb and VCAM-1-Fc binding assays (Figure 4F; Figure S3). These data indicate that CXCL12 promotes ZAP-70 binding to Vav1 in Vav1-talin complexes, followed by stimulation of Vav phosphorylation that leads to reduced Vav1-talin association, which is essential for progression of α4β1-mediated T cell adhesion.

PtdIns(4,5)P₂-Sequestering Probes Impair Both Vav1-Talin-β1 Associations and Cell Adhesion to VCAM-1

PtdIns(4,5)P₂ stimulates talin binding to the β1 integrin cytoplasmic domain (Martel et al., 2001), thereby constituting a candidate molecule regulating cell adhesion by inside-out

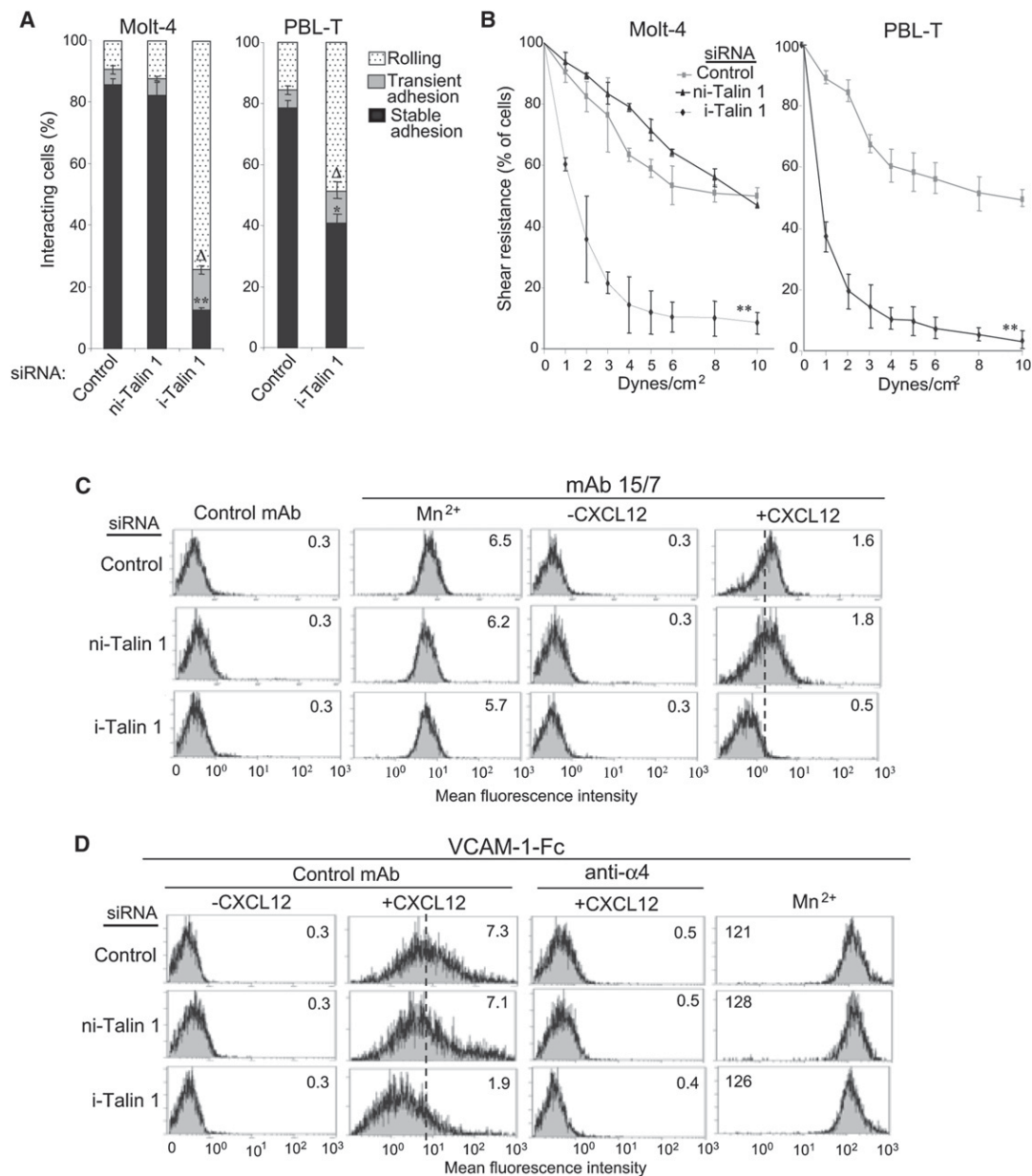


Figure 3. Talin Is Required for Chemokine-Stimulated T Cell Adhesion under Shear Stress Mediated by $\alpha 4\beta 1$

(A and B) Control or talin siRNA transfectants were perfused in flow chambers coated with VCAM-1 immobilized with CXCL12 and analyzed for rolling and transient or stable cell arrest (A; $n = 3$) or for cell detachment after increasing shear rates (B; $n = 3$). Data are presented as indicated in Experimental Procedures. **Adhesion was significantly inhibited compared to control siRNA transfectant attachment, $p < 0.01$, or * $p < 0.05$. Δ Transient arrest was significantly increased compared to control siRNA transfectants, $p < 0.05$.

(C) Molt-4 siRNA transfectants were incubated with or without CXCL12 or Mn²⁺, followed by incubation with 15/7 or control mAb and analysis by flow cytometry. (D) siRNA transfectants were preincubated with control or $\alpha 4$ mAb and subsequently incubated in the absence or presence of CXCL12 or Mn²⁺, before addition of VCAM-1-Fc. Cell-bound ligand was detected as indicated in Experimental Procedures. Insert numbers represent mean fluorescence intensity units. Representative results of three independent experiments for (C) and (D) are shown.

signaling. The pleckstrin homology (PH) domain of phospholipase C- $\delta 1$ (PLC- $\delta 1$) binds PtdIns(4,5)P₂ with high affinity (Watt et al., 2002) and has been used as a GFP-fused form to localize PtdIns(4,5)P₂ and to study the role of this phosphoinositide in cell adhesion (Downes et al., 2005; Martel et al., 2001; Tall et al., 2000). We expressed PH-PLC- $\delta 1$ -GFP (PH-GFP) in

Molt-4 cells, which was predominantly found in the cell membrane fraction, whereas control GFP was localized in the cytoplasm (Figure 5A). Interestingly, PH-GFP expression prevented Vav1-talin assembly and talin- $\beta 1$ binding promoted by CXCL12 (Figures 5B and 5C). Furthermore, PH-GFP transfectants showed a reduction in chemokine-upregulated attachment

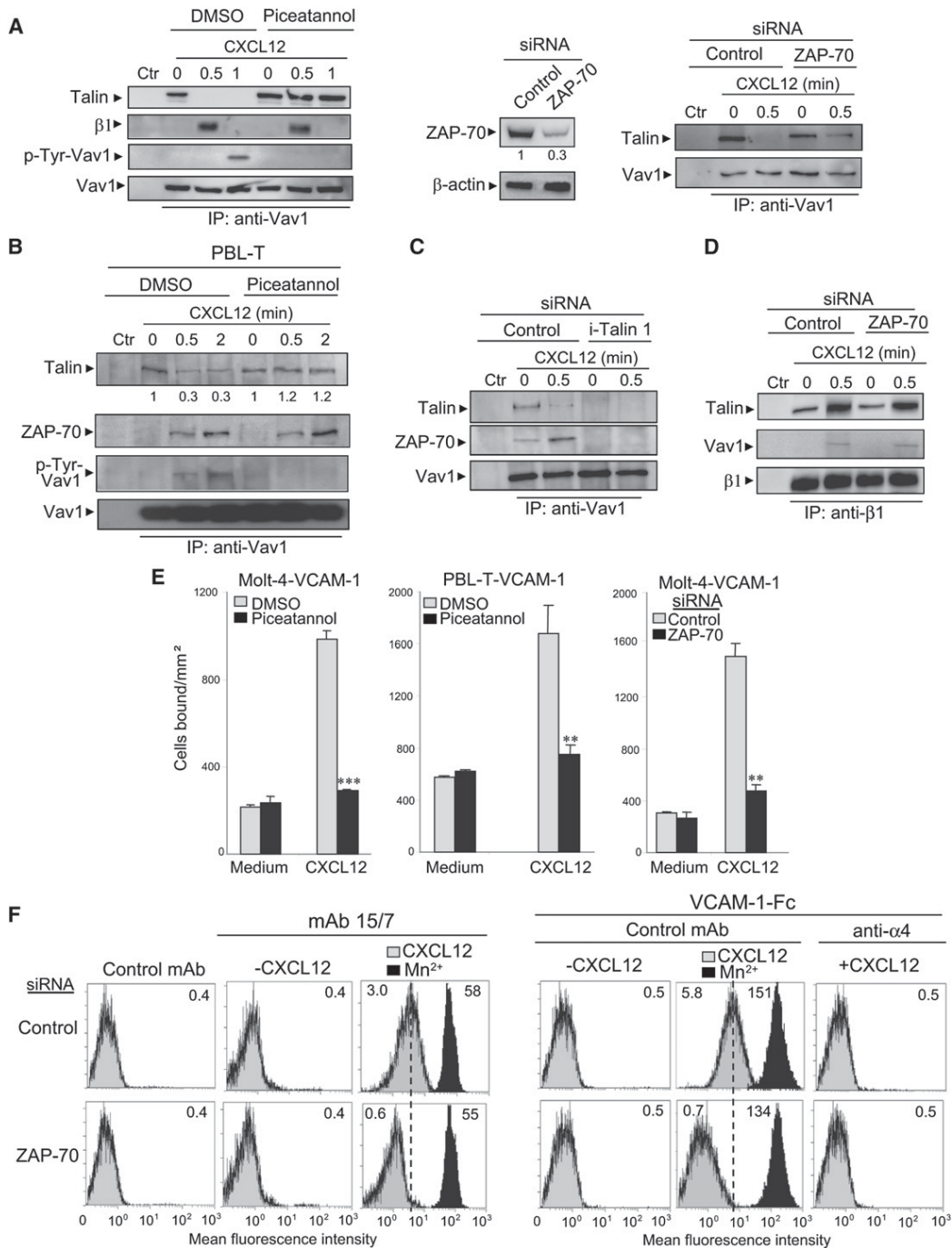


Figure 4. ZAP-70 Is Required for Chemokine-Promoted Vav1-Talin Dissociation and $\alpha 4 \beta 1$ -VCAM-1 Interaction

(A) Left: Molt-4 cells preincubated in piceatannol (25 μ M, 3 hr) or in carrier DMSO were exposed to CXCL12 and subjected to immunoprecipitation and immunoblotting. Lysates from cells transfected with ZAP-70 or control siRNA were analyzed by immunoblotting with anti-ZAP-70 (middle) or subjected to immunoprecipitation and immunoblotting (right).

(B) Piceatannol-treated cells were incubated with CXCL12 and subjected to immunoprecipitation and immunoblotting. Numbers below gels indicate values from densitometer analyses.

(C and D) Lysates from control, talin 1, or ZAP-70 siRNA transfectants were subjected to immunoprecipitation with Vav1 or $\beta 1$ mAbs, followed by immunoblotting.

(E) Cells preincubated in piceatannol or DMSO, or control or ZAP-70 siRNA transfectants were tested in adhesion assays to VCAM-1 immobilized with or without CXCL12. ***Adhesions were significantly inhibited, $p < 0.001$ or ** $p < 0.01$ ($n = 3$).

(F) Control or ZAP-70 siRNA transfectants were tested for 15/7 mAb (left) and VCAM-1-Fc (right) binding as stated in the legend for Figure 3.

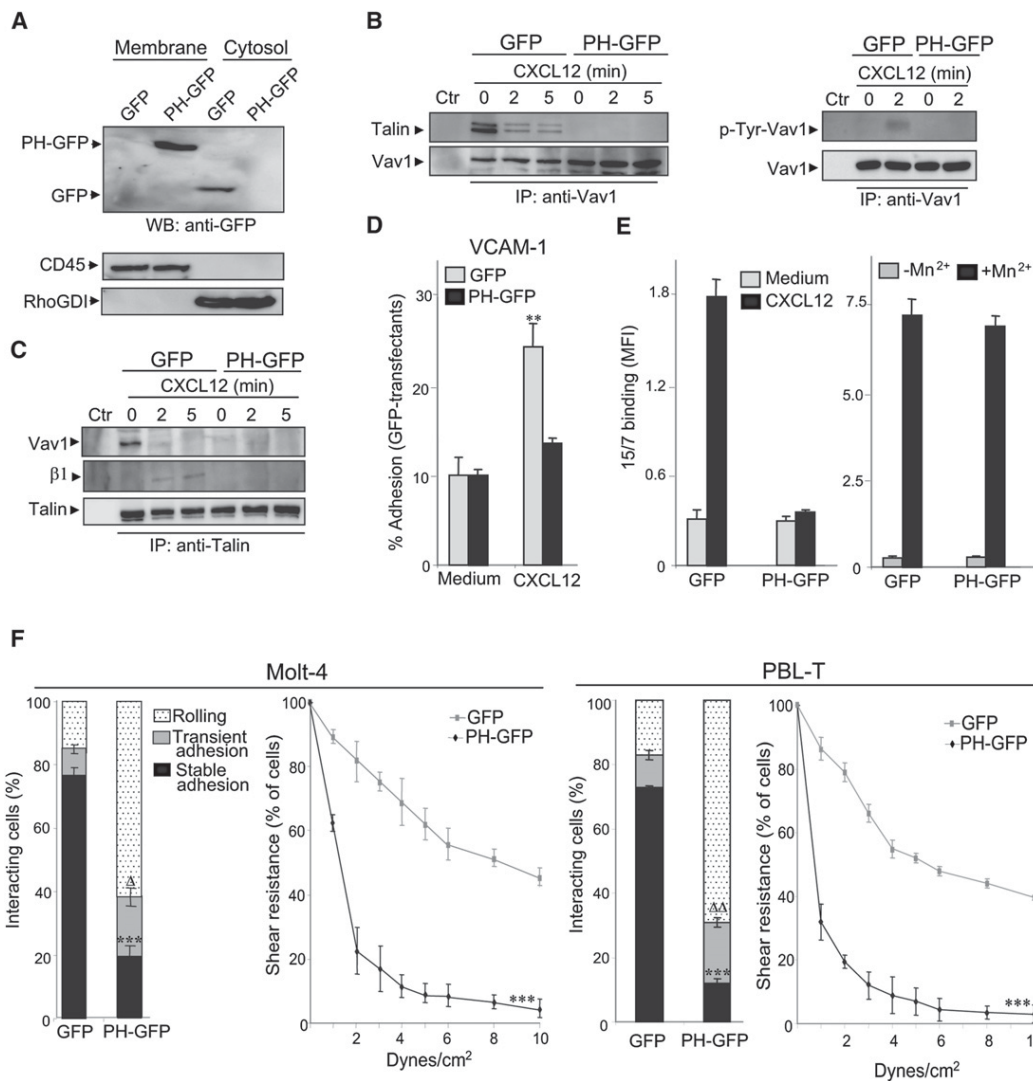


Figure 5. Associations between Vav1, Talin, and $\beta 1$, and Chemokine-Activated Cell Adhesion Mediated by $\alpha 4\beta 1$ Are Impaired by PtdIns(4,5)P₂-Sequestering Probes

(A) Molt-4 cells transfected with PH-PLC- $\delta 1$ -GFP (PH-GFP) or GFP vector alone were subjected to cell fractionation assays, and lysates were analyzed by immunoblotting with antibodies to GFP, CD45 (marker for membrane fraction), or RhoGDI (marker for cytosolic fraction).

(B and C) Same transfectants were tested by immunoprecipitation with anti-Vav1 or anti-talin and subsequent immunoblotting.

(D) Transfectants were tested in static adhesion assays to VCAM-1 immobilized with or without CXCL12. **Adhesions were significantly upregulated, $p < 0.01$.

(E) Transfectants were incubated with or without CXCL12 or Mn²⁺, followed by incubation with 15/7 or control mAb and analysis by flow cytometry. Data represent mean fluorescence intensity values from three independent experiments.

(F) Transfectants were perfused in flow chambers coated with VCAM-1 immobilized with CXCL12 and analyzed as in Figure 3. ***Adhesion was significantly inhibited compared to GFP transfectant attachment, $p < 0.001$. $\Delta\Delta$ Transient arrest was significantly increased compared to GFP transfectants, $p < 0.01$, or $\Delta p < 0.05$.

to VCAM-1 under static conditions (Figure 5D), and binding of 15/7 mAb was defective compared to control GFP counterparts, whereas both transfectants retained similar levels of Mn²⁺-triggered 15/7 mAb binding (Figure 5E). Control flow cytometry experiments indicated that expression of $\alpha 4$ and $\beta 1$ subunits in PH-GFP transfectants was similar to control GFP counterparts (not shown).

Adhesion assays under shear stress revealed that PH-GFP T cell transfectants had lower stable arrest associated with increased transient adhesion than did GFP transfectants and

showed higher detachment at increasing shear rates (Figure 5F). To assess whether integrin-independent cellular functions might be affected by PH-GFP expression, we subjected these transfectants to chemotaxis toward CXCL12 across bare filters. The results revealed that GFP and PH-GFP transfectants achieved comparable chemotaxis (Figure S4), indicating that PH-GFP expression is not exerting global inhibitory effects. Therefore, PH-GFP-dependent alteration of talin association with Vav1 and $\beta 1$ correlates with impairment in chemokine-stimulated T cell adhesion mediated by $\alpha 4\beta 1$, suggesting that PH-GFP

sequesters $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ required for formation of the signaling platform that is essential for adhesion.

Role of PIPKI γ 90 in CXCL12-Activated Cell Adhesion Mediated by α 4 β 1 and in Vav1-Talin- β 1 Association

Because $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ is synthesized by phosphatidylinositol phosphate kinases (Ling et al., 2006), from which the PIPKI γ 90 isoform binds to talin (Di Paolo et al., 2002; Ling et al., 2002), we analyzed whether overexpression of this kinase could restore the defective adhesion seen in PH-GFP transfectants. Molt-4 cells express endogenous PIPKI γ 90, which associates with talin (Figure 6A), but not with Vav1 (not shown). In addition, we found that extent of PIPKI γ 90-talin association was not substantially altered by CXCL12. Transfected PIPKI γ 90-GFP (KI γ 90-GFP) coprecipitated with talin again independently of CXCL12 action, whereas the mutant KI γ 90^{W647F}-GFP form showed large reduction in binding to talin (Figure 6B), as earlier reported with NIH 3T3 cells (Di Paolo et al., 2002). KI γ 90-GFP and KI γ 90^{W647F}-GFP transfectants had a similar degree of CXCL12-activated attachment to VCAM-1, without further activation relative to control GFP transfectants (Figures 6C and 6D), suggesting that PIPKI γ 90 endogenous activity was sufficient to stimulate adhesion of both KI γ 90-GFP and KI γ 90^{W647F}-GFP transfectants. However, KI γ 90-GFP, but not the mutant kinase form, was capable of recovering adhesion that was impaired by PH-GFP cotransfection (Figures 6C and 6D). Constitutive Vav1-talin association and its reduction by CXCL12, as well as stimulation of talin- β 1 binding, were not altered in KI γ 90-GFP or KI γ 90^{W647F}-GFP transfectants, but again only the former showed recovery of these dynamic associations that were abolished by PH-GFP expression (Figures 6E and 6F). Control experiments indicated dominant activity of KI γ 90-GFP over PH-GFP in CXCL12-stimulated adhesion to VCAM-1 (Figure S5), suggesting that KI γ 90-GFP is probably competing with PH-GFP locally rather than throughout the cell. Therefore, defective associations between Vav1, talin, and β 1 resulting from $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ sequestering by PH-GFP results in failure to activate cell attachment, but local recovery of phosphoinositide synthesis by talin-bound KI γ 90-GFP would allow correct molecular associations leading to rescue of adhesion.

A recent study showed that a RhoA-phospholipase D1 (PLD1)-PIPKI γ 90 signaling module regulates LFA-1 activity in human T lymphocytes (Bolomini-Vittori et al., 2009). Because PLD1-derived phosphatidic acid (PA) can regulate PIPKI γ 90 activity (Jarquin-Pardo et al., 2007), we studied whether PLD1 could also control chemokine-stimulated T cell adhesion mediated by α 4 β 1. We addressed this question by using n-butanol, a primary alcohol that scavenges PA produced after PLD1 activity (Brown et al., 2007). Although n-butanol blocked CXCL12-promoted, LFA-1-dependent Molt-4 adhesion to ICAM-1, in agreement with previous work (Bolomini-Vittori et al., 2009), it did not affect adhesion to VCAM-1 (Figure S6A). Control experiments showed that the inactive t-butanol did not alter stimulated adhesion to ICAM-1. In addition, binding of 15/7 mAb or VCAM-1-Fc to Molt-4 cells exposed to CXCL12 was not affected by n-butanol (Figure S6B). These results suggest that, contrary to LFA-1, stimulation by chemokines of α 4 β 1-dependent T cell adhesion does not require PLD1 activity.

Finally, CXCL12-stimulated T cell adhesion mediated by α 4 β 1 was not impaired by the PKC inhibitor Gö6850 at concentrations

up to 2 μM , whereas it blocked PMA-triggered adhesion (Figure S7A). We did not use higher amounts of Gö6850 because it might influence the activity of other kinases. Furthermore, Molt-4 transfectants overexpressing dominant-negative (DN) PKC α or θ isoforms (DN PKC α K368R or DN PKC θ K409R) (Baier-Bitterlich et al., 1996) attached to VCAM-1 at a similar degree compared to wild-type counterparts upon CXCL12 stimulation (Figure S7B), suggesting that PKC α or θ activity is not needed for chemokine-stimulated T cell adhesion mediated by α 4 β 1. A previous study reported that Gö6850 exerted partial inhibition of CXCL12-activated T cell adhesion to VCAM-1 at concentrations of Gö6850 of 10 μM (Ghandour et al., 2007). The differences in concentrations together with distinct experimental conditions including different time scales might account for the different results.

DISCUSSION

When T lymphocytes become exposed to chemokines, inside-out signals are generated that finally impinge on integrin cytoplasmic domains, leading to integrin activation and stimulation of cell adhesion (Ley et al., 2007). Vav1 is a key component of this signaling because it is required for α 4 β 1 integrin activation (Garcia-Bernal et al., 2005). Talin directly interacts with β subunit integrin cytoplasmic domains and regulates integrin activation (Tadokoro et al., 2003; Wegener et al., 2007), thereby representing a main candidate for transmission of chemokine signals. Indeed, earlier work (Manevich et al., 2007) and our present results demonstrate that talin is essential for chemokine-stimulated T lymphocyte adhesion mediated by α 4 β 1. Here we show that Vav1 and talin constitutively associate in human resting T lymphocytes and that they complex into an essential signaling platform. Thus, when chemokine-triggered signaling converges on this platform, Vav1 and talin gradually dissociate, representing a key event for activation of α 4 β 1-mediated cell adhesion, as shown in the model proposed in Figure S8. The importance of this platform is based on the fact that silencing Vav1 or talin, or expressing $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -sequestering probes, leads to failure to assemble the complex and to a subsequent blockade of CXCL12-stimulated T cell attachment to VCAM-1. The molecular properties of Vav1-talin association, whether a direct or indirect interaction takes place, have yet to be studied.

In addition to associate to Vav1, talin has a constitutive low level of binding to β 1, which requires Vav1 because it is absent in Vav1-silenced cells. Therefore, a Vav1-talin- β 1 complex is formed in nonstimulated T cells, although association between Vav1 and β 1 is probably weak and occasionally difficult to detect. Indeed, CXCL12 stimulates Vav1- β 1 association with similar kinetics as activation of talin- β 1 binding, suggesting that increased talin- β 1 association might approach and favor coprecipitation of Vav1 and β 1.

$\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ induces conformational changes on talin, leading to increased talin affinity for β 1 integrins (Martel et al., 2001). $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ is mainly synthesized by type I phosphatidylinositol phosphate kinases (Ling et al., 2006), from which PIPKI γ 90 is able to bind to talin, resulting in increased kinase activity (Di Paolo et al., 2002; Ling et al., 2002). We found that PIPKI γ 90 is expressed on T cells and that it associates with talin. Moreover, overexpressed PIPKI γ 90-GFP, but not the mutant

β 1-associated talin in nonstimulated T cells might function as the ground pool for promoting future tethers in a PtdIns(4,5)P₂-dependent manner. An important role for PIPKI γ 90 has also been recently proposed during chemokine-stimulated T cell adhesion mediated by LFA-1 (Bolomini-Vittori et al., 2009).

Increased talin- α 4 β 1 binding and Vav1 dissociation from talin in response to CXCL12 are required dynamic steps for stimulation of α 4 β 1 activation (Figures S8B and S8C). Upregulation of talin- β 1 binding needs preformed Vav1-talin complex, but it is independent of Vav1 dissociation from talin, suggesting that it occurs before Vav1-talin disassembly. The molecular events underlying CXCL12-stimulated talin- β 1 binding are not known but they might include a better access of the complex to PtdIns(4,5)P₂ resulting from chemokine actions. Stimulation by CXCL12 of talin binding to α 4 β 1 is critical but not sufficient to fully activate the integrin, because it requires ZAP-70-dependent subsequent dissociation of Vav1 from talin for further integrin activation, as detected with 15/7 anti- β 1 mAb, a reporter of α 4 β 1 activation. ZAP-70 is recruited and binds to Vav1 in preformed Vav1-talin complexes upon chemokine stimulation, as indicated by the fact that it does not occur in talin-silenced cells. A potential mediator of ZAP-70 recruitment is Lck, which is a target of CXCL12 signaling (Inngjerdigen et al., 2002) and tyrosine phosphorylates ZAP-70. Earlier work demonstrated that ZAP-70 is involved in Vav1 tyrosine phosphorylation in response to CXCL12 (Ottoson et al., 2001). Our results indicate that ZAP-70 binding to Vav1-talin complexes leads to Vav1 phosphorylation, which possibly weakens Vav1-talin association. Therefore, our data strongly suggest that chemokine-promoted, ZAP-70-dependent phosphorylation of Vav1 starts while associated with talin in the signaling platform. This conclusion is based on the following results. Talin silencing or PH-GFP expression blocks both formation of Vav1-talin complex and subsequent Vav1 phosphorylation. Furthermore, talin knock-down impairs Vav1-ZAP-70 binding, and inhibition of ZAP-70 activity abolishes chemokine-dependent Vav1 phosphorylation associated with blocking of Vav1-talin disassembly. Although this phosphorylation is difficult to detect at early time points in Molt-4 cells, results with PBL-T cells together with the above observations indeed indicate that phosphorylation occurs in Vav1-talin complexes, and thus, talin functions as a modulator of Vav1 tyrosine phosphorylation. Together, our data suggest that Vav1 functions as a constitutive repressive adaptor of talin that needs to be phosphorylated in order to be released from α 4 β 1-talin complexes and render talin available for additional β 1 integrin activation. It is noteworthy that the talin pool recently dissociated from Vav1 after chemokine-ZAP-70 signals may be involved in α 4 β 1 activation seconds after the first chemokine signal is transduced, and it could also contribute to strengthening of attachment at later times in the adhesion process. According to the present data, it is therefore unlikely that pre-existing α 4 β 1 high-affinity molecules, or clustered α 4 β 1 heterodimers after ligand binding that are engaged in outside-in signaling, could be associated to the Vav1-talin platform.

CXCL12-triggered phosphorylation of Vav1 is essential for Rac1 activation and progression of α 4 β 1-mediated T cell adhesion (Garcia-Bernal et al., 2005). An additional consequence of deficient Vav1 phosphorylation in talin-silenced cells was the impairment of Rac1 activation. The kinetics of Rac1 activation

in response to CXCL12 indicate that this is a late signaling event mediating stimulation of α 4 β 1-dependent cell adhesion strengthening, rather than involvement in α 4 β 1 activation (Figure S8C). Further adhesion strengthening might come from CXCL12-stimulated binding of vinculin to talin, which might be based on promotion of PtdIns(4,5)P₂-mediated opening of the head-tail vinculin interaction (Gilmore and Burridge, 1996) or talin rod stretching exposing buried vinculin-binding sites (del Rio et al., 2009).

Monocyte adhesion mediated by α 4 β 1 is also tightly controlled by chemokines (Chan et al., 2001). The Syk kinase is expressed in monocytes instead of ZAP-70, which is highly specific of T cells. Syk interacts with and tyrosine phosphorylates Vav proteins (Deckert et al., 1996), thus raising the possibility that a similar pathway of early chemokine-dependent activation of α 4 β 1 involving Syk-Vav1 might occur in monocytes. It is noteworthy that phospholipase C mediates α 4 β 1 activation in response to chemokines in monocytes (Hyduk et al., 2007). Thus, although ZAP-70 and Syk could have parallel roles in Vav activation, the involvement of PLC in α 4 β 1 activation may be restricted to monocytes.

Paxillin binds to the cytoplasmic domain of α 4 (Liu et al., 1999), modulating adhesion strengthening to α 4 β 1 ligands (Alon et al., 2005). However, recent data showed that paxillin is not involved in chemokine-stimulated adhesion mediated by α 4 β 1 (Manevich et al., 2007). Instead, Rap1 and kindlin-3 control chemokine-promoted T cell adhesion involving α 4 β 1 and LFA-1 (Moser et al., 2009; Shimonaka et al., 2003). It will be important to investigate potential structural and functional cross-talks between the Vav1-talin signaling platform and Rap1 and kindlin-3 in chemokine-triggered α 4 β 1-dependent adhesion. Because α 4 β 1 function is fundamental for T lymphocyte arrest on endothelium after chemokine stimulation at sites of inflammation (Luster et al., 2005), the present results should contribute to a better definition of the dynamic associations between components of the signaling machinery associated to α 4 β 1 activation.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cells and Antibodies

Human Molt-4 T cells and peripheral blood T lymphocytes were cultured and prepared as described (Garcia-Bernal et al., 2005). The Consejo Superior de Investigaciones Científicas Ethics Committee (Madrid, Spain) approved the protocols used to obtain and process the human samples. Control P3X63, α 4 HP1/2, β 1 TS2/16, and CD45 RP2/21 mAb were gifts from F. Sánchez-Madrid (Hospital de la Princesa, Madrid, Spain). Polyclonal β 1A antibodies and the β 1 mAb 15/7 were gifts from G. Tarone and R. Alon (Turin University, Italy; Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel, respectively), whereas PIPKI γ 90 antibodies were from P. De Camilli (Yale University, New Haven, CT). CXCR4 mAb was from R&D Systems (Minneapolis, MN); phosphotyrosine, Vav1, RhoGDI, and α 4 antibodies were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA); anti-Rac1 was from BD Biosciences PharMingen (San Diego, CA); anti-GFP was from Molecular Probes (Eugene, OR); and anti-vinculin and anti-talin clone 8D4 were from Sigma-Aldrich (St Louis, MO). Antibodies to ZAP-70 were from J.M. Rojo (Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid, Spain).

Transfections and RNA Interference

Vector coding for GFP-fused PH domain of PLC- δ 1 was from M.J. Rebecchi (State University of New York, NY), whereas PIPKI γ 90-GFP and PIPKI γ 90-W647F-GFP vectors were obtained from P. De Camilli. GFP-fused Vav1 wild-type and the mutant Vav1 Δ CH+Ac vectors were from X. Bustelo (Centro

Immunity

Vav1-Talin Dissociation Controls T Cell Adhesion

de Investigación del Cáncer, Salamanca, Spain). Three independent siRNA duplexes against human talin 1 were purchased from Ambion (Austin, TX). One of them strongly inhibited talin 1 expression and was labeled as i-talin 1 (interfering-talin 1); the other two showed little or no inhibition of talin 1 expression and they were presented as ni-talin 1 (noninterfering-talin 1) (see Figure 1C). ZAP-70 siRNA was purchased from Dharmacon (Lafayette, CO), and control and Vav1 siRNA (Vav1.3) were as reported (García-Bernal et al., 2005). Vectors and siRNA were nucleofected according to the described procedure (García-Bernal et al., 2005). Molt-4 or PBL-T siRNA transfectants were assayed 16 hr or 6 hr posttransfection, respectively.

Cell Adhesion and Soluble Binding Assays

For static cell adhesion to VCAM-1 alone or immobilized with CXCL12 (R&D Systems), we used the described method (García-Bernal et al., 2005). Extent of adhesion was quantified with a fluorescence analyzer (for siRNA transfectants) or by flow cytometry (GFP transfectants). For flow chamber adhesion assays, we followed the reported protocol (García-Bernal et al., 2006). In brief, transfectants were infused into flow chambers containing coimmobilized VCAM-1 and CXCL12. Rolling cells firmly attaching for at least 20 s were expressed as stable arrest, whereas cells attaching for a maximum of 5 s but resuming rolling were expressed as transient arrest. Otherwise, tethering cells that did not arrest at any moment were expressed as rolling cells. To evaluate shear resistance, cells were allowed to attach, followed by sequential increases of the flow. The number of cells remaining bound was determined as the percentage of total adhered cells after the adhesion step. For soluble binding, transfectants were stimulated for 45 s with CXCL12 or MnCl₂ before adding VCAM-1-Fc, which was detected by flow cytometry (García-Bernal et al., 2005). Before addition of the 15/7 mAb, cells were exposed to CXCL12 or MnCl₂ for 1 min.

Immunoprecipitation, Immunoblotting, Cell Fractionation, and GTPase Assays

For immunoprecipitation, Molt-4 (2×10^7) and PBL-T (5×10^7) cells were lysed with 1% digitonin as reported (Ticchioni et al., 2002). After preclearing with protein G-sepharose (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden), supernatants were incubated with antibodies, followed by coupling to protein G-sepharose beads. Proteins were resolved by SDS-PAGE and transferred to membranes that were sequentially incubated with primary antibodies and with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies. Proteins were visualized with SuperSignal chemiluminescent substrate (Pierce, Rockford, IL). For cell fractionation, cells (3×10^6) were incubated at 4°C with 100 μ l of hypotonic digitonin buffer, as described (Redondo-Munoz et al., 2006). In brief, cytosolic and membrane fractions were separated by centrifugation and the pellet was extracted with NP-40 lysis buffer whereas lysates were clarified by centrifugation. Protein detection was performed as above. For GTPase assays, we followed the method described (García-Bernal et al., 2005). In brief, cells exposed to CXCL12 were lysed and aliquots from extracts were separated for total lysate controls and for incubation with GST-PAK-CD fusion protein (Sander et al., 1998) and glutathione-agarose beads. Bound proteins were eluted and subjected to immunoblotting via Rac1 antibodies.

Statistical Analyses

Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey-Kramer multiple comparisons. In both analyses, the minimum acceptable level of significance was $p < 0.05$.

SUPPLEMENTAL DATA

Supplemental Data include eight figures and can be found with this article online at [http://www.cell.com/immunity/supplemental/S1074-7613\(09\)00499-3](http://www.cell.com/immunity/supplemental/S1074-7613(09)00499-3).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank J. Miguel Rodríguez-Frade for his initial help in flow adhesion experiments and P. Lastres for flow cytometry. We also thank A. García Pardo, Xosé Bustelo, and S. Ruiz for Vav1 reagents and helpful discussions. This work was supported by grant SAF2005-02119 and SAF2008-00479 from Ministerio de Ciencia e Innovación.

Received: May 4, 2009

Revised: August 31, 2009

Accepted: September 25, 2009

Published online: December 10, 2009

REFERENCES

- Alon, R., Feigelson, S.W., Manevich, E., Rose, D.M., Schmitz, J., Overby, D.R., Winter, E., Grabovsky, V., Shinder, V., Matthews, B.D., et al. (2005). Alpha4-beta1-dependent adhesion strengthening under mechanical strain is regulated by paxillin association with the alpha4-cytoplasmic domain. *J. Cell Biol.* *171*, 1073–1084.
- Baier-Bitterlich, G., Uberall, F., Bauer, B., Fresser, F., Wachter, H., Grunicke, H., Utermann, G., Altman, A., and Baier, G. (1996). Protein kinase C-theta isoenzyme selective stimulation of the transcription factor complex AP-1 in T lymphocytes. *Mol. Cell Biol.* *16*, 1842–1850.
- Barsukov, I.L., Prescott, A., Bate, N., Patel, B., Floyd, D.N., Bhanji, N., Bagshaw, C.R., Letinic, K., Di Paolo, G., De Camilli, P., et al. (2003). Phosphatidylinositol phosphate kinase type 1gamma and beta1-integrin cytoplasmic domain bind to the same region in the talin FERM domain. *J. Biol. Chem.* *278*, 31202–31209.
- Bolomini-Vittori, M., Montresor, A., Giagulli, C., Staunton, D., Rossi, B., Martinello, M., Constantin, G., and Laudanna, C. (2009). Regulation of conformer-specific activation of the integrin LFA-1 by a chemokine-triggered Rho signaling module. *Nat. Immunol.* *10*, 185–194.
- Brown, H.A., Henage, L.G., Preininger, A.M., Xiang, Y., and Exton, J.H. (2007). Biochemical analysis of phospholipase D. *Methods Enzymol.* *434*, 49–87.
- Bustelo, X.R. (2000). Regulatory and signaling properties of the Vav family. *Mol. Cell Biol.* *20*, 1461–1477.
- Calderwood, D.A. (2004). Integrin activation. *J. Cell Sci.* *117*, 657–666.
- Calderwood, D.A., Zent, R., Grant, R., Rees, D.J., Hynes, R.O., and Ginsberg, M.H. (1999). The Talin head domain binds to integrin beta subunit cytoplasmic tails and regulates integrin activation. *J. Biol. Chem.* *274*, 28071–28074.
- Campbell, I.D., and Ginsberg, M.H. (2004). The talin-tail interaction places integrin activation on FERM ground. *Trends Biochem. Sci.* *29*, 429–435.
- Campbell, D.J., Kim, C.H., and Butcher, E.C. (2003). Chemokines in the systemic organization of immunity. *Immunol. Rev.* *195*, 58–71.
- Carman, C.V., and Springer, T.A. (2003). Integrin avidity regulation: Are changes in affinity and conformation underemphasized? *Curr. Opin. Cell Biol.* *15*, 547–556.
- Chan, J.R., Hyduk, S.J., and Cybulsky, M.I. (2001). Chemoattractants induce a rapid and transient upregulation of monocyte alpha4 integrin affinity for vascular cell adhesion molecule 1 which mediates arrest: an early step in the process of emigration. *J. Exp. Med.* *193*, 1149–1158.
- Charo, I.F., and Ransohoff, R.M. (2006). The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N. Engl. J. Med.* *354*, 610–621.
- 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.
- del Rio, A., Perez-Jimenez, R., Liu, R., Roca-Cusachs, P., Fernandez, J.M., and Sheetz, M.P. (2009). Stretching single talin rod molecules activates vinculin binding. *Science* *323*, 638–641.
- Di Paolo, G., Pellegrini, L., Letinic, K., Cestra, G., Zoncu, R., Voronov, S., Chang, S., Guo, J., Wenk, M.R., and De Camilli, P. (2002). Recruitment and regulation of phosphatidylinositol phosphate kinase type 1 gamma by the FERM domain of talin. *Nature* *420*, 85–89.
- Downes, C.P., Gray, A., and Lucocq, J.M. (2005). Probing phosphoinositide functions in signaling and membrane trafficking. *Trends Cell Biol.* *15*, 259–268.
- Fischer, K.D., Kong, Y.Y., Nishina, H., Tedford, K., Marengere, L.E., Koziarzdzki, 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.
- García-Bernal, D., Sotillo-Mallo, E., Nombela-Arrieta, C., Samaniego, R., Fukui, Y., Stein, J.V., and Teixido, J. (2006). DOCK2 is required for

- chemokine-promoted human T lymphocyte adhesion under shear stress mediated by the integrin $\alpha 4\beta 1$. *J. Immunol.* **177**, 5215–5225.
- Garcia-Bernal, D., Wright, N., Sotillo-Mallo, E., Nombela-Arrieta, C., Stein, J.V., Bustelo, X.R., and Teixido, J. (2005). Vav1 and Rac control chemokine-promoted T lymphocyte adhesion mediated by the integrin $\{\alpha\}4\{\beta\}1$. *Mol. Biol. Cell* **16**, 3223–3235.
- Ghandour, H., Cullere, X., Alvarez, A., Luscinskas, F.W., and Mayadas, T.N. (2007). Essential role for Rap1 GTPase and its guanine exchange factor CalDAG-GEFI in LFA-1 but not VLA-4 integrin mediated human T-cell adhesion. *Blood* **110**, 3682–3690.
- Gilmore, A.P., and Burridge, K. (1996). Regulation of vinculin binding to talin and actin by phosphatidylinositol-4-5-bisphosphate. *Nature* **381**, 531–535.
- Goksoy, E., Ma, Y.Q., Wang, X., Kong, X., Perera, D., Plow, E.F., and Qin, J. (2008). Structural basis for the autoinhibition of talin in regulating integrin activation. *Mol. Cell* **31**, 124–133.
- Hyduk, S.J., Chan, J.R., Duffy, S.T., Chen, M., Peterson, M.D., Waddell, T.K., Digby, G.C., Szaszi, K., Kapus, A., and Cybulsky, M.I. (2007). Phospholipase C, calcium, and calmodulin are critical for $\alpha 4\beta 1$ integrin affinity up-regulation and monocyte arrest triggered by chemoattractants. *Blood* **109**, 176–184.
- Inngjerdingen, M., Torgersen, K.M., and Maghazachi, A.A. (2002). Lck is required for stromal cell-derived factor 1 α (CXCL12)-induced lymphoid cell chemotaxis. *Blood* **99**, 4318–4325.
- Jarquín-Pardo, M., Fitzpatrick, A., Galiano, F.J., First, E.A., and Davis, J.N. (2007). Phosphatidic acid regulates the affinity of the murine phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase- β for phosphatidylinositol-4-phosphate. *J. Cell. Biochem.* **100**, 112–128.
- Kim, M., Carman, C.V., and Springer, T.A. (2003). Bidirectional transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins. *Science* **301**, 1720–1725.
- Kinashi, T. (2005). Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 546–559.
- Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I., and Nourshargh, S. (2007). Getting to the site of inflammation: The leukocyte adhesion cascade updated. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 678–689.
- Ling, K., Doughman, R.L., Firestone, A.J., Bunce, M.W., and Anderson, R.A. (2002). Type I gamma phosphatidylinositol phosphate kinase targets and regulates focal adhesions. *Nature* **420**, 89–93.
- Ling, K., Schill, N.J., Wagoner, M.P., Sun, Y., and Anderson, R.A. (2006). Movin' on up: The role of PtdIns(4,5)P(2) in cell migration. *Trends Cell Biol.* **16**, 276–284.
- Liu, S., Thomas, S.M., Woodside, D.G., Rose, D.M., Kiosses, W.B., Pfaff, M., and Ginsberg, M.H. (1999). Binding of paxillin to $\alpha 4$ integrins modifies integrin-dependent biological responses. *Nature* **402**, 676–681.
- Lopez-Lago, M., Lee, H., Cruz, C., Movilla, N., and Bustelo, X.R. (2000). Tyrosine phosphorylation mediates both activation and downmodulation of the biological activity of Vav. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 1678–1691.
- Luster, A.D., Alon, R., and von Andrian, U.H. (2005). Immune cell migration in inflammation: Present and future therapeutic targets. *Nat. Immunol.* **6**, 1182–1190.
- Manevich, E., Grabovsky, V., Feigelson, S.W., and Alon, R. (2007). Talin 1 and paxillin facilitate distinct steps in rapid VLA-4-mediated adhesion strengthening to vascular cell adhesion molecule 1. *J. Biol. Chem.* **282**, 25338–25348.
- Martel, V., Racaud-Sultan, C., Dupe, S., Marie, C., Paulhe, F., Galmiche, A., Block, M.R., and Albiges-Rizo, C. (2001). Conformation, localization, and integrin binding of talin depend on its interaction with phosphoinositides. *J. Biol. Chem.* **276**, 21217–21227.
- Moser, M., Bauer, M., Schmid, S., Ruppert, R., Schmidt, S., Sixt, M., Wang, H.V., Sperandio, M., and Fassler, R. (2009). Kindlin-3 is required for $\beta 2$ integrin-mediated leukocyte adhesion to endothelial cells. *Nat. Med.* **15**, 300–305.
- Nayal, A., Webb, D.J., and Horwitz, A.F. (2004). Talin: An emerging focal point of adhesion dynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.* **16**, 94–98.
- Nieswandt, B., Moser, M., Pleines, I., Varga-Szabo, D., Monkley, S., Critchley, D., and Fassler, R. (2007). Loss of talin1 in platelets abrogates integrin activation, platelet aggregation, and thrombus formation in vitro and in vivo. *J. Exp. Med.* **204**, 3113–3118.
- Ottosen, N.C., Pribila, J.T., Chan, A.S., and Shimizu, Y. (2001). Cutting edge: T cell migration regulated by CXCR4 chemokine receptor signaling to ZAP-70 tyrosine kinase. *J. Immunol.* **167**, 1857–1861.
- Petrich, B.G., Marchese, P., Ruggeri, Z.M., Spiess, S., Weichert, R.A., Ye, F., Tiedt, R., Skoda, R.C., Monkley, S.J., Critchley, D.R., and Ginsberg, M.H. (2007). Talin is required for integrin-mediated platelet function in hemostasis and thrombosis. *J. Exp. Med.* **204**, 3103–3111.
- Redondo-Munoz, J., Escobar-Diaz, E., Samaniego, R., Terol, M.J., Garcia-Marco, J.A., and Garcia-Pardo, A. (2006). MMP-9 in B-cell chronic lymphocytic leukemia is up-regulated by $\alpha 4\beta 1$ integrin or CXCR4 engagement via distinct signaling pathways, localizes to podosomes, and is involved in cell invasion and migration. *Blood* **108**, 3143–3151.
- Rot, A., and von Andrian, U.H. (2004). Chemokines in innate and adaptive host defense: Basic chemokine grammar for immune cells. *Annu. Rev. Immunol.* **22**, 891–928.
- Sander, E.E., van Delft, S., ten Klooster, J.P., Reid, T., van der Kammen, R.A., Michiels, F., and Collard, J.G. (1998). Matrix-dependent Tiam1/Rac signaling in epithelial cells promotes either cell-cell adhesion or cell migration and is regulated by phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Cell Biol.* **143**, 1385–1398.
- Shimonaka, M., Katagiri, K., Nakayama, T., Fujita, N., Tsuruo, T., Yoshie, O., and Kinashi, T. (2003). Rap1 translates chemokine signals to integrin activation, cell polarization, and motility across vascular endothelium under flow. *J. Cell Biol.* **161**, 417–427.
- Tadokoro, S., Shattil, S.J., Eto, K., Tai, V., Liddington, R.C., de Pereda, J.M., Ginsberg, M.H., and Calderwood, D.A. (2003). Talin binding to integrin β tails: A final common step in integrin activation. *Science* **302**, 103–106.
- Tall, E.G., Spector, I., Pentylala, S.N., Bitter, I., and Rebecchi, M.J. (2000). Dynamics of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in actin-rich structures. *Curr. Biol.* **10**, 743–746.
- Ticchioni, M., Charvet, C., Noraz, N., Lamy, L., Steinberg, M., Bernard, A., and Deckert, M. (2002). Signaling through ZAP-70 is required for CXCL12-mediated T-cell transendothelial migration. *Blood* **99**, 3111–3118.
- Turner, M., and Billadeau, D.D. (2002). VAV proteins as signal integrators for multi-subunit immune-recognition receptors. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 476–486.
- Tybulewicz, V.L. (2005). Vav-family proteins in T-cell signalling. *Curr. Opin. Immunol.* **17**, 267–274.
- Watt, S.A., Kular, G., Fleming, I.N., Downes, C.P., and Lucocq, J.M. (2002). Subcellular localization of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate using the pleckstrin homology domain of phospholipase C $\delta 1$. *Biochem. J.* **363**, 657–666.
- Wegener, K.L., Partridge, A.W., Han, J., Pickford, A.R., Liddington, R.C., Ginsberg, M.H., and Campbell, I.D. (2007). Structural basis of integrin activation by talin. *Cell* **128**, 171–182.
- Yednock, T.A., Cannon, C., Vandevort, C., Goldbach, E.G., Shaw, G., Ellis, D.K., Liaw, C., Fritz, L.C., and Tanner, L.I. (1995). $\alpha 4 \beta 1$ integrin-dependent cell adhesion is regulated by a low affinity receptor pool that is conformationally responsive to ligand. *J. Biol. Chem.* **270**, 28740–28750.

Anexos II

Vav1-interacting molecules as positive or negative regulators of chemokine-stimulated T lymphocyte adhesion mediated by integrin $\alpha 4\beta 1$

Running title: Vav1-binding molecules regulate integrin-mediated T cell adhesion

Ana Dios-Esponera^{*‡}, Soledad Isern de Val^{*‡}, Rosa García-Verdugo^{*}, David García-Bernal^{*}, Nohemí Arellano-Sánchez^{*}, Carlos Cabañas[†], and Joaquin Teixidó^{*}

From: ^{*}Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Department of Cellular and Molecular Medicine, 28040 Madrid, Spain; [†]Centro de Biología Molecular, Department of Cell Biology and Immunology, Cantoblanco, Madrid, Spain

[‡]These authors equally contributed to this work

Present addresses:

Rosa García-Verdugo: Max Planck Institute for Neurobiology. Martinsried (Germany)
David García-Bernal: Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca. Murcia (Spain)

Corresponding author: Joaquin Teixidó. Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Department of Cellular and Molecular Medicine. Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain.

Phone 34-91-8373112; Fax 34-91-5360432; e-mail: joaquin@cib.csic.es

INTRODUCTION

Trafficking of T lymphocytes from lymph and blood circulation into lymphoid tissues and sites of inflammation depend on rapid and transient activation of $\alpha4\beta1$ and $\alphaL\beta2$ integrin function by chemokines presented on the endothelium and located inside tissues (1-4). The inside-out signalling from chemokine receptors to the cytoplasmic domains of these integrins generates high-affinity extracellular integrin conformations that are competent for ligand binding, thus initiating the step-wise process of cell adhesion. Several key molecules and pathways that are required for the inside-out signalling leading to integrin activation in response to chemokines in T lymphocytes are talin and kindlin-3, that bind directly to cytoplasmic motifs on the β subunits, and the Vav1-Rac1 and RAPL-Rap1 pathways, which transmit signals ultimately influencing the affinity and the avidity of these integrins (5-8).

Vav1 is a multidomain adaptor protein that binds several key molecules involved in T lymphocyte activation, and that functions as a guanine-nucleotide exchange factor (GEF) predominantly for Rac (9-11). Vav1 is needed for the stimulation of $\alpha4\beta1$ integrin function in T cells following binding of the chemokine CXCL12 to its receptor CXCR4 (12, 13). Thus, chemokine-induced, ZAP-70-dependent Vav1 tyrosine phosphorylation and dissociation from talin represents a key signaling event involved in $\alpha4\beta1$ activation and in adhesion strengthening mediated by this integrin (14).

In addition to associate with talin and ZAP-70, Vav1 binds to SLP-76 and Pyk2 (15-18). SLP-76 is an adaptor molecule that is essential for T cell activation and actin reorganization following TCR stimulation (19). ZAP-70-mediated phosphorylation of SLP-76 on N-terminal tyrosine residues allows its binding to the SH2 domain of Vav1

(15, 16, 20), whereas the C-terminal SH2 domain of SLP-76 interacts with several tyrosines on ADAP (21, 22), a key molecule that regulates T cell activation (23). SLP-76 mediates integrin activation in response to TCR stimulation, as α L β 2 activation and adhesion mediated by this integrin upon TCR stimulation is inhibited in cells deficient for SLP-76 (24, 25). CXCL12 promotes ZAP-70-dependent tyrosine phosphorylation of SLP-76 in T cells (26, 27), and it stimulates SLP-76 microclustering to enhance T cell responses (28). While lack of SLP-76 has been shown not to affect CXCL12-upregulated static T cell adhesion to ICAM-1 mediated by α L β 2 (25), a recent report revealed that SLP-76 is required for optimal T lymphocyte firm arrest on ICAM-1 under flow conditions (29).

There are two ADAP isoforms (120 kD and 130 kD) that preferentially locate in the cytoplasm and nucleus of T cells (30-32). Tyrosine phosphorylation of ADAP by Fyn leads to ADAP binding to the SH2 domain of SLP-76 (30, 31). ADAP binds SKAP-55 and Ena/VASP proteins, linking its adaptor function to integrin-dependent cell adhesion and actin reorganization (33, 34). Importantly, ADAP is required for TCR-stimulated cell adhesion mediated by β 1 and β 2 integrins (35, 36), and the ADAP-SKAP-55 signalling module has been shown to regulate integrin-mediated adhesion following TCR activation (37-39).

Pyk2 is a non-receptor tyrosine kinase that is homologous to FAK (40-42), and which is activated following TCR stimulation and cell exposure to chemoattractants (43-49). There are several Pyk2 isoforms expressed in distinct tissues. A 110 kD form is preferentially expressed in neuronal cells, whereas a 105 kD form lacking 42 amino acids located in between proline-rich sequences inside the C-terminal domain is specifically expressed by hematopoietic cells, including T and B cells and monocytes (40-42, 50). A third isoform called PRNK (Pyk2-related non-kinase) only contains 238

amino acids from the C-terminus and lacks the catalytic and N-terminal regions (51, 52) (53). A Tyr402 residue is a target of Pyk2 autophosphorylation, which in turns recruits and activates Src kinases, leading to Src-dependent phosphorylation of several tyrosine residues on Pyk2 (43, 52, 54). Early data showed that Pyk2 is capable of associating with Vav1 in T and NK cells (17, 49), and that CXCL12 further induces this association (18). More recently, it was shown that Pro717 on Pyk2 mediates direct binding to Vav1 (55).

Given the key role of Vav1 during stimulation by chemokines of $\alpha 4\beta 1$ -dependent T cell adhesion, here we have studied the potential involvement in this process of the Vav1-binding partners SLP-76 and Pyk2, as well as of the SLP-76-interactor molecule ADAP. The results reveal a positive regulation by SLP-76-ADAP in chemokine-activated T cell adhesion mediated by this integrin, whereas Pyk2 displays a repressor role.

MATERIALS AND METHODS

Cells, antibodies and reagents. The human Molt-4 and Jurkat T cell lines were cultured in RPMI 1640 medium (Lonza, Verviers, Belgium) and 10% fetal bovine serum (Gibco, Paisley, UK) (complete medium). The Jurkat-derived cell lines JCaM1.6 (American Type Culture Collection) and J14 (a gift from Dr. Arthur Weiss, University of California, San Francisco, USA), were grown in complete medium. Peripheral blood T lymphocytes (PBL-T) were prepared as described (12). The Consejo Superior de Investigaciones Científicas Ethics Committee (Madrid, Spain) approved the protocols used to obtain and process the human blood samples. Control P3X63, anti-CD45 RP2/21 mAb and anti- β 1 TS2/16 mAb were gifts from Dr. Francisco Sánchez-Madrid (Hospital de la Princesa, Madrid, Spain), and polyclonal anti- β 1A antibodies were from Dr. Guido Tarone (Turin University, Italy). Antibodies to SLP-76, Vav1, phosphotyrosine and RhoGDI were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), anti-Rac1 and anti-ADAP were from BD Biosciences (San Diego, CA) and anti-GFP from Molecular Probes (Eugene, OR). Antibodies to β -actin, vinculin and talin clone 8D4 were from Sigma-Aldrich (St Louis, MO), anti-pErk1/2, Erk1/2, pAkt and Akt antibodies were from Cell Signaling Technology (Danvers, MA) and antibody to Pyk2 was from Millipore (Billerica, MA). The HUTS-21 anti- β 1 mAb has been previously characterized, and antibody to ZAP-70 was from Dr. José María Rojo (Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid). CXCL12 was purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN) and CCL21 from Peprotech (Rocky Hill, NJ).

Transfections and RNA interference. Vectors coding for Rac *wild type* (wt), Rac V12 and Rac N17 fused with GFP have been already reported (56). The vector pRK5-myc-PRNK (53) was a gift from Dr. Ivan Dikic (Goethe University School of Medicine,

Frankfurt, Germany). Small interfering RNA (siRNA) against human SLP-76 (On-target plus, smart-pool) was purchased from Dharmacon (Lafayette, CO). siRNA for ADAP, sense: GAGAUUUCAAGUUUGCCCUtt, for Pyk2, sense: GAUGUGGUCCUGAAUCGUAtt, and control siRNA (12), were purchased from Sigma-Aldrich. Vectors and siRNA were nucleofected (Amaxa, Cologne, Germany) following the described procedure (12). Molt-4 or PBL-T siRNA transfectants were assayed 22-24 h post-transfection, and transfection did not affect cell viability, as assessed in flow cytometry cell cycle analyses.

Cell adhesion, chemotaxis and spreading assays. For static adhesions, cells were plated on wells coated with the fibronectin fragment FN-H89, which contains the CS-1 region, or with VCAM-1 together with CXCL12 or CCL21 (650 ng/ml), and plates were incubated and adhesion measured as reported (12). For flow chamber adhesion assays, we followed the reported protocol (13). In brief, cells were infused at a flow rate of 1 dyne/cm² into flow chambers containing coimmobilized VCAM-1 and CXCL12. Rolling cells that subsequently firmly attached were expressed as stable arrest, whereas tethering cells that did not arrest at any moment were expressed as rolling cells. To evaluate shear resistance, cells were allowed to attach, and then were subjected to sequential increases of the flow rate. The number of cells remaining bound was determined as the percentage of total adhered cells after the adhesion step. For chemotaxis assays we used the reported procedure (57), counting the migrated cells were in a flow cytometer (Coulter Epics XL). For cellular spreading, CXCL12-stimulated cells attached on VCAM-1 were fixed and analyzed as previously described (13).

Soluble binding VCAM-1, flow cytometry and F-actin polymerization mobilization assays. For cell binding to VCAM-1-Fc (R&D Systems), cells were stimulated for 45 sec

with CXCL12 before adding VCAM-1-Fc, which was detected by flow cytometry using phycoerythrin-conjugated AffiniPure F(ab')₂ fragment goat anti-human IgG, Fcγ₁ fragment specific (Jackson ImmunoResearch Lab., West Grove, PA). For the detection of high-affinity β₁, cells were stimulated for 45 sec with CXCL12 before adding the HUTS-21 anti-β₁ mAb (10 μg/ml) for 30 min at 4°C. After washing, cells were incubated with FITC-conjugated rabbit anti-mouse IgG (Jackson Immunoresearch Lab.). Cellular F-actin content was measured by flow cytometry following described protocols (57).

Immunoprecipitation, immunoblotting cell fractionation and GTPase assays. For immunoprecipitation, upon cell lysis in buffers containing 1% digitonin and posterior pre-clearing with protein G-sepharose beads (GE Healthcare BioScience AB, Uppsala, Sweden), supernatants were incubated with antibodies followed by coupling to protein G-sepharose. Proteins were separated by SDS-PAGE, transferred to membranes which were sequentially incubated with primary antibodies and with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies. Protein visualization was achieved using Immobilon Western chemiluminescent substrate (Millipore, Billerica, MA). For cell fractionation, we followed the described method (58). Briefly, following cell exposure to digitonin and centrifugation, pellet (membrane fraction) was extracted with NP-40 lysis buffer, whereas supernatants (cytosolic fraction) were clarified by centrifugation. Protein detection was performed as above. For GTPase assays we used the reported method (12). Briefly, cells exposed to CXCL12 were lysed, and aliquots from extracts separated for total lysate controls and for incubation with GST-PAK-CD fusion protein, followed by incubation with glutathione-sepharose beads (GE Healthcare). Bound proteins were eluted and subjected to immunoblotting using anti-Rac1 antibodies.

Statistical analyses. Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey-Kramer multiple comparisons. In both analyses, the minimum acceptable level of significance was $p < 0.05$.

RESULTS

Differential regulation by SLP-76, ADAP and Pyk2 of chemokine-activated T cell adhesion mediated by $\alpha 4\beta 1$. Immunoprecipitation analyses revealed that CXCL12 promotes a rapid and transient increase in the association of SLP-76 with Vav1 and ADAP in Molt-4 T cells (Fig. 1A, left and right). In addition, SLP-76 assembled with ZAP-70 and talin, and CXCL12 also transiently upregulated these associations, though with slower kinetics than SLP-76 assembly with Vav1 and ADAP (Fig. 1A, left). No $\beta 1$ integrin subunit was found in anti-SLP-76 immunoprecipitates (not shown). Cell fractionation experiments showed that SLP-76 was mainly found on the membrane-associated fraction and its localization was not altered by cell exposure to CXCL12 (Fig. 1B). Instead, ADAP displayed mostly a cytosolic localization in non-stimulated cells, but it was rapidly and transiently recruited to the membrane fraction following incubation with CXCL12, coincident with the stimulation by this chemokine of SLP-76-ADAP association.

To study the role of SLP-76 and ADAP in chemokine-stimulated T cell adhesion involving $\alpha 4\beta 1$, we knocked down these proteins by RNA interference in Molt-4 and PBL-T cells (Fig. 1C). ADAP depletion did not affect Vav1-SLP-76 association in non-stimulated cells ($t=0$), but it inhibited the increase in the assembly of these proteins in CXCL12-incubated cells (Fig. 1D, top). However, knocking down SLP-76 led to lack of Vav1-ADAP complex formation (Fig. 1D, bottom), stressing the induction by CXCL12 of Vav1-SLP-76-ADAP assembly. Control experiments indicated that SLP-76 and ADAP depletion did not affect cell viability or the expression of CXCR4, $\alpha 4$ or $\beta 1$ (not shown). Static adhesion assays to the $\alpha 4\beta 1$ ligands FN-H89 (CS-1/FN) and VCAM-1 revealed that SLP-76-depleted Molt-4 and PBL-T cells had a modest decrease in

adhesion to FN-H89, and just a tendency to adhere less to VCAM-1 compared to cells transfected with control siRNA (Fig. 1E). ADAP depletion generally led to a stronger inhibition of $\alpha 4\beta 1$ -dependent cell adhesion compared to SLP-76 knocking down. Similarly to Molt-4 cells, CXCL12-stimulated, SLP-76-deficient Jurkat J14 cells had similar adhesiveness to VCAM-1 than parental Jurkat cells, whereas chemokine-promoted adhesion of Lck-deficient Jurkat JCaM1.6 cells to this ligand was fully abrogated (Fig. 1F), consistent with previous data (59).

Previous data showed that the kinase Pyk2 binds to the SH3 domain of Vav1 in Jurkat T cells (17). Likewise, Vav1 was found to associate with Pyk2 in Molt-4 cells, and CXCL12 triggered a small and transient increase in Vav1-Pyk2 assembly (Fig. 2A, left and middle). SLP-76 was also detected in anti-Pyk2 immunoprecipitates, and the degree of Pyk2-SLP-76 association did not significantly changed upon incubation with CXCL12. In addition, Vav1-Pyk2 association did not depend on SLP-76 (Fig. 2A, right) or ADAP (not shown), as this complex was similarly detected in control, SLP-76 or ADAP siRNA transfectants. Interestingly, antibodies to talin, an additional Vav1 binding partner (14, 60), co-precipitated Pyk2 in addition to Vav1 both in Molt-4 and PBL-T cells (Fig. 2B). To assess the specificity of talin-Pyk2 assembly, as well as to analyze the potential Pyk2 involvement in $\alpha 4\beta 1$ -dependent T cell adhesion, we knocked down Pyk2 in both cell types, observing a clear reduction in Pyk2 expression following 24 h of transfection (Fig. 2C, top). Notably, talin-Pyk2 association was greatly diminished in Pyk2 knockdown cells, both with or without cell stimulation with CXCL12 (Fig. 2C, bottom), confirming the specificity of talin-Pyk2 assembly.

Remarkably, Pyk2 depletion resulted in a significant increase in chemokine-stimulated Molt-4 and PBL-T cell adhesion to FN-H89 and VCAM-1 compared to control siRNA transfectants (Fig. 2D). Stressing the regulatory role of Pyk2 in cell

adhesion involving $\alpha 4\beta 1$, overexpression of PRNK, a dominant-negative Pyk2 C-terminal region isoform that lacks the kinase domain (51), led to a detectable increase in $\alpha 4\beta 1$ -dependent adhesion of unstimulated T cells, which achieved a larger enhancement in the presence of CXCL12 (Fig. 2E). Pyk2 knocking down did not alter the association between Vav1 and talin, a complex needed during the first steps of $\alpha 4\beta 1$ -mediated T cell adhesion (14), or between Vav1 and SLP-76 (Fig. 2F). Furthermore, Pyk2-deficient cells displayed an inhibition of Erk1/2 MAP kinase activation following short exposure (up to 5 min) to CXCL12 (Fig. 2G). Instead, Akt activation in response to the chemokine was not affected in these transfectants, though they showed a slight decrease in basal Akt activation compared to control siRNA transfectants.

Next, we performed adhesion assays under flow conditions using SLP-76-, ADAP- and Pyk2-depleted T cells. For this, we first quantified the cells that were able to rapidly (less than 20 sec) and stably adhere under shear stress to VCAM-1 co-immobilized with CXCL12. Results revealed that Molt-4 cells knockdown for SLP-76 or ADAP that tethered on VCAM-1/CXCL12 have a moderate though significant decrease in stable cell arrest associated with enhanced transient adhesion compared with control siRNA transfectants (Fig. 3A). The decrease in cell arrest was more evident when we used PBL-T transfectants, which predominantly displayed a rolling phenotype. Confirming the involvement of SLP-76, flow chamber adhesion assays using J14 cells revealed a reduction in stable cell arrest on VCAM-1/CXCL12 in comparison to parental Jurkat cells (Fig. 3A). Control experiments indicated that adhesion was abolished by cell pre-treatment with pertussis toxin (not shown).

The decrease in $\alpha 4\beta 1$ -mediated T cell adhesion upon SLP-76 or ADAP depletion could arise from early impairment in adopting integrin high-affinity conformations upon chemokine stimulation, or from subsequent defective adhesion

strengthening and/or cell spreading. We used HUTS-21, a mAb that recognizes a $\beta 1$ integrin activation epitope (61), to analyze whether knock down of these proteins affects the generation of high-affinity $\alpha 4\beta 1$. In addition, we used VCAM-1-Fc in soluble binding assays as a probe to determine efficiency of first steps of $\alpha 4\beta 1$ -VCAM-1 interaction in the absence of cell spreading. Flow cytometry experiments with chemokine-incubated SLP-76- or ADAP-depleted transfectants showed no significant alterations in HUTS-21 binding compared to control siRNA transfectants (Fig. 3B). Furthermore, VCAM-1-Fc soluble binding to these transfectants after a short (20 sec) exposure to CXCL12 did not reveal differences in binding relative to control transfectants (Fig. 3C), even after long incubation times with VCAM-1-Fc (not shown).

Contrary to SLP-76 or ADAP silencing, Pyk2-depleted T cells showed stronger cell arrest on VCAM-1/CXCL12 under flow conditions than control siRNA transfectants (Fig. 3D). While Pyk2 knockdown transfectants displayed no significant alterations in HUTS mAb binding (Fig. 3E, left), or in the dynamics of talin- $\beta 1$ association in response to CXCL12 (Fig. 3E, right), an additional measure of integrin activation, they showed higher VCAM-1-Fc binding at incubation times between 2 and 4 min than control counterparts (Fig. 3F). Control experiments showed that all siRNA transfectants retained similar degrees of HUTS-21 mAb or VCAM-1-Fc binding upon exposure to Mn^{2+} (Figs. 3B, C, E, F), a positive control for integrin affinity regulation. These results strongly suggest that chemokine-stimulated early acquisition of high-affinity $\alpha 4\beta 1$ conformations that are competent for ligand binding does not require SLP-76, ADAP or Pyk2 function, but Pyk2 regulates the avidity of $\alpha 4\beta 1$ for VCAM-1.

To analyze the strength of adhesion of transfectants depleted for SLP-76, ADAP or Pyk2, we subjected attached cells in flow chambers to detachment at sequential

increases of shear stress. ADAP-depleted Molt-4 and PBL-T cells displayed lower resistance rates to detachment than control siRNA transfectants (Fig. 4A). Depletion of SLP-76 in PBL-T and J14 cells caused a modest reduction in their resistance to detachment compared to control transfectants, whereas no gross alterations in resistance were detected in SLP-76-knockdown Molt-4 transfectants (Fig. 4A, B). Instead, Pyk2-silenced PBL-T and Molt-4 cells developed significantly higher resistance rates to detachment at increased shear stress than control siRNA transfectants (Fig. 4C). In the adhesion process, cells spread on their ligands after the strengthening of the adhesion. ADAP-knockdown transfectants, and to a lesser extent SLP-76-depleted cells, had defective spreading on VCAM-1/CXCL12 (Fig. 4D). On the contrary, Pyk2 knockdown cells displayed substantially higher spreading than control siRNA transfectants (Fig. 4D). These results indicate that ADAP and Pyk2 regulate the chemokine-stimulated T cell adhesion strengthening and spreading steps mediated by $\alpha 4\beta 1$, whereas SLP-76 modulates the spreading phase of the adhesion, with minor roles in adhesion strengthening.

In chemokine-stimulated cells, the strength of $\alpha 4\beta 1$ -mediated T cell adhesion and the spreading process involves Vav1-dependent activation of Rac1 (12), a GTPase that controls cell migration linked to reorganization of the actin cytoskeleton (62). To first test if SLP-76 and ADAP could regulate Rac1 activation following stimulation with CXCL12, we carried out GTPase assays with Molt-4 cells depleted for these proteins. SLP-76 and ADAP silencing led to defective Rac1 activation in response to CXCL12 (Fig. 5A, left; 5B). In the case of SLP-76-deficient cells, impaired Rac1 activation correlated with inhibition of Vav1 tyrosine phosphorylation and Vav1-ZAP-70 assembly promoted by the chemokine (Fig. 5A, right). Moreover, these observations were associated with impairment in CXCL12-stimulated F-actin polymerization in SLP-

76- and ADAP-knockdown cells (Fig. 5C). On the contrary, Pyk2 depletion resulted in higher Rac1 activation and F-actin polymerization than control transfectants (Fig. 5D, E).

As the above results indicate that CXCL12-stimulated strengthening of adhesion to VCAM-1 and Rac1 activation are regulated by ADAP and Pyk2, we studied whether Rac1 mediated the signalling involving these two proteins that led to the control of this adhesion. To address this question, we transfected constitutively active or dominant negative forms of Rac1 (Rac V12 or Rac DN, respectively) together with ADAP or Pyk2 siRNA, and tested the transfectants in adhesion assays to VCAM-1 co-immobilized with CXCL12. The results revealed that the reduced stimulation of adhesion shown by ADAP-depleted cells relative to control transfectants was rescued to control levels by Rac V12 co-transfection with ADAP siRNA (Fig. 6A). On the other hand, the upregulated adhesion to VCAM-1 displayed by Pyk2-knockdown transfectants was lowered by Rac DN co-transfection with Pyk2 siRNA (Fig. 6B). These results reveal that the alterations in Rac1 activation following ADAP or Pyk2 knock down represent an important mechanism involved in the reduced or increased cell adhesion mediated by $\alpha4\beta1$ upon stimulation with CXCL12.

Therefore, the data indicate that Rac1 is a common mediator of ADAP and Pyk2 signalling in chemokine-stimulated, $\alpha4\beta1$ -dependent T cell adhesion, and thus we next tested the effect of their combined depletion on CXCL12-upregulated cell adhesion to VCAM-1 and on Rac1 activation. The adhesion results showed that the impaired stimulation of adhesion displayed by ADAP-deficient cells was recovered to the levels of control siRNA transfectants in cells transfected with both ADAP and Pyk2 siRNA, although these double transfectants did not reach the adhesion values exhibited by cells transfected with Pyk2 siRNA alone (Fig. 6C). Notably, the recovery in adhesion shown

by cells knock down for both proteins correlated with their longer sustained Rac1 activation by CXCL12 (Fig. 6D). These results strongly suggest the existence of competition between the stimulatory actions of ADAP and the inhibitory activity of Pyk2 targeting Rac1 in CXCL12-activated adhesion mediated by $\alpha4\beta1$.

REFERENCES

1. Moser, B., M. Wolf, A. Walz, and P. Loetscher. 2004. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol* 25: 75-84.
2. Luster, A. D., R. Alon, and U. H. von Andrian. 2005. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat Immunol* 6: 1182-1190.
3. Kinashi, T. 2005. Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes. *Nat Rev Immunol* 5: 546-559.
4. Ley, K., C. Laudanna, M. I. Cybulsky, and S. Nourshargh. 2007. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 7: 678-689.
5. Alon, R., and S. W. Feigelson. 2012. Chemokine-triggered leukocyte arrest: force-regulated bi-directional integrin activation in quantal adhesive contacts. *Curr Opin Cell Biol* 24: 670-676.
6. Moser, M., K. R. Legate, R. Zent, and R. Fassler. 2009. The tail of integrins, talin, and kindlins. *Science* 324: 895-899.
7. Calderwood, D. A., I. D. Campbell, and D. R. Critchley. 2013. Talins and kindlins: partners in integrin-mediated adhesion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14: 503-517.
8. Kim, C., F. Ye, and M. H. Ginsberg. 2011. Regulation of integrin activation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 27: 321-345.
9. Bustelo, X. R. 2000. Regulatory and signaling properties of the Vav family. *Mol Cell Biol* 20: 1461-1477.
10. Turner, M., and D. D. Billadeau. 2002. VAV proteins as signal integrators for multi-subunit immune-recognition receptors. *Nat Rev Immunol* 2: 476-486.
11. Tybulewicz, V. L. 2005. Vav-family proteins in T-cell signalling. *Curr Opin Immunol* 17: 267-274.
12. Garcia-Bernal, D., N. Wright, E. Sotillo-Mallo, C. Nombela-Arrieta, J. V. Stein, X. R. Bustelo, and J. Teixido. 2005. Vav1 and Rac Control Chemokine-promoted T Lymphocyte Adhesion Mediated by the Integrin $\alpha_4\beta_1$. *Mol Biol Cell* 16: 3223-3235.
13. Garcia-Bernal, D., E. Sotillo-Mallo, C. Nombela-Arrieta, R. Samaniego, Y. Fukui, J. V. Stein, and J. Teixido. 2006. DOCK2 is required for chemokine-promoted human T lymphocyte adhesion under shear stress mediated by the integrin $\alpha_4\beta_1$. *J Immunol* 177: 5215-5225.
14. Garcia-Bernal, D., M. Parmo-Cabanas, A. Dios-Esponera, R. Samaniego, P. d. l. O. D. Hernan, and J. Teixido. 2009. Chemokine-induced Zap70 kinase-mediated dissociation of the Vav1-talin complex activates $\alpha_4\beta_1$ integrin for T cell adhesion. *Immunity* 31: 953-964.
15. 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.
16. 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.
17. Katagiri, T., T. Takahashi, T. Sasaki, S. Nakamura, and S. Hattori. 2000. Protein-tyrosine kinase Pyk2 is involved in interleukin-2 production by Jurkat T cells via its tyrosine 402. *J Biol Chem* 275: 19645-19652.
18. Okabe, S., S. Fukuda, Y. J. Kim, M. Niki, L. M. Pelus, K. Ohyashiki, P. P. Pandolfi, and H. E. Broxmeyer. 2005. Stromal cell-derived factor-

- 1alpha/CXCL12-induced chemotaxis of T cells involves activation of the RasGAP-associated docking protein p62Dok-1. *Blood* 105: 474-480.
19. Koretzky, G. A., F. Abtahian, and M. A. Silverman. 2006. SLP76 and SLP65: complex regulation of signalling in lymphocytes and beyond. *Nat Rev Immunol* 6: 67-78.
 20. Raab, M., A. J. da Silva, P. R. Findell, and C. E. Rudd. 1997. Regulation of Vav-SLP-76 binding by ZAP-70 and its relevance to TCR zeta/CD3 induction of interleukin-2. *Immunity* 6: 155-164.
 21. Geng, L., M. Raab, and C. E. Rudd. 1999. Cutting edge: SLP-76 cooperativity with FYB/FYN-T in the Up-regulation of TCR-driven IL-2 transcription requires SLP-76 binding to FYB at Tyr595 and Tyr651. *J Immunol* 163: 5753-5757.
 22. Boerth, N. J., B. A. Judd, and G. A. Koretzky. 2000. Functional association between SLAP-130 and SLP-76 in Jurkat T cells. *J Biol Chem* 275: 5143-5152.
 23. Wang, H., and C. E. Rudd. 2008. SKAP-55, SKAP-55-related and ADAP adaptors modulate integrin-mediated immune-cell adhesion. *Trends Cell Biol* 18: 486-493.
 24. Baker, R. G., C. J. Hsu, D. Lee, M. S. Jordan, J. S. Maltzman, D. A. Hammer, T. Baumgart, and G. A. Koretzky. 2009. The adapter protein SLP-76 mediates "outside-in" integrin signaling and function in T cells. *Mol Cell Biol* 29: 5578-5589.
 25. Horn, J., X. Wang, P. Reichardt, T. E. Stradal, N. Warnecke, L. Simeoni, M. Gunzer, D. Yablonski, B. Schraven, and S. Kliche. 2009. Src homology 2-domain containing leukocyte-specific phosphoprotein of 76 kDa is mandatory for TCR-mediated inside-out signaling, but dispensable for CXCR4-mediated LFA-1 activation, adhesion, and migration of T cells. *J Immunol* 183: 5756-5767.
 26. Ottoson, N. C., J. T. Pribila, A. S. Chan, and Y. Shimizu. 2001. Cutting edge: T cell migration regulated by CXCR4 chemokine receptor signaling to ZAP-70 tyrosine kinase. *J Immunol* 167: 1857-1861.
 27. Kremer, K. N., T. D. Humphreys, A. Kumar, N. X. Qian, and K. E. Hedin. 2003. Distinct role of ZAP-70 and Src homology 2 domain-containing leukocyte protein of 76 kDa in the prolonged activation of extracellular signal-regulated protein kinase by the stromal cell-derived factor-1 alpha/CXCL12 chemokine. *J Immunol* 171: 360-367.
 28. Smith, X., H. Schneider, K. Kohler, H. Liu, Y. Lu, and C. E. Rudd. 2013. The chemokine CXCL12 generates costimulatory signals in T cells to enhance phosphorylation and clustering of the adaptor protein SLP-76. *Sci Signal* 6: ra65.
 29. Lee, D., J. Kim, R. G. Baker, G. A. Koretzky, and D. A. Hammer. 2012. SLP-76 is required for optimal CXCR4-stimulated T lymphocyte firm arrest to ICAM-1 under shear flow. *Eur J Immunol* 42: 2736-2743.
 30. da Silva, A. J., Z. Li, C. de Vera, E. Canto, P. Findell, and C. E. Rudd. 1997. Cloning of a novel T-cell protein FYB that binds FYN and SH2-domain-containing leukocyte protein 76 and modulates interleukin 2 production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 7493-7498.
 31. Musci, M. A., L. R. Hendricks-Taylor, D. G. Motto, M. Paskind, J. Kamens, C. W. Turck, and G. A. Koretzky. 1997. Molecular cloning of SLAP-130, an SLP-76-associated substrate of the T cell antigen receptor-stimulated protein tyrosine kinases. *J Biol Chem* 272: 11674-11677.

32. Veale, M., M. Raab, Z. Li, A. J. da Silva, S. K. Kraeft, S. Weremowicz, C. C. Morton, and C. E. Rudd. 1999. Novel isoform of lymphoid adaptor FYN-T-binding protein (FYB-130) interacts with SLP-76 and up-regulates interleukin 2 production. *J Biol Chem* 274: 28427-28435.
33. Marie-Cardine, A., L. R. Hendricks-Taylor, N. J. Boerth, H. Zhao, B. Schraven, and G. A. Koretzky. 1998. Molecular interaction between the Fyn-associated protein SKAP55 and the SLP-76-associated phosphoprotein SLAP-130. *J Biol Chem* 273: 25789-25795.
34. Krause, M., A. S. Sechi, M. Konradt, D. Monner, F. B. Gertler, and J. Wehland. 2000. Fyn-binding protein (Fyb)/SLP-76-associated protein (SLAP), Ena/vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) proteins and the Arp2/3 complex link T cell receptor (TCR) signaling to the actin cytoskeleton. *J Cell Biol* 149: 181-194.
35. Peterson, E. J., M. L. Woods, S. A. Dmowski, G. Derimanov, M. S. Jordan, J. N. Wu, P. S. Myung, Q. H. Liu, J. T. Pribila, B. D. Freedman, Y. Shimizu, and G. A. Koretzky. 2001. Coupling of the TCR to integrin activation by Slap-130/Fyb. *Science* 293: 2263-2265.
36. Griffiths, E. K., C. Krawczyk, Y. Y. Kong, M. Raab, S. J. Hyduk, D. Bouchard, V. S. Chan, I. Kozieradzki, A. J. Oliveira-Dos-Santos, A. Wakeham, P. S. Ohashi, M. I. Cybulsky, C. E. Rudd, and J. M. Penninger. 2001. Positive regulation of T cell activation and integrin adhesion by the adapter Fyb/Slap. *Science* 293: 2260-2263.
37. Wang, H., E. Y. Moon, A. Azouz, X. Wu, A. Smith, H. Schneider, N. Hogg, and C. E. Rudd. 2003. SKAP-55 regulates integrin adhesion and formation of T cell-APC conjugates. *Nat Immunol* 4: 366-374.
38. Kliche, S., D. Breitling, M. Togni, R. Pusch, K. Heuer, X. Wang, C. Freund, A. Kasirer-Friede, G. Menasche, G. A. Koretzky, and B. Schraven. 2006. The ADAP/SKAP55 signaling module regulates T-cell receptor-mediated integrin activation through plasma membrane targeting of Rap1. *Mol Cell Biol* 26: 7130-7144.
39. Wang, H., H. Liu, Y. Lu, M. Lovatt, B. Wei, and C. E. Rudd. 2007. Functional defects of SKAP-55-deficient T cells identify a regulatory role for the adaptor in LFA-1 adhesion. *Mol Cell Biol* 27: 6863-6875.
40. Lev, S., H. Moreno, R. Martinez, P. Canoll, E. Peles, J. M. Musacchio, G. D. Plowman, B. Rudy, and J. Schlessinger. 1995. Protein tyrosine kinase PYK2 involved in Ca(2+)-induced regulation of ion channel and MAP kinase functions. *Nature* 376: 737-745.
41. Avraham, S., R. London, Y. Fu, S. Ota, D. Hiregowdara, J. Li, S. Jiang, L. M. Pasztor, R. A. White, J. E. Groopman, and et al. 1995. Identification and characterization of a novel related adhesion focal tyrosine kinase (RAFTK) from megakaryocytes and brain. *J Biol Chem* 270: 27742-27751.
42. Sasaki, H., K. Nagura, M. Ishino, H. Tobioka, K. Kotani, and T. Sasaki. 1995. Cloning and characterization of cell adhesion kinase beta, a novel protein-tyrosine kinase of the focal adhesion kinase subfamily. *J Biol Chem* 270: 21206-21219.
43. Dikic, I., G. Tokiwa, S. Lev, S. A. Courtneidge, and J. Schlessinger. 1996. A role for Pyk2 and Src in linking G-protein-coupled receptors with MAP kinase activation. *Nature* 383: 547-550.

44. Ganju, R. K., W. C. Hatch, H. Avraham, M. A. Ona, B. Druker, S. Avraham, and J. E. Groopman. 1997. RAFTK, a novel member of the focal adhesion kinase family, is phosphorylated and associates with signaling molecules upon activation of mature T lymphocytes. *J Exp Med* 185: 1055-1063.
45. Qian, D., S. Lev, N. S. van Oers, I. Dikic, J. Schlessinger, and A. Weiss. 1997. Tyrosine phosphorylation of Pyk2 is selectively regulated by Fyn during TCR signaling. *J Exp Med* 185: 1253-1259.
46. Berg, N. N., and H. L. Ostergaard. 1997. T cell receptor engagement induces tyrosine phosphorylation of FAK and Pyk2 and their association with Lck. *J Immunol* 159: 1753-1757.
47. Davis, C. B., I. Dikic, D. Unutmaz, C. M. Hill, J. Arthos, M. A. Siani, D. A. Thompson, J. Schlessinger, and D. R. Littman. 1997. Signal transduction due to HIV-1 envelope interactions with chemokine receptors CXCR4 or CCR5. *J Exp Med* 186: 1793-1798.
48. Ganju, R. K., P. Dutt, L. Wu, W. Newman, H. Avraham, S. Avraham, and J. E. Groopman. 1998. Beta-chemokine receptor CCR5 signals via the novel tyrosine kinase RAFTK. *Blood* 91: 791-797.
49. Gismondi, A., J. Jacobelli, R. Strippoli, F. Mainiero, A. Soriani, L. Cifaldi, M. Piccoli, L. Frati, and A. Santoni. 2003. Proline-rich tyrosine kinase 2 and Rac activation by chemokine and integrin receptors controls NK cell transendothelial migration. *J Immunol* 170: 3065-3073.
50. Dikic, I., and J. Schlessinger. 1998. Identification of a new Pyk2 isoform implicated in chemokine and antigen receptor signaling. *J Biol Chem* 273: 14301-14308.
51. Xiong, W. C., M. Macklem, and J. T. Parsons. 1998. Expression and characterization of splice variants of PYK2, a focal adhesion kinase-related protein. *J Cell Sci* 111 (Pt 14): 1981-1991.
52. Li, X., R. C. Dy, W. G. Cance, L. M. Graves, and H. S. Earp. 1999. Interactions between two cytoskeleton-associated tyrosine kinases: calcium-dependent tyrosine kinase and focal adhesion tyrosine kinase. *J Biol Chem* 274: 8917-8924.
53. Ivankovic-Dikic, I., E. Gronroos, A. Blaukat, B. U. Barth, and I. Dikic. 2000. Pyk2 and FAK regulate neurite outgrowth induced by growth factors and integrins. *Nat Cell Biol* 2: 574-581.
54. Avraham, H., S. Y. Park, K. Schinkmann, and S. Avraham. 2000. RAFTK/Pyk2-mediated cellular signalling. *Cell Signal* 12: 123-133.
55. Gao, C., and S. D. Blystone. 2009. A Pyk2-Vav1 complex is recruited to beta3-adhesion sites to initiate Rho activation. *Biochem J* 420: 49-56.
56. del Pozo, M. A., M. Vicente-Manzanares, R. Tejedor, J. M. Serrador, and F. Sanchez-Madrid. 1999. Rho GTPases control migration and polarization of adhesion molecules and cytoskeletal ERM components in T lymphocytes. *Eur J Immunol* 29: 3609-3620.
57. Sanz-Rodriguez, F., A. Hidalgo, and J. Teixido. 2001. Chemokine stromal cell-derived factor-1alpha modulates VLA-4 integrin-mediated multiple myeloma cell adhesion to CS-1/fibronectin and VCAM-1. *Blood* 97: 346-351.
58. Redondo-Munoz, J., E. Escobar-Diaz, R. Samaniego, M. J. Terol, J. A. Garcia-Marco, and A. Garcia-Pardo. 2006. MMP-9 in B-cell chronic lymphocytic leukemia is up-regulated by alpha4beta1 integrin or CXCR4 engagement via distinct signaling pathways, localizes to podosomes, and is involved in cell invasion and migration. *Blood* 108: 3143-3151.

59. Feigelson, S. W., V. Grabovsky, E. Winter, L. L. Chen, R. B. Pepinsky, T. Yednock, D. Yablonski, R. Lobb, and R. Alon. 2001. The Src kinase p56(lck) up-regulates VLA-4 integrin affinity. Implications for rapid spontaneous and chemokine-triggered T cell adhesion to VCAM-1 and fibronectin. *J Biol Chem* 276: 13891-13901.
60. 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.
61. Luque, A., M. Gomez, W. Puzon, Y. Takada, F. Sanchez-Madrid, and C. Cabanas. 1996. Activated conformations of very late activation integrins detected by a group of antibodies (HUTS) specific for a novel regulatory region (355-425) of the common beta 1 chain. *J Biol Chem* 271: 11067-11075.
62. Parsons, J. T., A. R. Horwitz, and M. A. Schwartz. 2010. Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 633-643.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Role of SLP-76 and ADAP in $\alpha 4\beta 1$ -dependent T cell adhesion in response to chemokines. (A) Molt-4 T cells incubated for the indicated times with CXCL12 were subjected to immunoprecipitation with anti-SLP-76, anti-Vav1 or control antibodies, followed by western blotting with antibodies to the indicated proteins. (B) Molt-4 cells were tested in cell fractionation assays. RhoGDI and CD45 represent cytosolic and membrane markers, respectively. (C) Cells were transfected with SLP-76, ADAP or control siRNA, and SLP-76 and ADAP expression was analyzed by immunoblotting. Control loading is shown by blotting with anti- β -actin antibodies. (D) CXCL12-incubated control, ADAP or SLP-76 siRNA Molt-4 transfectants were assayed by immunoprecipitation with anti-Vav1 antibodies followed by immunoblotting with antibodies to the proteins shown. (E) SLP-76- or ADAP-knockdown transfectants were subjected to adhesion assays to FN-H89 or VCAM-1 in the absence (Medium) or presence of co-immobilized CXCL12 (n=3-5). (F) Parental Jurkat and Jurkat-derived cells were tested in adhesion assays to VCAM-1 as in (E) (n=2). *** Adhesions were significantly inhibited in comparison with chemokine-stimulated control siRNA transfectants or parental Jurkat cells, p<0.001, ** p<0.01 or * p<0.05.

Figure 2. Pyk2 regulates CXCL12-stimulated T cell adhesion to $\alpha 4\beta 1$ ligands. (A) Parental (left and middle) or siRNA-transfected (right) Molt-4 cells were incubated in the absence or presence of CXCL12 and subsequently subjected to immunoprecipitation and western blotting. (B) Cell lysates were immunoprecipitated with talin or control antibodies and tested by immunoblotting with antibodies to the indicated proteins. (C, top) Cells were transfected with Pyk2 or control siRNA and upon the indicated times, cell lysates were assayed by western blotting. (Bottom) siRNA transfectants were

subjected to immunoprecipitation with anti-talin antibodies followed by immunoblotting with antibodies to the shown proteins. (D) Pyk2 and control siRNA transfectants were tested in adhesion assays to FN-H89 or VCAM-1 in the absence (Medium) or presence of co-immobilized CXCL12 (n=5). (E) Cells were transfected with empty (Mock) or PRNK vectors, and transfectants tested by western blotting for PRNK expression (left), or in adhesion assays (n=4). (F) Control or Pyk2 siRNA transfectants were immunoprecipitated with anti-Vav1 antibodies followed by immunoblotting with antibodies to the indicated proteins. (G) Same transfectants were exposed to CXCL12 for the times shown, and analyzed by immunoblotting with antibodies to phospho-Erk1/2, Erk1/2, phospho-Akt and Akt. ^{ΔΔΔ}Adhesions were significantly stimulated $p < 0.001$, ^{ΔΔ} $p < 0.01$ or ^Δ $p < 0.05$.

Figure 3. Flow chamber adhesion assays and determination of $\alpha 4\beta 1$ activation in SLP-76-, ADAP- or Pyk2-depleted T cells. (A) Molt-4 or PBL-T control, SLP-76 or ADAP siRNA transfectants, or Jurkat J14 cells, were perfused in flow chambers coated with VCAM-1 immobilized with CXCL12, and analyzed for rolling and transient or stable cell arrest (n=4). Data is presented as mean \pm SD of cell percentages from the total cell population. (B, C) The indicated siRNA Molt-4 transfectants were tested by flow cytometry for HUTS-21 mAb (B) or VCAM-1-Fc (C) binding after stimulation with CXCL12 or Mn^{2+} . (D-F) Control or Pyk2 siRNA transfectants were subjected to adhesion under flow as described in (A), tested for HUTS-21 or VCAM-1-Fc binding (E, left; F), or incubated with CXCL12 and processed for immunoprecipitation and immunoblotting (E, right).

Figure 4. Analyses of adhesion strengthening and spreading on VCAM-1. (A-C) Control, SLP-76, ADAP or Pyk2 siRNA transfectants in Molt-4 or PBL-T cells (A, C), or parental Jurkat or J14 cells (B) that were attached on co-immobilized VCAM-1 and

CXCL12 in flow chambers, were subjected to cell detachment after increasing shear stress. Data show cell percentages from the initial number of bound cells remaining attached at the indicated shear stresses (n=4). (D) siRNA transfectants were allowed to attach to VCAM-1 immobilized with CXCL12, and spreading was evaluated by Nomarski at the indicated times. Percentage of cell spreading was determined from a significant number of cells from different fields of view (n=2500-3000). *Spreading was significantly inhibited, $p < 0.05$, or Δ stimulated, $p < 0.05$, compared with control siRNA transfectants (n=3).

Figure 5. Role of SLP-76, ADAP and Pyk2 on CXCL12-stimulated Rac1 activation and F-actin polymerization. (A, B) Molt-4 cells transfected with SLP-76, ADAP or control siRNA were stimulated with CXCL12 and subjected to GTPase assays to detect Rac1 activation (A, left; B), or analyzed by immunoprecipitation and western blotting (A, right). (C) Same transfectants were exposed to CXCL12 and tested in F-actin polymerization assays. (D, E) Molt-4 cells transfected with Pyk2 or control siRNA were stimulated with CXCL12 and subjected to GTPase assays for Rac1 activation (D) or to F-actin polymerization analyses (E).

Figure 6. Rac1 involvement in ADAP- and Pyk2-regulated T cell adhesion mediated by $\alpha 4\beta 1$. (A, B) Molt-4 cells were transfected with the indicated vectors and siRNA, and transfectants tested by flow cytometry, western blotting or in adhesion assays as indicated. In (A), adhesion was significantly *inhibited in comparison with chemokine-stimulated control siRNA transfectants, $p < 0.05$, or Δ stimulated, $p < 0.05$, compared with ADAP siRNA transfectants. In (B), adhesion was significantly $\Delta\Delta$ stimulated, $\Delta\Delta p < 0.01$, or *inhibited in comparison with Pyk2 siRNA transfectants, $p < 0.05$. (C) Molt-4 cells were transfected with the individual or combined siRNA, as shown, and transfectants analyzed by immunoblotting (left) or in adhesion assays

(right). * Adhesion was significantly inhibited, $p < 0.05$, or $\Delta\Delta\Delta$ stimulated, $p < 0.001$, in comparison with control siRNA transfectants. (D) Cells were transfected with both ADAP and Pyk2, or with control siRNA, and transfectants tested in GTPase assays to detect active Rac.

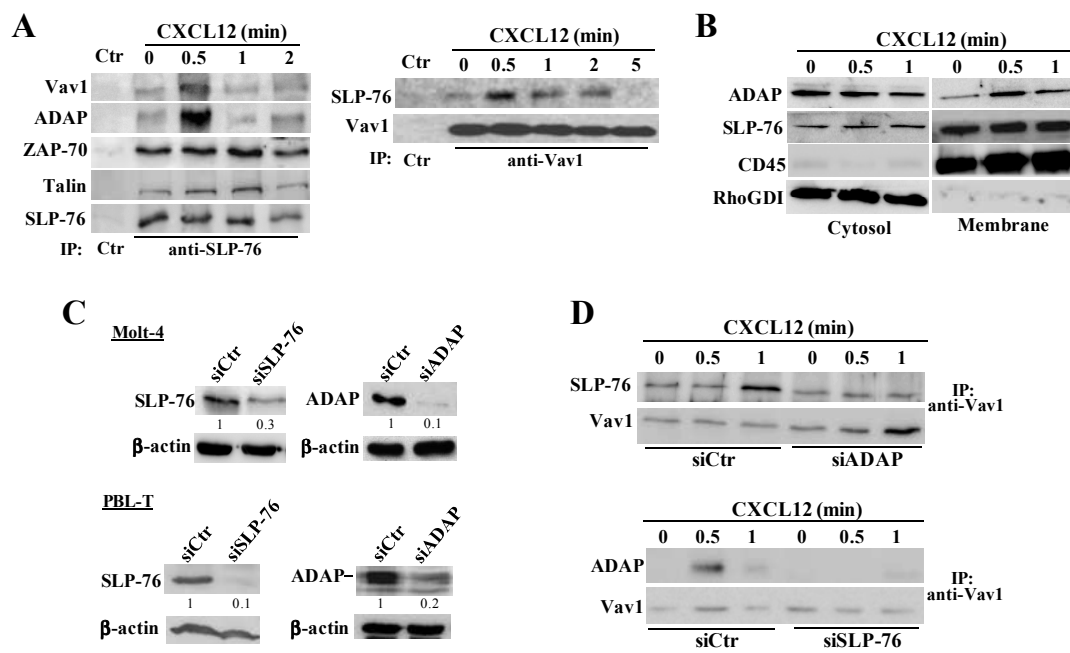
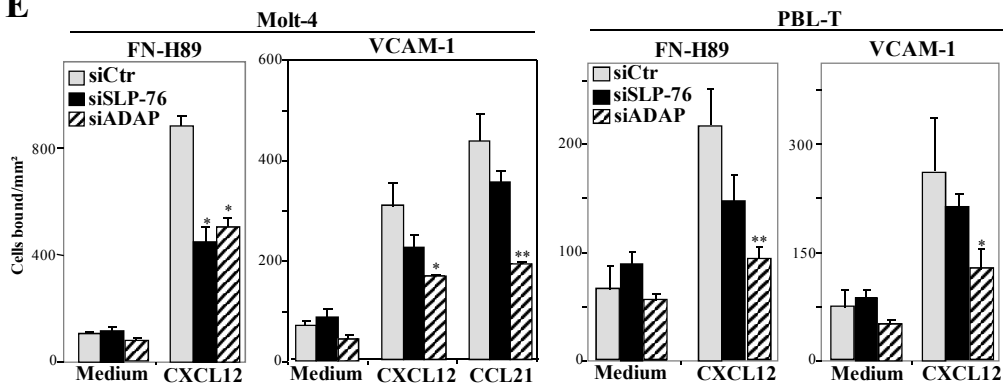
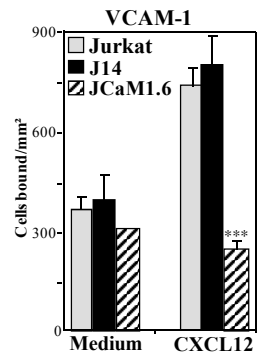


Fig. 1

E**F****Fig. 1**

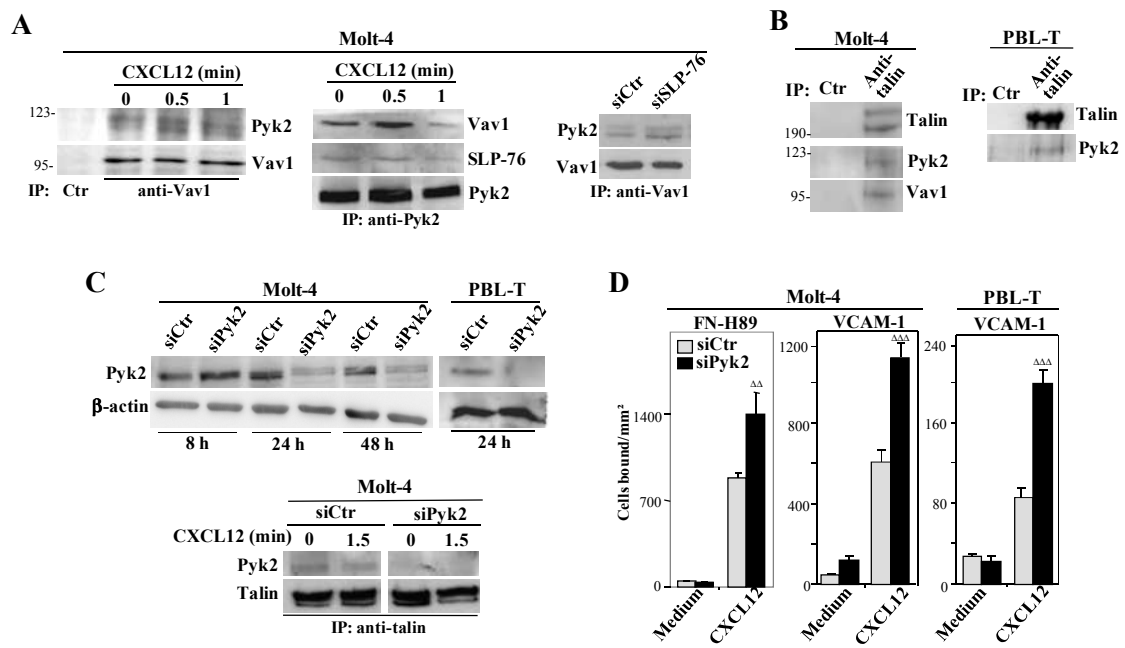


Fig. 2

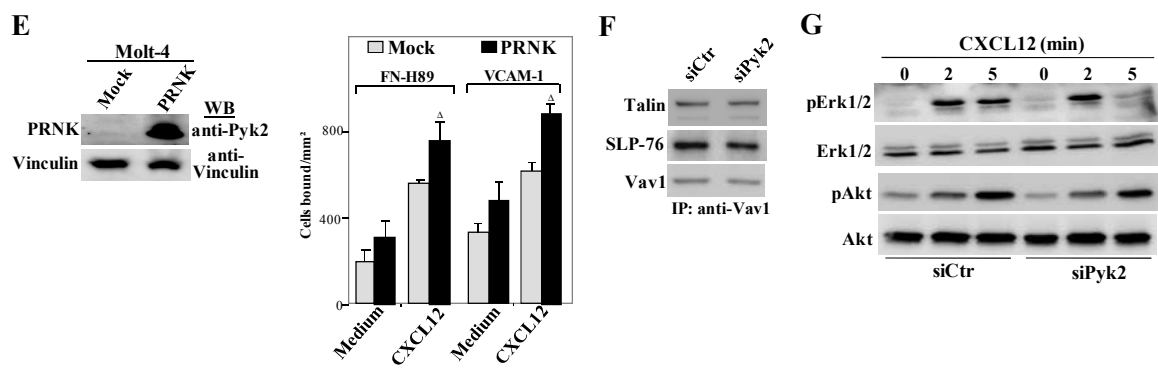


Fig. 2

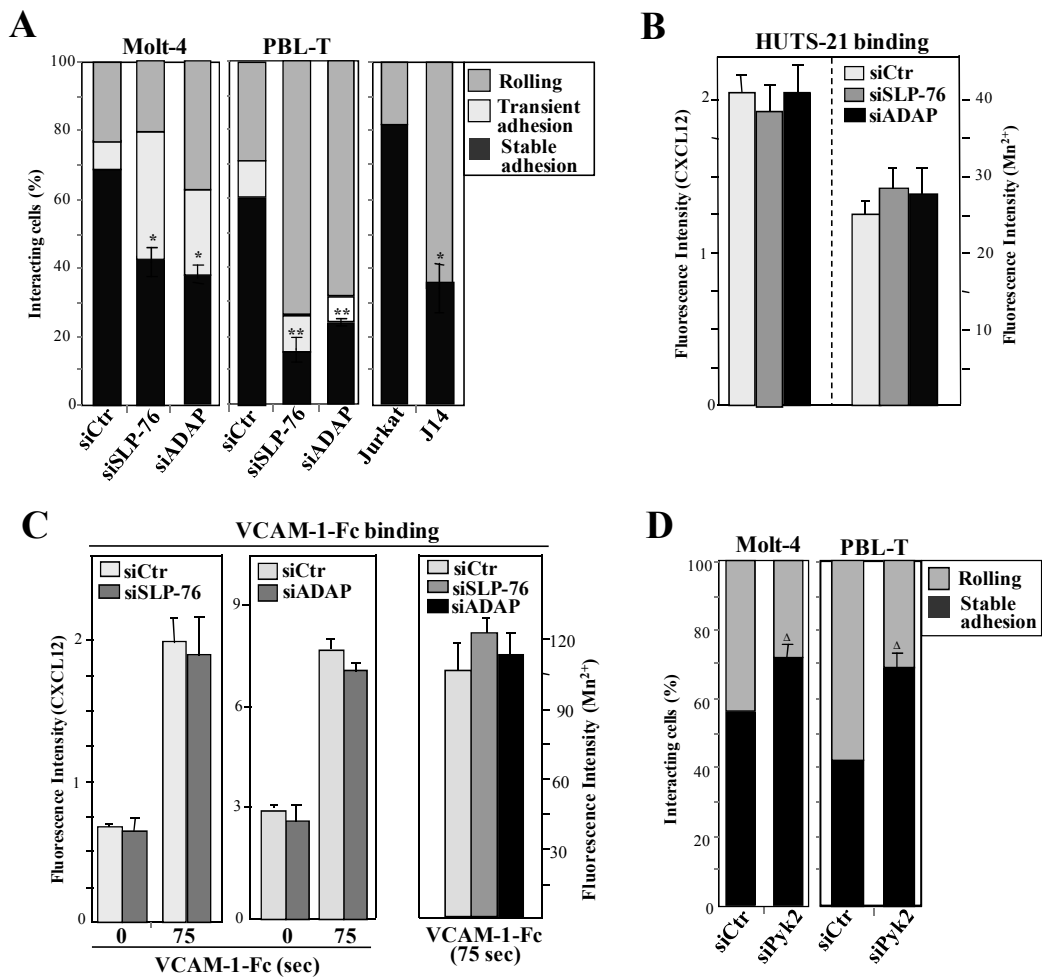


Fig. 3

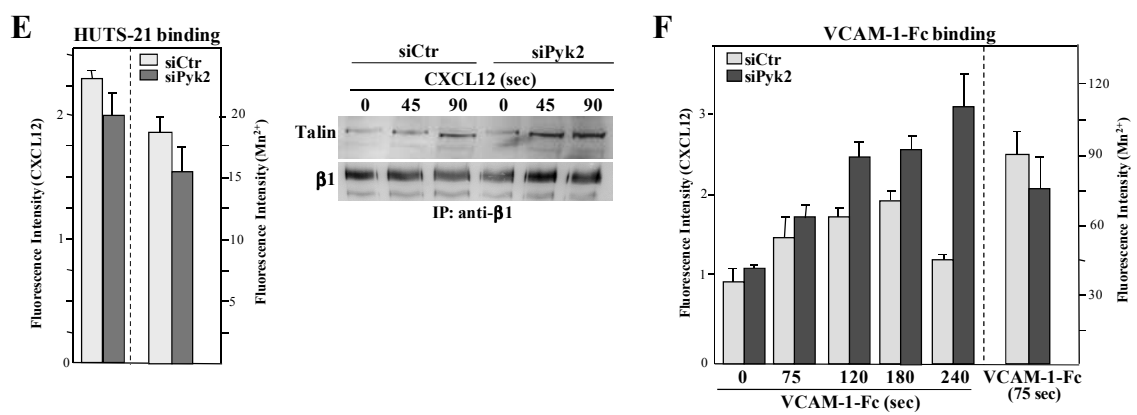


Fig. 3

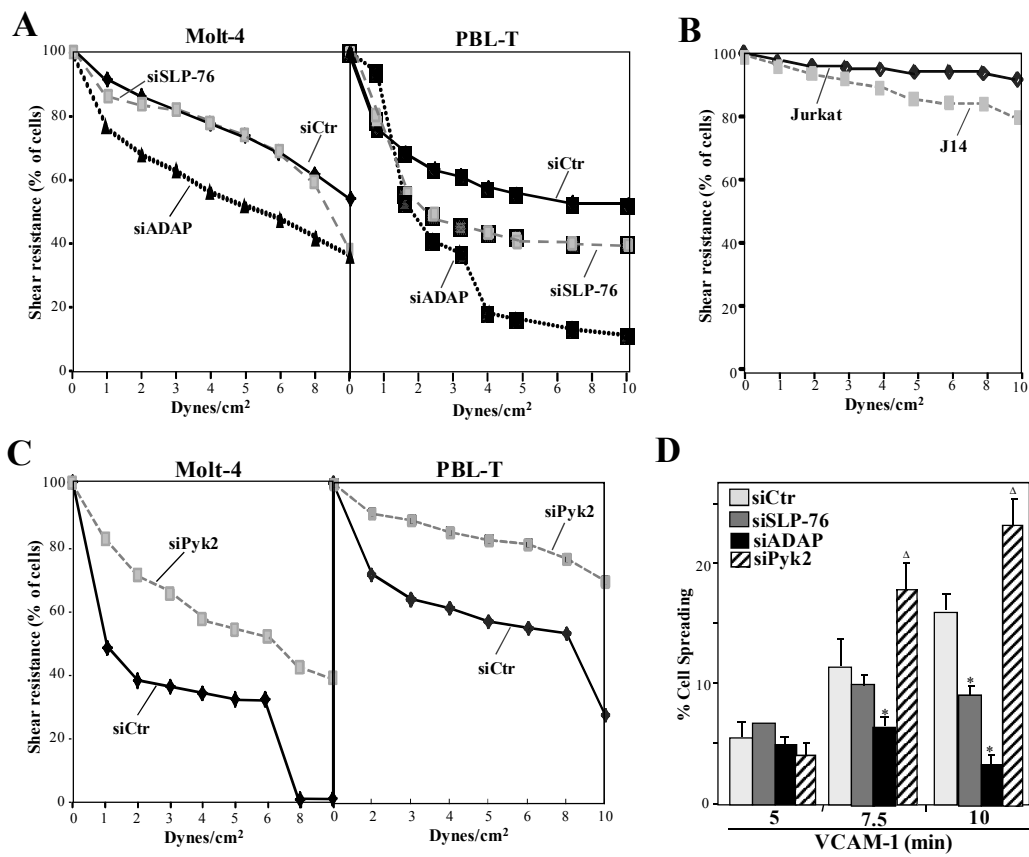
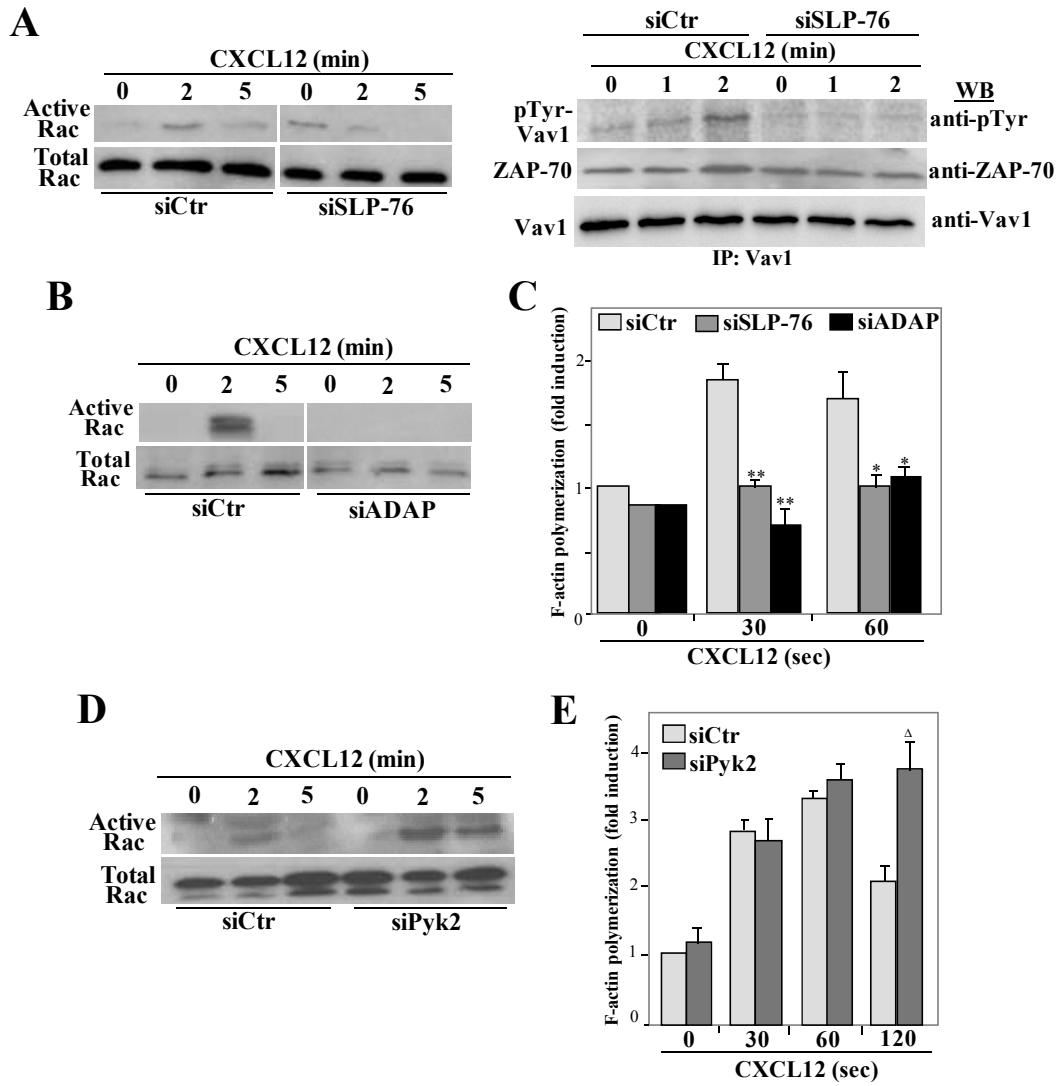


Fig. 4



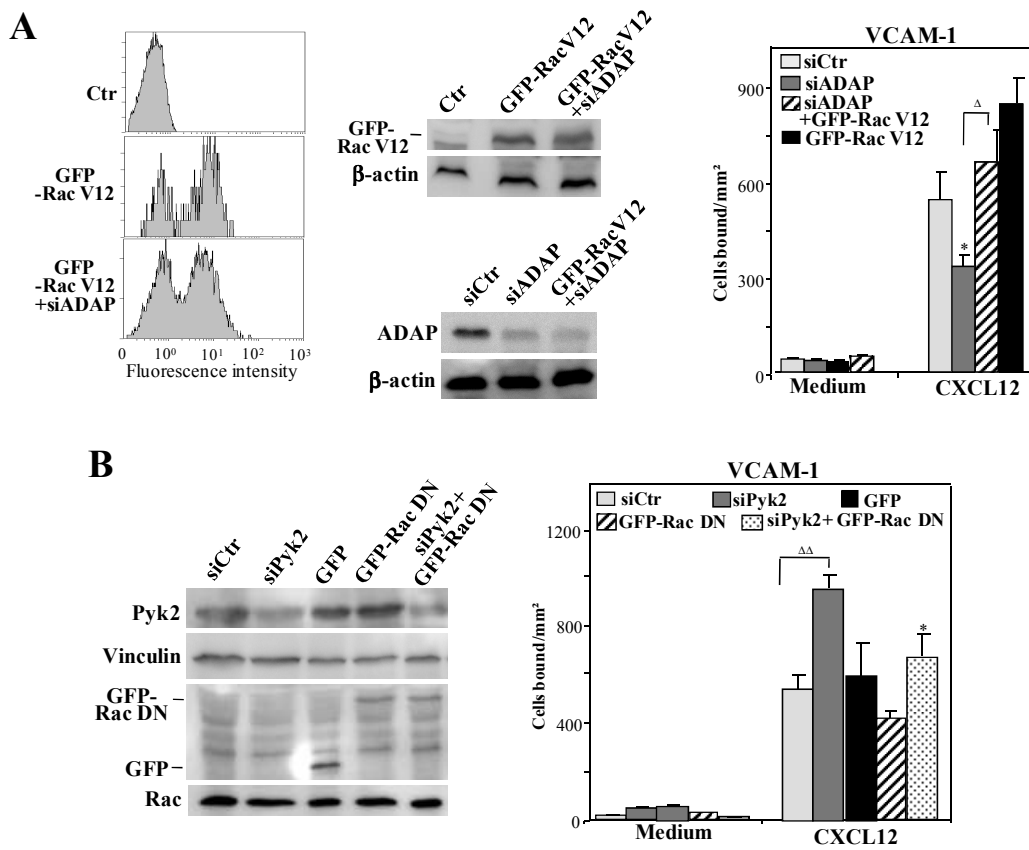


Fig. 6

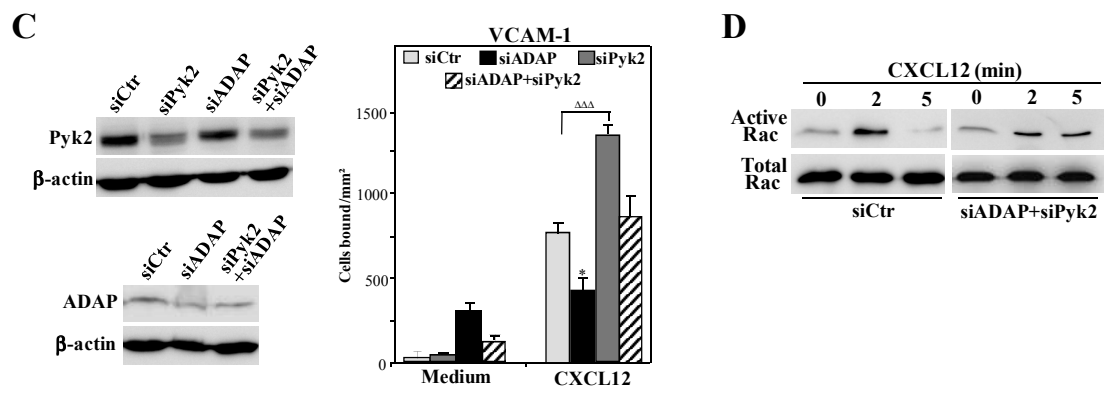


Fig. 6

Anexos III

RGS10 Restricts Upregulation by Chemokines of T Cell Adhesion Mediated by $\alpha 4\beta 1$ and $\alpha L\beta 2$ Integrins

David García-Bernal,¹ Ana Dios-Esponera,¹ Elena Sotillo-Mallo, Rosa García-Verdugo, Nohemí Arellano-Sánchez, and Joaquin Teixidó

Chemokines rapidly and transiently upregulate $\alpha 4\beta 1$ and $\alpha L\beta 2$ integrin-mediated adhesion during T lymphocyte extravasation by activating G α -dependent inside-out signaling. To limit and terminate G α -mediated signaling, cells can use several mechanisms, including the action of regulator of G protein signaling (RGS) proteins, which accelerate the GTPase activity of G α subunits. Using human T cells silenced for or overexpressing RGS10, we show in this article that RGS10 functions as an inhibitor of G α -dependent, chemokine-upregulated T cell adhesion mediated by $\alpha 4\beta 1$ and $\alpha L\beta 2$. Shear stress-dependent detachment and cell spreading analyses revealed that RGS10 action mainly targets the adhesion strengthening and spreading phases of $\alpha 4\beta 1$ -mediated cell attachment. Associated with these observations, chemokine-stimulated Vav1–Rac1 activation was longer sustained and of higher intensity in RGS10-silenced T cells, or inhibited in cells overexpressing RGS10. Of importance, expression of constitutively activated Rac1 forms in cells overexpressing RGS10 led to the rescue of CXCL12-stimulated adhesion to VCAM-1 to levels similar to those in control transfectants. Instead, adhesion under flow conditions, soluble binding experiment, flow cytometry, and biochemical analyses revealed that the earlier chemokine-triggered integrin activation step was mostly independent of RGS10 actions. The data strongly suggest that RGS10 opposes activation by chemokines of the Vav1–Rac1 pathway in T cells, leading to repression of adhesion strengthening mediated by $\alpha 4\beta 1$. In addition to control chemokine-upregulated T cell attachment, RGS10 also limited adhesion-independent cell chemotaxis and activation of cdc42. These results identify RGS10 as a key molecule that contributes to the termination of G α -dependent signaling during chemokine-activated $\alpha 4\beta 1$ - and $\alpha L\beta 2$ -dependent T cell adhesion. *The Journal of Immunology*, 2011, 187: 1264–1272.

Chemokines stimulate cell migration and activation, and exert their functions upon binding to heterotrimeric guanine nucleotide-binding (G) protein-coupled receptors (GPCR) (1–3). In the immune system, chemokines promote the migration of immune cells from lymph and blood circulation into lymphoid tissues and sites of inflammation during immune surveillance (4–7). For T lymphocytes, this process is achieved after rapid and transient stimulation of $\alpha 4\beta 1$ and $\alpha L\beta 2$ integrin activity by chemokines presented on the endothelium. Thus, chemokine binding to GPCR induces activation of intracellular effector molecules that lead to integrin-mediated upregulation of lymphocyte adhesion, a process called inside-out signaling (8, 9). Key inside-out molecules that regulate the activation of $\alpha 4\beta 1$ and $\alpha L\beta 2$ include talin and kindlin-3, as well as the Vav1–Rac1 and RALP–Rap1 pathways (10–15).

Heterotrimeric G proteins consist of an α subunit and a complex formed by β and γ subunits (16–18). Basally, G $\beta\gamma$ and GDP-

bound G α are associated, and following interaction with an activated receptor, GTP replaces GDP and GTP-G α dissociates from the G $\beta\gamma$ dimer. These two elements interact with effector proteins, leading to the activation of distinct signaling pathways. The GTPase activity inherent to G α limits G protein activation, as GTP hydrolysis causes reassociation of GDP-G α and G $\beta\gamma$. G proteins are classified into four subfamilies—G_s, G_{i/o}, G_{q/11}, and G_{12/13}—according to the G α protein present in the complex (17, 18).

Heterotrimeric G proteins can be regulated by members of the regulators of G protein signaling (RGS) family (19–22). RGS proteins contain a 120-aa-long region called RGS domain, which is responsible for binding to G α subunits and for GTPase accelerating activity (21). This activity promotes the return of G α to its inactive form, which leads to faster termination of G protein-dependent signaling. Therefore, RGS proteins control the timing and duration of specific responses involving GPCR signaling. In T lymphocytes, constitutive or regulated expression of RGS2, RGS3, RGS4, RGS14, and RGS16 has been previously reported (23–27). Both migration and G protein-mediated signaling activation has been shown to be a target of regulation by these RGS proteins.

RGS10 belongs to the R12 subfamily of the RGS family, which also includes RGS12 and RGS14 (21), and it has been found to be expressed on brain, thymus, and lymph nodes (28, 29). RGS10 mainly accelerates the GTPase activity of G α_i (28). RGS10 is phosphorylated at Ser¹⁶⁸ by cAMP-dependent protein kinase A, and this phosphorylation has been proposed to regulate RGS10 cell localization and function (30).

Although considerable effort has been made to identify molecules that are required for integrin activation in T lymphocytes, little is known about the mechanisms controlling the termination of integrin-mediated adhesion, a process that contributes to the homeostasis of the immune response. RGS proteins represent good

Departamento de Medicina Celular y Molecular, Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 28040 Madrid, Spain

¹D.G.-B. and A.D.-E. contributed equally to this work.

Received for publication September 1, 2010. Accepted for publication May 26, 2011.

This work was supported by Grant SAF2008-00479 from Ministerio de Ciencia e Innovación (to J.T.).

Address correspondence and reprint requests to Dr. Joaquin Teixidó, Departamento de Medicina Celular y Molecular, Centro de Investigaciones Biológicas, Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain. E-mail address: joaquin@cib.csic.es

The online version of this article contains supplemental material.

Abbreviations used in this article: G protein, guanine nucleotide binding protein; GPCR, G protein-coupled receptor; HA, hemagglutinin; PBL-T, peripheral blood T lymphocytes; RGS, regulator of G protein signaling; shRNA, short hairpin RNA; siRNA, small interfering RNA.

Copyright © 2011 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/11/\$16.00

www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1002960

candidates to regulate the strength and duration of GPCR-dependent signaling leading to integrin activation in lymphocytes. In the present work, we have investigated whether RGS10 could represent such a regulatory molecule in the control of integrin-dependent T cell adhesion. The results indicate that RGS10 represses the strength of chemokine-dependent T lymphocyte adhesion mediated by $\alpha 4\beta 1$, and therefore suggest that RGS10 may control the duration of GPCR-dependent signaling required for upregulation of this adhesion.

Materials and Methods

Cells, Abs, and reagents

Human Molt-4 and Jurkat T cell lines, as well as peripheral blood T lymphocytes (PBL-Ts), were cultured and prepared as described (31). The Consejo Superior de Investigaciones Científicas Ethics Committee (Madrid, Spain) approved the protocols used to obtain and process the human blood samples. Human CD4⁺ T cells were purified using anti-CD4-coated microbeads (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Control P3X63 anti- $\alpha 4$ HP1/2, anti- $\beta 1$ TS2/16, and anti-CD45 RP2/21 mAb were gifts from Dr. Francisco Sánchez-Madrid (Hospital de la Princesa, Madrid, Spain), and polyclonal anti- $\beta 1$ A Abs were from Dr. Guido Tarone (Turin University, Turin, Italy). The MEM-148 anti- $\beta 2$ mAb and Abs to RGS10, $G\alpha_i$, Vav1, phosphotyrosine, Rap1, and RhoA were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA); anti-Rac1 and anti-Cdc42 were from BD Biosciences Pharmingen (San Diego, CA); and anti-GFP was from Molecular Probes (Eugene, OR). Abs to β -actin, hemagglutinin (HA), paxillin, and talin clone 8D4 were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), and anti-pErk1/2 and Erk1/2 Abs were from Cell Signaling Technology (Danvers, MA). Anti-CXCR4 mAb and CXCL12 were purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN). CCL21 was obtained from Peprotech (Rocky Hill, NJ), and pertussis toxin was from Sigma-Aldrich.

Transfections and RNA interference

HA-fused RGS10 in the pcDNA3.1 vector was obtained from Missouri S&T cDNA Resource Center (Rolla, MO), and vectors coding for wild-type and active (V12) Rac1 fused with GFP were from Dr. F. Sánchez-Madrid. Two small interfering RNA (siRNA) duplexes against human RGS10 (RGS10.1, sense: 5'-CAAAGGAGAUCAUGACTt-3'; and RGS10.2, sense: 5'-GAACCGCACCCUCUGAUGUtt-3') were purchased from Dharmacon (Chicago, IL). Synthetic oligonucleotides (64-mer) that included the 19-mer sequence from the RGS10.1 siRNA sequence were synthesized, annealed, and ligated into pSuper vector, as described (32), to generate the pSuper-RGS10 short hairpin RNA (shRNA). The pSuper vector was used as the control in transfections involving pSuper-RGS10. Human Rac1 and Rap1, or control siRNA (31), were purchased from Ambion (Austin, TX). Vectors and siRNA were nucleofected (Amaxa, Cologne, Germany) following the described procedure (31). Molt-4 or PBL-T siRNA transfectants were assayed 22–24 h posttransfection, and transfection did not affect cell viability, as assessed in flow cytometry cell-cycle analyses.

Cell adhesion, chemotaxis, and spreading assays

For static adhesions, cells were plated on wells coated with CXCL12 or CCL21 (650 ng/ml), together with the fibronectin fragment FN-H89 or VCAM-1, and plates were incubated for 2 min at 37°C, according to the described method (31). Extent of adhesion was quantified with a fluorescence analyzer (BMG Labtechnologies, Offenburg, Germany). For flow chamber adhesion assays, we followed the reported protocol (33). In brief, cells were infused at a flow rate of 1 dyne/cm² into flow chambers containing coimmobilized VCAM-1 and CXCL12. Rolling cells that subsequently firmly attached for at least 20 s were expressed as stable arrest, whereas tethering cells that did not arrest at any moment were expressed as rolling cells. To evaluate shear resistance, cells were allowed to attach and then were subjected to sequential increases of the flow rate. The number of cells remaining bound was determined as the percentage of total adhered cells after the adhesion step. For chemotaxis assays, we used the reported procedure (34). Migrated cells were counted in a flow cytometer (Coulter Epics XL; Beckman Coulter, Miami, FL) by passing each sample in the same predetermined time and flow conditions. For cellular spreading, CXCL12-stimulated cells attached on VCAM-1 were fixed and analyzed as previously described (33). For cell binding to VCAM-1-Fc (R&D Systems), cells were stimulated for 45 s with CXCL12 before adding VCAM-1-Fc for 75 s. For cell binding to ICAM-1-Fc (R&D Systems), cells (2×10^5) were resuspended in HEPES buffer (HEPES 20 mM, pH

7.4; NaCl 140 mM; glucose 2 gr/l; BSA 0.1%) with or without 5 mM Mg²⁺ and 1 mM EGTA. ICAM-1-Fc (200 μ g/ml) was added to samples, and after a 30-min incubation at 37°C, cells were stimulated for 60 s with CXCL12. Detection of VCAM-1-Fc and ICAM-1-Fc was performed by flow cytometry using PE-conjugated AffiniPure F(ab')₂ fragment goat anti-human IgG, Fc γ fragment specific (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA).

Flow cytometry and calcium mobilization assays

For detection of high-affinity LFA-1, cells resuspended in HEPES buffer were incubated for 10 min at 37°C with the MEM-148 mAb (10 μ g/ml), followed by exposure for 5 min to CXCL12. After washing, cells were incubated with FITC-conjugated rabbit anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories) for 30 min at 4°C. For calcium mobilization, cells were washed with labeling medium (HBSS containing 1% FBS, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 1 mM), followed by an incubation step of 45 min at 37°C with the Ca²⁺-sensitive fluorescent dyes Fluo3-AM and FuraRed-AM (Molecular Probes) to a final concentration of 4 μ M and 10 μ M, respectively. After cell stimulation with CXCL12, we measured the ratio of Fluo3-AM/FuraRed-AM fluorescence by flow cytometry. Ionomycin (Sigma-Aldrich) was used as a positive control for Ca²⁺ mobilization.

Immunoprecipitation, immunoblotting, and GTPase assays

For immunoprecipitation, cells were solubilized in lysis buffer containing 1% digitonin, and after preclearing with protein G-Sepharose beads (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden), supernatants were incubated with Abs followed by coupling to protein G-Sepharose. Proteins were resolved by SDS-PAGE, then transferred to membranes that were sequentially incubated with primary Abs and with HRP-conjugated secondary Abs. Proteins were visualized using SuperSignal Chemiluminescent Substrate (Pierce, Rockford, IL). For GTPase assays, we followed the method described (31). Briefly, cells exposed to CXCL12 were lysed, and aliquots from extracts were separated for total lysate controls and for incubation either with GST-PAK-CD (for active Rac1 and cdc42), GST-Ral-GDS (for active Rap1), or GST-C21 (for active RhoA) fusion proteins, followed by incubation with glutathione-agarose beads. Bound proteins were eluted and subjected to immunoblotting using anti-Rac1, anti-cdc42, anti-Rap1, or anti-RhoA Abs.

Statistical analyses

Data were analyzed by one-way ANOVA, followed by Tukey–Kramer multiple comparisons. In both analyses, the minimum acceptable level of significance was $p < 0.05$.

Results

RGS10 controls chemokine-stimulated T cell adhesion mediated by $\alpha 4\beta 1$ and $\alpha L\beta 2$ integrins

RGS10 was found to be expressed in PBL-Ts and in the CD4⁺ subpopulation, as well as in the human T cell lines Molt-4 and Jurkat (Fig. 1A). CXCL12 rapidly and transiently stimulated the association of RGS10 with $G\alpha_i$ (Fig. 1B), suggesting that RGS10 might regulate $G\alpha_i$ -dependent signaling pathways in T cells. To investigate whether adhesion of T cells to $\alpha 4\beta 1$ ligands that is upregulated by CXCL12 can be controlled by RGS10, we silenced its expression in Molt-4 and PBL-T cells by siRNA or shRNA, and tested transfectants in static adhesion assays to CS-1/fibronectin (FN-H89) and to VCAM-1. RGS10.1 siRNA reduced the expression of RGS10 by 70% and 90% in Molt-4 and PBL-T cells, respectively, whereas transfection with RGS10.2 siRNA led to a 50% decrease in the expression of this protein (Fig. 1C). When RGS10 shRNA was transfected into Molt-4 cells, a 50% reduction in RGS10 expression was observed (Fig. 1C, bottom panel). Molt-4 and PBL-T cells silenced for RGS10 expression showed significantly stronger attachment to FN-H89 and VCAM-1 immobilized with CXCL12 than to control siRNA or shRNA transfectants (Fig. 1D, 1E). Under basal conditions (no CXCL12 stimulation), the attachment of RGS10 knockdown T cells to VCAM-1 was slightly increased compared with control siRNA transfectants, although the extent of this increase was always smaller than the upregulation of adhesion seen in RGS10-depleted cells incubated

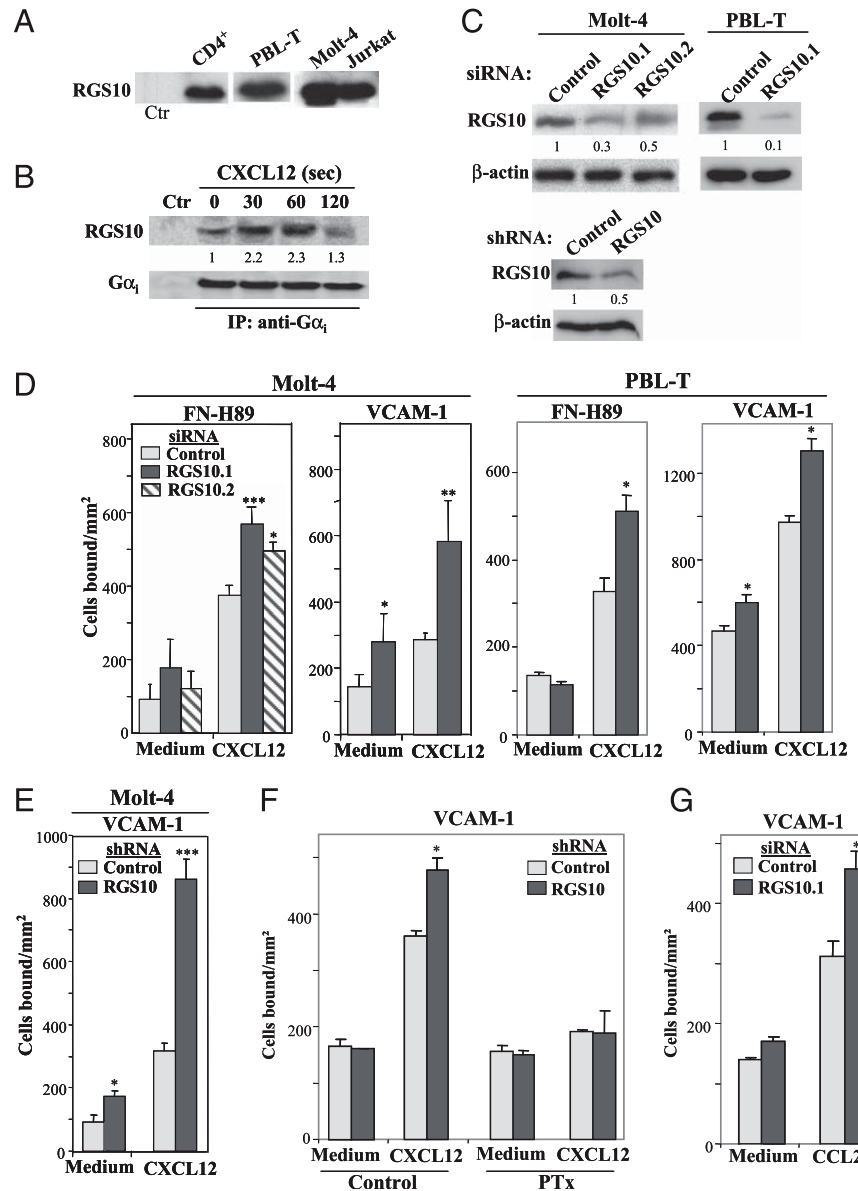


FIGURE 1. RGS10-silenced T cells have increased $\alpha 4\beta 1$ -dependent adhesion in response to chemokines. *A*, Expression of RGS10 in T cells was assessed by immunoblotting with anti-RGS10 Abs. *B*, Molt-4 cells incubated for the indicated times with CXCL12 were subjected to immunoprecipitation with anti-G α_i or control Abs, followed by Western blotting with Abs to the indicated proteins. *C*, Molt-4 or PBL-T cells were transfected with different RGS10 siRNA, and the expression of RGS10 was analyzed by immunoblotting. Control loading is shown by blotting with anti- β -actin Abs. *D* and *E*, Cells were transfected with either control or RGS10 siRNA or shRNA, and transfectants tested in adhesion assays to the $\alpha 4\beta 1$ ligands FN-H89 and VCAM-1 immobilized without (Medium) or with CXCL12. *F*, Control or RGS10 shRNA Molt-4 transfectants were left untreated (Control) or incubated with PTx (16 h, 100 ng/ml), and subsequently subjected to adhesion assays to VCAM-1 coimmobilized with or without CXCL12. *G*, Molt-4 siRNA transfectants were tested in adhesion assays to VCAM-1 coimmobilized with or without CCL21. Numbers under gel represent densitometer analyses in arbitrary units. Adhesions were significantly upregulated in comparison with chemokine-stimulated control siRNA transfectants. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Ctr, control Abs; PTx, pertussis toxin.

with CXCL12. Pertussis toxin, an inhibitor of G α_i -triggered signaling, blocked both the CXCL12-stimulated T cell adhesion to VCAM-1 in control shRNA transfectants and the further upregulation of adhesion seen in RGS10 shRNA counterparts (Fig. 1*F*), indicating that RGS10 was exerting its regulatory actions on adhesion through G α_i . Flow cytometry control experiments indicated that RGS10 depletion did not alter the expression of CXCR4, $\alpha 4$ or $\beta 1$ (not shown).

To determine whether the regulation by RGS10 of $\alpha 4\beta 1$ -dependent T cell adhesion could also be detected with chemokines other than CXCL12, we used CCL21, a chemokine that binds to the CCR7 receptor on the surface of T lymphocytes and that has been demonstrated to activate integrin-mediated lymphocyte adhesion (35, 36). The results indicated that RGS10-silenced T cells attached to VCAM-1 more strongly than did control siRNA transfectants when exposed to CCL21 (Fig. 1*G*), indicating that RGS10 controls $\alpha 4\beta 1$ -dependent T cell adhesion in response to multiple G α_i -coupled chemokine receptors.

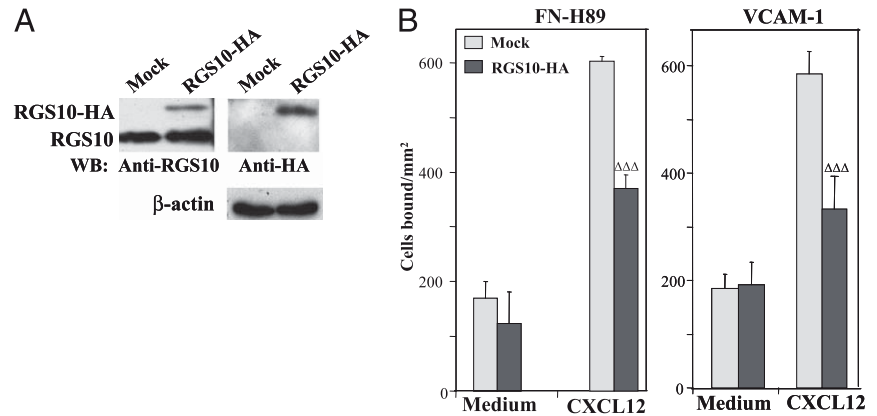
Further support for the involvement of RGS10 in the control of T cell adhesion mediated by $\alpha 4\beta 1$ in response to chemokines came from experiments using T cells that overexpressed RGS10. Thus, Molt-4 cells overexpressing RGS10-HA displayed a significant

reduction in CXCL12-upregulated attachment to FN-89 and VCAM-1, compared with mock transfectants (Fig. 2*A*, 2*B*). To analyze whether RGS10 could regulate other adhesions in T cells, in addition to $\alpha 4\beta 1$ -dependent attachment, we studied the effect of silencing or overexpressing RGS10 on $\alpha L\beta 2$ -mediated adhesion. RGS10-depleted Molt-4 and PBL-T cells displayed higher attachment to ICAM-1 than did control siRNA transfectants when exposed to CXCL12; conversely, transfectants overexpressing RGS10 displayed a significant inhibition of CXCL12-triggered adhesion, compared with control transfectants (Fig. 3*A*, 3*B*). In addition, RGS10 silencing led to stronger adhesion to ICAM-1 triggered by CCL21 than to cells transfected with control siRNA (Fig. 3*C*). Together, these results indicate that RGS10 functions as a controller of chemokine-stimulated T cell adhesion involving integrins $\alpha 4\beta 1$ and $\alpha L\beta 2$.

RGS10 controls the chemokine-upregulated T cell adhesion strengthening and spreading steps mediated by $\alpha 4\beta 1$

The adhesion process dependent on lymphocyte integrins can be divided into an initial step involving generation of high-affinity activated integrins that support firm interaction with their ligands, a subsequent phase of increase in avidity that includes

FIGURE 2. RGS10 overexpression leads to decrease in chemokine-stimulated, $\alpha 4\beta 1$ -dependent T cell adhesion. *A*, Molt-4 cells were transfected with pcDNA3.1 (Mock) or pcDNA3.1-RGS10-HA vectors and analyzed by immunoblotting with anti-RGS10 or anti-HA Abs. *B*, Transfectants were tested in adhesion assays to FN-H89 or VCAM-1 immobilized with or without CXCL12. Adhesions were significantly inhibited. $\Delta\Delta\Delta p < 0.001$ ($n = 4$).



enhanced valency of the adhesions, followed by a phase of adhesion strengthening that supports final cell spreading (9). To study which of these steps can be regulated by RGS10, we first performed adhesion assays under flow conditions to mimic the initial phases of the adhesion cascade. Adhesion under shear stress revealed a moderate and statistically nonsignificant ($p > 0.05$) increase in rapid (<20 s) stable cell arrest on VCAM-1 coimmobilized with CXCL12 of both PBL-T and Molt-4 RGS10 siRNA transfectants, when compared with control counterparts (Fig. 4A). Control experiments indicated that adhesion was abolished by pretreatment of cells with pertussis toxin (not shown). Dissociation of Vav1 from talin and increase in talin- $\beta 1$ association in response to chemokines constitute early events that lead to integrin activation (13). Neither Vav1-talin dissociation nor talin- $\beta 1$ assembly was significantly affected by RGS10 silencing (Fig. 4B); furthermore, RGS10-depleted T cells displayed binding capacity to soluble VCAM-1-Fc comparable to that in control counterparts (Fig. 4C). In addition, soluble binding to Molt-4 cells of ICAM-1-Fc or MEM-148, an anti- $\beta 2$ mAb that recognizes high-affinity states of $\alpha L\beta 2$ (37), was not altered by RGS10 knocking down (Fig. 4D). These results strongly suggest that the initial steps of chemokine-triggered T cell adhesion that generate active $\alpha 4\beta 1$ and $\alpha L\beta 2$ are not significantly controlled by RGS10 function.

Notably, RGS10-silenced PBL-T and Molt-4 cells developed higher resistance to detachment at increased shear stress than did control siRNA transfectants (Fig. 4E). Moreover, RGS10 knock-down cells displayed higher spreading on VCAM-1 than did control siRNA transfectants, and interference reflection microscopy analyses showed that the ligand-bound focal plane of RGS10-depleted cells had a larger area than did control trans-

fectants (Fig. 4F). Therefore, these data indicate that the adhesion strengthening and spreading steps of $\alpha 4\beta 1$ -mediated T cell adhesion following stimulation by chemokines are targeted by RGS10 activity.

Control by RGS10 of $\alpha 4\beta 1$ -dependent T cell adhesion involves regulation of Vav1-Rac1 activation

Activation by chemokines of the Vav1-Rac1 pathway is required for $\alpha 4\beta 1$ -mediated T cell adhesion strengthening (31). RGS10-depleted Molt-4 cells displayed a more sustained Vav1 tyrosine phosphorylation and Rac1 activation in response to CXCL12 than did control siRNA transfectants (Fig. 5A). On the contrary, RGS10 overexpression led to reduced Vav1 phosphorylation levels and to a decrease in Rac1 activation compared with findings in control transfectants (Fig. 5B). As also shown before (31), Rac1 silencing completely abolished CXCL12-stimulated Molt-4 cell adhesion to VCAM-1 (Supplemental Fig. 1). Remarkably, reduction in CXCL12-stimulated adhesion to VCAM-1 in cells overexpressing RGS10 was rescued by coexpression of GFP-fused active Rac1 (V12), under both static and flow conditions (Fig. 5C, 5D). These data indicate that control of Vav1-Rac1 activation by RGS10 in chemokine-dependent signaling underlies the regulation of $\alpha 4\beta 1$ -mediated T cell adhesion by RGS10.

Rap1 activation in response to CXCL12 was only minimally increased at 2.5 min in RGS10 knockdown cells compared with control transfectants (Fig. 5E, left panel), whereas longer incubations with the chemokine caused no changes in Rap1 activation between these transfectants (not shown). In addition, Rap1 depletion led to partial (40%) inhibition of CXCL12-stimulated Molt-4 cell adhesion to VCAM-1 (Fig. 5E, right panel).

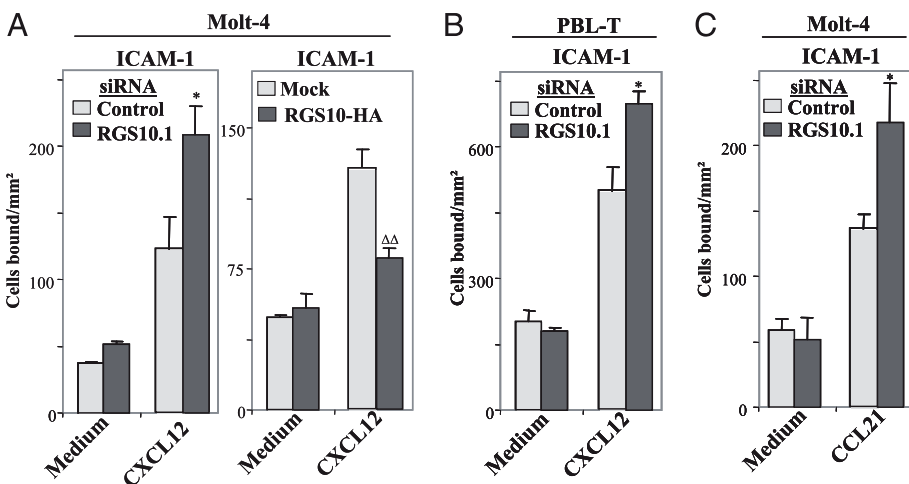


FIGURE 3. RGS10 regulates $\alpha L\beta 2$ -dependent T cell adhesion in response to chemokines. The indicated Molt-4 or PBL-T control or RGS10 siRNA transfectants, or cells overexpressing RGS10 (RGS10-HA), were tested in adhesion assays to ICAM-1 coimmobilized with or without CXCL12 (*A*, *B*) or CCL21 (*C*). Adhesions were significantly stimulated in comparison with chemokine-stimulated control siRNA transfectants, * $p < 0.05$, or significantly inhibited, $\Delta\Delta p < 0.01$.

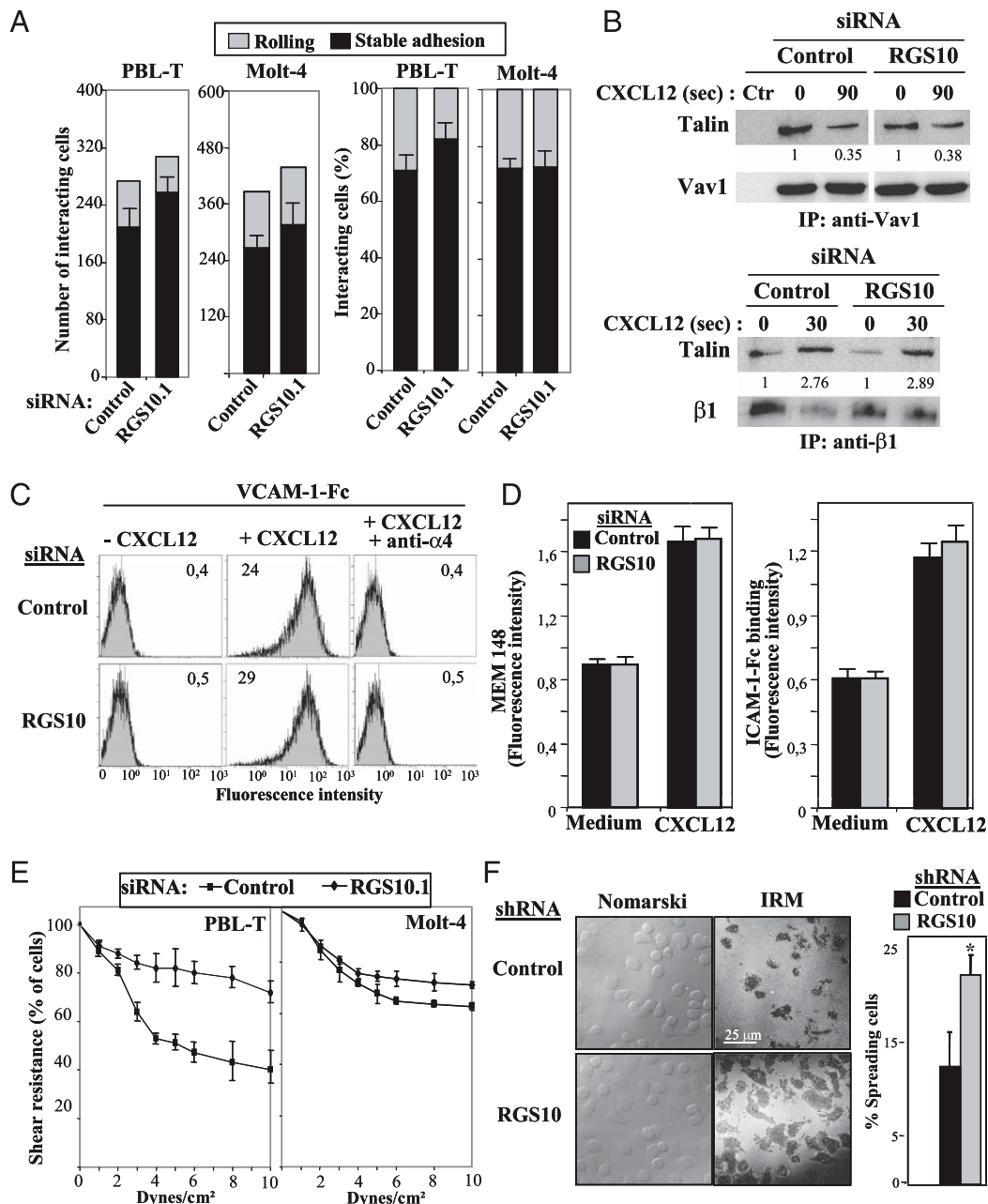


FIGURE 4. RGS10-depleted T cells show increased adhesion strengthening and spreading on VCAM-1. *A*, PBL-T or Molt-4 cells transfected with control or RGS10 siRNA were perfused in flow chambers coated with VCAM-1 immobilized with CXCL12, and analyzed for rolling and stable cell arrest ($n = 4$). Data are presented as mean \pm SD of number of interacting cells or cell percentages from the total cell population either rolling, or rolling and subsequently stably sticking. *B*, Molt-4 siRNA transfectants were subjected to immunoprecipitation with anti-Vav1, anti- $\beta 1$, or Ctr Abs, followed by Western blotting with Abs to the indicated proteins. Numbers under gel represent densitometer analyses in arbitrary units. *C*, Control or RGS10 siRNA Molt-4 transfectants were analyzed for binding of VCAM-1-Fc following stimulation with CXCL12. *D*, The same transfectants were incubated with or without CXCL12 and tested for MEM-148 anti- $\beta 2$ mAb, or for ICAM-1-Fc binding. *E*, Control or RGS10 siRNA PBL-T or Molt-4 transfectants attached on immobilized VCAM-1 and CXCL12 in flow chambers were subjected to cell detachment after increasing shear stress. Data show mean \pm SD of cell percentages from the initial number of bound cells remaining attached at the indicated shear stresses. *F*, Control or RGS10 shRNA transfectants were allowed to attach to VCAM-1 immobilized with CXCL12, and spreading was analyzed by Nomarski or by IRM. Percentage of cell spreading was determined from a significant number of cells from different fields of view ($n = 2500$ – 3000). Spreading was significantly stimulated. * $p < 0.05$. Ctr, control; IRM, interference reflection microscopy.

Therefore, these results indicate that a major consequence of RGS10 actions is the limitation of Vav1–Rac1 activation by chemokines, which then results in reduction in $\alpha 4\beta 1$ -dependent T cell attachment.

RGS10 regulates T cell chemotaxis and *cdc42* activation

Finally, we investigated whether RGS10 is capable of controlling T cell responses to chemokines other than cell adhesion. Che-

motaxis to CXCL12 of RGS10 knockdown Molt-4 transfectants was significantly higher than that of control siRNA counterparts, whereas cells overexpressing RGS10 migrated clearly less than mock transfectants (Fig. 6A). In addition, RGS10 silencing led to sustained *cdc42* activation in response to CXCL12 (Fig. 6B), whereas no substantial alterations were detected for RhoA activation (Fig. 6C). Phosphorylation of the Erk1/2 MAPK was only modestly increased in RGS10 knockdown cells (Fig. 6D), and no

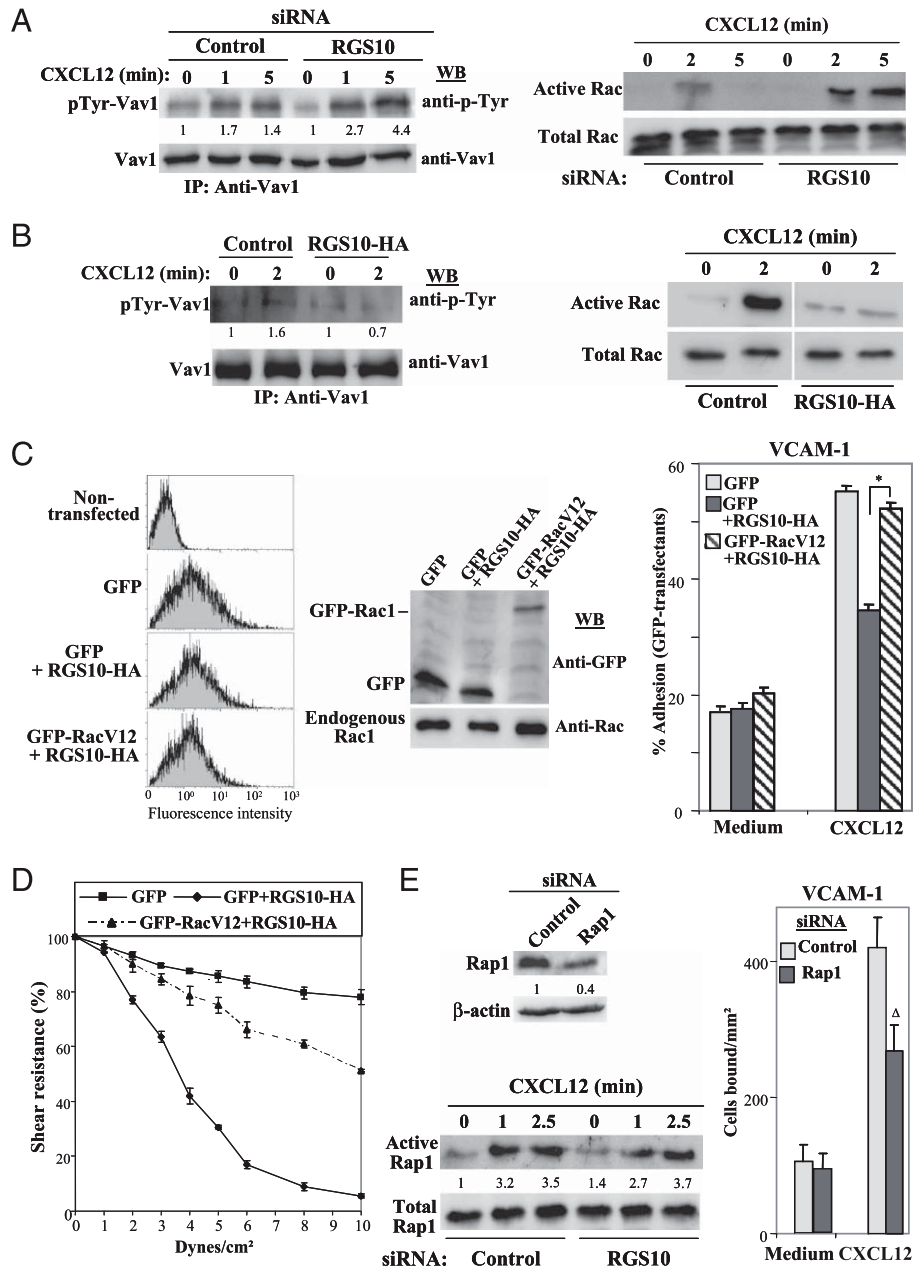


FIGURE 5. RGS10-dependent control of chemokine-stimulated, $\alpha 4\beta 1$ -mediated adhesion is associated with regulated activation of the Vav1–Rac1 pathway. *A*, Control or RGS10 siRNA Molt-4 transfectants were incubated with CXCL12 for the indicated times, and subsequently subjected to immunoprecipitation with control or anti-Vav1 Abs, followed by immunoblotting with the indicated Abs (*left*), or tested in Rac GTPase assays (*right*). *B*, Molt-4 cells were transfected with empty vector (Mock) or with RGS10-HA, and transfectants were analyzed as in *A*. *C*, Molt-4 cells were left untransfected, or were transfected either with GFP vector alone, or with GFP or GFP-RacV12 vectors together with the RGS10-HA plasmid. Cells were then analyzed by flow cytometry for GFP expression (*left*), examined by Western blotting with the indicated Abs (*middle*), or subjected to static adhesion assays to VCAM-1 immobilized with or without CXCL12 (*right*). Adhesion was significantly rescued. * $p < 0.05$. *D*, The same GFP transfectants were tested in flow chambers for cell detachment after increasing shear stress. Data show mean \pm SD of cell percentages from the initial number of bound cells remaining attached at the indicated shear stresses. *E*, Control or Rap1 siRNA transfectants were analyzed by immunoblotting or were tested in adhesion assays to VCAM-1 immobilized with or without CXCL12. Adhesion was significantly inhibited. $\Delta p < 0.05$.

changes in the activation of the PI3K downstream effector Akt were observed (not shown). Furthermore, RGS10 depletion did not significantly affect Ca^{2+} mobilization triggered by CXCL12 (Fig. 6E). Thus, RGS10 is capable of regulating not only $\alpha 4\beta 1$ - and $\alpha L\beta 2$ -dependent T cell adhesion but also migration and activation of specific signaling pathways.

Discussion

Lymphocyte extravasation at sites of tissue injury or at lymphoid organs depends on chemokine-activated adhesion mediated by $\alpha 4\beta 1$ and $\alpha L\beta 2$ integrins (8, 9). This activation must be rapid to deliver tight cell attachment to resist the blood shear stress, but also transient to allow lymphocyte locomotion and diapedesis across endothelial layers. The chemokine-dependent integrin activation step in lymphocytes requires an inside-out signaling that impinges on the integrin β subunit cytoplasmic domains, a key event for transmitting conformational changes to the extracellular regions that leads to increase in integrin affinity (11). Talin and kindlins are recipients of this inside-out signaling, which promotes

their binding to the β cytoplasmic domains, finally stimulating the transition to high-affinity $\alpha 4\beta 1$ and $\alpha L\beta 2$ conformations (10–12).

The transient nature of integrin activation by chemokines indicates that an active molecular machinery limits and ultimately inhibits the signaling stimulated following $G\alpha$ -coupled chemokine receptor interaction with their ligands. To limit and terminate this signaling, cells use several mechanisms, including the action of RGS proteins, which accelerate the GTPase activity of $G\alpha$ subunits (19, 21). In this work, we show that RGS10 opposes the chemokine-stimulated signaling that is needed for T cell adhesion mediated by $\alpha 4\beta 1$ and $\alpha L\beta 2$. Thus, upregulation of adhesion to $\alpha 4\beta 1$ and $\alpha L\beta 2$ ligands in response to CXCL12 and CCL21 was significantly stronger in RGS10-depleted cells than in control transfectants. On the contrary, when RGS10 was overexpressed, stimulation of adhesion by these chemokines was limited. RGS10 transiently associated to $G\alpha_i$ in T cells following exposure to CXCL12, and pertussis toxin blocked chemokine-upregulated adhesion to VCAM-1 of both control and RGS10-silenced cells,

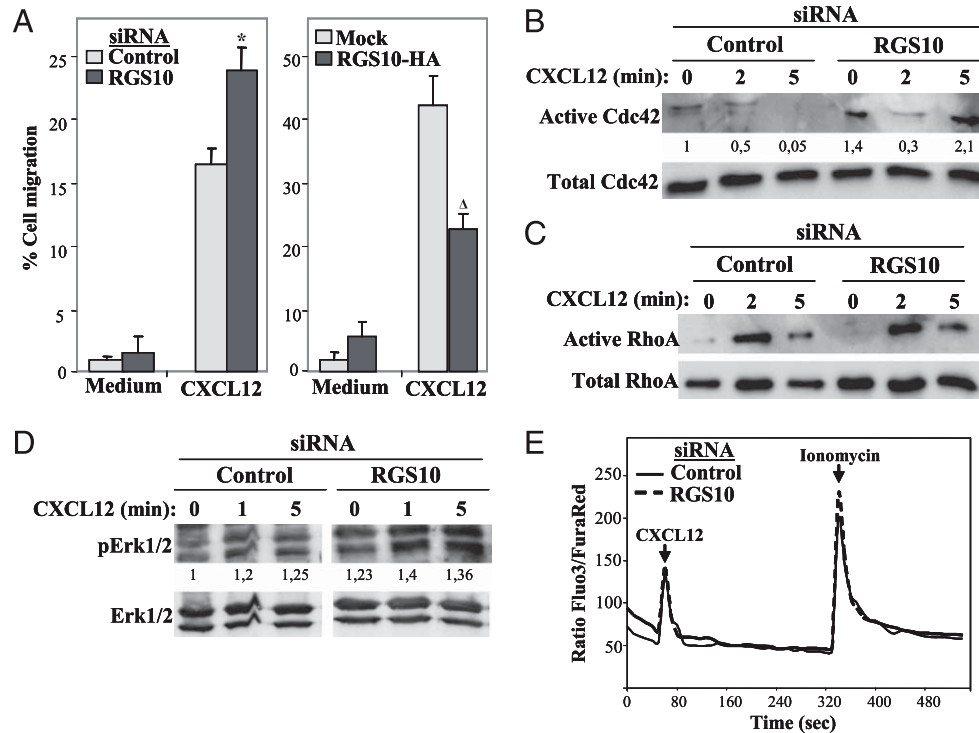


FIGURE 6. RGS10 controls chemokine-triggered T cell chemotaxis and cdc42 activation. *A*, Molt-4 cells were transfected with control or RGS10 siRNA (left) or with mock or RGS10-HA vectors (right), and subsequently subjected to chemotaxis toward CXCL12. Chemotaxis was significantly upregulated (*) or inhibited (Δ), $p < 0.05$. *B–D*, Control or RGS10 siRNA transfectants were subjected to cdc42 (*B*) or RhoA GTPase (*C*) assays, or tested by immunoblotting for Erk1/2 and phospho-Erk1/2 expression levels (*D*). *E*, Control or RGS10 siRNA transfectants were subjected to Ca^{2+} mobilization experiments in response to CXCL12 (200 ng/ml).

suggesting that RGS10 is inhibiting the adhesion mediated by $\alpha 4\beta 1$ by repressing $G\alpha_i$ -dependent signaling.

Flow chamber adhesion experiments that measure rapid firm cell attachment under shear stress revealed that RGS10 silencing caused only moderate and statistically nonsignificant increases in T cell firm arrest to VCAM-1 following the rolling step. Moreover, chemokine-stimulated increase in talin- $\beta 1$ association, an early event leading to high-affinity $\alpha 4\beta 1$ that is competent for VCAM-1 binding and that is linked with Vav1-talin dissociation (13), was not altered by RGS10 depletion. Correlating with this observation, binding of soluble VCAM-1-Fc, as well as interaction of ICAM-1-Fc with $\alpha L\beta 2$, was comparable in control and RGS10 knock-down T cells. In addition, generation of $\alpha L\beta 2$ high-affinity states was not affected by RGS10 depletion. Instead, chemokine-stimulated Rac1 activation, a process taking place during the strengthening of adhesion after the integrin activation step (31), was longer sustained and of higher intensity in RGS10-silenced cells, or inhibited in cells overexpressing RGS10. Of importance, expression of constitutively activated Rac1 forms in cells overexpressing RGS10 led to the rescue of CXCL12-stimulated adhesion to VCAM-1 to levels similar to those in control transfectants. The regulation of Rac1 activation by RGS10 was most likely a consequence of RGS10-dependent control of Vav1 tyrosine phosphorylation, as it was increased or decreased in cells silenced or overexpressing RGS10, respectively. At present, we have not experimentally addressed the mechanisms underlying the control by RGS10 of Vav1 phosphorylation by CXCL12, but on the basis of published work, it is possible that RGS10 might control the duration and/or intensity of $G\alpha_i$ -dependent activation of the ZAP-70 kinase in response to CXCL12 (38, 39). Therefore, these results strongly suggest that RGS10 actions mostly oppose the Vav1-Rac1-dependent adhesion strengthening and spreading steps of $\alpha 4\beta 1$ -mediated T cell adhesion triggered by chemokines,

with no or minor involvement of RGS10 in the initial integrin activation phases.

VCAM-1 binding triggered by chemokines is inhibited in T cells silenced for Vav1 or talin, owing to the requirement of a preformed Vav1-talin complex for $\alpha 4\beta 1$ activation (13). This activation step is optimally achieved following increase in talin binding to $\alpha 4\beta 1$ upon chemokine-promoted Vav1-talin disassembly involving Vav1 tyrosine phosphorylation by ZAP-70. The fact that phosphorylation of Vav1 is of higher intensity in RGS10-depleted than control cells, without further increase in talin- $\beta 1$ binding, suggests a more sustained $G\alpha_i$ -dependent activation in cells silenced for RGS10, with no alterations in the rapid and earlier $\alpha 4\beta 1$ activation.

Rap1 activation has been reported to mediate chemokine-promoted, integrin-dependent T cell adhesion (14, 40, 41). We found that Rap1 silencing partially (40%) affects CXCL12-stimulated T cell adhesion to VCAM-1. However, our results indicated that Rap1 activation by CXCL12 was not significantly altered in RGS10 knockdown T cells, suggesting minor roles for Rap1 in mediating the increased adhesion seen in RGS10 knock-down cells.

In addition to repressing chemokine-upregulated T cell adhesion dependent on $\alpha 4\beta 1$ and $\alpha L\beta 2$, RGS10 also inhibited adhesion-independent cell chemotaxis and cdc42 activation in response to CXCL12. The mechanisms underlying the control by RGS10 of these two processes has not been addressed in the current study, but they also likely involve termination of $G\alpha_i$ -dependent activation of downstream signaling.

The following model can be proposed from present and earlier data. Chemokine binding to their receptors triggers $G\alpha_i$ -dependent signaling that leads to changes in molecular associations between Vav1, talin, and $\beta 1$, resulting in early $\alpha 4\beta 1$ activation (13), but also promotes $G\alpha_i$ association with RGS10. Although the initial steps of adhesion are not targeted following RGS10- $G\alpha_i$ associ-

ation, the consequence of the assembly of this complex may well be the gradual termination of Vav1–Rac1 activation that triggers chemokine-upregulated strengthening of the adhesion mediated by $\alpha 4\beta 1$.

Other RGS proteins, such as RGS2, RGS3, RGS4, RGS14, and RGS16, have been reported to be expressed in T cells, either resting or activated (23–27). Therefore, it could be speculated that some of them might contribute together with RGS10 to the inhibition of chemokine-stimulated, $\alpha 4\beta 1$ - and $\alpha L\beta 2$ -dependent T cell adhesion. Thus, an early work showed that overexpression of RGS1, RGS3, and RGS4 in a pre-B cell line led to reduced adhesion to VCAM-1 following chemoattractant activation (42). In addition, overexpression of RGS16 results in inhibition of CXCL12-induced migration and MAPK and Akt activation in the progenitor Mo7e model cell line (43). Furthermore, RGS1 and RGS3 inhibit CXCL12-triggered B cell chemotaxis (44). Therefore, RGS protein function in lymphoid cells appears to be highly relevant for physiological termination of chemokine signals that control important processes such as cell adhesion and migration, as well as cell activation.

Not only do RGS proteins associate to G α subunits and accelerate their GTPase activity, but they are also capable of acting as effector antagonists by competing with effector molecules for GTP-bound G α subunits, and they can also directly interact with effectors (21, 45, 46). For instance, RGS2 binds adenylyl cyclase (47), and RGS4 interacts with phospholipase C β and phosphatidic acid (48, 49). In addition, RGS14 binds activated H-Ras forms, as well as Raf kinases (50, 51), and regulates their subcellular localization and activities. RGS10 belongs to the same D/R12 subfamily of RGS14, but nevertheless it lacks the RBD domains responsible for binding to active H-Ras. In future work, it will be important to determine whether structural and/or functional relationships exist between RGS10 and the molecular signaling required for chemokine-stimulated T cell adhesion mediated by $\alpha 4\beta 1$.

Acknowledgments

We thank Drs. José Miguel Rodríguez-Frade and Pedro Lastres for help in flow chamber and flow cytometry experiments and Centro de Transfusiones de la Comunidad de Madrid for providing buffy coats. We also thank Dr. Carlo Laudanna for helpful comments.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

- Rossi, D., and A. Zlotnik. 2000. The biology of chemokines and their receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 18: 217–242.
- Proudfoot, A. E. 2002. Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets. *Nat. Rev. Immunol.* 2: 106–115.
- Allen, S. J., S. E. Crown, and T. M. Handel. 2007. Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu. Rev. Immunol.* 25: 787–820.
- Campbell, D. J., C. H. Kim, and E. C. Butcher. 2003. Chemokines in the systemic organization of immunity. *Immunol. Rev.* 195: 58–71.
- Rot, A., and U. H. von Andrian. 2004. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokines grammar for immune cells. *Annu. Rev. Immunol.* 22: 891–928.
- Charo, I. F., and R. M. Ransohoff. 2006. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N. Engl. J. Med.* 354: 610–621.
- Thelen, M., and J. V. Stein. 2008. How chemokines invite leukocytes to dance. *Nat. Immunol.* 9: 953–959.
- Luster, A. D., R. Alon, and U. H. von Andrian. 2005. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat. Immunol.* 6: 1182–1190.
- Ley, K., C. Laudanna, M. I. Cybulsky, and S. Nourshargh. 2007. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat. Rev. Immunol.* 7: 678–689.
- Tadokoro, S., S. J. Shattil, K. Eto, V. Tai, R. C. Liddington, J. M. de Pereda, M. H. Ginsberg, and D. A. Calderwood. 2003. Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation. *Science* 302: 103–106.
- Shattil, S. J., C. Kim, and M. H. Ginsberg. 2010. The final steps of integrin activation: the end game. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11: 288–300.
- Moser, M., M. Bauer, S. Schmid, R. Ruppert, S. Schmidt, M. Sixt, H. V. Wang, M. Sperandio, and R. Fässler. 2009. Kindlin-3 is required for beta2 integrin-mediated leukocyte adhesion to endothelial cells. *Nat. Med.* 15: 300–305.
- García-Bernal, D., M. Pardo-Cabañas, A. Dios-Esponera, R. Samaniego, D. Hernán-P de la Ossa, and J. Teixidó. 2009. Chemokine-induced Zap70 kinase-mediated dissociation of the Vav1-talin complex activates alpha4beta1 integrin for T cell adhesion. *Immunity* 31: 953–964.
- Shimonaka, M., K. Katagiri, T. Nakayama, N. Fujita, T. Tsuruo, O. Yoshie, and T. Kinashi. 2003. Rap1 translates chemokine signals to integrin activation, cell polarization, and motility across vascular endothelium under flow. *J. Cell Biol.* 161: 417–427.
- Katagiri, K., N. Ohnishi, K. Kabashima, T. Iyoda, N. Takeda, Y. Shinkai, K. Inaba, and T. Kinashi. 2004. Crucial functions of the Rap1 effector molecule RAPL in lymphocyte and dendritic cell trafficking. *Nat. Immunol.* 5: 1045–1051.
- Offermanns, S. 2001. In vivo functions of heterotrimeric G-proteins: studies in Galpha-deficient mice. *Oncogene* 20: 1635–1642.
- Neves, S. R., P. T. Ram, and R. Iyengar. 2002. G protein pathways. *Science* 296: 1636–1639.
- Pierce, K. L., R. T. Premont, and R. J. Lefkowitz. 2002. Seven-transmembrane receptors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3: 639–650.
- Kehrl, J. H. 1998. Heterotrimeric G protein signaling: roles in immune function and fine-tuning by RGS proteins. *Immunity* 8: 1–10.
- Hollinger, S., and J. R. Hepler. 2002. Cellular regulation of RGS proteins: modulators and integrators of G protein signaling. *Pharmacol. Rev.* 54: 527–559.
- Willars, G. B. 2006. Mammalian RGS proteins: multifunctional regulators of cellular signalling. *Semin. Cell Dev. Biol.* 17: 363–376.
- Druey, K. M. 2009. Regulation of G-protein-coupled signaling pathways in allergic inflammation. *Immunol. Res.* 43: 62–76.
- Heximer, S. P., A. D. Cristillo, and D. R. Forsdyke. 1997. Comparison of mRNA expression of two regulators of G-protein signaling, RGS1/BL34/1R20 and RGS2/GOS8, in cultured human blood mononuclear cells. *DNA Cell Biol.* 16: 589–598.
- Scheschonka, A., C. W. Dessauer, S. Sinnarajah, P. Chidiac, C. S. Shi, and J. H. Kehrl. 2000. RGS3 is a GTPase-activating protein for g(alpha) and g(qalpha) and a potent inhibitor of signaling by GTPase-deficient forms of g(qalpha) and g(11alpha). *Mol. Pharmacol.* 58: 719–728.
- Sato, K., H. Kawasaki, C. Morimoto, N. Yamashima, and T. Matsuyama. 2002. An abortive ligand-induced activation of CCR1-mediated downstream signaling event and a deficiency of CCR5 expression are associated with the hyporesponsiveness of human naive CD4+ T cells to CCL3 and CCL5. *J. Immunol.* 168: 6263–6272.
- Cho, H., T. Kozasa, K. Takekoshi, J. De Gunzburg, and J. H. Kehrl. 2000. RGS14, a GTPase-activating protein for G12alpha, attenuates G12alpha- and G13alpha-mediated signaling pathways. *Mol. Pharmacol.* 58: 569–576.
- Beadling, C., K. M. Druey, G. Richter, J. H. Kehrl, and K. A. Smith. 1999. Regulators of G protein signaling exhibit distinct patterns of gene expression and target G protein specificity in human lymphocytes. *J. Immunol.* 162: 2677–2682.
- Hunt, T. W., T. A. Fields, P. J. Casey, and E. G. Peralta. 1996. RGS10 is a selective activator of G alpha i GTPase activity. *Nature* 383: 175–177.
- Gold, S. J., Y. G. Ni, H. G. Dohlman, and E. J. Nestler. 1997. Regulators of G-protein signaling (RGS) proteins: region-specific expression of nine subtypes in rat brain. *J. Neurosci.* 17: 8024–8037.
- Burgon, P. G., W. L. Lee, A. B. Nixon, E. G. Peralta, and P. J. Casey. 2001. Phosphorylation and nuclear translocation of a regulator of G protein signaling (RGS10). *J. Biol. Chem.* 276: 32828–32834.
- García-Bernal, D., N. Wright, E. Sotillo-Mallo, C. Nombela-Arrieta, J. V. Stein, X. R. Bustelo, and J. Teixidó. 2005. Vav1 and Rac control chemokine-promoted T lymphocyte adhesion mediated by the integrin alpha4beta1. *Mol. Biol. Cell* 16: 3223–3235.
- Brummelkamp, T. R., R. Bernards, and R. Agami. 2002. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296: 550–553.
- García-Bernal, D., E. Sotillo-Mallo, C. Nombela-Arrieta, R. Samaniego, Y. Fukui, J. V. Stein, and J. Teixidó. 2006. DOCK2 is required for chemokine-promoted human T lymphocyte adhesion under shear stress mediated by the integrin alpha4beta1. *J. Immunol.* 177: 5215–5225.
- Sanz-Rodríguez, F., A. Hidalgo, and J. Teixidó. 2001. Chemokine stromal cell-derived factor-1alpha modulates VLA-4 integrin-mediated multiple myeloma cell adhesion to CS-1/fibronectin and VCAM-1. *Blood* 97: 346–351.
- Stein, J. V., A. Rot, Y. Luo, M. Narasimhaswamy, H. Nakano, M. D. Gunn, A. Matsuzawa, E. J. Quackenbush, M. E. Dorf, and U. H. von Andrian. 2000. The CC chemokine thymus-derived chemotactic agent 4 (TCA-4), secondary lymphoid tissue chemokine, 6CKine, exodus-2) triggers lymphocyte function-associated antigen 1-mediated arrest of rolling T lymphocytes in peripheral lymph node high endothelial venules. *J. Exp. Med.* 191: 61–76.
- Stein, J. V., S. F. Soriano, C. M'rimi, C. Nombela-Arrieta, G. G. de Buitrago, J. M. Rodríguez-Frade, M. Mellado, J. P. Girard, and C. Martínez-A. 2003. CCR7-mediated physiological lymphocyte homing involves activation of a tyrosine kinase pathway. *Blood* 101: 38–44.
- Tang, R. H., E. Tng, S. K. Law, and S. M. Tan. 2005. Epitope mapping of monoclonal antibody to integrin alphaL beta2 hybrid domain suggests different requirements of affinity states for intercellular adhesion molecules (ICAM)-1 and ICAM-3 binding. *J. Biol. Chem.* 280: 29208–29216.
- Otton, N. C., J. T. Pribila, A. S. Chan, and Y. Shimizu. 2001. Cutting edge: T cell migration regulated by CXCR4 chemokine receptor signaling to ZAP-70 tyrosine kinase. *J. Immunol.* 167: 1857–1861.

39. Ticchioni, M., C. Charvet, N. Noraz, L. Lamy, M. Steinberg, A. Bernard, and M. Deckert. 2002. Signaling through ZAP-70 is required for CXCL12-mediated T-cell transendothelial migration. *Blood* 99: 3111–3118.
40. Ghandour, H., X. Cullere, A. Alvarez, F. W. Luscinskas, and T. N. Mayadas. 2007. Essential role for Rap1 GTPase and its guanine exchange factor CalDAG-GEFI in LFA-1 but not VLA-4 integrin mediated human T-cell adhesion. *Blood* 110: 3682–3690.
41. Bos, J. L. 2005. Linking Rap to cell adhesion. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17: 123–128.
42. Bowman, E. P., J. J. Campbell, K. M. Druey, A. Scheschonka, J. H. Kehrl, and E. C. Butcher. 1998. Regulation of chemotactic and proadhesive responses to chemoattractant receptors by RGS (regulator of G-protein signaling) family members. *J. Biol. Chem.* 273: 28040–28048.
43. Berthebaud, M., C. Rivière, P. Jarrier, A. Foudi, Y. Zhang, D. Compagno, A. Galy, W. Vainchenker, and F. Louache. 2005. RGS16 is a negative regulator of SDF-1-CXCR4 signaling in megakaryocytes. *Blood* 106: 2962–2968.
44. Reif, K., and J. G. Cyster. 2000. RGS molecule expression in murine B lymphocytes and ability to down-regulate chemotaxis to lymphoid chemokines. *J. Immunol.* 164: 4720–4729.
45. Abramow-Newerly, M., A. A. Roy, C. Nunn, and P. Chidiac. 2006. RGS proteins have a signalling complex: interactions between RGS proteins and GPCRs, effectors, and auxiliary proteins. *Cell. Signal.* 18: 579–591.
46. Neitzel, K. L., and J. R. Hepler. 2006. Cellular mechanisms that determine selective RGS protein regulation of G protein-coupled receptor signaling. *Semin. Cell Dev. Biol.* 17: 383–389.
47. Salim, S., S. Sinnarajah, J. H. Kehrl, and C. W. Dessauer. 2003. Identification of RGS2 and type V adenylyl cyclase interaction sites. *J. Biol. Chem.* 278: 15842–15849.
48. Chidiac, P., M. E. Gadd, and J. R. Hepler. 2002. Measuring RGS protein interactions with Gq alpha. *Methods Enzymol.* 344: 686–702.
49. Ouyang, Y. S., Y. Tu, S. A. Barker, and F. Yang. 2003. Regulators of G-protein signaling (RGS) 4, insertion into model membranes and inhibition of activity by phosphatidic acid. *J. Biol. Chem.* 278: 11115–11122.
50. Willard, F. S., M. D. Willard, A. J. Kimple, M. Soundararajan, E. A. Oestreich, X. Li, N. A. Sowa, R. J. Kimple, D. A. Doyle, C. J. Der, et al. 2009. Regulator of G-protein signaling 14 (RGS14) is a selective H-Ras effector. *PLoS ONE* 4: e4884.
51. Shu, F. J., S. Ramineni, and J. R. Hepler. 2010. RGS14 is a multifunctional scaffold that integrates G protein and Ras/Raf MAPkinase signalling pathways. *Cell. Signal.* 22: 366–376.

Anexos IV

Sphingosine-1-phosphate activates chemokine-promoted myeloma cell adhesion and migration involving $\alpha 4\beta 1$ integrin function

David García-Bernal,^{1#} Javier Redondo-Muñoz,^{1#} Ana Dios-Esponera,¹ Raphaël Chèvre,² Elvira Bailón,¹ Mercedes Garayoa,³ Nohemí Arellano-Sánchez,¹ Norma C Gutierrez,⁴ Andrés Hidalgo,² Angeles García-Pardo¹ and Joaquin Teixidó^{1*}

¹ Cellular and Molecular Medicine Programme, Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Madrid, Spain

² Department of Epidemiology, Atherothrombosis and Cardiovascular Imaging, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC), Madrid, Spain

³ Department of Haematology, Centro de Investigación del Cáncer, Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer (CSIC), Salamanca, Spain

⁴ Department of Haematology, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, Spain

*Correspondence to: Joaquin Teixidó, Centro de Investigaciones Biológicas, Cellular and Molecular Medicine Program, Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain. e-mail: joaquin@icb.csic.es

#These authors contributed equally to this study.

Abstract

Myeloma cell adhesion dependent on $\alpha 4\beta 1$ integrin is crucial for the progression of multiple myeloma (MM). The $\alpha 4\beta 1$ -dependent myeloma cell adhesion is up-regulated by the chemokine CXCL12, and pharmacological blockade of the CXCL12 receptor CXCR4 leads to defective myeloma cell homing to bone marrow (BM). Sphingosine-1-phosphate (S1P) regulates immune cell trafficking upon binding to G-protein-coupled receptors. Here we show that myeloma cells express S1P1, a receptor for S1P. We found that S1P up-regulated the $\alpha 4\beta 1$ -mediated myeloma cell adhesion and transendothelial migration stimulated by CXCL12. S1P promoted generation of high-affinity $\alpha 4\beta 1$ that efficiently bound the $\alpha 4\beta 1$ ligand VCAM-1, a finding that was associated with S1P-triggered increase in talin- $\beta 1$ integrin association. Furthermore, S1P cooperated with CXCL12 for enhancement of $\alpha 4\beta 1$ -dependent adhesion strengthening and spreading. CXCL12 and S1P activated the DOCK2-Rac1 pathway, which was required for stimulation of myeloma cell adhesion involving $\alpha 4\beta 1$. Moreover, *in vivo* analyses indicated that S1P contributes to optimizing the interactions of MM cells with the BM microvasculature and for their lodging inside the bone marrow. The regulation of $\alpha 4\beta 1$ -dependent adhesion and migration of myeloma cells by CXCL12-S1P combined activities might have important consequences for myeloma disease progression.

Copyright © 2012 Pathological Society of Great Britain and Ireland. Published by John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: multiple myeloma; chemokines; cell adhesion and migration; integrins; bone marrow; signalling

Received 17 February 2012; Revised 14 May 2012; Accepted 12 June 2012

No conflicts of interest were declared.

Introduction

In multiple myeloma (MM), malignant plasma cells home to and accumulate in different niches within the bone marrow (BM) microenvironment [1–3]. The chemokine-receptor axis CXCL12–CXCR4 and the integrins $\alpha 4\beta 1$ and $\alpha 5\beta 1$ have been proposed to mediate myeloma cell trafficking to the BM [4,5]. The *in vivo* relevance of CXCL12–CXCR4 in MM is highlighted by the fact that the CXCR4 inhibitor AMD3100 impairs homing of myeloma cells by disrupting their interaction with the BM microenvironment [6,7]. CXCL12 binding to CXCR4 triggers inside-out signalling, leading to $\alpha 4\beta 1$ - and $\alpha 5\beta 1$ -dependent stimulation of myeloma cell adhesion [4]. $\alpha 4\beta 1$ -mediated myeloma cell adhesion is crucial for

MM progression *in vivo*, as anti- $\alpha 4$ antibodies inhibit this adhesion and the development of MM and associated osteolysis [8,9]. Moreover, cell adhesion-mediated drug resistance in MM involves $\alpha 4\beta 1$ activity [10,11].

Sphingosine-1-phosphate (S1P) is a lipid, produced during sphingolipid turnover, that is generated by sphingosine kinase-catalysed phosphorylation of sphingosine [12–14] and dephosphorylated by S1P phosphatases or degraded by S1P lyases [14]. S1P is found in plasma and lymph, mainly produced by red blood cells and by the lymphatic endothelium [15–17]. The five S1P receptors (S1P1–S1P5) belong to the G protein-coupled receptor family and, among them, S1P1 controls lymphocyte egress from the thymus, spleen and lymph nodes (LNs) [16,18–24] as well as plasma cell egress from LNs [25]. The first clues