

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA**



TESIS DOCTORAL

Papel regulador de Slingshot-1 en la activación de linfocitos T

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Rocío Ramírez Muñoz

Director

Pedro Roda Navarro

Madrid, 2018

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE
MADRID
FACULTAD DE MEDICINA**



TESIS DOCTORAL

**Papel regulador de Slingshot-1 en la
activación de linfocitos T**

ROCÍO RAMÍREZ MUÑOZ

**Director
Dr. Pedro Roda Navarro**

Madrid, 2017

ÍNDICE



ÍNDICE

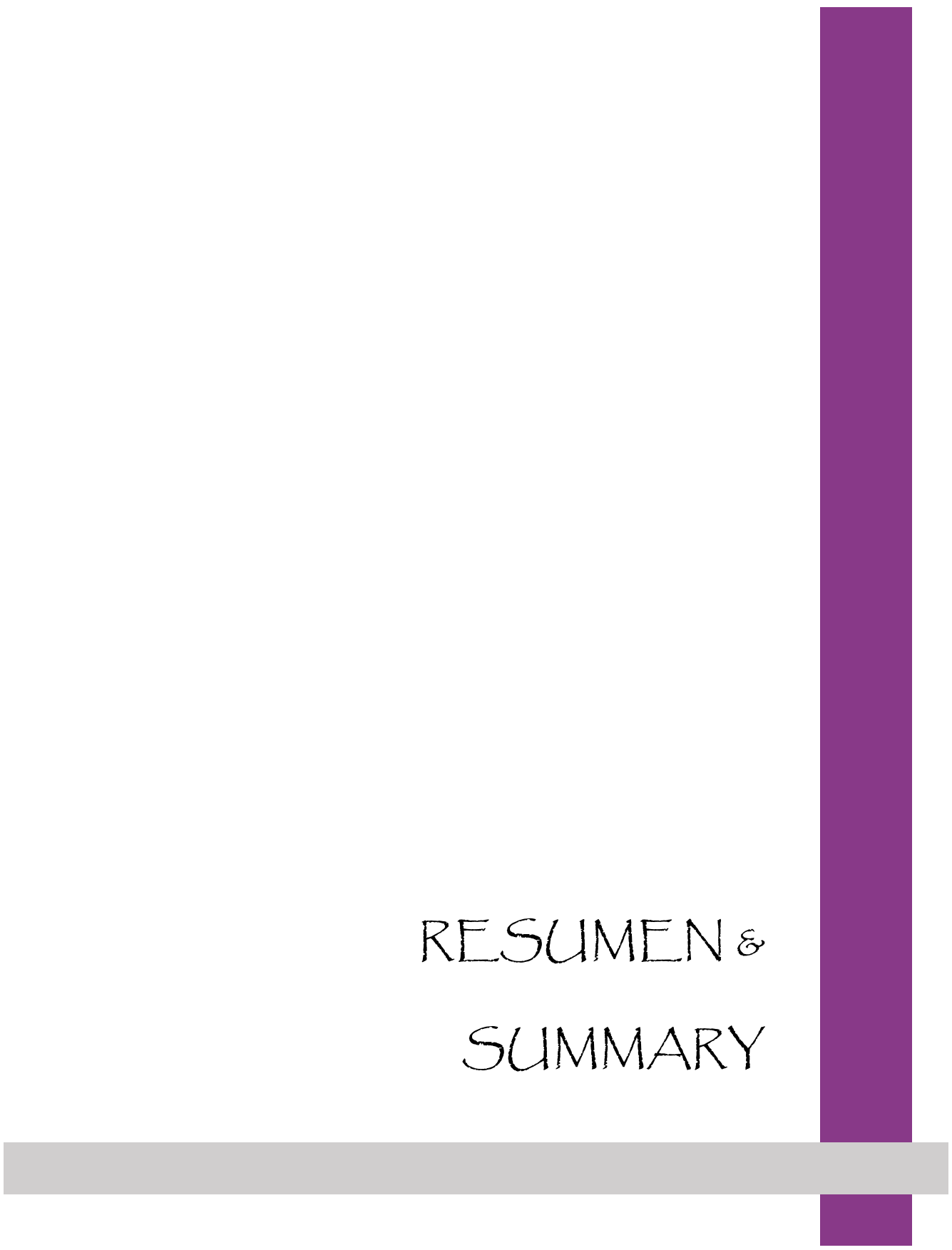
RESUMEN & SUMMARY.....	5
ABREVIATURAS.....	15
INTRODUCCIÓN	21
1.1. Activación del linfocito T	23
1.1.1. La sinapsis inmunológica.....	23
1.2. Estructura y regulación del citoesqueleto de actina.....	27
1.2.1. Papel del citoesqueleto de actina en la activación T	28
1.2.2. Papel del citoesqueleto de actina en la migración celular.....	29
1.3. Proteínas de unión a actina: la familia de las cofilinas	31
1.3.1. Mecanismo de acción.....	31
1.3.2. Regulación de la actividad de cofilina	33
1.3.3. Cofilina en la migración celular	36
1.3.4. Cofilina en la activación linfocitaria	37
1.4. <i>Slingshots</i>	38
1.4.1. Estructura	39
1.4.2. Actividad y unión a actina	40
1.4.3. Regulación	41
1.4.4. SSHs en la migración celular.....	44
1.4.5. SSHs en la activación de células T	45
1.5. Respuestas de ultrasensibilidad y biestabilidad	45
1.5.1. Posibles mecanismos de ultrasensibilidad en el módulo de cofilina	47

OBJETIVOS.....	49
MATERIALES Y MÉTODOS	53
3.1. Anticuerpos.....	55
3.2. Líneas y cultivo celular	56
3.3. Citometría de flujo	57
3.4. Aislamiento y expansión de células primarias humanas.....	58
3.4.1. Expansión de linfocitos CD4 ⁺ humanos.....	58
3.4.2. Expansión de linfocitos CD8 ⁺ humanos.....	58
3.4.3. Purificación o aislamiento de células CD8 ⁺ humanas	58
3.4.4. Aislamiento de linfocitos CD4 ⁺ totales humanos.....	58
3.5. Manejo de ratones y aislamiento y cultivo de células de ratón	59
3.6. Generación de plásmidos	59
3.6.1. Mutagénesis dirigida	60
3.7. Transfección.....	61
3.7.1. Electroporación	61
3.7.2. Nucleofección.....	61
3.8. qPCR.....	62
3.9. Migración celular	62
3.9.1. Migración en microcanales (2D)	62
3.9.2. Migración en matriz de colágeno (3D).....	63
3.10. Estudios de activación celular.....	63
3.10.1. Formación de conjugados e inmunofluorescencia	63
3.10.2. Activación por anticuerpos	64

3.10.3. Activación sobre bicapas lipídicas presentadoras de antígeno	64
3.11. Western blot	64
3.12. Ensayos de movilización de calcio	66
3.13. Microscopía y adquisición de imágenes	66
3.13.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	66
3.13.2. Microscopía confocal	67
3.13.3. Microscopía de fluorescencia de reflexión interna total (TIRF).....	67
3.13.4. Análisis de imágenes	68
RESULTADOS	69
4.1. Expresión de los SSHs en linfocitos T	71
4.2. La sobreexpresión de SSH1 o cofilina induce anomalías morfológicas	71
73	
4.3. Regulación del módulo de cofilina por SSH1	74
4.4. Distribución de SSH1 en la SI	77
4.5. Dinámica de la polarización de SSH1 a la SI.....	78
4.6. Papel de SSH1 en la homeostasis de actina.....	79
4.7. Papel de SSH1 en el ensamblaje y dinámica de la SI	80
4.7.1. Papel en la SI madura	80
4.7.2. Dinámica del TCR durante la formación de la SI	83
4.7.3. Dinámica de actina	83
4.7.4. Estabilidad de la SI.....	86
4.8. Papel de SSH1 en la señalización temprana de los linfocitos T	88
4.9. Papel de SSH1 en la migración celular	92
DISCUSIÓN.....	95

ÍNDICE

5.1.	Expresión de los SSHs en linfocitos T.....	97
5.2.	Anomalías morfológicas al sobreexpresar SSH1 o cofilina.....	97
5.3.	Ultrasensibilidad y biestabilidad del módulo de cofilina en linfocitos T 98	
5.4.	Distribución dinámica de SSH1 a la SI.....	100
5.5.	Control de los niveles de actina por SSH1	101
5.6.	Papel de SSH1 en el ensamblaje y dinámica molecular de la SI	102
5.7.	Papel de SSH1 en la señalización temprana de los linfocitos T	105
5.8.	Papel de SSH1 en la migración celular.....	108
	CONCLUSIONES & CONCLUSION.....	109
	REFERENCIAS.....	109
	ANEXO I: INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA.....	109
	ANEXO II: PUBLICACIONES	109
	ANEXO III: CURRICULUM.....	109



RESUMEN &
SUMMARY

Introducción

Durante la activación del linfocito T, se establece una interacción estrecha con la célula presentadora de antígeno (APC). Esta unión se denomina sinapsis inmunológica (SI) y es necesaria para la correcta activación del linfocito. La formación de la SI implica la polarización de orgánulos celulares y múltiples moléculas de señalización hacia la zona de contacto, donde se reorganizan diferencialmente en anillos concéntricos o SMACs (*SupraMolecular Activation Clusters*). En la zona más periférica de la SI (dSMAC) se acumula la actina, cuya dinámica es esencial no sólo para el ensamblaje de la SI sino también para las funciones efectoras de los linfocitos. La necesidad de una correcta dinámica de actina hace muy interesante el estudio de las proteínas que la regulan. Una de las más importantes es cofilina, que a su vez está activada por la fosfatasa SSH1, cuyo papel durante la activación linfocitaria se desconoce actualmente.

Objetivos

El objetivo principal de nuestro trabajo fue investigar el papel de SSH1 durante la migración, activación y formación de la SI de los linfocitos T. Debido a los múltiples mecanismos de regulación de SSH1 sobre cofilina, nos preguntamos además cómo era la respuesta del módulo de señalización de cofilina en función de los niveles de SSH1.

Resultados

Mediante experimentos de sobreexpresión de SSH1 o de un mutante de unión a actina (W458A), observamos que existía una respuesta ultrasensible en el módulo de cofilina mediada en parte por la unión de SSH1 a actina. Esta respuesta era además biestable e irreversible con la estimulación antigénica. Realizando experimentos de microscopía confocal, descubrimos que SSH1 era polarizado a las mismas zonas de la SI que actina (dSMAC), lo que también podría contribuir a la ultrasensibilidad del módulo debido al enorme aumento de actividad de SSH1 tras su unión a actina filamentosa. A través de experimentos de microscopía de TIRF, observamos que la sobreexpresión de un mutante catalítico de SSH1 (C393S) bloqueaba la centralización del TCR y la capacidad de adhesión en tiempos iniciales, fenotipo que atribuimos a la alteración de la dinámica y reorganización de actina en la SI debido a los mayores niveles de F-actina que

presentaban las células con altos niveles de expresión de C393S. Estas células además mostraron un defecto en la movilización de calcio a pesar de los mayores niveles de fosforilación de CD3 ζ en tiempos tempranos, mientras que las células que sobreexpresaban SSH1 *wild type* mostraron mayores niveles de activación de CD3 ζ y PLC γ 1, pero niveles de calcio normales. Además, descubrimos que SSH1 disminuía la velocidad y direccionalidad de las células en migración en microcanales (dos dimensiones), mientras que en matrices de colágeno tridimensionales aumentaba la velocidad y distancia recorrida.

Conclusiones

A la vista de nuestros resultados, concluimos que la activación de cofilina es ultrasensible en función de los niveles de SSH1, y que esta respuesta está mediada en parte por la unión de SSH1 a actina. SSH1 además participa en la homeostasis de actina filamentosa y es esencial para el clareamiento de actina en tiempos iniciales de formación de la SI. Los reordenamientos de actina mediados por SSH1 son necesarios para la adhesión celular tras estimulación antigénica y para la centralización inicial del TCR, aunque su perturbación no afectó a la arquitectura de la SI madura. Sin embargo, esta dinámica de actina alterada produjo un defecto en la movilización de calcio tras estimulación del TCR, probablemente debido a la perturbación del *cross-talk* entre la actina y el aumento de calcio intracelular. Además, encontramos un papel de SSH1 en la direccionalidad de la migración celular en dos dimensiones y en la velocidad y distancia recorrida en tres dimensiones.

Introduction

During T-cell activation, a stable interaction with the antigen-presenting cell (APC) is established. This junction is called the immunological synapse (IS) and is necessary for the proper activation of T cells. The formation of the IS involves the polarization of cell organelles and multiple signaling molecules towards the contact area, where they are differentially reorganized in concentric rings or SMACS (SupraMolecular Activation Clusters). In the outermost part of the IS (dSMAC), the actin is accumulated, and its dynamics are essential not only for the assembly of the IS, but also for the effector functions of the lymphocytes. The need for proper actin dynamics makes the study of its regulatory proteins very interesting. One of the most important proteins is cofilin, which is in turn activated by the phosphatase SSH1, whose role during T-cell activation is currently unknown.

Objectives

The main objective of our work was to investigate the role of SSH1 during T-cell migration, activation and formation of the IS. Due to the multiple SSH1 regulatory mechanisms of cofilin, we also wondered how was the response of the cofilin signaling module as a function of SSH1 levels.

Results

Using overexpression of SSH1 or its actin-binding mutant (W458A), we observed that there was an ultrasensitive response in the cofilin module mediated in part by SSH1 binding to actin. This response was also bistable and irreversible with antigenic stimulation. With confocal microscopy experiments, we found that SSH1 was polarized to the same regions of the IS than actin (dSMAC), which could also contribute to the ultrasensitivity of the module due to the huge increase in SSH1 activity upon binding to filamentous actin. In TIRF microscopy experiments, we observed that the overexpression of a catalytically inactive mutant of SSH1 (C393S) blocked the centralization of the TCR and the adhesion ability in early stages, a phenotype that we explained by the alteration of the dynamics and reorganization of actin at the IS due to the higher levels of F-actin that showed the cells with high expression levels of C393S.

These cells also showed a defect in calcium mobilization despite the higher levels of CD3 ζ phosphorylation in early stages, while cells overexpressing wild type SSH1 showed higher activation of CD3 ζ and PLC γ 1 but normal calcium levels. Besides, we found that SSH1 caused a decrease in the speed and directionality of cells migrating in microchannels (two dimensions), while it caused an increase in the speed and distance in collagen matrices.

Conclusions

In the sight of our results, we conclude that cofilin activation is ultrasensitive as a function of SSH1 levels and this response is partly mediated by SSH1 binding to actin. SSH1 also participates in filamentous actin homeostasis and is essential for actin clearance in the initial stages of IS formation. Actin remodeling mediated by SSH1 are necessary for cell adhesion upon antigenic stimulation and for the initial TCR centralization, even though its disturbance did not affect the architecture of mature ISs. However, this altered actin dynamics caused a defect in calcium mobilization after TCR stimulation, probably due to an alteration of the cross-talk between actin and intracellular calcium increase. Also, we found a role for SSH1 in the directionality of migrating cells in two dimensions and in the velocity and distance in three dimensions.

ABREVIATURAS



ABREVIATURAS

Abreviatura	Nombre completo en español	Nombre completo en inglés
2D	Dos dimensiones	
3D	Tres dimensiones	
ABP	Proteína de unión a actina	<i>Actin Binding Protein</i>
ADAP	Proteína adaptadora promotora de adhesión y desgranulación	<i>Adhesion and Degranulation-promoting Adapter Protein</i>
ADF	Factor despolimerizante de actina	<i>Actin Depolymerizing Factor</i>
ADP	Adenosín difosfato	<i>Adenosin Diphosphate</i>
AP-1	Proteína activadora-1	<i>Activator Protein-1</i>
APC	Célula Presentadora de Antígeno	<i>Antigen-Presenting Cell</i>
ATP	Adenosín trifosfato	<i>Adenosin Triphosphate</i>
CaMK	Kinasa dependiente de Ca ²⁺ -calmodulina	<i>Ca²⁺-calmodulin-dependent kinase</i>
CD	Grupo de diferenciación	<i>Cluster of Differentiation</i>
cSMAC	Grupo de activación supramolecular central	<i>Central Supramolecular Activation Cluster</i>
DAG	Diacilglicerol	<i>Diacylglycerol</i>
dSMAC	Grupo de activación supramolecular distal	<i>Distal Supramolecular Activation Cluster</i>
DSP	Fosfatasa de especificidad dual	<i>Dual Specificity Phosphatase</i>
ECL	Quimioluminiscencia mejorada	<i>Enhanced ChemiLuminescence</i>
EGF	Factor de crecimiento epidérmico	<i>Epidermal Growth Factor</i>
ERK	Proteínas kinasa reguladas por señal extracelular	<i>Extracellular signal-Regulated protein Kinases</i>
F-actina	Actina filamentosa	<i>Filamentous Actin</i>
FBS	Suero fetal bovino	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FSC	Dispersión frontal	<i>Forward SCatter</i>
G-actina	Actina globular	<i>Globular Actin</i>
Gads	Adaptador relacionado con GRB2 por debajo de Shc	<i>GRB2-related Adapter Downstream of Shc</i>
GFP	Proteína verde fluorescente	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GRB2	Proteína 2 de unión al receptor de factores de crecimiento	<i>Growth factor Receptor-Bound protein 2</i>
HAP	Péptido de hemaglutinina de la gripe	<i>Influenza Hemmaglutinnin peptide</i>
HRP	Peroxidasa de rábano	<i>HorseRadish Peroxidase</i>
HSC70	Proteína relacionada con choque térmico de 70 kDa	<i>Heat Shock Cognate Protein 70 kDa</i>
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular-1	<i>Intercellular Adhesion Molecule-1</i>
IFN γ	Interferón γ	<i>γ Interferon</i>

ABREVIATURAS

IL	Interleucina	<i>Interleukin</i>
IP ₃	Inositol (1,4,5)-trifosfato	<i>Inositol (1,4,5)-triphosphate</i>
ITAM	Motivos de activación del inmunoreceptor basados en tirosina	<i>Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs</i>
Itk	Tirosín-kinasa inducida por IL-2	<i>IL-2-induced Tyrosine Kinase</i>
JNK	Kinasa amino-terminal c-Jun	<i>c-Jun amino-terminal Kinase</i>
LAT	Conector para la activación de células T	<i>Linker for Activation of T cells</i>
Lck	Proteína tirosín-kinasa específica de linfocitos	<i>Lymphocyte-specific protein tyrosine Kinase</i>
LFA-1	Antígeno asociado a la función del linfocito-1	<i>Lymphocyte Function-Associated Antigen-1</i>
MAP	Proteína activada por mitógeno	<i>Mitogen-Activated Protein</i>
MEK	Kinasa de la proteína kinasa activada por mitógeno	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase</i>
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
MTOC	Centro organizador de microtúbulos	<i>Microtubule-Organizing Centre</i>
NFAT	Factor nuclear de células T activadas	<i>Nuclear Factor of Activated T cells</i>
PBMCs	Células mononucleares de sangre periférica	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
pCof	Fosfo-cofilina	<i>Phospho-cofilin</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PDMS	Polidimetilsiloxano	<i>Polydimethylsiloxane</i>
PI3K	Fosfoinositol 3-kinasa	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
PIP ₂	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato	<i>Phosphatidylinositol 3,4,5-biphosphate</i>
PIP ₃	Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato	<i>Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate</i>
PKC θ	Proteína kinasa C θ	<i>Protein Kinase C θ</i>
PKD	Proteína kinasa D	<i>Protein Kinase D</i>
PLC γ -1	Fosfolipasa C γ -1	<i>Phospholipase Cγ-1</i>
PLD1	Fosfolipasa D1	<i>Phospholipase D1</i>
pMHC	Complejo péptido-MHC	<i>Peptide-MHC complex</i>
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo	<i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
pNPP	p-Nitrofenil fosfato	<i>p-Nitrophenyl phosphate</i>
PP1	Proteína fosfatasa 1	<i>Protein Phosphatase 1</i>
PP2A	Proteína fosfatasa 2A	<i>Protein Phosphatase 2A</i>
pSMAC	Grupo de activación supramolecular periférico	<i>Peripheral Supramolecular Activation Cluster</i>
PTEN	Homólogo de tensina y fosfatasa	<i>Phosphatase and Tensin Homolog</i>

ABREVIATURAS

PTP	Proteína fosfatasa de tirosina	<i>Protein Tyrosine Phosphatase</i>
qPCR	PCR cuantitativa	<i>Quantitative PCR</i>
ROS	Especies reactivas de oxígeno	<i>Reactive Oxygen Species</i>
SDF-1 α	Factor derivado de célula estromal-1 α	<i>Stromal Cell-Derived Factor 1α</i>
SEE	Enterotoxina estafilocócica E	<i>Staphylococcal Enterotoxin E</i>
SH2	Homología a Src 2	<i>Src-homology 2</i>
SI	Sinapsis Inmunológica	<i>Immunological synapse</i>
SLP-76	Proteína leucocitaria de 76 kDa con dominio SH2	<i>SH2 domain-containing Leukocyte Protein of 76 kDa</i>
SMAC	Grupo de activación supramolecular	<i>Supramolecular Activation Cluster</i>
SSC	Dispersión lateral	<i>Side SCatter</i>
TCR	Receptor de la célula T	<i>T Cell Receptor</i>
TESK	Proteína quinasa testicular	<i>TESticular protein Kinase</i>
TIRFM	Microscopía de fluorescencia de reflexión interna total	<i>Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy</i>
TNB	Tampón Tris-NaCl-Bloqueo	<i>Tris-NaCl-Blocking buffer</i>
VH1	Vaccinia Virus H1	<i>Vaccinia Virus H1</i>
ZAP70	Proteína de 70 kDa asociada a la cadena zeta	<i>Zeta-chain-Associated Protein of 70 kDa</i>

INTRODUCCIÓN



1.1. Activación del linfocito T

Para que la activación del linfocito T tenga lugar, se necesita un reconocimiento de antígeno presentado en moléculas específicas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC-I para linfocitos CD8⁺ y MHC-II para linfocitos CD4⁺) por una célula presentadora de antígeno (APC, *Antigen-Presenting Cell*), que puede ser una célula B, una célula dendrítica o un macrófago. Inmediatamente tras el contacto inicial, el linfocito escanea mediante sus receptores de célula T (TCRs, *T-Cell Receptors*) los complejos péptido-MHC (pMHC) presentes en la superficie de la misma. Si el pMHC contiene el antígeno para el cual el linfocito es específico, se dispara la activación y agregación de los TCRs en cuestión de segundos (Campi *et al.* 2005), lo que a su vez inicia el reclutamiento y activación de una serie de proteínas transmembranales y citoplasmáticas involucradas en diversas rutas de señalización, así como en la dinámica del citoesqueleto y del sistema endosomal (Figura In1) (Kupfer & Singer, 1989). Estas reacciones llevan a la expansión clonal de células naïve, o a su diferenciación a células efectoras o de memoria, mientras que la reestimulación por el TCR lleva a diferentes funciones inmunológicas, como secreción de citoquinas o citotoxicidad. Para una completa activación de los linfocitos T, tanto naïve como efectoras o de memoria, se requiere de una interacción estrecha y duradera en el tiempo entre el linfocito T y la APC que se denomina sinapsis inmunológica (SI) (Norcross, 1984; Dustin *et al.*, 1998; Monks *et al.*, 1998; Grakoui *et al.*, 1999; Mempel *et al.*, 2004).

1.1.1. La sinapsis inmunológica

En 1984, Norcross sugirió por primera vez un modelo de activación linfocitaria dependiente de una comunicación cruzada que requería de la existencia de una interacción estrecha entre la célula T y la APC, de manera similar a lo que ocurre en las sinapsis neuronales (Norcross, 1984). En este trabajo, Norcross propuso que cuando un linfocito T reconocía un pMHC en una APC, tenía lugar una unión compleja y estable entre ambas células, lo que acarrearía la interacción de moléculas de adhesión, la acumulación de moléculas de TCR en el linfocito T y la liberación dirigida de citoquinas. Sin embargo, no fue hasta 1998 cuando Dustin *et al.* acuñaron el término SI (Dustin *et al.*, 1998) y cuando Monks *et al.* observaron estas interacciones en tres dimensiones, mostrando que las proteínas localizadas en el sitio de contacto no estaban distribuidas aleatoriamente, sino altamente organizadas en diferentes áreas que denominaron grupos de activación supramoleculares

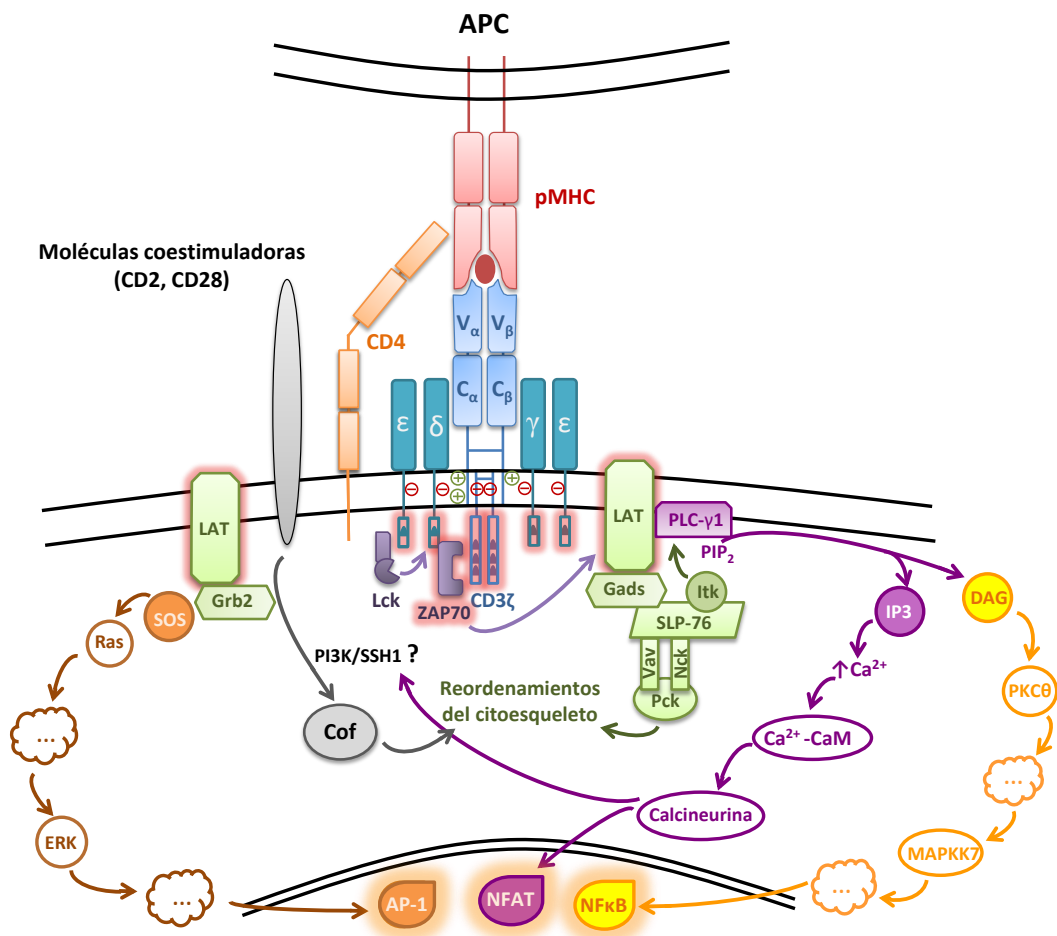


Figura In1: Esquema de la cascada de señalización para la activación del linfocito T. La unión del TCR y CD4/CD8 a un pMHC adecuado dispara una ruta de señalización intracelular que se inicia con la fosforilación de los motivos ITAM de las cadenas ζ de CD3 por Lck, lo que lleva al reclutamiento de ZAP70 y a la formación del complejo de señalización LAT/SLP-76. Este complejo recluta y organiza espacial y temporalmente múltiples moléculas que llevan a la regulación de la adhesión celular, a la remodelación del citoesqueleto de actina y a la expresión de factores de transcripción relacionados con la producción de citoquinas y la proliferación celular. Las flechas indican activación molecular. Cof: cofilina; SSH1: *Slingshot 1*.

o SMACs (del inglés *SupraMolecular Activation Clusters*) (Monks *et al.*, 1998; Grakoui *et al.*, 1999).

El proceso de formación de la SI (esquemático en la Figura In2) comienza con el contacto entre una célula T y una APC a través de interacciones de baja afinidad entre integrinas como LFA-1 e ICAM-1, respectivamente (Hogg *et al.*, 2011). Estas interacciones establecen adhesiones temporales que permiten a los TCRs escanear la superficie de la APC en busca de un pMHC específico (Donnadieu *et al.*, 1994). Si la APC no presenta péptidos específicos para el TCR, las células se separarán pronto tras este contacto inicial (Friedman *et al.*, 2010). Sin embargo, el reconocimiento por parte del TCR de pMHCs específicos y de

suficiente afinidad supone una señal de parada (Dustin *et al.*, 1997; Friedman *et al.*, 2010) que llevará al establecimiento de una interacción más duradera entre ambas células, permitiendo nuevas uniones TCR-pMHC (Donnadieu *et al.*, 1994; Dustin *et al.*, 1997; Hosseini *et al.*, 2009). Inmediatamente tras este reconocimiento, los TCRs en periferia comienzan a agruparse en microcomplejos que también incluyen moléculas de señalización como ZAP70 o SLP-76 (Yokosuka *et al.*, 2005). En cuestión de segundos, las integrinas son acumuladas en la zona central del contacto (Grakoui *et al.*, 1999) y se inician cascadas de señalización por el TCR en periferia que llevan a la activación y aumento de afinidad de LFA-

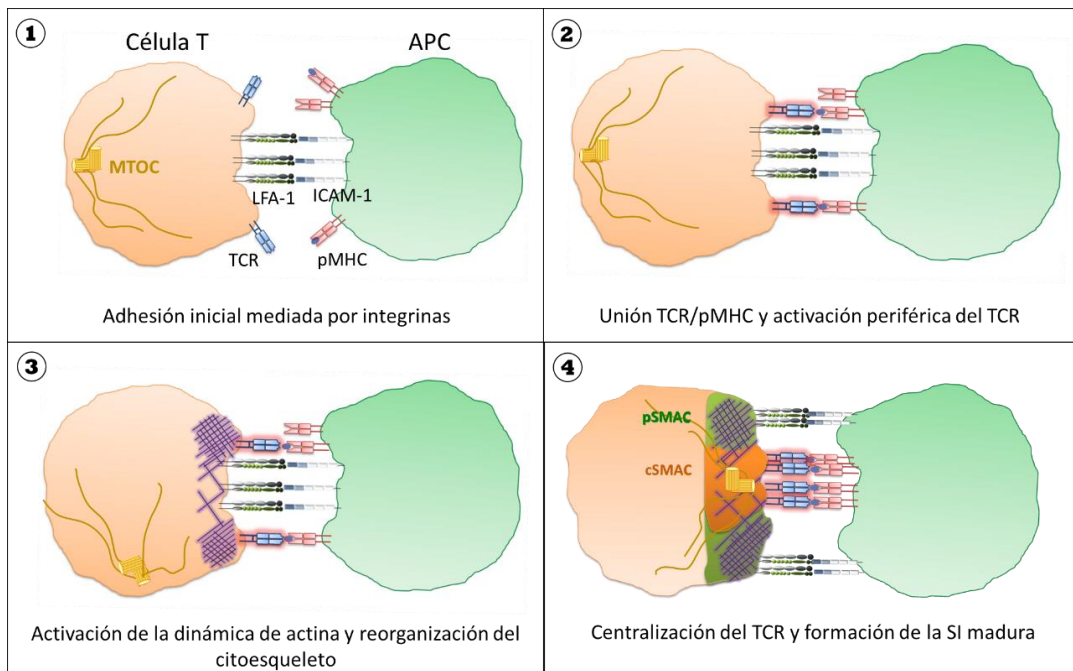


Figura In2: Representación esquemática de los pasos en la formación de una sinapsis inmunológica (SI). 1: se produce el contacto inicial entre la célula T y la APC a través de las integrinas (LFA-1/ICAM-1). 2: esta adhesión inicial permite que la célula T escanee la APC y pueda encontrar un pMHC que reconozca, disparándose los primeros eventos de activación del TCR en la zona periférica de la interacción. 3: las rutas de señalización disparadas tras la activación inicial del TCR llevan a la reorganización del citoesqueleto de actina, produciéndose un aumento de actina filamentososa en la zona periférica de la interacción y depleción del centro. 4: esta organización del citoesqueleto de actina lleva a la redistribución de las moléculas de señalización en anillos concéntricos, formando la clásica estructura de una sinapsis madura en la que se distinguen una zona central rica en TCRs (cSMAC) y una zona periférica rica en actina y moléculas de adhesión (pSMAC).

1, haciendo aún más estable la unión celular (Dustin & Springer, 1989; Donnadieu *et al.*, 1994).

Algunas de estas rutas por debajo del TCR e integrinas disparan la reorganización del citoesqueleto de actina y tubulina (Lowin-Kropf *et al.*, 1998; Sedwick *et al.*, 1999) y participan tanto en la polarización y acumulación de múltiples moléculas y orgánulos

celulares hacia la zona de interacción como en su reorganización en la SI (Kupfer & Singer, 1989; Monks *et al.*, 1998). Esta remodelación de los citoesqueletos de actina y tubulina son un aspecto crítico para el correcto ensamblaje de la SI (Burkhardt *et al.*, 2008; Soares *et al.*, 2013). Uno de los cambios más destacables ligado al reordenamiento de actina es la inversión por completo de la organización del TCR y LFA-1 (Grakoui *et al.*, 1999): los TCRs migran y se acumulan en el centro, reemplazando a las moléculas de adhesión y definiendo el cSMAC (zona CD3 *high*) (Yokosuka *et al.*, 2008; Hashimoto-Tane & Saito, 2016), mientras que las integrinas forman un anillo a su alrededor, denominado pSMAC (Figura In3) (Grakoui *et al.*, 1999). El cSMAC es también rico en moléculas de señalización como microcomplejos de CD28/PKC θ , que se acumulan alrededor de la zona rica en moléculas de CD3 (zona CD3 *low*) y parecen importantes para la activación sostenida (Yokosuka *et al.*, 2008; Hashimoto-Tane & Saito 2016). El MTOC y el citoesqueleto de tubulina también son polarizados a esta zona del contacto (Geiger *et al.*, 1982) y es crítico para la organización y polarización del TCR y de moléculas de señalización a la zona de interacción, así como para la activación sostenida de la célula T (Das *et al.*, 2004; Martin-Cofreces *et al.*, 2008; Martin-Cofreces *et al.*, 2012). Por otro lado, gracias a la polarización del MTOC, el cSMAC se convierte en una zona de apagamiento de la señal del TCR (Lee *et al.*, 2003; Varma *et al.*, 2006). La organización molecular diferencial en anillos concéntricos, con un cSMAC rico en TCRs, un pSMAC rico en integrinas y un MTOC polarizado es lo que se conoce como SI madura (Figura In3) y puede durar horas (Grakoui *et al.*, 1999).

Existe un tercer anillo alrededor del pSMAC denominado SMAC distal o dSMAC (Freiberg *et al.*, 2002), caracterizado por una acumulación y flujo retrógrado de actina (Bunnell *et al.*, 2001). Dicho anillo genera unas fuerzas físicas responsables del mantenimiento de la SI (Billadeau *et al.*, 2007) y de la activación y movimiento de múltiples moléculas (Babich *et al.*, 2012; Yi *et al.*, 2012; Comrie *et al.*, 2015). Estas tres zonas (dSMAC, pSMAC y cSMAC) también se han denominado lamelipodio, lamela y cuerpo celular, respectivamente, por equiparación con la organización de actina en células en migración (Dustin, 2008; Babich *et al.*, 2012) que se explicará más adelante. De la importancia de la estructura y dinámica de actina para la organización, cohesión y mantenimiento de la SI madura hablaremos en profundidad a continuación por tratarse de un aspecto de máxima relevancia para este trabajo.

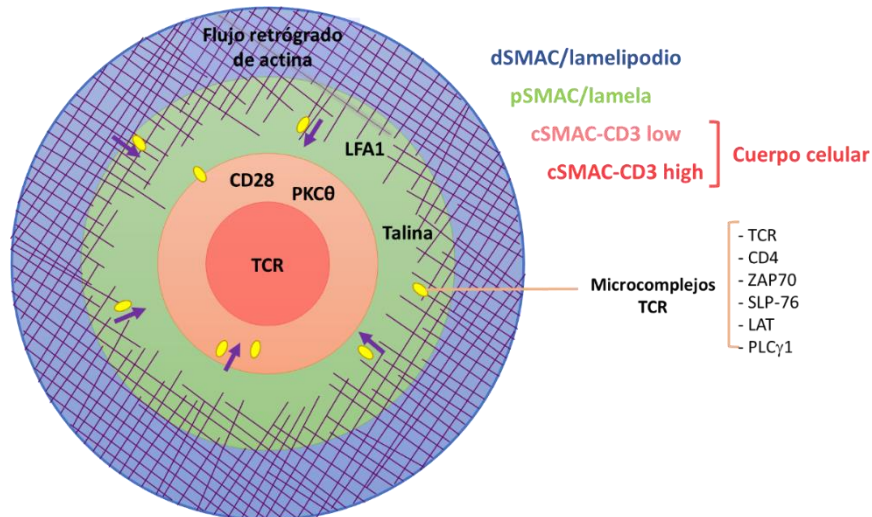


Figura In3: Representación esquemática de una SI madura vista frontalmente mostrando las moléculas acumuladas en cada SMAC. La actina es acumulada en el dSMAC, desde donde establece un flujo retrógrado hacia el cSMAC que ayuda al movimiento centrípeto de los microcomplejos de TCR y moléculas de señalización. En el pSMAC se encuentran moléculas de adhesión como integrinas (LFA1) y moléculas relacionadas con el citoesqueleto (como talina). En el cSMAC se diferencia una zona más periférica con microcomplejos de CD28 y PKC θ (CD3 *low*) y una zona más interna rica en TCR (CD3 *high*).

1.2. Estructura y regulación del citoesqueleto de actina

El citoesqueleto de actina es responsable del funcionamiento de numerosos procesos vitales, como la migración, el transporte intracelular o la citocinesis. En todos ellos, la remodelación de actina es esencial. Está compuesto por monómeros de actina globular (G-actina) que se ensamblan en filamentos de actina (F-actina) helicoidales y asimétricos (Huxley, 1963), con un extremo (-) o protuberante de despolimerización y un extremo (+) o barbado de polimerización. Por este último se produce la elongación del filamento gracias a la adición de monómeros de actina unidos a ATP (Hayashi & Ip, 1976). Posteriormente y mientras el filamento sigue creciendo, el ATP se hidroliza a ADP, lo que hace perder estabilidad al monómero debido a un cambio conformacional, facilitando así su liberación por el extremo (-). El acoplamiento entre los procesos de adición y liberación de monómeros de G-actina por extremos opuestos del filamento produce un efecto que simula una cinta de correr (*treadmilling*) y es el mecanismo por el cual se producen la elongación y acortamiento de los filamentos (Pollard *et al.*, 2000). Cuando la concentración de monómeros libres disponibles en la célula se reduce por debajo de la concentración crítica de equilibrio, se paraliza la polimerización de nuevos filamentos, dando como resultado una despolimerización neta hasta que se restauran los niveles de G-actina.

En situaciones de reposo celular, el citoesqueleto de actina se encuentra en un estado estacionario dinámico: no se trata de una red de filamentos estables, sino que están continuamente remodelándose gracias a un equilibrio perfectamente regulado entre polimerización y despolimerización sin producirse cambios netos en los niveles totales de F-actina (Pollard, 1986). Este estado activo basal permite a la célula ser capaz de responder rápidamente a señales externas o situaciones de estrés que requieren una rápida reorganización celular mediada por el citoesqueleto de actina (por ejemplo, en el caso de la respuesta de linfocitos a señales de migración o activación).

1.2.1. Papel del citoesqueleto de actina en la activación T

Uno de los mayores cambios que tiene lugar durante la activación de la célula T es el de la actina, cuya reorganización es esencial para que se lleve a cabo la correcta formación de la SI y la completa activación celular (Burkhardt *et al.*, 2008).

De manera previa al inicio de la señalización por el TCR, los linfocitos T necesitan encontrar APCs con antígenos específicos y escanear su superficie de manera eficiente (Donnadieu *et al.*, 1994). En esta etapa inicial participa enormemente el citoesqueleto de actina. Una vez se produce el reconocimiento de antígeno, se dispara una serie de cambios morfológicos y estructurales que llevan a la expansión de la célula T sobre la superficie de la APC gracias a la dinámica de actina (Bunnell *et al.*, 2001). Además, la actina subcortical genera unas fuerzas de tracción sobre el TCR en la célula T y sobre el pMHC en la célula B, que atraen las dos células entre sí y que son necesarias para disparar la señalización (Beemiller & Krummel, 2010). Estas fuerzas de tracción entre ambas células son dependientes de la afinidad del TCR por su ligando e incrementan la afinidad de integrinas como LFA-1 (Comrie *et al.*, 2015), aumentando la adhesión y la duración de la unión (Lub *et al.*, 1997).

Según progresa la SI, se produce una rápida polimerización de actina en la periferia acompañada de despolimerización en las zonas más internas, formándose finalmente un anillo de actina (Bunnell *et al.*, 2001) donde se inicia la señalización por el TCR (Lee *et al.*, 2002; Varma *et al.*, 2006). Este anillo periférico es extremadamente rico en F-actina a la vez que altamente dinámico gracias a la activación por debajo de la señalización por el TCR y moléculas coestimuladoras de múltiples proteínas tanto de polimerización y nucleación (WASp, WAVE2, Arp2/3) (Krause *et al.*, 2000; Nolz *et al.*, 2006) como de despolimerización y fragmentación (cofilina) (Samstag *et al.*, 1991; Samstag *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 2000). Este

proceso dinámico entre polimerización y despolimerización que se mantiene a lo largo de todo el contacto T-APC establece un flujo retrógrado centrípeto de actina, de unos 20 nm/seg, que es responsable de la formación y movimiento de microcomplejos de TCR y moléculas de señalización hacia el centro de la interacción, segregados del LFA-1 periférico (Campi *et al.*, 2005; Kaizuka *et al.*, 2007; DeMond *et al.*, 2008), así como del movimiento y activación de moléculas de adhesión (Comrie *et al.*, 2015). El flujo retrógrado de actina también es esencial para la correcta arquitectura de la SI mediante el movimiento de moléculas de señalización (Gowrishankar *et al.*, 2012) y para el mantenimiento de la señalización por debajo del TCR (Valitutti *et al.*, 1995; Delon *et al.*, 1998; Babich *et al.*, 2012).

1.2.2. Papel del citoesqueleto de actina en la migración celular

La remodelación del citoesqueleto de actina es esencial para la migración celular y tiene lugar por la activación de proteínas como WASP, WAVE, Arp2/3 o cofilina, que son necesarias para la polimerización y despolimerización locales de actina en el lamelipodio (Ridley *et al.*, 2003).

En primer lugar, se generan múltiples lamelas alrededor de toda la célula que posteriormente se convierten en una única protrusión de membrana que constituirá el frente celular o lamelipodio. Allí se acumulará la actina, organizada en una red ramificada de filamentos, y tendrá lugar una fuerte dinámica de recambio del citoesqueleto (Nishita *et al.*, 2005). Los extremos barbados (de polimerización) de los filamentos ramificados se sitúan en la parte más proximal a la membrana celular del lamelipodio, mientras que los extremos opuestos (susceptibles a despolimerización) se sitúan hacia la parte interna de la célula (Begg *et al.*, 1978; Small *et al.*, 1978), pero no de manera perpendicular sino con un cierto ángulo, siendo el más favorable 35° (Maly & Borisy, 2001). Gracias a la adición de monómeros por los extremos barbados y al *capping* por proteínas caperuza en los protuberantes, el lamelipodio avanza, arrastrando consigo el cuerpo celular (Pollard & Borisy, 2003). A pesar de la alta densidad de actina en el frente celular, ésta está organizada en una red muy densa filamentos cortos altamente ramificados situados hasta 1 μm por debajo de la membrana plasmática y que son indicativos de un recambio y una reconstrucción rápidas de actina, mientras que en el resto de la célula predominan filamentos más largos y no ramificados que dotan a las zonas media y posterior de mayor rigidez y estabilidad (Small *et al.*, 1978; Pollard & Borisy, 2003). Esta organización diferencial de actina se ha comparado con la organización concéntrica que tiene lugar en la SI (Figura In4) (Dustin, 2008). De hecho, las células en migración son capaces de integrar señales

antigénicas y de quimioquinas unidas a receptores en las APCs y pasar de una unión intercelular móvil y dinámica (kinapsis) (Dustin, 2008) a una unión más estable (sinapsis) o viceversa, mediante la acción de WASp y PKC θ , respectivamente (Sims *et al.*, 2007; Dustin, 2008).

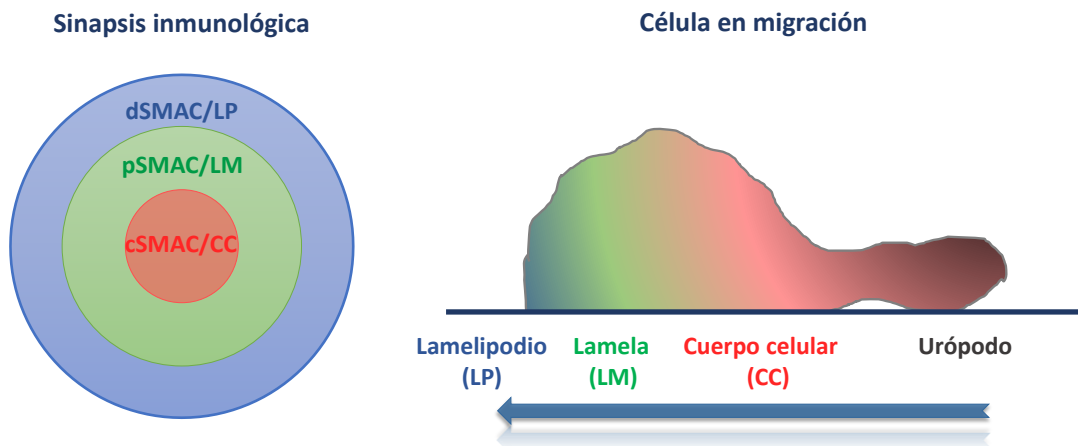


Figura In4: Comparación entre la organización diferencial de actina y proteínas reguladoras del citoesqueleto en la SI madura y en células en migración. En el dSMAC/lamelipodio existe una alta acumulación y flujo retrógrado de actina y abundan las proteínas reguladoras del citoesqueleto, tanto polimerizadoras como despolimerizadoras. En el pSMAC/lamela existe también un flujo retrógrado de actina pero de menor velocidad. En el cSMAC/cuerpo celular, la actina es inexistente o poco abundante. El urópodo es una zona donde abundan filamentos largos y estables de actina. La flecha azul indica la dirección del movimiento. LP: Lamelipodio; LM: Lamela; CC: Cuerpo Celular.

Los linfocitos son células altamente móviles capaces de alternar dos tipos de movimiento: primero, necesitan desplazarse en superficies en dos dimensiones (2D), como por ejemplo sobre el endotelio de los vasos sanguíneos, para después ser capaces de extravasarse y moverse en entornos en tres dimensiones (3D), como la matriz extracelular (Friedl *et al.*, 2001; Friedl & Weigelin, 2008). En el primer caso, la migración se produce con un movimiento ameboides que precisa de una polarización del citoesqueleto de actina al frente celular y que es dependiente de interacciones cortas entre integrinas (principalmente LFA-1) y sus ligandos (Friedl *et al.*, 2001). En este movimiento, los linfocitos forman sólo pequeñas protrusiones lamelares y avanzan gracias a la contracción del sistema de actomiosina, por lo que son poco dependientes del flujo de actina. En el caso de la migración 3D, el movimiento no es dependiente de integrinas y el movimiento se produce por una dinámica y flujo de actina constantes en el frente celular unido a contracciones del sistema de actomiosina en el urópodo que impulsa el núcleo a través de espacios intersticiales pequeños (Lammermann *et al.*, 2008; Klemke *et al.*, 2010).

1.3. Proteínas de unión a actina: la familia de las cofilinas

Las proteínas de unión a actina (ABPs, *Actin Binding Proteins*) se consideraron inicialmente moléculas estructurales, cuya función era únicamente mantener la arquitectura del citoesqueleto de actina. Sin embargo, actualmente se sabe que tienen una función mucho más dinámica y compleja, participando en la remodelación del citoesqueleto que tiene lugar ante ciertas señales externas durante numerosos procesos celulares, desde el crecimiento neuronal o la migración celular a la fagocitosis o la activación celular.

Dentro de las ABPs se encuentra la familia de las cofilinas. Esta familia comprende 3 miembros: cofilina 1, cofilina 2 y ADF (*Actin Depolymerizing Factor*, o destrina), con un 70-80% de homología entre sí y que constituyen unos de los principales reguladores de la dinámica del citoesqueleto de actina gracias a su actividad de desensamblaje (despolimerización y fragmentación) de filamentos (Van Troys *et al.*, 2008). La relevancia de este grupo de reguladores del citoesqueleto queda patente en la letalidad en estadio embrionario de ratones *knockout* de cofilina (Gurniak *et al.*, 2005).

Se trata de proteínas de unos 19 kDa descritas por Bamburg *et al.* en 1980 (Bamburg *et al.*, 1980) con al menos una isoforma expresada en todas las células eucariotas. En humanos, presentan una expresión diferencial, siendo cofilina 1 la isoforma predominante y expresada de manera ubicua, cofilina 2 específica de músculo y ADF la más abundante en tejidos epiteliales y endoteliales (Van Troys *et al.*, 2008). En cuanto a su localización subcelular, cofilina se acumula en zonas con una alta dinámica de actina, tales como protrusiones y pliegues de membrana o el lamelipodio, especialmente durante procesos como la migración (Dawe *et al.*, 2003) o el ensamblaje de la SI (Eibert *et al.*, 2004).

A pesar de su alta homología y de una afinidad similar por actina, las tres isoformas presentan diferente capacidad para regular la renovación (*turnover*) de actina, siendo, de menor a mayor eficiencia, ADF, cofilina 1 y cofilina 2 (Van Troys *et al.*, 2008).

1.3.1. Mecanismo de acción

Cofilina puede unirse tanto a G-actina como a F-actina (Nishida *et al.*, 1984; Hayden *et al.*, 1993). En su unión al filamento, cofilina se une a dos subunidades adyacentes de G-actina, lo que induce un retorcimiento que acorta un 25% la longitud de la hélice (McGough *et al.*, 1997; Klejnot *et al.*, 2013). Este cambio conformacional del filamento favorece la

unión cooperativa de más moléculas de cofilina en sitios contiguos, propagando así el acortamiento unidireccionalmente hacia el extremo protuberante y pudiendo llegar a recubrir el filamento uniformemente (Ngo *et al.*, 2015).

Tras la unión de cofilina al filamento, ésta puede realizar varias acciones (Figura In5):

A. Despolimerización de F-actina

Por un lado, cofilina promueve la despolimerización de filamentos aumentando la tasa de disociación del fosfato de ATP-actina por el extremo (-) del filamento, liberando monómeros de ADP-actina (Nishida *et al.*, 1984; Blanchoin & Pollard, 1999). Esto genera un *pool* de G-actina que puede volver a convertirse en ATP-actina y reciclarse mediante su incorporación a nuevos filamentos.

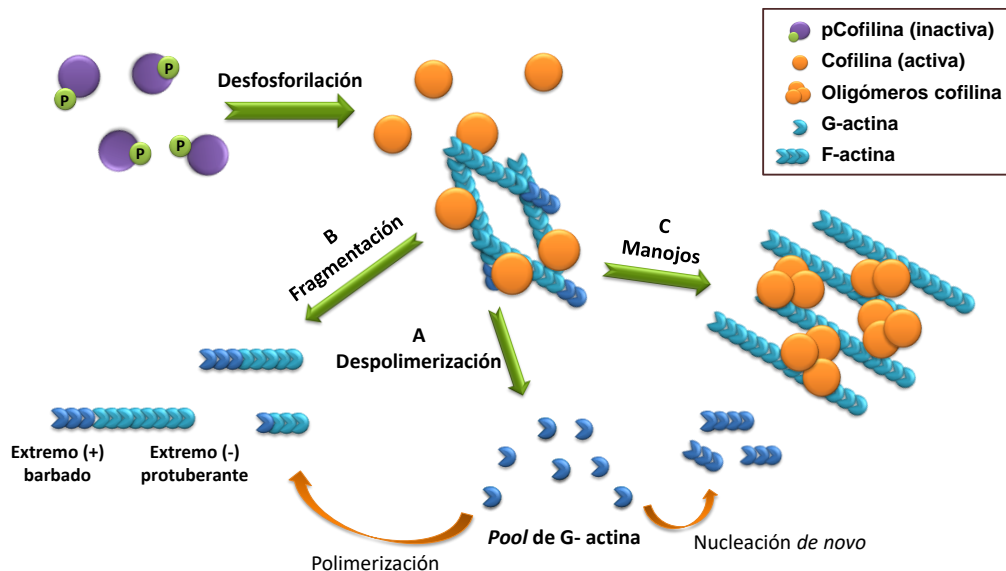


Figura In5: Mecanismos de acción de cofilina sobre los filamentos de actina. Cuando cofilina es activada por desfosforilación, puede realizar varias acciones sobre F-actina: **A)** Despolimerización de filamentos desde los extremos (-) liberando monómeros de G-actina susceptibles de iniciar la polimerización de nuevos filamentos (nucleación *de novo*) o de ser añadidos a filamentos ya existentes (polimerización); **B)** Fragmentación de filamentos largos en fragmentos más pequeños; **C)** Unión de varios filamentos de actina entre sí generando gruesos manojos de F-actina (actividad de *bundling*) cuando cofilina se encuentra formando oligómeros.

B. Fragmentación

Por otro lado, cofilina puede fragmentar F-actina en filamentos más cortos (Maciver, 1991). La mayoría de roturas tienen lugar en las zonas cercanas al final de un agrupamiento de cofilina, en zonas límite entre la estructura normal y la superenrollada, donde hay una discontinuidad estructural (Ngo *et al.*, 2015). Aunque esto disminuye la longitud total del filamento, también aumenta el número total de filamentos y, por

tanto, el número de extremos barbados susceptibles de ser elongados por adición de nuevos monómeros de actina (Ghosh *et al.*, 2004).

C. *Formación de manojos de F-actina* (bundling)

Por último, se ha descrito actividad de *bundling* de filamentos de actina por oligómeros de cofilina (Pfannstiel *et al.*, 2001). Estos oligómeros se forman mediante puentes disulfuro cuando cofilina se encuentra en su conformación oxidada (ver más abajo) y en lugar de despolimerizar filamentos, los estabiliza uniéndolos entre sí. Esta acción de cofilina mantiene la organización, grosor y uniformidad de la malla de filamentos paralelos (Wu *et al.*, 2016).

El efecto final de la actividad de cofilina depende, entre otras cosas, de su concentración relativa a G-actina libre: a concentraciones locales relativamente bajas de cofilina (hasta 200 nM), la actividad de desensamblaje de filamentos es óptima; según aumenta la concentración de cofilina, la fragmentación es menos frecuente y sólo tiene lugar al final de largas acumulaciones de cofilina unida a actina; a concentraciones aún mayores, todos los filamentos están completamente recubiertos de moléculas de cofilina que nuclea, saturan y estabilizan la red (Andrianantoandro & Pollard, 2006; Ngo *et al.*, 2015). Por tanto, no puede decirse que la función de cofilina sea relajar o estabilizar el citoesqueleto de actina, sino promover su dinámica y remodelación en función de su concentración relativa a G-actina, disgregando los filamentos más viejos que ya no son necesarios y favoreciendo su síntesis en lugares en los que se necesita una nueva red de actina. Otros mecanismos de regulación de la actividad de cofilina se comentarán en detalle a continuación.

1.3.2. Regulación de la actividad de cofilina

Debido a su importante papel, cofilina está sujeta a numerosos mecanismos de regulación (Figura In6):

A. *Fosforilación/desfosforilación*

El principal mecanismo regulador es el monociclo de fosforilación/desfosforilación en la serina 3 (Ser3), residuo implicado en la unión a actina (Moriyama & Yahara 1996). La presencia de un fosfato en la Ser3, situación constitutiva en linfocitos T en reposo (Samstag *et al.*, 1991; Samstag *et al.*, 1994), impide la unión de cofilina a actina debido a una repulsión de carga entre ambas, inactivando por tanto la proteína sin mediar

cambio conformacional (Blanchoin *et al.*, 2000). La desfosforilación de esta Ser3 activa cofilina y permite de nuevo su unión a actina (Lee *et al.*, 2000). Kinasas de las familias LIM (LIMK1 y LIMK2) o TES (TESK1 y TESK2), activadas por rutas de señalización de Rho GTPasas, MAP kinasas o Rac, son capaces de fosforilar dicho residuo (Yang *et al.*, 1998; Arber *et al.*, 1998; Toshima *et al.*, 2001), mientras que la desfosforilación y activación es llevada a cabo principalmente por fosfatasas de la familia de los SSHs (Niwa *et al.*, 2002). Además, la presencia del grupo fosfato en la Ser3 es necesaria para el reconocimiento específico y desfosforilación de cofilina por SSH1 (Kurita *et al.*, 2008). Otras fosfatasas de cofilina son la haloácido deshalogenasa cronofina (Gohla *et al.*, 2005) y las serín fosfatasas PP1 y PP2A (Ambach *et al.*, 2000).

B. Secuestro por fosfoinosítidos de membrana

La unión de cofilina desfosforilada a moléculas de PIP₂ impide la interacción de cofilina con actina a la vez que mantiene una reserva de cofilina inactiva cerca de la red de actina subcortical, lista para ser rápidamente activada por hidrólisis de PIP₂ (Yonezawa *et al.*, 1990). Este mecanismo de regulación podría restringir espacialmente la activación de cofilina a zonas submembranas donde se activa PLC γ -1, como el frente celular durante la migración o la SI durante la activación celular (Eibert *et al.*, 2004; Klemke *et al.*, 2010). Por último, la unión a PIP₂ favorece la formación de oligómeros de cofilina, capaces de estabilizar filamentos de actina (Pfannstiel *et al.*, 2001).

C. Secuestro por cortactina

Cofilina también puede ser secuestrada por cortactina desfosforilada (Oser *et al.*, 2009): cuando aumenta la generación de fragmentos cortos de actina, cortactina es desfosforilada por fosfatasas aún desconocidas, lo que permite su unión a cofilina e impide su actividad fragmentadora, controlando así la aparición de más filamentos cortos. La fosforilación de cortactina por kinasas de la familia Src y Abl libera nuevamente cofilina y restaura su actividad de desensamblaje de filamentos (Oser *et al.*, 2009).

LFA-1, F-actina o la propia cofilina (Klemke *et al.*, 2008). Sin embargo, los linfocitos T necesitan estar activos en ambientes oxidativos. Esta situación se salva gracias a la generación de un microambiente reductor en la región submembrana del linfocito T mediante la *upregulación* de tioles durante la activación por células dendríticas (Schulte *et al.*, 2013). Este ambiente reducido previene la inactivación de cofilina por PIP₂, generando una reserva de cofilina activa anclada a la membrana plasmática.

1.3.3. Cofilina en la migración celular

Durante la migración celular, cofilina se acumula en el lamelipodio en su forma activa (Klemke *et al.*, 2010). Esta activación de cofilina es promovida por quimioquinas como SDF-1 α (ligando de CXCR4), que inactivan LIMK a través de la activación local de la ruta Ras-MEK en el frente celular (Figura In7) (Klemke *et al.*, 2010). La activación localizada de Ras también lleva a la activación de PI3K, que se ha descrito por encima de la activación de cofilina, quizá a través de la activación de SSH1 (Nishita *et al.*, 2004; Wabnitz *et al.*, 2006). Otros mecanismos para aumentar la concentración de cofilina activa de manera local en el lamelipodio podrían ser su liberación de PIP₂ al ser hidrolizado por PLC γ -1 activada (van Rheenen *et al.*, 2007) y la inhibición de LIMK a través de la inhibición de la ruta RhoA/ROCK (Klemke *et al.*, 2010). La activación local de cofilina genera nuevos extremos barbados desde filamentos de F-actina, los cuales a su vez son necesarios para que el complejo Arp2/3 pueda empezar a polimerizar y extender una red ramificada de actina en respuesta a quimiotaxis que, junto con la actividad sincronizada de cofilina, permitirán la formación del lamelipodio (Ghosh *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2007). Además, RhoA y ROCK, que activan LIMK y por tanto inhiben cofilina, se sitúan en las zonas media y posterior de la célula en migración (Klemke *et al.*, 2010).

Múltiples trabajos destacan la importancia del correcto funcionamiento del módulo de cofilina para el movimiento celular y han demostrado su papel en células Jurkat en la formación del lamelipodio y el mantenimiento de la direccionalidad (Nishita *et al.*, 2005; Klemke *et al.*, 2010). En otro estudio con células de adenocarcinoma mamario de rata, la sobreexpresión del dominio catalítico de LIMK resultó en la fosforilación de prácticamente toda la cofilina de la célula e incapacidad para formar el frente celular (Zebda *et al.*, 2000).

De acuerdo con la mayor importancia del citoesqueleto de actina en la migración 3D, la inhibición de la actividad de cofilina directamente o a través de la inhibición de Ras o MEK (*upstream* de cofilina) redujo la velocidad, la direccionalidad y el porcentaje de células que

migraron en soportes 3D que simulan la matriz extracelular; sin embargo, la migración en 2D, la cual es menos dependiente de la dinámica de actina, no se vio afectada (*et al.*, 2010). En resumen, la correcta regulación del módulo de cofilina es necesaria para conservar la direccionalidad del movimiento celular dependiente del flujo de actina.

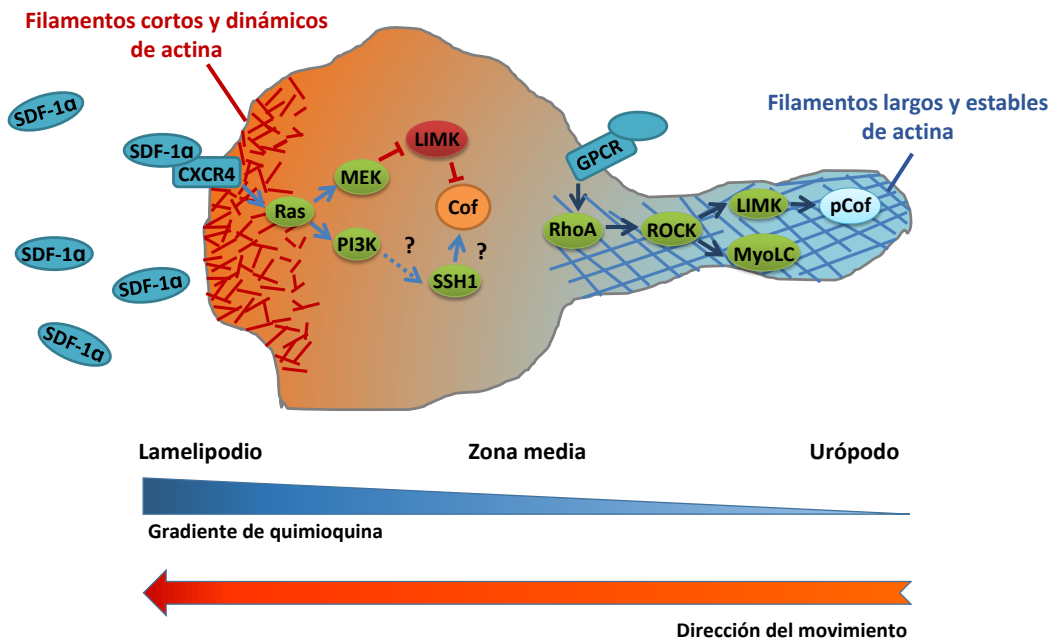


Figura In7: Cofilina participa en la migración celular promoviendo la renovación del citoesqueleto de actina en el frente celular. En la figura se muestra la activación de la ruta Ras/MEK que tiene lugar en presencia de la quimioquina SDF-1α. Como resultado de la activación local de cofilina en el lamelipodio, se generan múltiples fragmentos cortos de actina, mientras que en el urópodo la forma de actina predominante es en forma de filamentos largos debido a que cofilina se encuentra localmente inactiva.

1.3.4. Cofilina en la activación linfocitaria

La señalización mediante moléculas coestimuladoras como CD2 o CD28 activa cofilina, permitiendo su unión a actina. En el caso de CD2, esto ocurre de manera independiente a la estimulación por TCR (*Lee et al.*, 2000), por lo que se ha propuesto cofilina como una molécula nexa entre la cascada de señalización del TCR y la de coestimulación (Figura In1) y necesaria para la correcta activación celular, aunque aún se desconocen las rutas que lo median. Cofilina se ha situado también por debajo de la cascada de señalización Ras-MEK/PI3K, activada por señalización de TCR más coestimulación (*Wabnitz et al.*, 2006).

Al tratar linfocitos T humanos de sangre periférica con péptidos específicos bloqueantes de la unión de cofilina a actina se demostró la importancia de esta interacción para el proceso de activación linfocitaria (*Eibert et al.*, 2004). En este trabajo, al activar linfocitos T primarios con APCs presentando superantígeno E (SEE) se observó una menor

proliferación y producción de IL-2, IL-10 e IFN γ en células que habían sido tratadas con dichos péptidos en comparación con las no tratadas. Además, se redujo el porcentaje de conjugados T-B y se alteró la topología de la SI, interfiriéndose con la polarización de CD2 a la zona de interacción, aunque no con la acumulación de CD3.

Esto sugiere que cofilina puede ser un mediador clave en el establecimiento de la SI y en la consecuente función efectora del linfocito T, y refuerza nuestro interés en estudiar moléculas reguladoras de su actividad, en concreto, la familia de los SSHs.

1.4. *Slingshots*

Los SSHs son una subfamilia de proteínas fosfatasa de tirosina (PTPs) de clase I, cuyo residuo catalítico es una cisteína (Niwa *et al.*, 2002). Dentro de las PTPs, los SSHs se engloban dentro de las *Dual Specificity Phosphatases* (DSPs), que a su vez incluyen varias subfamilias con diferente especificidad (Alonso *et al.*, 2004). Los tres miembros de los SSH tienen especificidad por residuos de pSer (Alonso *et al.*, 2004).

En humanos, existen tres genes *SSH* que codifican los tres miembros de la familia (SSH1, SSH2 y SSH3), todos con actividad fosfatasa sobre cofilina pero siendo el tercero mucho menos eficiente que los otros dos (Ohta *et al.*, 2003). En cuanto a su expresión, SSH1 es el más ubicuo y con mayores niveles de expresión en general, mientras que SSH3 se encuentra sobre todo en tejidos epiteliales y SSH2 es más abundante en tejidos neuronales (Ohta *et al.*, 2003). Ratones con el gen *ssh3* delecionado no muestran alteraciones en el desarrollo, viabilidad o fertilidad (Kousaka *et al.*, 2008), mientras que ratones *knockout* de *ssh1* presentaron un aumento de masa ósea, aunque los resultados no fueron muy consistentes entre las diferentes cohortes (Brommage *et al.*, 2014). No se ha descrito ningún fenotipo en ratones delecionados de *ssh2*.

Por otro lado, la sobreexpresión en células HeLa de cada isoforma de SSH no produjo cambios en la organización del citoesqueleto, mientras que el silenciamiento de SSH1 o la sobreexpresión de formas catalíticamente inactivas de SSH1 o SSH2 (pero no de SSH3) produjo manojos gruesos y largos de actina (Niwa *et al.*, 2002; Ohta *et al.*, 2003).

1.4.1. Estructura

La estructura proteica de los tres SSHs se encuentra representada en la Figura In8. La secuencia firma HCxxGxxR del dominio fosfatasa (F) se encuentra cerca del extremo N-terminal y es compartida tanto entre isoformas como con el resto de miembros de la familia DSP y PTP (Ohta *et al.*, 2003). El residuo nucleofílico C393 ataca el grupo fosfato de la proteína diana, de manera similar a otras PTPs (Kolmodin & Aqvist, 2001; Kurita *et al.*, 2008). Mientras que los dos dominios del extremo N-terminal (denominados A y B) están también muy conservados dentro de la familia, las secuencias C-terminal apenas guardan similitud, a excepción de una región rica en serinas (dominio S) presente en SSH1 y SSH2. SSH3 carece de esta región S y su región C-terminal es mucho más corta (Ohta *et al.*, 2003). Por estas diferencias, el dominio C-terminal podría ser el responsable del control diferencial de las isoformas mediante interacciones con factores reguladores. También es la zona implicada en la unión a actina (Ohta *et al.*, 2003), mientras que la región N-terminal está implicada en el reconocimiento de cofilina (Kurita *et al.*, 2008).

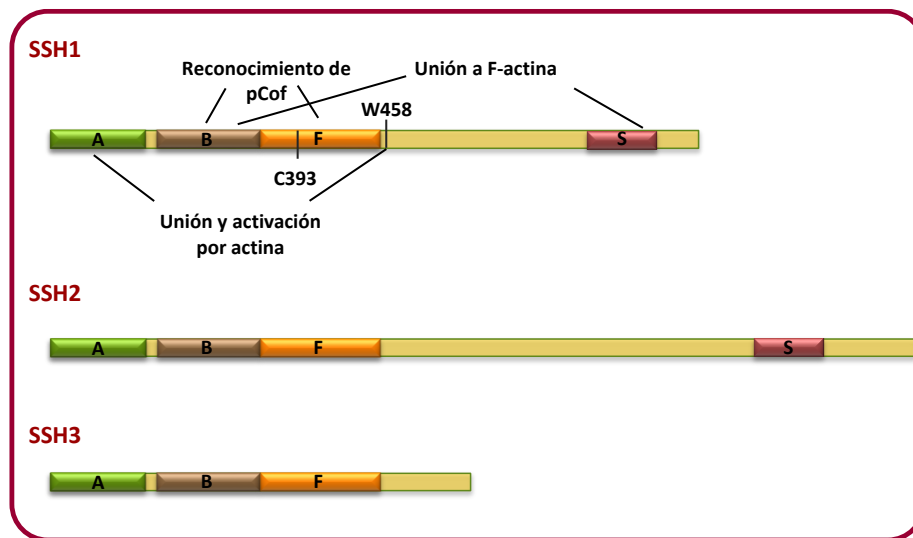


Figura In8: Estructura de las tres isoformas de SSH. Mientras que la parte N-terminal de la proteína está altamente conservada entre isoformas, la parte C-terminal varía considerablemente. SSH2 presenta un dominio C-terminal más largo que SSH1 y SSH3 carece de esta región. Se resaltan en SSH1 los residuos C393 (residuo catalítico) y W458 (crítico para la unión y activación por actina). A: dominio A; B: dominio B; F: dominio fosfatasa; S: región rica en serinas.

Además del dominio F, el dominio B de SSH1 es necesario para la desfosforilación de cofilina y parece ser también la región que confiere la especificidad de sustrato, ya que el dominio F por sí solo es capaz de desfosforilar sustratos sintéticos como pNPP (Kurita *et al.*, 2008). La región C-terminal de SSH1 parece prescindible para esta interacción (Kurita *et al.*,

2008). La afinidad relativamente baja del dominio B por pCof permite la liberación rápida del sustrato tras la desfosforilación, lo que favorece un suministro efectivo y continuo de cofilina libre activa y el reciclaje rápido de los filamentos de actina (Kurita *et al.*, 2008).

1.4.2. Actividad y unión a actina

Según ensayos de cosedimentación, SSH1 y en menor medida SSH2 son capaces de unirse a F-actina de manera independiente de su actividad fosfatasa, mientras que SSH3 no se une (Ohta *et al.*, 2003; Kurita *et al.*, 2007). Esto hace que SSH3 presente una distribución difusa en el citoplasma, mientras que las otras isoformas colocalizan con actina filamentosa (Ohta *et al.*, 2003). Hasta la fecha, no se ha observado que ningún SSH sea capaz de unir G-actina (Ohta *et al.*, 2003; Niwa *et al.*, 2002).

Dado que aparentemente SSH1 no forma dímeros (Kurita *et al.*, 2007), su función de estabilización parece estar mediada por la unión simultánea de una molécula de SSH1 a múltiples filamentos de actina (Yamamoto *et al.*, 2006; Kurita *et al.*, 2007). Existen tres zonas en SSH1 que son clave para su unión a actina: el motivo LHK (residuos 185-187) en el dominio B cerca del extremo N-terminal, el motivo LKR (973-975) del dominio S y el triptófano de la posición 458 (W458) en la zona C-terminal del dominio P (Yamamoto *et al.*, 2006). Cada uno de ellos parece participar en la unión y activación por actina en diferentes localizaciones: mutaciones en el dominio LHK hacen que SSH1 pierda su colocalización con actina en zonas periféricas cerca de la membrana plasmática; el W458 parece clave para la unión a actina en general, ya que el cambio por alanina en esta posición (W458A) hace que SSH1 aparezca con una distribución citoplasmática difusa; y los aminoácidos de la región C-terminal parecen inhibir la localización de SSH1 en fibras de estrés (Yamamoto *et al.*, 2006).

La dualidad en la actividad de SSH1 (formación de manojos y despolimerización de filamentos por activación de cofilina) la convierte en una proteína muy interesante. Se ha propuesto que en estado inactivo estabilice el citoesqueleto y que en respuesta a estimulación cambie a su conformación activa, desfosforilando cofilina y promoviendo la despolimerización de los filamentos (Kurita *et al.*, 2007). Otro modelo propuesto para controlar su actividad dual es mediante fosforilación/desfosforilación o mediante proteínas reguladoras de su unión a actina. Sin embargo, se desconoce cómo se regulan estas funciones totalmente opuestas que podrían estar controlando de manera importante el equilibrio y organización de actina en la célula.

Otras actividades exclusivas de SSH1 frente a las otras isoformas son la desfosforilación y activación de LIMK1 y de coronina 1B, una ABP que desfosforila e inhibe LIMK1 y LIMK2 (Cai *et al.*, 2007), lo que junto con la actividad directa de SSH1 sobre cofilina contribuye a aumentar la actividad de cofilina.

A continuación, comentaremos más en detalle estos y otros mecanismos de regulación (Figura In9).

1.4.3. Regulación

A. Fosforilación/desfosforilación

Existen varios residuos sujetos a regulación por fosforilación en SSH1: las Ser937 y Ser978 del extremo C-terminal, que median la unión a 14-3-3 en su estado fosforilado (Nagata-Ohashi *et al.*, 2004), y la Ser402 del dominio catalítico, que inhibe la unión y desfosforilación de cofilina cuando se encuentra fosforilada (Barisic *et al.*, 2011).

Actualmente, las kinasas y fosfatasas responsables de esta regulación son prácticamente desconocidas. Únicamente se han identificado miembros de las PKD que son capaces de fosforilar todas las serinas mencionadas (Eiseler *et al.*, 2009; Peterburs *et al.*, 2009; Barisic *et al.*, 2011), pero no se sabe nada sobre las fosfatasas que actúan en estos residuos. Sólo se ha descrito que estímulos como neuregulina (Nagata-Ohashi *et al.*, 2004) o la señalización por β -arrestina (Xiao *et al.*, 2010) o integrinas (Kligys *et al.*, 2007) inducen desfosforilación de estas serinas, lo que libera a SSH1 de su secuestro por 14-3-3 (ver más abajo) y permite la translocación de SSH1 al lamelipodio y la activación local de cofilina (Nagata-Ohashi *et al.*, 2004).

B. Activación por unión a actina

El mecanismo regulador que más dispara la actividad catalítica de SSH1 es su unión a actina, que aumenta su actividad fosfatasa específica sobre cofilina entre 10 (Nagata-Ohashi *et al.*, 2004) y 1200 veces (Kurita *et al.*, 2008). Esto tiene lugar probablemente por un cambio conformacional en los dominios N y P tras la unión a F-actina que ocasiona un cierre del sitio activo en una conformación más óptima para desfosforilar pCof (Kurita *et al.*, 2008). De todos los sitios de unión a actina presentes en SSH1 (Figura In8), el dominio A y el residuo W458 parecen indispensables para este aumento de actividad (Nishita *et al.*, 2005; Yamamoto *et al.*, 2006). Sin embargo, mientras que mutaciones en el W458 afectan drásticamente a la unión de SSH1 a actina, mutantes

que carecen del dominio A sólo la reducen parcialmente y no tienen afectada su actividad fosfatasa basal sobre cofilina (Yamamoto *et al.*, 2006; Kurita *et al.*, 2008). Por tanto, parece que W458 es un residuo clave en la unión a actina y en el aumento de actividad tras esta interacción.

La acumulación de F-actina en zonas que requieren un alto recambio del citoesqueleto (como el lamelipodio en células en migración o la SI), puede constituir un mecanismo de activación local de cofilina a través del aumento de actividad de SSH1 (Mizuno, 2013). De hecho, este mecanismo de activación es necesario para mantener la direccionalidad durante la migración celular (Nishita *et al.*, 2005). Al tratar células con Latrunculina A (droga que impide la polimerización de actina) se reduce la desfosforilación de cofilina mediada por SSH1, presumiblemente debido a un menor aumento de actividad por unión a actina (Nagata-Ohashi *et al.*, 2004). Este mecanismo regulador no está presente en SSH3 (el cual no se une a actina), y no se ha estudiado en SSH2.

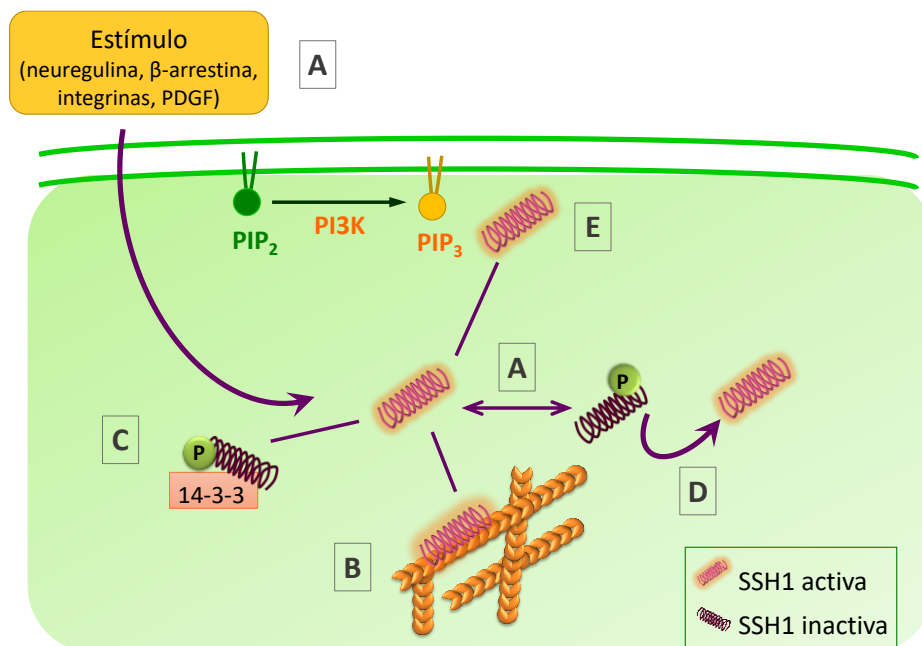


Figura In9: Mecanismos de regulación de SSH1. A) Fosforilación/desfosforilación regulada por ciertos estímulos exógenos. B) Aumento de actividad catalítica por unión a actina. C) Secuestro por 14-3-3. D) Autodesfosforilación en Ser384. E) Activación por PIP₃.

C. Secuestro por 14-3-3

Las proteínas 14-3-3 funcionan como módulos de unión de fosfoserinas y fosfotreoninas (Yaffe 2002). SSH1 puede interactuar con 14-3-3 cuando se encuentra

fosforilada en las Ser937 y Ser978, próximas al dominio LKR de unión a F-actina (Nagata-Ohashi *et al.*, 2004; Yamamoto *et al.*, 2006), lo que impide la desfosforilación de SSH1 y disminuye su activación mediada por unión a actina, probablemente debido a un impedimento estérico para dicha interacción por la proximidad de los sitios implicados (Nagata-Ohashi *et al.*, 2004; Yamamoto *et al.*, 2006). De hecho, la sobreexpresión de 14-3-3 secuestra SSH1 en el citoplasma e impide su translocación a las acumulaciones de actina en el lamelipodio y la activación de cofilina en esa zona (Nagata-Ohashi *et al.*, 2004).

Gracias a este mecanismo de regulación, SSH1 se mantiene inactiva en el citoplasma y puede ser liberada tras ciertos estímulos que oxidan residuos de cisteína en 14-3-3, como PDGF en células vasculares (Maheswaranathan *et al.*, 2011), neuregulina en células epiteliales (Nagata-Ohashi *et al.*, 2004) o la señalización por integrinas en queratinocitos (Kligys *et al.*, 2007), permitiendo su unión a F-actina de manera local.

D. Autodesfosforilación

SSH1 es además capaz de autodesfosforilarse en el residuo de Ser834 (Maheswaranathan *et al.*, 2011). Para ello es necesaria primero su liberación de 14-3-3, ya que este residuo se encuentra en el motivo de unión a esta proteína, y una vez libre la autodesfosforilación de la Ser834 impide que SSH1 sea secuestrado nuevamente por 14-3-3. De hecho, mutantes fosfo-deficientes (con una mutación S834A que impide la fosforilación de este residuo) son constitutivamente activos, ya que escapan a la acción de 14-3-3 (Maheswaranathan *et al.*, 2011).

E. Regulación por otras proteínas

Aunque todavía queda mucho por conocer acerca de la regulación de SSH1, se han descrito mecanismos de regulación por otras proteínas. Una de ellas es PI3K, la cual se activa localmente en protrusiones de membrana inducidas por insulina, produciendo un aumento de PIP₃ en esa zona que parece ser el responsable de la activación de SSH1, aunque el mecanismo exacto no ha sido aún elucidado (Nishita *et al.*, 2004).

A pesar de que no se conocen los residuos implicados, calcineurina (una fosfatasa activada por señales de calcio) es capaz de activar SSH1 por desfosforilación directa (Figura In1) (Wang *et al.*, 2005). Es posible que las Ser937 y Ser978 (Figura In8) sean los

residuos sujetos a este mecanismo de regulación, que liberaría a SSH1 de 14-3-3 (Wang *et al.*, 2005), pero aún no ha sido investigado.

Además de la activación de coronina 1B por SSH1 comentada anteriormente, SSH1 también puede ser activado por coronina 1B y 2A en protrusiones de membrana, aumentando la concentración local de cofilina activa en esa zona (Cai *et al.*, 2007; Marshall *et al.*, 2009). Coronina 1B además dirige SSH1 al frente celular (Cai *et al.*, 2007). Es probable que otros miembros de la familia, como coronina 1A, estén implicados en la regulación de SSH1 dado el efecto de su delección sobre la dinámica de actina y la activación celular (Mugnier *et al.*, 2008).

Las PKDs (situadas por debajo de las rutas de RhoA y H₂O₂), además de inhibir SSH1 directamente por fosforilación en las Ser937 y Ser978 (Eiseler *et al.*, 2009), son capaces de fosforilar y activar PAK4, que a su vez puede inhibir cofilina por activación de LIMK (Spratley *et al.*, 2011) y por reducción de la actividad fosfatasa de SSH1 por fosforilación en algún residuo aún no identificado de la región N-terminal (Soosairajah *et al.*, 2005).

1.4.4. SSHs en la migración celular

La acumulación de SSH1 en el lamelipodio en respuesta a ciertos estímulos (Nagata-Ohashi *et al.*, 2004; Nishita *et al.*, 2004), sugiere un papel regulador sobre cofilina durante la migración celular (Figura In7).

En células Jurkat, los niveles de pCof se incrementan de manera transitoria tras 1-5 minutos de estimulación con SDF-1 α debido a la activación de LIMK1, probablemente a través de Rac1 (Nishita *et al.*, 2002; Nishita *et al.*, 2005), y tras 20 minutos de estimulación vuelven a los niveles basales por acción de SSH1 (Nishita *et al.*, 2005). La acción de LIMK1 parece necesaria para la formación del lamelipodio en el inicio de la respuesta celular de migración, ya que su silenciamiento impide la generación de la misma y el movimiento. Sin embargo, la inhibición de SSH1 mediante siRNA no impide la migración celular pero sí produce pérdida de quimiotaxis debido a la presencia de múltiples lamelipodios en respuesta a estimulación (Nishita *et al.*, 2005). El modelo postulado por Nishita *et al.* propone que inicialmente se produce la activación de LIMK, aumentando los niveles de F-actina mediante la inhibición transitoria de cofilina y permitiendo así la formación de múltiples lamelipodios en la célula antes de un minuto tras la estimulación. La posterior translocación de SSH1 a un solo lamelipodio y su activación por unión a la actina allí acumulada, junto con la activación de LIMK en toda

la célula, llevarían a la activación local de cofilina y al establecimiento de un flujo dinámico de actina en un solo lamelipodio. Así, el equilibrio dinámico de los filamentos de actina estaría mediado por la fosforegulación de cofilina mediante un equilibrio entre las actividades de LIMK y SSH1.

1.4.5. SSHs en la activación de células T

La función de los SSHs durante la activación linfocitaria en respuesta a antígeno aún no ha sido estudiada. Varias observaciones previas nos sugieren que SSH1 podría tener un papel importante durante la activación del linfocito T: la activación de su sustrato cofilina tras estimulación del TCR o moléculas coestimuladoras por un mecanismo aún no entendido completamente (Lee *et al.*, 2000; Wabnitz *et al.*, 2006), la importante función de cofilina en el ensamblaje de la SI y función del linfocito T (Eibert *et al.*, 2004) o la acumulación de SSH1 en zonas ricas en F-actina (Mizuno, 2013).

1.5. Respuestas de ultrasensibilidad y biestabilidad

Los módulos de señalización basados en enzimas opuestas (como por ejemplo el monociclo de fosforilación/desfosforilación de cofilina) pueden responder a los cambios de estímulos con diferentes funciones de respuesta en función del mecanismo que las gobierne (Ferrell & Ha, 2014a, 2014b, 2014c). Si la tasa de reacción es directamente proporcional a la concentración de sustrato, se puede asumir que opera la ley de acción de masas (Ecuación 1), la curva estímulo-respuesta adquiere una forma hiperbólica que se denomina **Michaeliana (Figura In10 A)**,

$$\text{Respuesta} = \frac{\text{Estímulo}}{EC_{50} + \text{Estímulo}} \quad \text{Ecuación 1}$$

donde EC_{50} es el nivel de estímulo con el que se obtiene el 50% de respuesta.

Cuando el módulo posee ciertas propiedades, como regulaciones recíprocas o bucles de retroalimentación (*feedback loops*) positiva, pueden darse respuestas de **ultrasensibilidad** de tipo sigmoideal (**Figura In10 B**), descritas por la ecuación de Hill de cooperatividad (Ecuación 2) (Hill, 1910),

$$\text{Respuesta} = \frac{\text{Estímulo}^n}{\text{EC}_{50}^n + \text{Estímulo}^n} \quad \text{Ecuación 2}$$

donde n es el coeficiente o exponente de Hill que sirve como medida de ultrasensibilidad de la respuesta. Si $n=1$, la respuesta no es ultrasensible sino Michaeliana; valores de $n>1$ implican que la respuesta es ultrasensible; cuanto mayor sea n , más ultrasensible es la respuesta (Ferrell & Ha, 2014a).

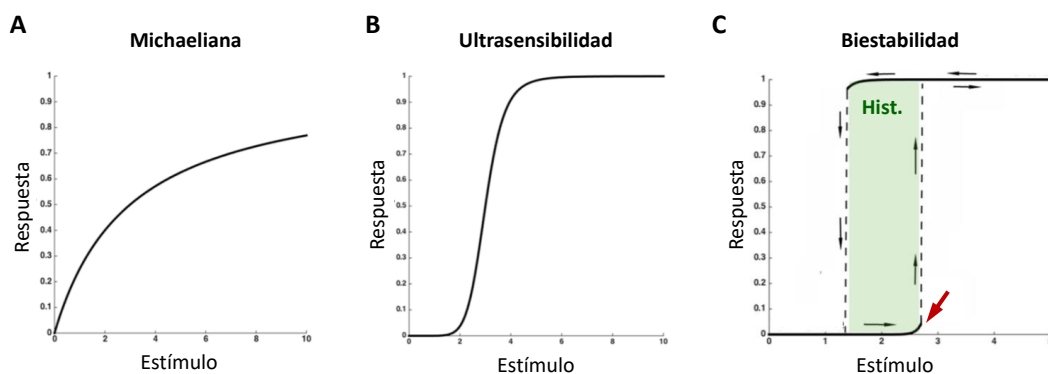


Figura In10: Posibles cinéticas estímulo/respuesta de un módulo de señalización. **A)** Cinética de Michaelis-Menten: la respuesta aumenta de manera hiperbólica con el estímulo hasta que alcanza un nivel de saturación o máxima respuesta. **B)** Ultrasensibilidad: la respuesta empieza a partir de un cierto nivel de estímulo y alcanza el nivel de máxima respuesta con un pequeño incremento del mismo. **C)** Biestabilidad: respuesta de ultrasensibilidad en la que existe una franja en el nivel de estímulo (banda verde) en la que existen dos posibles estados estacionarios: el de baja respuesta y el de alta respuesta. Las líneas punteadas indican estados intermedios, no posibles. La flecha roja señala el umbral de respuesta del módulo. Las flechas negras representan el paso desde el estado de baja respuesta al de alta respuesta, y viceversa. El estado de alta respuesta se mantiene cuando el estímulo disminuye por debajo del umbral, fenómeno conocido como histéresis (Hist.) (Ramirez-Munoz *et al.*, 2016).

Los módulos de señalización con respuestas ultrasensibles permiten filtrar (no responder a) los estímulos más bajos, de manera que sólo los niveles de estímulo por encima de un cierto nivel producirán una respuesta. Esta respuesta será además abrupta, alcanzando el máximo con un pequeño incremento de estímulo sobre el umbral, y se conoce como respuesta de tipo interruptor (Ferrell and Ha 2014a). Las respuestas ultrasensibles facilitan la aparición de **biestabilidad (Figura In10 C)**, una situación en la que para un cierto nivel de estímulo pueden existir dos estados estacionarios de respuesta: el de baja respuesta (*off state*) o el de alta respuesta (*on state*) (Ferrell & Ha, 2014b).

Las respuestas ultrasensibles pueden estar generadas por varios mecanismos:

- A) Ultrasensibilidad de orden cero, cuando tanto la enzima que cataliza la reacción directa como la que cataliza la inversa operan cerca de la saturación y las reacciones son independientes de la concentración de sustrato (Goldbeter & Koshland, 1981; Ferrell & Ha, 2014a).
- B) Acumulación local de la molécula de señalización del módulo y la enzima que la activa. Esto aumenta la especificidad y velocidad de transmisión de la señal debido a la mayor frecuencia a la que se encuentran las proteínas (Ferrell, 1998).
- C) Regulación recíproca, una situación que se da cuando un estímulo es capaz de activar la enzima activadora del módulo y, a la vez, inhibir a la inhibidora (Ferrell & Ha, 2014b).
- D) Bucles de retroalimentación positivos o doble negativos, que permiten que un determinado estímulo actúe sobre una respuesta más de una vez (Ferrell & Ha, 2014b). Esto aumenta la ultrasensibilidad enormemente y facilita la aparición de respuestas **biestables** con **histéresis** (Ferrell, 2002), en las que el sistema se mantiene en el estado de máxima respuesta aun después de que el estímulo baje por debajo del umbral. Si los bucles de retroalimentación son muy fuertes, la respuesta puede convertirse en irreversible, manteniéndose en el tiempo aunque desaparezca totalmente el estímulo que la disparó mediante mecanismos de memoria molecular (Ferrell & Ha, 2014c).

1.5.1. Posibles mecanismos de ultrasensibilidad en el módulo de cofilina

Varias de las características comentadas están presentes en el módulo de cofilina (Figura In11), lo que nos hizo pensar que podría existir ultrasensibilidad en el módulo (Ramirez-Munoz *et al.*, 2016).

En primer lugar, SSH1 no sólo es capaz de aumentar los niveles de cofilina activa mediante su desfosforilación directa, sino que además es capaz de desfosforilar e inhibir la enzima LIMK que inactiva cofilina. Por tanto, cualquier estímulo que active SSH1 inhibe LIMK, generando una regulación recíproca (Figura In11, flecha roja (i)); (Soosairajah *et al.*, 2005). En segundo lugar, SSH1 es capaz de autoactivarse por desfosforilación en la Ser834 (Maheswaranathan *et al.*, 2011), lo que generaría un bucle de retroalimentación positiva sobre su activación (Figura In11, flecha verde (ii)). En tercer lugar, la unión de SSH1 a actina filamentosa, organizada a su vez por cofilina activa (Ghosh *et al.*, 2004), aumenta

enormemente la actividad catalítica de SSH1 (Nagata-Ohashi *et al.*, 2004), lo que genera un bucle de retroalimentación positiva en el módulo (Figura In11, flecha verde (iii)).

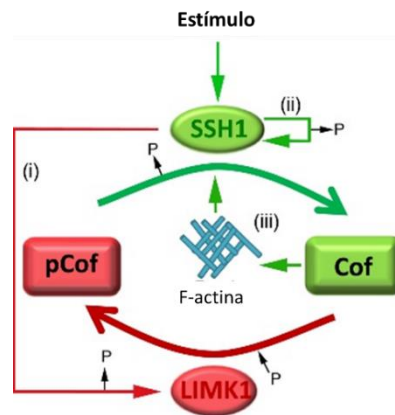


Figura In11: Posibles mecanismos de ultrasensibilidad en el módulo de cofilina. Cofilina es fosforilada por LIMK y desfosforilada (activada) por SSH1. SSH1 presenta varios mecanismos de regulación que podrían dar lugar a una respuesta ultrasensible: (i) inactivación de LIMK por SSH1; (ii) autodesfosforilación; (iii) aumento de actividad catalítica tras unión a actina filamentosa (Ramirez-Munoz *et al.*, 2016).



OBJETIVOS

OBJETIVOS

Debido a las propiedades de SSH1, los mecanismos reguladores en el módulo de cofilina y la gran falta de conocimiento acerca del papel de SSH1 en la migración, así como en la activación y formación de la SI en linfocitos T, en esta tesis doctoral nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Aportar evidencias experimentales de que SSH1 induce una respuesta ultrasensible en el módulo de cofilina, así como si existe biestabilidad e irreversibilidad.
2. Investigar mecanismos reguladores implicados en la ultrasensibilidad.
3. Estudiar la distribución dinámica de SSH1 en la SI.
4. Estudiar el papel regulador de SSH1 en el ensamblaje de la SI y en la señalización de los linfocitos T.
5. Investigar si SSH1 tiene un papel en la migración en dos y tres dimensiones de los linfocitos T.

MATERIALES Y
MÉTODOS



3.1. Anticuerpos

A continuación se incluye una lista de los anticuerpos usados, detallando su especie de origen, casa comercial o laboratorio y técnica en la que se emplearon (Tabla 1).

Tabla 1: Listado de los anticuerpos empleados. FSM: Dr. Francisco Sánchez Madrid, Centro Nacional de Investigación Cardiovascular (CNIC), Madrid; Act.: activación; Aisl.: aislamiento; FACS: citometría de flujo; IF: inmunofluorescencia; M: Microscopía; WB: Western Blot.

Anticuerpo	Casa comercial	País	Especie	Aplicación
CD3ε (clon Hit3a)	Biologend	EEUU	Ratón	Act.
CD3ε (clon T3b)	FSM	España	Ratón	IF, FACS
CD3ε (clon UCHT-1)	FSM	España	Ratón	Act.
CD3ζ (clon 448)	Abcam	Reino Unido	Conejo	WB
CD4 (HP2/6)	FSM	España	Ratón	FACS, Aisl.
CD8 (TP 1/13 T8)	FSM	España	Ratón	FACS, Aisl.
CD19 (BU12)	FSM	España	Ratón	FACS, Aisl.
CD19-PerCP	Immunostep	España	Ratón	FACS
CD28	BD Pharmingen	EEUU	Ratón	Act.
CD28-APC	BD Pharmingen	EEUU	Ratón	FACS
CD63 (TEA 3/18.1)	FSM	España	Ratón	FACS
CD69-APC	Life Technologies	EEUU	Ratón	FACS
CD69-FITC	Biologend	EEUU	Ratón	FACS
Cofilina total (mAb22)	Sobrenadante	España	Ratón	FACS, WB
ERK1/2	Cell Signaling	EEUU	Conejo	WB
HLA-DR	FSM	España	Ratón	FACS
IgG humana	Sigma Aldrich	EEUU	Humano	FACS, IF
ICAM-1	FSM	España	Ratón	FACS
LFA-1 (TP1/40)	FSM	España	Ratón	FACS
LFA-1 activa (mAb24)	FSM	España	Ratón	IF
NKp46	FSM	España	Ratón	Aisl.
p-CD3ζ	Abcam	Reino Unido	Conejo	WB
pCof	Cell Signaling	EEUU	Conejo	FACS, WB

p-ERK1/2	Cell Signaling	EEUU	Conejo	WB
p-PLC γ	Cell Signaling	EEUU	Conejo	WB
PLC γ	Cell Signaling	EEUU	Conejo	WB
SSH-1	Abcam	Reino Unido	Conejo	IF, FACS
α -Tubulina	Sigma Aldrich	EEUU	Ratón	IF
TCR β -A597 (clon H57)	Biologend	EEUU	Hámster armenio	M

3.2. Líneas y cultivo celular

Las líneas de células B (**Raji** y **HOM-2**) fueron crecidas en RPMI 1640 + GlutaMAX-I (Gibco, Suiza) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS; Hyclone, Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) y penicilina/estreptomicina (Lonza) a 100 u/ml y 100 μ g/ml, respectivamente.

La línea celular Jurkat **E6-1** derivada de leucemia humana y su clon **J77** (ambas V β 8⁺) fueron crecidas en RPMI 1640 (Lonza, Suiza) suplementado de la misma manera que las líneas B, más glutamina 10 mM (Lonza, Suiza).

El clon de Jurkat **CH7C17** (aquí llamado CH7), que carece de CD28 y, además de expresar TCR V β 8, está transfectado establemente con un TCR V β 3 transgénico específico para el péptido hemaglutinina de la gripe, HAP (Hewitt *et al.*, 1992), se creció en RPMI 1640 + GlutaMAX-I suplementado de la misma manera que las líneas B. Semanalmente se añadieron los antibióticos puromicina (4 μ g/ml; InvivoGen) e higromicina B (400 μ g/ml; Sigma Aldrich, Estados Unidos) para mantener la expresión del TCR transgénico.

El clon de CH7 transfectado establemente con un plásmido de baja expresión de β -actina unido a mCherry (**CH7- β -actina**) fue cedido por el grupo de Juan Serrador (Departamento de Biología Celular e Inmunología, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, de Madrid) (García-Ortiz *et al.*, 2017) y se mantuvo en cultivo de la misma manera que las CH7 parentales pero suplementando el cultivo de manera adicional con el antibiótico G418 (0,8 mg/ml; Calbiochem, Estados Unidos) semanalmente para mantener la expresión de β -actina.

Por último, la línea celular **D10** de linfocitos T CD4⁺ de ratón se creció en RPMI suplementado con 10% de FBS, glutamina 2 mM, penicilina/estreptomicina 100 u/ml y 100 µg/ml, respectivamente, y β-mercaptoetanol 50 µM.

Periódicamente se comprobó por citometría la expresión de marcadores de superficie en todas las líneas celulares humanas (CD3, CD4, LFA-1, CD28 y Vβ3 o Vβ8 en el caso de las líneas T, y CD19, HLA-DR e ICAM-1 en el caso de las líneas B), así como que no hubiera contaminación por micoplasma mediante el kit “VenorGeM® Mycoplasma Detection Kit for conventional PCR” y la enzima “MB Taq DNA Polymerase” (ambos de Minerva Biolabs GmbH, Alemania).

3.3. Citometría de flujo

Todas las tinciones de superficie se realizaron en hielo, resuspendiendo en 100.000 células en 50 µl de PBS por tinción con γ-globulina humana (10 µg/ml; Sigma Aldrich). Tras 30 minutos de bloqueo, se añadió el anticuerpo correspondiente o la sonda de actina filamentosa faloidina-A647 (Molecular Probes, Estados Unidos) durante 30 minutos, seguido de un lavado con PBS. En el caso de anticuerpos no marcados, se añadieron los correspondientes anticuerpos secundarios y se incubaron durante 30 minutos más. Tras un nuevo lavado, se resuspendieron las células en 200 µl de PBS frío con 1mM EDTA y se analizaron por citometría.

En el caso de las tinciones intracelulares, en primer lugar se fijaron las células con paraformaldehído (PFA) 4% en PBS durante 20 minutos en hielo y se lavaron con PBS. A continuación, se permeabilizaron con PBS + 0,2% saponina durante 20 minutos a temperatura ambiente y se lavaron. Tras este paso, se siguió el mismo protocolo de tinción con anticuerpos que para las tinciones de superficie.

Los datos se adquirieron en un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences, Estados Unidos) y se analizaron utilizando el programa FlowJo (TreeStar, Estados Unidos).

3.4. Aislamiento y expansión de células primarias humanas

Para la obtención de células primarias, se aislaron PBMCs (células mononucleares de sangre periférica) desde *buffy coats* procedentes del Centro de Transfusión de la Comunidad de Madrid. Para ello, se realizó una separación por gradiente de densidad con Ficoll-HisPaque (Rafer, España) mediante centrifugación a 600g durante 30 minutos a temperatura ambiente (RT). Posteriormente, se recogió la interfase de PBMCs con diferentes fines:

3.4.1. Expansión de linfocitos CD4⁺ humanos

Para la obtención de blastos CD4, se repartieron 1,5 millones de PBMCs en cada pocillo de una P24 en presencia de superantígeno E (SEE) soluble a 1 µg/ml (Toxin Technology, Estados Unidos). A las 24 horas se añadió IL-2 a 50 u/ml (Peprotech, Estados Unidos), renovándose cada dos días. Las células se utilizaron entre los 7 y 14 días de cultivo.

3.4.2. Expansión de linfocitos CD8⁺ humanos

Para la obtención de blastos CD8, se repartieron 1,5 millones de PBMCs en cada pocillo de P24 y se añadió una mezcla de péptidos virales (*CEF pool*; Mabtech, Suecia) procedentes de citomegalovirus, virus de Epstein-Barr y virus de la gripe. A las 48 horas se añadió IL-2 a 50 u/ml, renovándose cada dos días. A las dos semanas, se comprobó el porcentaje de células CD8⁺ y se purificaron en el caso de obtener una pureza menor al 70%.

3.4.3. Purificación o aislamiento de células CD8⁺ humanas

Para enriquecer el cultivo de blastos en células CD8⁺ o para purificar linfocitos CD8⁺ totales desde PBMCs, se realizó una selección negativa empleando bolas magnéticas *Dynabeads Protein G* (Life Technologies, Estados Unidos) conjugadas con sobrenadantes anti-CD19 y anti-CD4 siguiendo las instrucciones proporcionadas por la casa comercial. El porcentaje de células CD8⁺ obtenidas tras este procedimiento se encontraba en torno al 80-90%.

3.4.4. Aislamiento de linfocitos CD4⁺ totales humanos

El aislamiento de células CD4⁺ totales a partir de PBMCs se realizó mediante selección negativa, empleando el kit específico “*Dynabeads™ Untouched™ Human CD4 T cells*” (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) y siguiendo las instrucciones proporcionadas por la casa comercial. El porcentaje de células CD4⁺ obtenidas se encontraba en torno al 90-99%.

3.5. Manejo de ratones y aislamiento y cultivo de células de ratón

Todo el manejo de ratones se realizó en la Universidad de California San Francisco (UCSF) de acuerdo a la normativa vigente del Comité Institucional para el Cuidado y Uso Animal (IACUC).

Se emplearon únicamente ratones transgénicos OT-I sacrificados mediante cámara de CO₂ y posterior dislocación cervical evitando todo el sufrimiento en la manera de lo posible. Posteriormente, se extrajeron los ganglios linfáticos maxilares, axilares, intestinales e inguinales, se disgregaron, se filtraron a través de poros de 100 µm (Thermo Fisher Scientific) y se lavaron en medio RPMI completo.

Por otro lado, se extrajo el bazo, se disgregó en PBS y se filtró por poros de 100 µm. Tras lavarlo con PBS, se lisaron los glóbulos rojos mediante incubación con NH₄Cl 175 mM durante 10 min en hielo. A continuación, se incubaron las células con SL8 (OVA 257-264; Anaspec, Estados Unidos) a 100 ng/ml durante 30 min a 37°C. Por último, se pasaron a un flask junto con las células de los ganglios en proporción 2:1 (bazo:ganglio). A las 48 horas, se añadió IL-2 a 10 u/ml, renovando la citoquina cada dos días. Las células se emplearon a los 4-7 días de cultivo.

3.6. Generación de plásmidos

En primer lugar, se realizó una PCR con *primers* específicos para SSH1 o cofilina (Sigma Aldrich, Tabla 2) utilizando la ADN polimerasa *PfuTurbo* (Agilent Technologies, Estados Unidos) a partir de cDNA de PBMCs. Tras comprobar el tamaño de la banda amplificada en un gel de agarosa, se purificó el producto de PCR utilizando el kit “QIAquick® Gel Extraction Kit” (Qiagen, Alemania). El producto obtenido se sometió a digestión con las enzimas de restricción XhoI y HindIII (New England Biolabs, Estados Unidos), al igual que el vector eGFP C1 o N1 (Clontech, Estados Unidos) para SSH1 o cofilina, respectivamente. Tanto el vector como el fragmento amplificado digeridos se sometieron a electroforesis en gel de agarosa para purificar las bandas del tamaño deseado como anteriormente. Estos fragmentos se sometieron a ligación con DNA ligasa T4 (New England Biolabs) durante toda la noche a 16°C. Tras la ligación, se transformaron 5 µl de la reacción en bacterias competentes *XL1-blue* (Agilent Technologies) siguiendo las indicaciones de la casa comercial y se plaquearon

50-100 µl de bacterias en placas de LB-agar con kanamicina a 30 µg/ml (Sigma Aldrich). Al día siguiente se realizó una PCR de 5-10 colonias aleatorias con los mismos *primers* específicos para comprobar el correcto clonaje y expresión de nuestra construcción. Cuando el tamaño de banda amplificado era el esperado, se crecieron las colonias correspondientes en 5 ml de medio de cultivo LB durante toda la noche para extraer el ADN plasmídico con el kit “QIAprep® Spin Miniprep Kit” (Qiagen). Se enviaron muestras a secuenciar a la Unidad de Genómica (UCM) y se creció una colonia que presentara la secuencia e inserción correctas en 300 ml de medio de cultivo LB para llevar a cabo una nueva extracción de ADN utilizando el kit “NucleoBond® PC” (Macherey-Nagel, Alemania). Estas preparaciones fueron empleadas para transfecciones transitorias.

Tabla 2: Listado de *primers* empleados para el clonaje de SSH1 y cofilina y para el subclonaje de W458A por mutagénesis dirigida. Las bases subrayadas corresponden a las secuencias diana de las enzimas de restricción indicadas en el nombre del *primer* mientras que las bases en rojo indican las bases que se mutaron para generar la mutación puntual W458A de SSH1. **Fw:** *primer forward*; **Rv.:** *primer reverse*.

Gen	Secuencia <i>primer</i>
SSH1	Fw-XhoI: CCC <u>CTCGAG</u> TTATGGCCCTGGTGACCCTGCAG
	Rv-HindIII: CCCAAGCTTTTAGCTTTTGCTCATCCACGAAGG
Cofilina	Fw-EcoRI: CCCGAATTCATGGCCTCCGGTGTGGCTGTC
	Rv-AgeI: CCC <u>ACCGG</u> TGGCAAAGGCTTGCCCTCCAGGGAGATG
W458A	Fw: GGCACAACAAGCTG GCC CGTCAGCAGACAGAC
	Rv: GTCTGTCTGCTGACG GCC CAGCTTGTTGTGCC

La construcción GFP-C393S (mutante catalítico de SSH1), se diseñó en el laboratorio y se generó en la casa comercial GenScript (China) sobre la base del vector pcDNA 3.1 + N-eGFP. El plásmido de pmCherry- CD3ζ N1 fue amablemente cedido por el laboratorio del Dr. Balbino Alarcón (Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid) y el plásmido p^{CAG}LifeAct-TagRFP fue adquirido a la casa comercial Ibidi (Alemania).

3.6.1. Mutagénesis dirigida

La construcción GFP-W458A (mutante SSH1 de unión a actina) fue generada mediante mutagénesis dirigida a partir de la construcción GFP-SSH1 previamente generada. En primer lugar, se diseñaron *primers* complementarios a la región de la secuencia flanqueando el residuo a mutar, incluyendo en ellos una mutación puntual adecuada (Tabla 2). Tras

amplificación por PCR con *PfuTurbo*, se digirió el producto de la reacción con la enzima DpnI (Agilent Technologies). El producto resultante se transformó en bacterias ultracompetentes XL10-Gold (Agilent Technologies) siguiendo las instrucciones de la compañía. Se plaquearon 10-250 μ l en placas de LB-agar con kanamicina (30 μ g/ml) y tras 16 horas se comprobaron colonias aleatorias por PCR y secuenciación como se ha explicado anteriormente.

3.7. Transfección

3.7.1. Electroporación

Para electroporar células CH7, se lavaron éstas con HBSS sin calcio ni magnesio (Lonza) y con Opti-MEM (Gibco) antes de resuspender 2,5-5 millones de células por transfección en 400 μ l de Opti-MEM junto con la construcción de interés (2 μ g de DNA/millón de células). Esta suspensión se sometió a un choque eléctrico de 240 mV y 975 μ F en un equipo Gene Pulser II (Bio-Rad, Estados Unidos). Se resuspendieron suavemente a 1 millón/ml en medio RPMI incompleto pre-equilibrado y tras 2 horas se cambió el medio por medio completo. Al día siguiente se realizó una separación por Ficoll antes del experimento para eliminar células muertas y restos celulares.

3.7.2. Nucleofección

La línea J77, las células CD4⁺ primarias humanas, la línea múrida D10 y los blastos CD8⁺ de ratón fueron nucleofectadas debido a la baja eficiencia obtenida mediante electroporación. Para ello, se emplearon kits específicos de Amaxa[®] (Lonza) y el programa de nucleofección más apropiado según la ficha técnica, utilizando siempre 2 μ g de DNA/millón de células. Tras la nucleofección, las células se resuspendieron a 1-2 millones/ml en medio completo previamente equilibrado y al día siguiente se realizó una separación por Ficoll antes del experimento.

En el caso de las células humanas se utilizó el equipo Amaxa[™] Nucleofector[™] II (Amaxa Biosystems, Lonza), mientras que para las células de ratón se empleó el Neon Transfection System (Thermo Fisher Scientific) en la UCSF.

3.8. qPCR

Para realizar PCRs cuantitativas, en primer lugar se extrajo el RNA total de células primarias humanas CD4⁺ o CD8⁺ de donantes sanos, de blastos CD4⁺ o CD8⁺ obtenidos de los mismos donantes y de células Jurkat CH7 o J77, utilizando el kit “Absolutely RNA Microprep Kit” (Agilent Technologies, Estados Unidos). 2 µg de este RNA fueron utilizados para sintetizar cDNA con el kit “High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit” (Applied Biosystems, Estados Unidos). A partir de estos cDNAs se realizaron qPCRs con sondas específicas para los genes *SSH1*, *SSH2* y *SSH3* y la mezcla de reacción “TaqMan Universal PCR Master Mix” (Life Technologies) en un equipo 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Estados Unidos). Para todas las muestras se calculó el valor Δ CT como los valores de CT normalizados al valor CT del gen de la proteína ribosomal 18S.

3.9. Migración celular

3.9.1. Migración en microcanales (2D)

Los microcanales se prepararon rellenando moldes con canales de diferentes anchuras disponibles en el laboratorio del Dr. Krummel (Departamento de Patología, UCSF) con el polímero PDMS 10:1, dejando un grosor de 2-3 mm sobre el molde. Se dejó polimerizar toda la noche a temperatura ambiente en una cámara de vacío y al día siguiente se hornearon a 55°C durante una hora para finalizar la polimerización. Una vez atemperados, se cortaron rectángulos con pocillos individuales. Se agujerearon las zonas centrales al principio de los canales, se lavaron con etanol 95% y se limpiaron bien empleando un equipo limpiador de plasma. Se colocaron los moldes bocabajo sobre un cristal, se hornearon durante 10 minutos más a 60°C y se limpiaron de nuevo.

Finalmente, se recubrieron con ICAM-1 (5 µg/ml) durante 1 hora, se lavaron y se colocaron en las perforaciones de cada canal 10 µl de una suspensión celular conteniendo 200.000 células en RPMI completo. Las imágenes se adquirieron cada 20 segundos durante 3 horas utilizando un equipo Zeiss Axiovert 200M (laboratorio del Dr. Krummel, UCSF). Se empleó un objetivo 40x PlanFluar/1.3 de aire y las muestras se mantuvieron en condiciones de temperatura y CO₂ controladas (37°C y 5%, respectivamente).

3.9.2. Migración en matriz de colágeno (3D)

Los experimentos de migración en matrices tridimensionales se realizaron en colaboración con el Dr. Javier Redondo (Universidad Complutense de Madrid, UCM).

Partiendo de células CH7 transfectadas con las construcciones GFP de interés, se marcaron con la sonda *Cell Tracker Far Red* (Molecular Probes) para facilitar el seguimiento de las células. Se resuspendieron en medio RPMI con 2% FBS y 25 mM HEPES y se mezclaron 300.000 células con una mezcla de colágeno a 1,7 mg/ml en un pocillo de una cámara Nunc Lab-Tek II de 8 pocillos (Thermo Scientific, Estados Unidos). Se dejó polimerizar la matriz con las células embebidas en ella durante una hora y media a 37°C y se pusieron bajo un microscopio confocal Olympus FV1200 (Centro de Apoyo a la Investigación (CAI)-UCM).

Se adquirió una imagen cada 5 minutos durante 3 horas, programando una pletina motorizada tomando 3 planos Z de cada campo. Se usó un objetivo UPLSAPO 20x/0.75 abriendo el *pinhole* al máximo para aumentar la anchura del plano Z. Las muestras fueron mantenidas en condiciones de temperatura y CO₂ controladas (37°C y 5%, respectivamente).

3.10. Estudios de activación celular

3.10.1. Formación de conjugados e inmunofluorescencia

Para la formación de conjugados, se marcaron las células B (Raji o HOM-2) con CMAC (marcador de citoplasma) y se cargaron con SEE en el caso de las Raji, o con SEB o HAP en el caso de las HOM-2. A continuación, se incubaron con las células T (J77 o CH7, respectivamente) en proporción 1:1 durante 20 minutos. Por último, se fijaron las células con PFA 4% y se mantuvieron en PBS hasta su tinción.

Las tinciones se realizaron en cámara húmeda, permeabilizando las muestras para tinciones intracelulares con Triton X-100 0,1% durante 5 minutos. A continuación, se bloquearon con IgG humana (10 µg/ml) en TNB, se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes durante 1 hora y se añadieron los anticuerpos secundarios o la sonda de actina filamentosa faloidina-A568 (Molecular Probes) durante 30 minutos. Por último, se montaron los cristales con Mowiol 4-88 (Sigma Aldrich).

3.10.2. Activación por anticuerpos

Para la activación con anticuerpos, se recubrieron cristales o placas con anti-CD3 (UCHT-1 o Hit3a) a 5-10 $\mu\text{g/ml}$, y se añadió anti-CD28 (2 $\mu\text{g/ml}$). Para experimentos de citometría, se dejaron las células 4 horas antes de teñir; para experimentos de microscopía, se adquirieron las imágenes inmediatamente.

3.10.3. Activación sobre bicapas lipídicas presentadoras de antígeno

Las bicapas lipídicas se prepararon con una mezcla de fosfolípidos (Avanti Polar Lipids, Estados Unidos) según lo descrito anteriormente (Beemiller *et al.*, 2012), sobre cámaras Nunc Lab-Tek II de 8 pocillos limpiadas con HCl 1 M/etanol 70% durante 30 minutos y NaOH 10 M durante 15 minutos. Brevemente, se mezclaron POPC 96,5%, DGS-NTA(Ni) 2%, Cap-PE-biotinilado y PEG5000-PE 0,5% en cloroformo, se secaron bajo flujo de nitrógeno y se dejaron toda la noche en cámara de vacío. Al día siguiente se rehidrataron en DPBS (Gibco) a una concentración total de 4 mM, se extruyeron los liposomas por membranas Nuclepore® Track-Etched de 100 nm (Whatman, Reino Unido) usando un extrusor de lípidos (Avanti) y se repartieron 250 μl en cada pocillo. Después de 30 min, se lavó cada pocillo con 8 ml de DPBS y se bloquearon los sitios de unión inespecífica con DPBS-BSA 1% durante 30 minutos. A continuación, se añadieron 25 ng de estreptavidina (Life Technologies) a cada pocillo y tras 30 minutos se lavaron y se añadió una mezcla de 63 ng de ICAM-1 (producido en el laboratorio del Dr. Krummel, UCSF) y 6 ng de OVA-MHC (NIH Tetramer Core Facility, Estados Unidos). Estas concentraciones son similares a las que existen en las células presentadoras según resultados previos del laboratorio del Dr. Krummel (comunicación personal). Tras una nueva incubación de 30 minutos, se lavaron los pocillos y se cambió el DPBS por RPMI + 1% FBS + 10 mM HEPES justo antes de la adquisición de imágenes.

Por otro lado, los blastos CD8⁺ de ratones OT-I se incubaron con el anticuerpo anti-TCR β -Alexa Fluor 597 (clon H57, Biolegend, Estados Unidos) para seguir el movimiento del TCR.

3.11. Western blot

Para los experimentos de Western blot, se mezclaron entre 300.000 y 600.000 células J77 con células Raji (cargadas con SEE) en proporción 10:1 y se incubaron durante 5, 15 o 30

minutos. Para las muestras de 0 minutos (no estimuladas), se incubaron células T con células B sin antígeno.

Tras las incubaciones, las células fueron lisadas a 1 millón/100 μ l en el siguiente tampón de lisis suave: TrisHCl pH 7,5 5 mM o 20 mM; Triton X-100 0,2%; NP40 1%; NaCl 150 mM; MgCl₂, 1,5 mM y EDTA 2 mM. A este tampón se añadieron en el momento los siguientes inhibidores de proteasas: mezcla de inhibidores de proteasas 1x (Roche, Suiza), ortovanadato sódico 2 mM, PMSF 1 mM, fluoruro sódico 10 mM, β -glicerol fosfato 5 mM y pirofosfato sódico 1 mM (todos de Sigma Aldrich). Tras incubación durante 40 min en hielo, se centrifugaron las muestras durante 10 min a 1000 g y 4°C y se les añadió tampón de carga Laemmli buffer 1x con 5% de β -mercaptoetanol.

Las muestras así obtenidas se sometieron a electroforesis en geles de 1 mm de anchura al 13% de poliacrilamida (100 V, 20 min + 130 V, 90 min). Posteriormente, se realizó una transferencia húmeda a membranas de PVDF (4 horas a 300 mA), bloqueo de 1 hora con TBS + 0,2% Tween-20 + 5% BSA e incubación con anticuerpos primarios (anti-pCD3 ζ , anti-pPLC γ y anti-pERK1/2) durante 16 h a 4°C en agitación. Estas membranas se incubaron con el anticuerpo secundario cabra-anti-conejo IgG-HRP (Bonsai Advanced Technologies, España) (en el caso de pCD3 ζ y pPLC γ) o burro-anti-conejo-680 (Bonsai Advanced Technologies) (en el caso de pERK) durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación. El revelado se realizó con reactivos de ECL Plus (Thermo Fisher Scientific) utilizando un equipo Odyssey (LI-COR Biosciences, Estados Unidos).

Después del revelado, se quitaron los anticuerpos utilizando el reactivo *Stripping buffer* (LI-COR Biosciences) y se incubaron las membranas con anticuerpos primarios contra las proteínas totales (CD3 ζ , PLC γ y ERK1/2) durante toda la noche a 4°C en agitación. Al día siguiente, se revelaron las membranas con los anticuerpos secundarios correspondientes de la misma manera que con las proteínas fosforiladas. La cuantificación de las bandas se realizó utilizando el programa informático Image Studio (LI-COR Biosciences).

3.12. Ensayos de movilización de calcio

Para los experimentos funcionales de calcio, se emplearon células Jurkat E6-1 transfectadas con las construcciones GFP-SSH1, GFP-C393S o GFP sola marcadas con la sonda de calcio X-Rhod-1-AM (Molecular Probes) 2 μ M en medio HBSS con $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ + 2% FCS + 25 mM HEPES + 0,0003% ácido plurónico. Tras 40 minutos a 37°C, se lavaron las células y se resuspendieron en medio RPMI + 2% FCS + 25 mM HEPES a 2 millones/ml. Los datos se recogieron en un equipo LSR Fortessa (BD Biosciences), utilizando 600 μ l de cada condición de la siguiente manera: adquisición de la señal basal durante 1 min, adición de 50 μ l de tetrámeros anti-CD3/anti-CD28 (Stemcell Technologies, Canadá), adquisición durante 5 minutos, adición de 5 μ l de ionomicina (1 mg/ml) y adquisición durante 3 minutos más. Las muestras se mantuvieron a 37°C durante todo el experimento. El análisis de los datos se realizó utilizando el programa FCS Express (De Novo Software, Estados Unidos).

3.13. Microscopía y adquisición de imágenes

3.13.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

En los experimentos realizados con SEM se emplearon blastos CD8⁺ de ratones OT-I previamente nucleofectados y separados en GFP⁺ y GFP⁻ como control. Se plaquearon aproximadamente 25.000 células de cada tipo en cristales recubiertos con poli-L-lisina (PLL) 0.01% y se dejaron adherir durante 1 hora a 37°C.

A continuación, se fijaron las células con una mezcla de glutaraldehído 2% y formaldehído 4% en tampón fosfato 0,1 M pH 7,3 durante toda la noche a 4°C. Luego, se hicieron tres aclarados de 15 minutos con tampón fosfato seguido de un lavado de 1 hora con tetróxido de osmio (OsO_4) 1%. Se realizó un nuevo lavado de 5 minutos y se deshidrataron las muestras con incubaciones de 15 minutos en concentraciones crecientes de etanol (35%, 70%, 95% y 100%). Se hicieron dos nuevas incubaciones con etanol 100% durante 15 y 30 minutos y se procedió al desecado al punto crítico con CO_2 . Por último, se montaron en una matriz de aluminio y se hizo un recubrimiento con oro. Las muestras se examinaron en un microscopio electrónico NeoScope (Nikon) en la UCSF.

3.13.2. Microscopía confocal

Para la adquisición de imágenes por microscopía confocal, se utilizó el equipo Olympus FV1200 del CAI-UCM. En el caso de las muestras fijadas, se utilizó un objetivo UPLSAPO 60x/1.35 de aceite de inmersión. Los distintos fluoróforos empleados se excitaron con láseres 405 (CMAC), 488 (GFP), 559 (mCherry y Alexa Fluor 568) y 594 (Alexa Fluor 594). De cada imagen se tomaron entre 20 y 30 planos confocales Z con un incremento de 300 nm.

En el caso de las secuencias de vídeos de conjugados, se empleó un objetivo UPLSAPO 60x/1.20 de agua. Los distintos fluoróforos se excitaron como se ha comentado, tomándose una imagen cada 5 segundos. En este caso, las muestras fueron mantenidas en condiciones de temperatura y CO₂ controladas (37°C y 5%, respectivamente).

3.13.3. Microscopía de fluorescencia de reflexión interna total (TIRF)

La microscopía de TIRF de blastos CD8⁺ de ratón se realizó en la UCSF utilizando un sistema Zeiss Axiovert 200-M equipado con un láser TIRF. Se utilizó un objetivo 100x PlanApo/1.46 de aceite de inmersión para los experimentos sobre bicapas lipídicas activadoras y un objetivo 40x PlanFluar/1.3 para los experimentos de migración sobre microcanales. Para la microscopía de TIRF en dos colores, se utilizó un sistema de escaneo simultáneo en dos canales (Photometrics, Estados Unidos) con un filtro dicróico de pase largo de 560 nm y filtros de emisión de 525/50 nm y 605/70 nm para dividir el campo de la cámara en dos imágenes y así poder adquirir de manera simultánea GFP y Alexa Fluor 568. La cámara empleada fue una Evolve emCCD (Photometrics) y el intervalo temporal fue de 1-2 segundos con una exposición de 33-100 mseg durante 3-5 minutos.

La microscopía de TIRF de células humanas se realizó en el Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC, Madrid) en colaboración con el grupo del Dr. Francisco Sánchez Madrid. El equipo empleado fue un Leica AM TIRF MC M montado sobre un microscopio Leica DMI 6000B equipado con una cámara Andor-DU8285 VP-4094. Las imágenes se adquirieron con un objetivo HCX PL APO 100x/1.46 de aceite de inmersión y una penetrancia Z de 110 nm. Las muestras fueron excitadas con láseres 488 (GFP) o 561 (mCherry) y el intervalo temporal fue de 100-200 mseg.

3.13.4. Análisis de imágenes

Todas las imágenes de microscopía fueron analizadas con el programa gratuito Fiji (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>; NIH, Estados Unidos). Para la cuantificación de la acumulación de proteínas en la SI, se empleó el *plugin* “Synapse Measure” para Fiji (Calabia-Linares *et al.*, 2011). Este programa calcula proporciones de intensidades de fluorescencia locales comparando las intensidades en diferentes regiones de la célula T y en la zona de interés, y corrigiéndolas con la señal del fondo y de la célula B.

Para los análisis de colocalización, se empleó el *plugin* JACoP (*Just Another Colocalization Plugin*) para Fiji (Bolte & Cordelières, 2006).

RESULTADOS

4.1. Expresión de los SSHs en linfocitos T

En primer lugar, se estudió la expresión de los distintos miembros de los SSHs mediante qPCR en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ totales, blastos CD4⁺ y CD8⁺ (generados a partir de los mismos donantes que los totales) y las líneas CH7 y J77 (Figura R1 A). En todos los tipos celulares estudiados, SSH3 fue la isoforma menos expresada, mientras que los niveles de expresión de SSH1 y SSH2 fueron similares dentro de cada tipo.

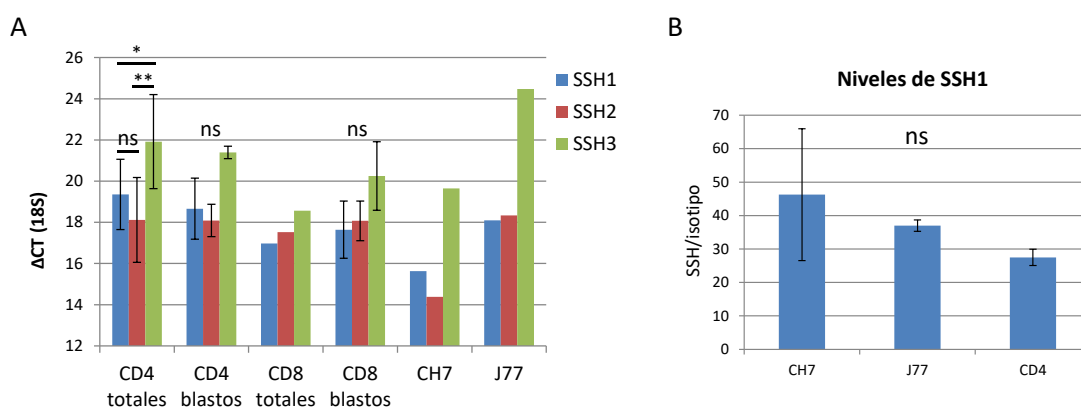


Figura R1: SSH3 es la isoforma con menor expresión en linfocitos T. **A)** Niveles de expresión de SSH1, SSH2 y SSH3 estudiados por qPCR en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ totales de donantes sanos, blastos CD4⁺ y CD8⁺ generados a partir de los mismos donantes y las líneas celulares Jurkat CH7 y J77. En la gráfica se muestran los valores del ΔCT para cada gen sustraídos con el valor del ΔCT del gen ribosomal 18S. **B)** Cuantificación de los niveles de proteína SSH1 en células Jurkat y linfocitos T CD4⁺ totales. Número de donantes en la qPCR = 4 (CD4⁺ totales), 2 (blastos CD4⁺ y blastos CD8⁺) o 1 (CD8⁺ totales, CH7 y J77). Número de ensayos de citometría = 5 (J77) ó 2 (CH7 y CD4⁺ totales). Análisis estadístico empleado: ANOVA de un factor con corrección de Bonferroni. *p-valor <0,05; **p-valor <0,01.

Los datos de qPCR se complementaron con ensayos de citometría para estudiar los niveles de proteína (Figura R1 B). Aunque no existen diferencias significativas en los niveles de proteína debido probablemente al bajo número de experimentos, las CH7 fueron las células que más SSH1 expresaban de las poblaciones estudiadas, seguidas por las J77 y después por los linfocitos T CD4⁺ totales. Estos datos sobre los niveles de proteína coinciden con lo observado para el mRNA.

4.2. La sobreexpresión de SSH1 o cofilina induce anomalías morfológicas

Con el objetivo de estudiar si la sobreexpresión de SSH1 o cofilina produce alteraciones del citoesqueleto que se reflejen en anomalías morfológicas, se transfectaron células de la

línea múrida D10 con las construcciones Cof-GFP o GFP-SSH1 (Figura R2) y se observaron bajo SEM según lo descrito en el apartado 3.13.1 de Materiales y métodos.

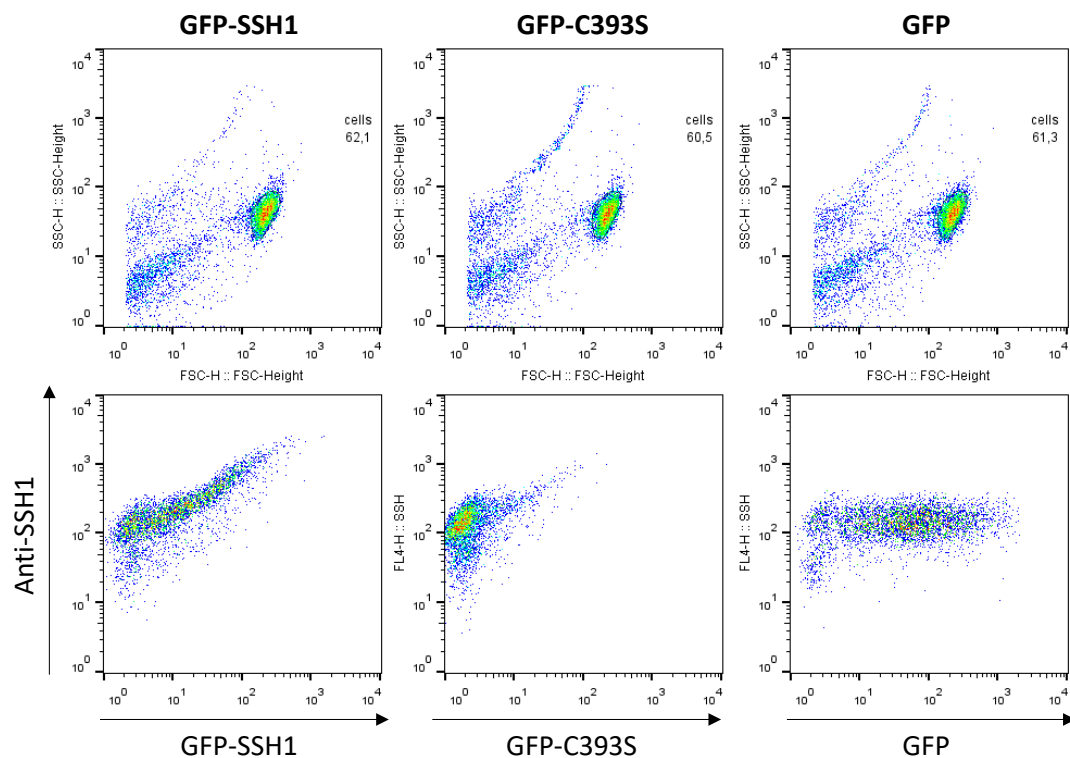


Figura R2: Las proteínas quiméricas codificadas por los plásmidos generados se expresan correctamente. Se transfectaron células Jurkat CH7 con cada una de las construcciones generadas (GFP-SSH1 y GFP-C393S) y con el vector GFP como control. Se tiñeron las células de cada transfección con un anticuerpo policlonal anti-SSH1 y se comprobó la correlación entre los niveles de expresión de la proteína quimérica y los niveles de tinción para comprobar la integridad de las construcciones.

Las células control (GFP⁻), presentaban microvellosidades en toda su superficie y una morfología y tamaño homogéneos (Figura R3 A y R3 D izquierda, flechas rojas). Sin embargo, las células que sobreexpresaban SSH1 presentaban formas bulbosas en la superficie y microvellosidades menos abundantes, en ocasiones ausentes (Figura R3 B y R3 D central, flechas rojas y asteriscos). Las células que sobreexpresaban cofilina mostraban alteraciones similares a las encontradas en las células sobreexpresando SSH1 pero con alguna diferencia: aunque también presentaban en ocasiones formas bulbosas en su superficie, tenían más microvellosidades que las GFP-SSH1, aunque éstas aparecían ensanchadas y con forma redondeada en comparación con las del control (Figura R3 C y R3 D derecha, flechas rojas). En ambos casos, las células a menudo parecían tener varios frentes celulares, originando formas en cruz o en triángulo.

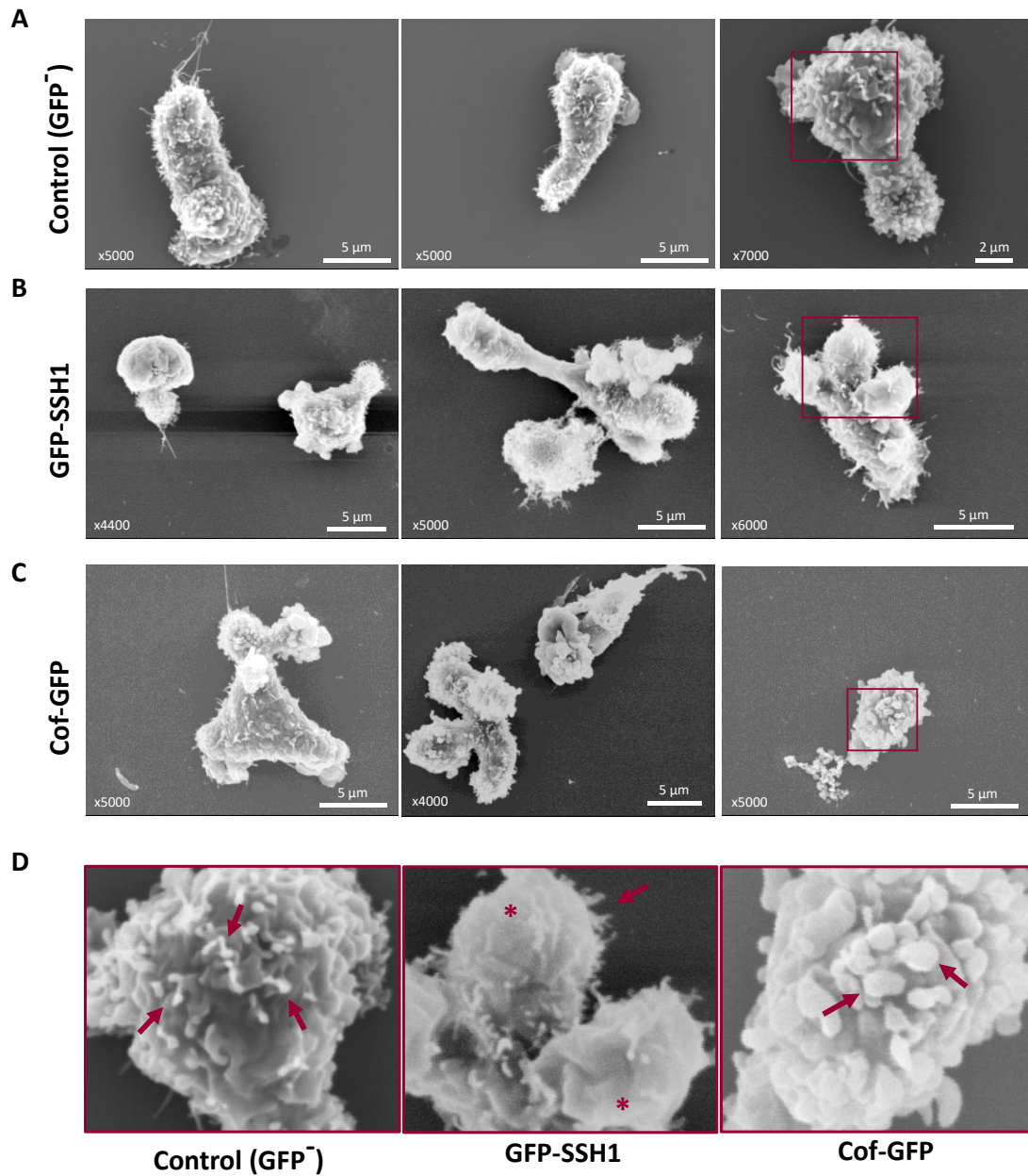


Figura R3: La sobreexpresión de SSH1 o cofilina produce anomalías morfológicas en la célula. Las imágenes de SEM muestran 3 ejemplos representativos de cada condición de células D10: Cof-GFP⁻ (A), GFP-SSH1⁺ (B) y Cof-GFP⁺ (C). Los recuadros rojos sobre cada imagen de la derecha delimitan el área ampliada y mostrada en D. Las flechas rojas en D indican las anomalías morfológicas explicadas en el texto, mientras que los asteriscos rojos resaltan zonas de la membrana sin microvellosidades. En la parte inferior izquierda de cada imagen (A-C) se muestra el aumento y en la parte inferior derecha la barra de escala.

4.3. Regulación del módulo de cofilina por SSH1

Dados los posibles mecanismos de ultrasensibilidad presentes en el módulo de cofilina (ver apartado 1.5.1 de la Introducción), nos propusimos estudiar si se observaba este tipo de respuesta de cofilina activa en función de los niveles de SSH1. Para ello, transfectamos células Jurkat con la construcción GFP-SSH1 y estudiamos los niveles de pCof por citometría de flujo (Figura R4).

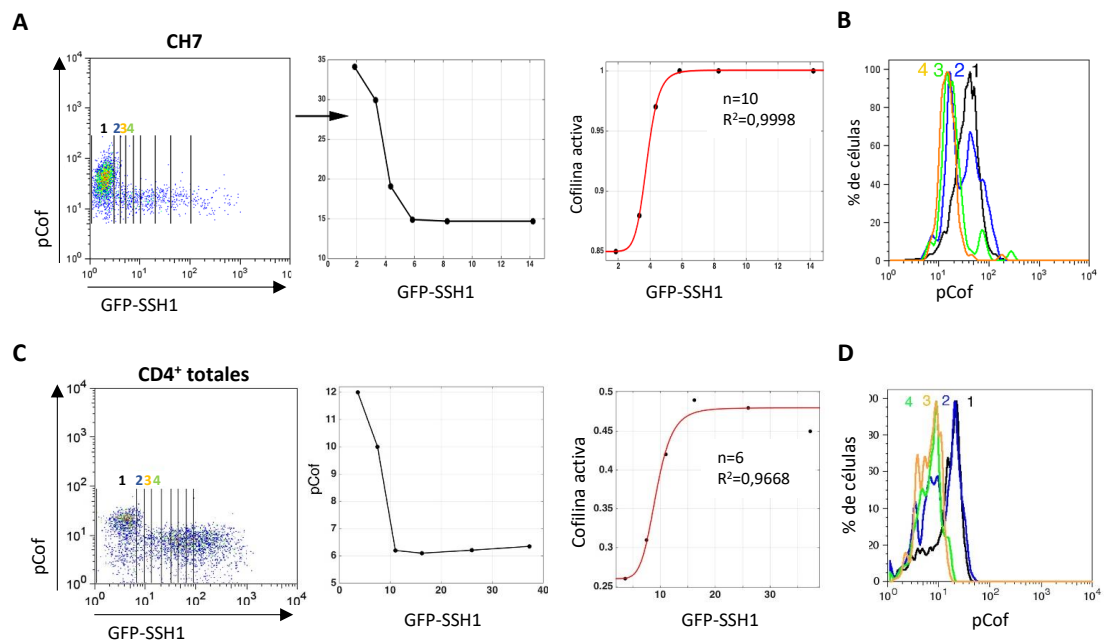


Figura R4: Existe una respuesta de ultrasensibilidad en el módulo de cofilina en función de los niveles de SSH1.
A) Dot plots de los niveles de pCof en función de los niveles de expresión de GFP-SSH1 en células CH7. Se establecieron diferentes regiones en los niveles de expresión de GFP-SSH1 (1 a 4), y de cada una de ellas se obtuvo la media geométrica de la intensidad (MGI) de pCof (representado en el panel central). En el panel de la derecha se representan los niveles de cofilina activa, calculada como $(tCof - pCof)/tCof$, frente a GFP-SSH1 y el ajuste a la ecuación de Hill según lo descrito (Trunnell *et al.*, 2011), realizado con la herramienta *Curve Fitting* de Matlab (MathWorks, Inc.). **B)** Histogramas de pCof en cada una de las regiones establecidas en **A**. Los paneles inferiores **C** y **D** muestran las mismas representaciones que **A** y **B**, respectivamente, en células T CD4⁺ primarias. tCof: cofilina total; pCof: cofilina fosforilada. n=coeficiente de Hill.

La sobreexpresión de GFP-SSH1 causó una brusca reducción en los niveles de pCof, alcanzando los mínimos niveles de fosforilación con niveles de expresión de GFP-SSH1 bajos, tanto en células Jurkat como en CD4⁺ primarias (Figura R4 A y R4 C). Este tipo de respuesta recuerda a una respuesta de tipo ultrasensible (apartado 1.5 y Figura In11 de la Introducción) (Ferrell & Ha, 2014a), por lo que ajustamos las curvas a la ecuación de Hill, que define este tipo de respuestas, y obtuvimos coeficientes de Hill elevados ($n \geq 6$) en todos los casos (Figura

RESULTADOS

R4 A y R4 C). Estos resultados indican que la activación de cofilina es ultrasensible a los niveles de SSH1.

En los histogramas de la Figura R4 B y R4 C se observa una curva bimodal para la región 2 (curva azul) correspondiente a los niveles más bajos detectables de GFP-SSH1. Esto sugiere la existencia de biestabilidad en el módulo, con dos posibles estados de respuesta para un determinado rango de estímulo (apartado 1.5 de la Introducción).

Para obtener más evidencias experimentales de la biestabilidad, se analizaron por Western Blot los niveles de pCof en linfocitos T CD4⁺ primarios, blastos CD4⁺ expandidos en presencia de SEE durante 7 días e IL-2 durante los últimos 6 días, blastos CD4⁺ a los que se retiró el SEE tras 24 horas y se añadió IL-2 los 6 días siguientes, y células J77 (Figura R5). Los niveles de pCof en CD4⁺ totales fueron los más elevados, y se reducían hasta casi 4 veces tras la estimulación antigénica con SEE durante 7 días. Esta reducción de pCof se mantenía al retirar el estímulo tras 24 horas, lo que sugiere que existe una respuesta biestable con un estado de activación del módulo que se mantiene al retirar el estímulo y en la que probablemente operen mecanismos de memoria molecular para generar una respuesta irreversible (Ferrell & Ha, 2014c).

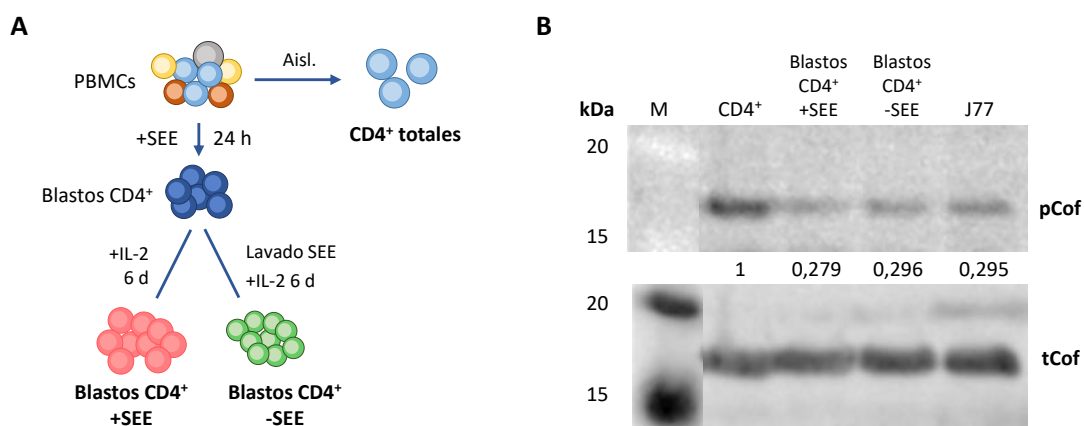


Figura R5: Los niveles de cofilina activa aumentan con la estimulación antigénica y se mantienen en el tiempo al retirar el estímulo. A) Protocolo de obtención y generación de las células empleadas en este experimento. **B)** Western Blot de lisados de células CD4⁺ totales, blastos CD4⁺ estimulados durante 24 horas con SEE y 6 días con SEE + IL-2, blastos CD4⁺ estimulados durante 24 horas con SEE y 6 días con solo IL-2, y células de la línea J77, usando anticuerpos específicos para pCof y tCof. Los números bajo las bandas de pCof indican la cuantificación de las intensidades de las bandas de pCof divididas entre las de tCof y relativizando cada valor al de los linfocitos CD4⁺ totales. La figura muestra un experimento representativo de 4. Aisl.: Aislamiento; pCof: fosfo-cofilina; tCof: cofilina total.

RESULTADOS

Existen varios mecanismos en el módulo de cofilina que podrían estar mediando la ultrasensibilidad en el módulo (apartado 1.5.1 de la Introducción). Para estudiar si el bucle de retroalimentación positiva causado por la unión de SSH1 a F-actina es uno de ellos, transfectamos células Jurkat con las construcciones GFP-SSH1, GFP-C393S o el mutante de unión a actina GFP-W458A (Figura R6 A). Los resultados muestran que el mutante C393S no es capaz de desfosforilar cofilina, mientras que el mutante W458A sí, aunque la reducción en los niveles de pCof en este caso es menos abrupta que en el caso de GFP-SSH1, con coeficientes de Hill siempre menores (de hasta la mitad) (Figura R6 B-D). Por tanto, podemos decir que la ultrasensibilidad en la respuesta del módulo es dependiente, al menos en parte, de la unión de SSH1 a F-actina.

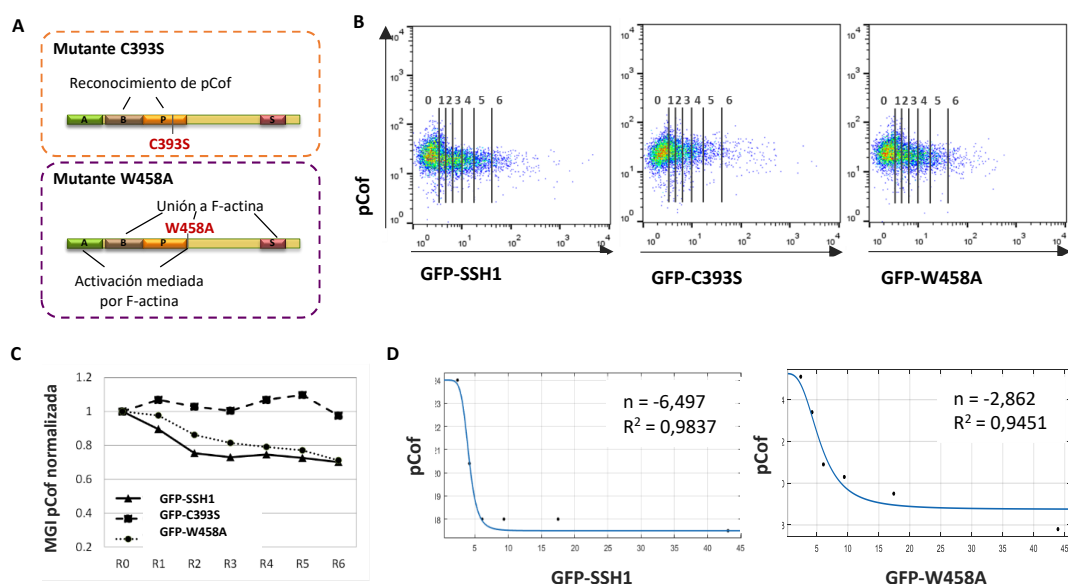


Figura R6: La respuesta ultrasensible en el módulo de cofilina es dependiente, al menos en parte, de la unión de SSH1 a actina. A) Figura esquemática donde se muestra la estructura de SSH1 y la mutación puntual del mutante W458A. B) Se tomaron diferentes regiones correspondiendo a distintos niveles de expresión de SSH (0 a 6) y se obtuvo la media geométrica de la intensidad de fluorescencia (MGI) para pCof en cada uno de ellos. Estos valores, normalizados a R0, se representaron gráficamente en C. D) Los datos obtenidos para las construcciones de GFP-SSH1 (izquierda) y GFP-W458A (derecha) se ajustaron a la ecuación de Hill para estudiar la ultrasensibilidad de la respuesta en función de los niveles de SSH mediante la herramienta *Curve Fitting* de MatLab. n = coeficiente de Hill; pCof: fosfo-cofilina. Se muestra un experimento representativo de 3.

Además de la presencia de bucles de retroalimentación, otro mecanismo capaz de generar ultrasensibilidad es la acumulación local de una enzima y su sustrato (apartado 1.5 de la Introducción) (Ferrell, 1998). Debido a que cofilina se polariza y acumula en la periferia de la SI (Eibert *et al.*, 2004), quisimos estudiar si SSH1 se acumula también en esas áreas y si este reclutamiento es dependiente de su actividad catalítica o de su unión a actina.

4.4. Distribución de SSH1 en la SI

Para estudiar la acumulación de SSH1 a la SI, transfectamos células CH7 con las construcciones GFP-SSH1, GFP-C393S o GFP-W458A y conjugamos estas células T durante 20 minutos con células B presentadoras de HAP según lo descrito en el apartado 3.10.1 de Materiales y métodos. Los resultados se recogen en la Figura R7 y muestran la acumulación

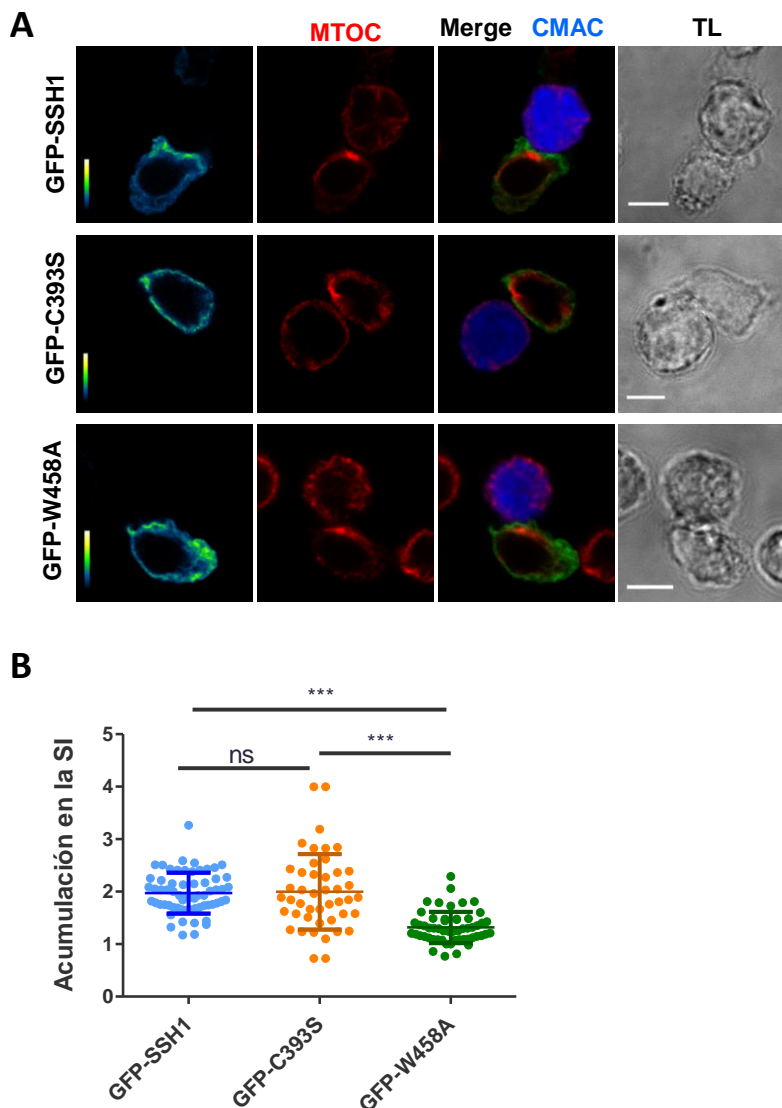


Figura R7: SSH1 se distribuye en la periferia de la SI de linfocitos T CD4⁺ de manera independiente de su actividad catalítica y dependiente de su interacción con actina. A) Imágenes representativas de conjugados a 20 minutos entre células HOM2 marcadas con CMAC (azul) y células CH7 transfectadas con GFP-SSH1, GFP-C393S o GFP-W458A. Los conjugados se tiñeron con un anticuerpo anti- α -tubulina para visualizar el MTOC (rojo) como marcador de SI maduras. El panel muestra imágenes representativas de interacciones CH7-HOM2. **B)** Cuantificación de la acumulación de SSH1 o sus mutantes en la SI utilizando el *plugin* de Fiji *Synapse Measures*. Las barras de error representan la desviación estándar de la media. Prueba estadística empleada: ANOVA de un factor con corrección de Bonferroni. n = 45-63 células de 4 experimentos independientes. *** p<0,005. Barras de escala: 5 μ m.

de SSH1 o sus mutantes en la SI. Esta localización es independiente de su actividad catalítica, ya que el mutante C393S se acumulaba en igual medida (Figura R7 B), pero sin embargo, la unión a actina es necesaria para que SSH1 se polarice, como muestra la distribución del mutante W458A.

Para estudiar en más detalle la distribución de SSH1 en la SI, realizamos tinciones de marcadores clásicos de los distintos SMACs (CD3 para el cSMAC, LFA1 para el pSMAC y actina para el dSMAC) en conjugados generados de la misma manera y los estudiamos por microscopía confocal (Figura R8). Realizando reconstrucciones 3D de la zona de interacción, observamos que la distribución de SSH1 era más periférica que la de CD3 y LFA1 y coincidía totalmente con la de actina, lo que indica que SSH1 se acumula en el dSMAC.

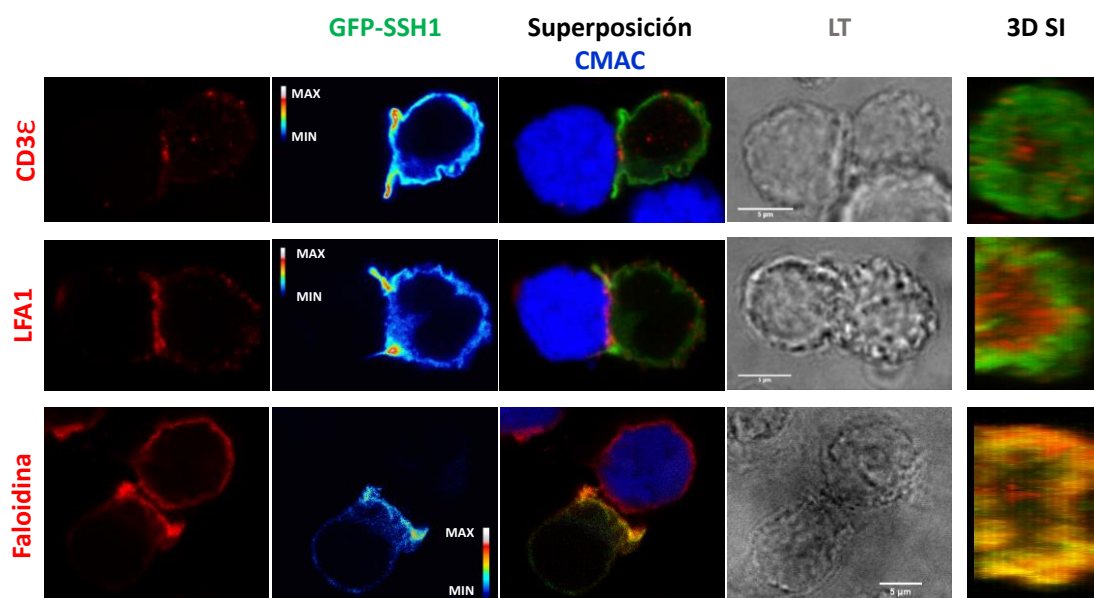


Figura R8: SSH1 se acumula en el dSMAC de la SI, colocalizando con actina filamentosa. Conjugados a 20 minutos entre HOM2 cargadas con HAP (marcadas con CMAC, en azul) y CH7 transfectadas con GFP-SSH1, GFP-C393S o GFP-W458A (pseudocolor). Los conjugados fueron fijados y teñidos con CD3, LFA1 o actina (rojo) y se estudió la localización de cada una de estas moléculas respecto a SSH1 mediante reconstrucciones 3D de la zona de interacción (paneles de la derecha). Se muestran imágenes representativas de 20-30 células de 2 experimentos independientes. LT: Luz transmitida. Barras de escala: 5 µm.

4.5. Dinámica de la polarización de SSH1 a la SI

A continuación, quisimos estudiar la dinámica del reclutamiento de SSH1 a la SI. Para ello, analizamos mediante microscopía confocal de intervalo temporal la interacción entre células Jurkat y Raji, transfectando las primeras con la construcción GFP-SSH1 junto con

CD3 ζ -mCherry (Figura R9 A y Vídeo 1) o el marcador de actina filamentosa LifeAct-TagRFP (Figura R9 B y Vídeo 2). En las gráficas a la derecha de cada secuencia de vídeo podemos observar que SSH1 comienza a acumularse en la zona de interacción muy rápidamente (en 15-30 segundos), alcanzando la máxima acumulación entre 1 y 1,5 min tras el contacto inicial. También se observa que el movimiento de SSH1 a la zona de interacción comienza antes que la acumulación de CD3 ζ o de actina.

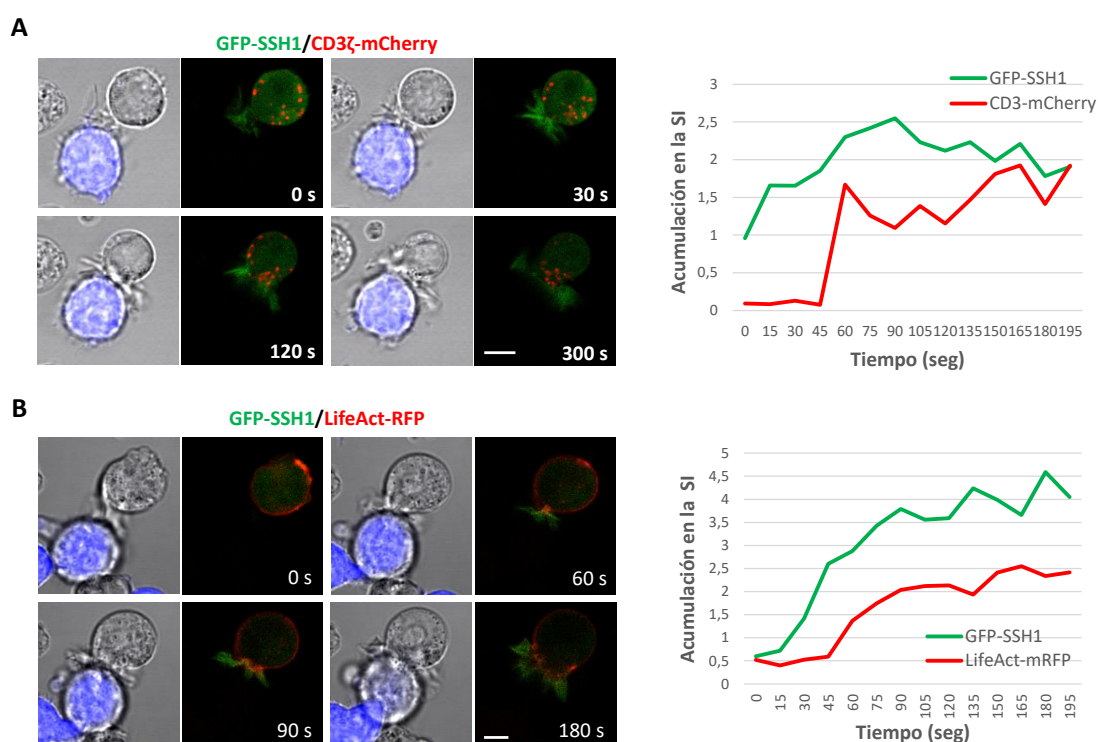


Figura R9: SSH1 se acumula rápidamente en la SI. Intervalos temporales de microcopia confocal de interacciones entre células Raji cargadas con SEE (marcadas con CMAC, en azul) y células J77 transfectadas con las construcciones GFP-SSH1 y CD3 ζ -mCherry **(A)** o GFP-SSH1 y LifeAct-RFP **(B)**. A la derecha de cada secuencia de vídeo se muestra la cuantificación de la acumulación de cada molécula en la SI a lo largo del tiempo, calculada utilizando el *plugin* de Fiji *Synapse Measures*. La figura muestra un experimento representativo de 3. Barras de escala: 5 μ m.

4.6. Papel de SSH1 en la homeostasis de actina

Dado el importante papel de SSH1 como regulador de cofilina (Figura R4), nos preguntamos cómo afecta la sobreexpresión de SSH1 o el mutante C393S a los niveles totales de F-actina. Para estudiarlo, transfectamos células CH7 con cada una de las construcciones y

RESULTADOS

analizamos por citometría de flujo los niveles de actina filamentosa mediante marcaje con faloidina (Figura R10 A) o con anti-pCof (Figura R10 B). A continuación, establecimos regiones a lo largo de los niveles de expresión de GFP, obtuvimos los valores de MGI de faloidina o pCof en cada región y los representamos en gráficas (Figura R10 derecha). Así, observamos un aumento notable y lineal de los niveles de F-actina con valores altos de expresión del mutante C393S, mientras que en el caso de SSH1 se producía una ligera disminución a valores bajos y medios de expresión que se recuperaba con valores mayores.

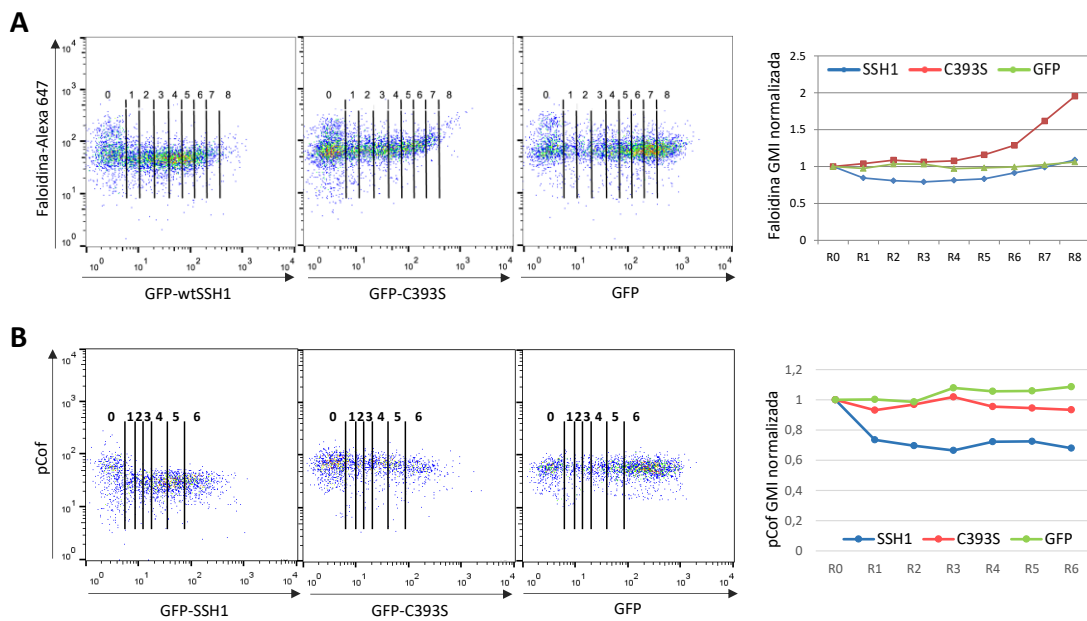


Figura R10: La expresión de GFP-C393S altera la homeostasis de actina en linfocitos T CD4⁺. **A)** *Dot plots* de los niveles de actina filamentosa marcada con faloidina frente a los niveles de GFP-SSH1, GFP-C393S o GFP sola. Se tomaron diferentes regiones (0-8) correspondiendo a distintos niveles de expresión de GFP y se obtuvo la media geométrica de la intensidad de fluorescencia (MGI) para faloidina en cada uno de ellos. Estos valores aparecen representados en la gráfica de la derecha. **B)** *Dot plots* de los niveles de pCof en función de los niveles de GFP-SSH1, GFP-C393S o GFP sola en las mismas células que **A**. A la derecha se muestra la gráfica con los niveles de pCof en función de SSH1 según el mismo análisis realizado en **A**. La figura muestra un experimento representativo de 4.

4.7. Papel de SSH1 en el ensamblaje y dinámica de la SI

4.7.1. Papel en la SI madura

Para estudiar si la sobreexpresión de SSH1 o de su mutante catalítico afectaban a la maduración de la SI, formamos conjugados entre células CH7 y HOM2 durante 20 min, teñimos para los marcadores de sinapsis CD3, LFA1 total y LFA1 activa y los estudiamos por

RESULTADOS

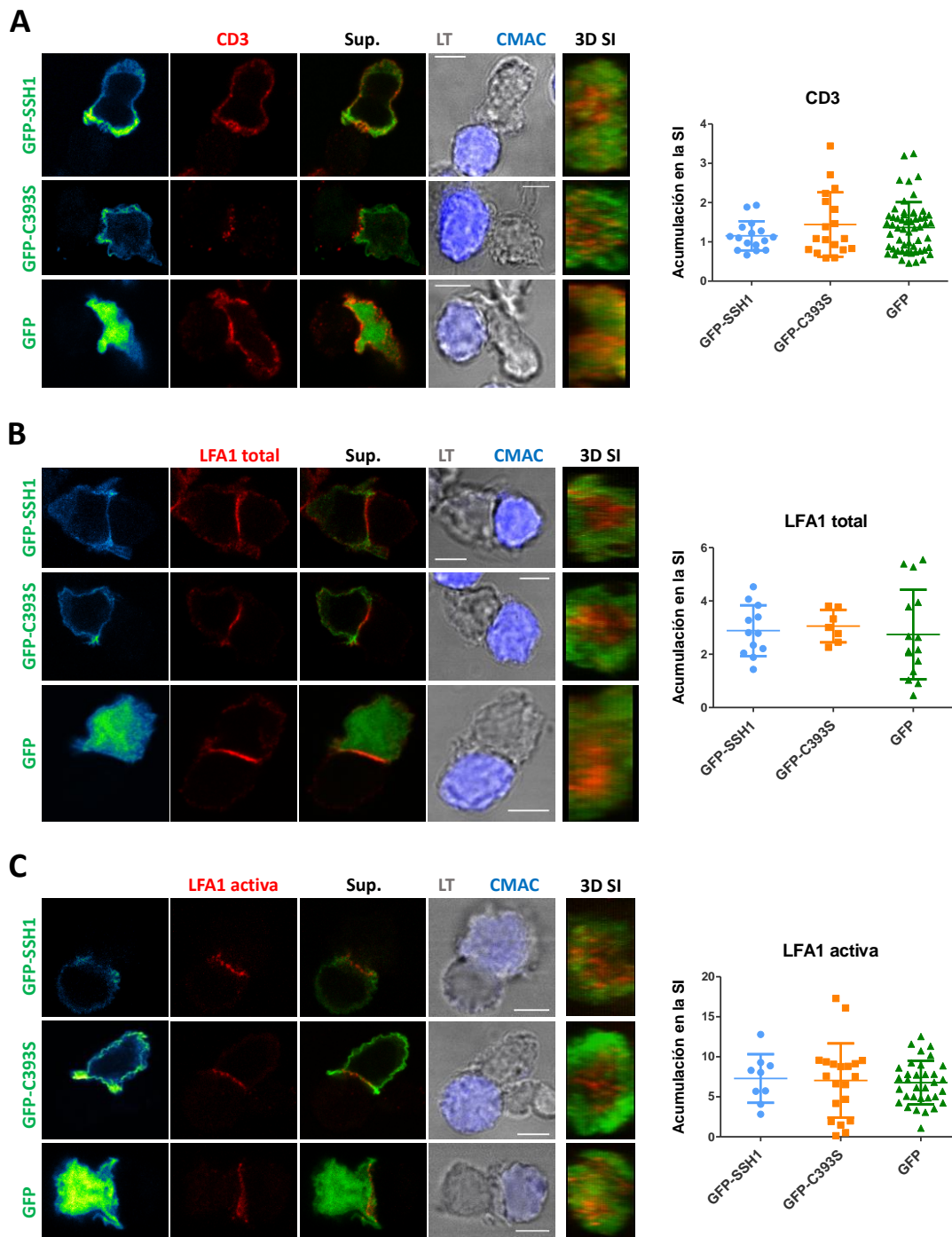


Figura R11: La interferencia con los niveles de expresión de SSH1 no altera la polarización de CD3 o LFA1 ni la activación de LFA1 en la SI. Se incubaron células Jurkat transfectadas con GFP-SSH1, GFP-C393S o GFP durante 20 minutos con células HOM2 cargadas con HAP y se estudió la polarización de CD3 (A), LFA1 total (B) o LFA1 activa (C) utilizando el *plugin* de Fiji *Synapse Measures*. En cada panel se muestran imágenes representativas de entre 7 y 56 células de 2 experimentos junto con una reconstrucción tridimensional de la zona de interacción mostrando la colocalización de SSH1 con cada una de las moléculas estudiadas. Prueba estadística utilizada: ANOVA de un factor con corrección de Bonferroni. LT: Luz transmitida; Sup.: superposición de canales. Barras de escala: 5 μ m.

RESULTADOS

microscopía confocal (Figura R11). De la misma manera, estudiamos también la polarización y distribución de componentes del citoesqueleto como el MTOC o la actina filamentosa (Figura R12). No se encontraron deficiencias en la acumulación de CD3, LFA1

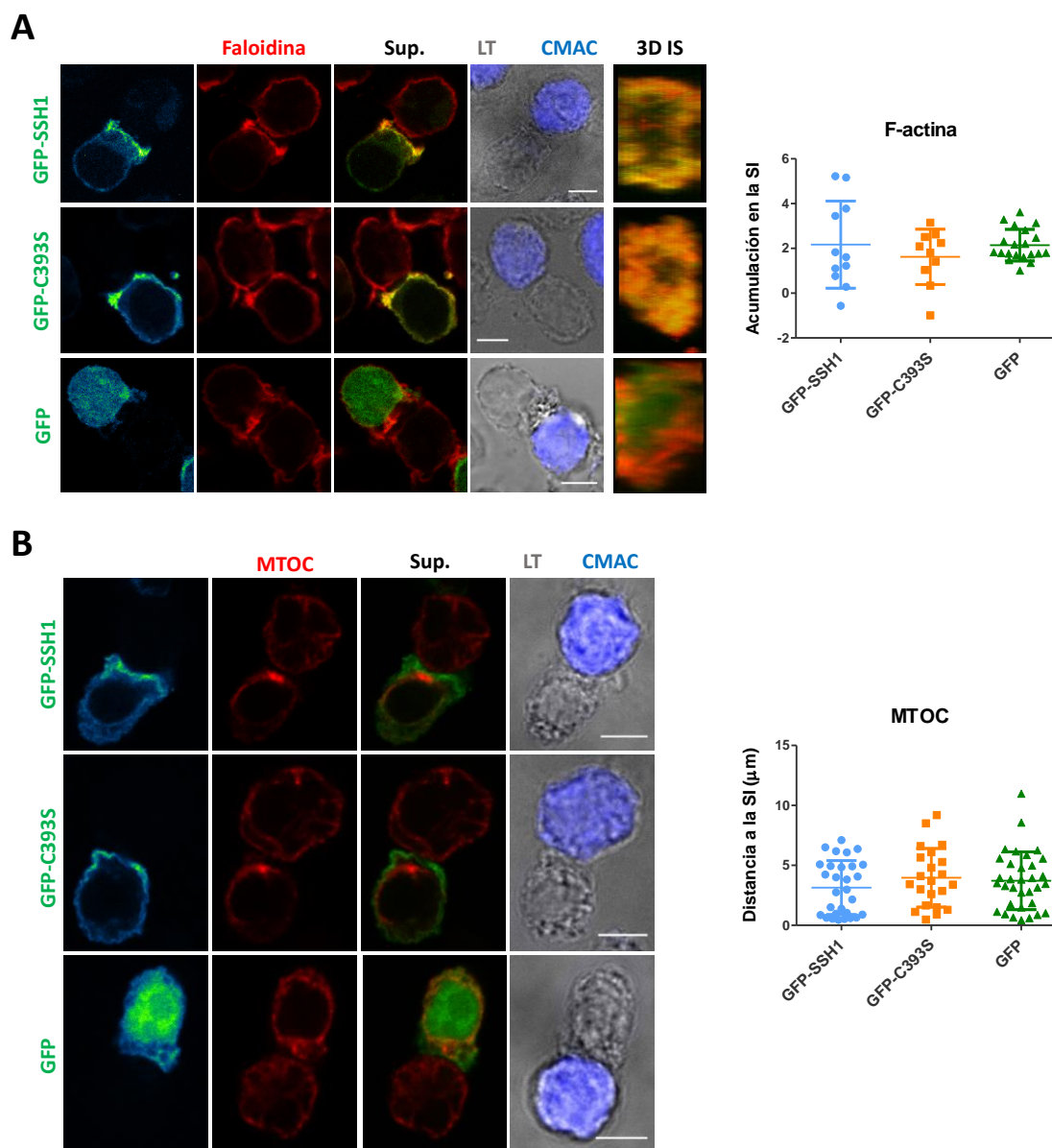


Figura R12: La interferencia con los niveles de expresión de SSH1 no altera la polarización de actina o el MTOC a la SI. Se incubaron células Jurkat transfectadas con GFP-SSH1, GFP-C393S o GFP durante 20 minutos con células HOM2 cargadas con HAP y se estudió la polarización de actina filamentosa (**A**) o el MTOC (**B**) utilizando el *plugin* de Fiji *Synapse Measures*. En cada panel se muestran imágenes representativas de entre 7 y 56 células de 2 experimentos. En el caso de la actina, se muestran a la derecha reconstrucciones tridimensionales de la zona de interacción mostrando la colocalización de SSH1 con actina. Prueba estadística utilizada: ANOVA de un factor con corrección de Bonferroni. LT: Luz transmitida; Sup.: superposición de canales. Barras de escala: 5 µm.

total, LFA1 activa o actina filamentosa, así como tampoco en la polarización del MTOC hacia la SI. Sin embargo, la distribución de la actina parecía ligeramente alterada al sobreexpresar el mutante catalítico C393S, ya que el clareamiento central parecía de menor área, y en el anillo periférico se apreciaban acumulaciones laterales de actina (Figura R12 D).

4.7.2. Dinámica del TCR durante la formación de la SI

A pesar de no encontrar diferencias claras en muestras fijadas a tiempos largos de interacción, nos preguntamos si la dinámica molecular a tiempos más tempranos (<5 minutos) podría estar alterada cuando sobreexpresábamos las proteínas quiméricas. Para investigarlo, utilizamos blastos CD8⁺ de ratones OT-I estimulados de manera específica sobre bicapas lipídicas presentadoras de antígeno y grabamos secuencias de vídeo mediante microscopía de TIRF. Este tipo de microscopía ofrece una adquisición de imágenes con mayor resolución espacial respecto a la microscopía confocal gracias a la iluminación de la muestra con un haz de luz oblicua que crea un campo de luz evanescente que permite visualizar un campo estrecho de la muestra (hasta tan solo 90 nm de profundidad), aumentando así la proporción señal-ruido. También ofrece mayor resolución temporal gracias a que la adquisición de imágenes se realiza por detección paralela a través de una cámara digital en lugar de mediante escaneo láser. Las bicapas están formadas por una mezcla de lípidos que simula la membrana plasmática y tienen inmersas en ellas moléculas de MHC-I presentando el péptido OVA (para el cual son específicos los linfocitos de estos ratones) y moléculas ICAM-1 (Figura R13 A) a concentraciones similares a las que presenta una célula B (apartado 3.10.3 de Materiales y métodos). En cuanto a los resultados obtenidos, en las células sin transfectar se observa la centralización del TCR tras el reconocimiento antigénico (Figura R13 B y Vídeo 3), que fue similar a la observada en las células que sobreexpresaban GFP-SSH1, en las que se constituyó un cSMAC rico en TCRs y carente de SSH1 (Figura R13 B y Vídeo 4). Sin embargo, al sobreexpresar el mutante C393S, los microcomplejos quedaban acumulados en periferia, perdiéndose su centralización y por tanto bloqueando la formación de un cSMAC típico (Figura R13 C y Vídeo 5).

4.7.3. Dinámica de actina

Debido al incremento que produce la sobreexpresión del mutante C393S en los niveles de F-actina total (Figura R10), quisimos estudiar si esto afectaba a la dinámica de actina y a la formación de la SI. Para ello, transfectamos blastos CD8⁺ de ratones OT-I con las

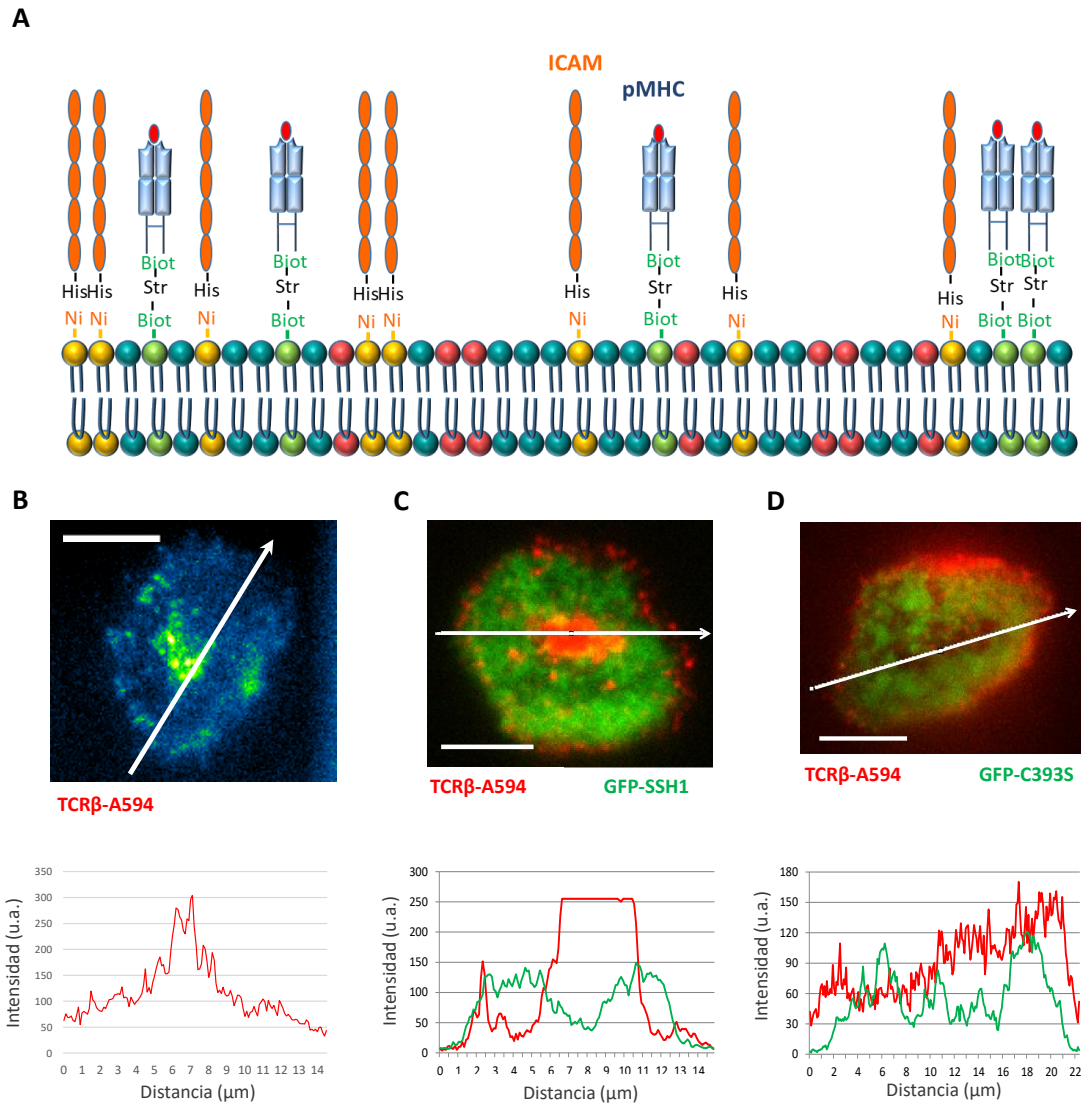


Figura R13: La expresión de GFP-C393S impide la centralización del TCR en la SI. **A)** Representación esquemática de las bicapas lipídicas activadoras empleadas. Sobre estas bicapas se colocaron blastos T CD8⁺ de ratones OT-I sin transfectar **(B)**, transfectados con GFP-SSH1 **(C)** o GFP-C393S **(D)** y teñidos con un anticuerpo anti-TCR β (clon H57). En la figura se muestra una imagen representativa de una SI a tiempos cortos (<3 min) de células sobreexpresando cada construcción (n=3-4 células). Las gráficas debajo de cada imagen representan la intensidad de fluorescencia del TCR β **(B)** o del TCR β frente a GFP-SSH1 **(C)** o a GFP-C393S **(D)** a lo largo de la flecha blanca dibujada sobre cada célula. u.a.: Unidades Arbitrarias; His: histidina; Ni: níquel; Biot: biotina; Str: estreptavidina. Barras de escala: 5 μm .

construcciones GFP-SSH1 o GFP-C393S junto con el plásmido LifeAct-TagRFP y los activamos sobre bicapas lipídicas presentadoras de antígeno. En el caso de GFP-SSH1 (Figura R14 A y Vídeos 6 y 7), se observó un único lamelipodio uniforme con una acumulación de actina en la zona más alejada del cuerpo celular que progresaba seguida de una zona de

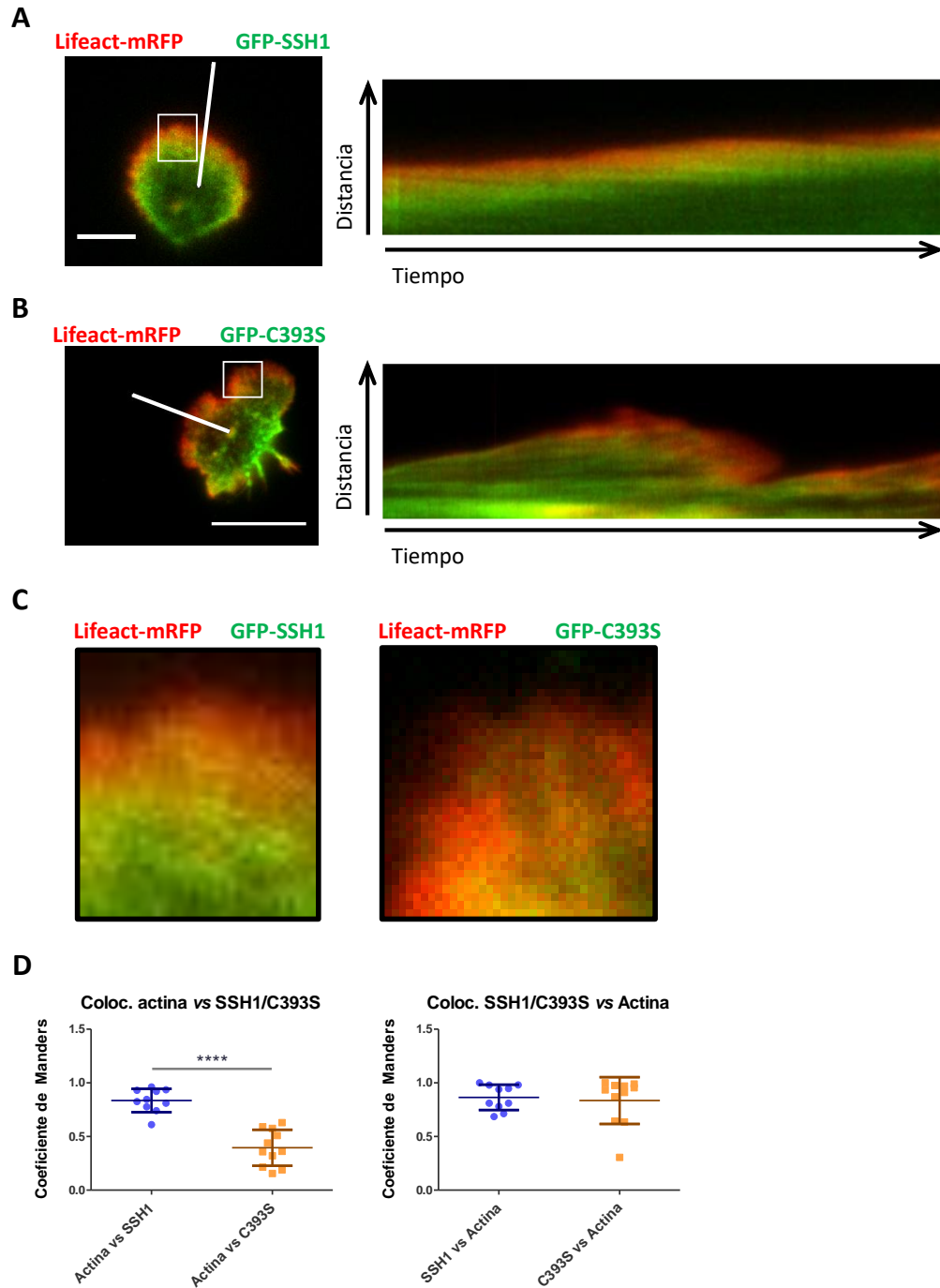


Figura R14: La sobreexpresión del mutante C393S altera la dinámica de actina en las lamelas de linfocitos T CD8⁺. **A)** y **B)** Se muestran blastos CD8⁺ de ratones OT-I cotransfectados con LifeAct-RFP y GFP-SSH1 (**A**) o GFP-C393S (**B**) activados sobre bicapas lipídicas presentadoras de antígeno (OVA). A la derecha de cada imagen se muestra un kimograma (representación de tiempo frente a distancia) realizado a lo largo de la línea blanca dibujada sobre cada célula. **C)** Ampliación de los recuadros blancos sobre cada célula en A y B que representan un ejemplo de las regiones que se tomaron para los análisis de colocalización. **D)** Análisis de la colocalización de actina con GFP-SSH1 o GFP-C393S (M1) y de GFP-SSH1 o GFP-C393S con actina (M2), calculado mediante el coeficiente de Manders en regiones lamelares en movimiento. Análisis estadístico empleado: prueba de Mann Whitney. ****p-valor <0,001. n = 1-4 regiones por célula de 3-4 células distintas. Barras de escala: 5 μ m.

colocalización con SSH1 y por último un frente de SSH1 libre de F-actina (Babich *et al.*, 2012). Al sobreexpresar GFP-C393S (Figura R14 B y Vídeo 8), las células presentaban múltiples lamelas improductivas que se formaban simultáneamente en diferentes direcciones, con apariencia desorganizada y presentando menor colocalización del C393S con actina (Figura R14 C).

También analizamos la dinámica de actina en un modelo de linfocitos T CD4⁺ (Jurkat CH7) activados sobre cristales recubiertos con anticuerpos (anti-CD3 ϵ Hit3a y anti-CD28). Como control se utilizaron células transfectadas con GFP sola (Figura R15 A y Vídeo 9). En ellas se observa la dinámica normal de expansión y clareamiento de actina en la zona central tras activación del TCR, alcanzando la máxima extensión a aproximadamente 1 min, momento en el que se aprecia claramente una zona central despejada de actina. En las células que sobreexpresaban GFP-SSH1 (Figura R15 B y Vídeo 10), el clareamiento comenzaba entre los 15 y 30 segundos, antes incluso de que acabara la extensión celular. En el caso de las células expresando GFP-C393S (Figura R15 C y vídeo 11), el clareamiento de actina en los primeros dos minutos estaba bloqueado. La dinámica del clareamiento de actina en cada condición se encuentra representada en el gráfico de la Figura R15 D, calculada como área de la zona central sin actina dividido entre la intensidad de fluorescencia de actina en esa zona. Con la progresión de la SI, este cociente se hace mayor debido a la pérdida de actina filamentosa y al aumento del área del cuerpo celular.

4.7.4. Estabilidad de la SI

Dados los defectos en la dinámica de actina que producía la sobreexpresión del mutante catalítico, nos propusimos estudiar la estabilidad de la SI. Para ello, activamos células CH7 transfectadas sobre superficies recubiertas de anticuerpos anti-CD3 (UCHT-1) durante diferentes tiempos (4, 5 ó 7 minutos), tras lo cual fijamos las muestras con paraformaldehído 4% y calculamos el porcentaje de células adheridas (Figura R16 A), el área de expansión (Figura R16 B) y el clareamiento de actina (Figura R16 C).

Como se observa en la Figura R16 A, las células con GFP-SSH1 ya habían alcanzado el máximo de adhesión a los 4 minutos. Sin embargo, las células que sobreexpresaban el mutante C393S tardaban más tiempo en adherirse, observándose el mayor porcentaje de células adheridas a los 5 minutos. A pesar de ello, las células C393S una vez adheridas no presentaban defectos en cuanto a área de expansión respecto a las GFP o las GFP-SSH1 en

RESULTADOS

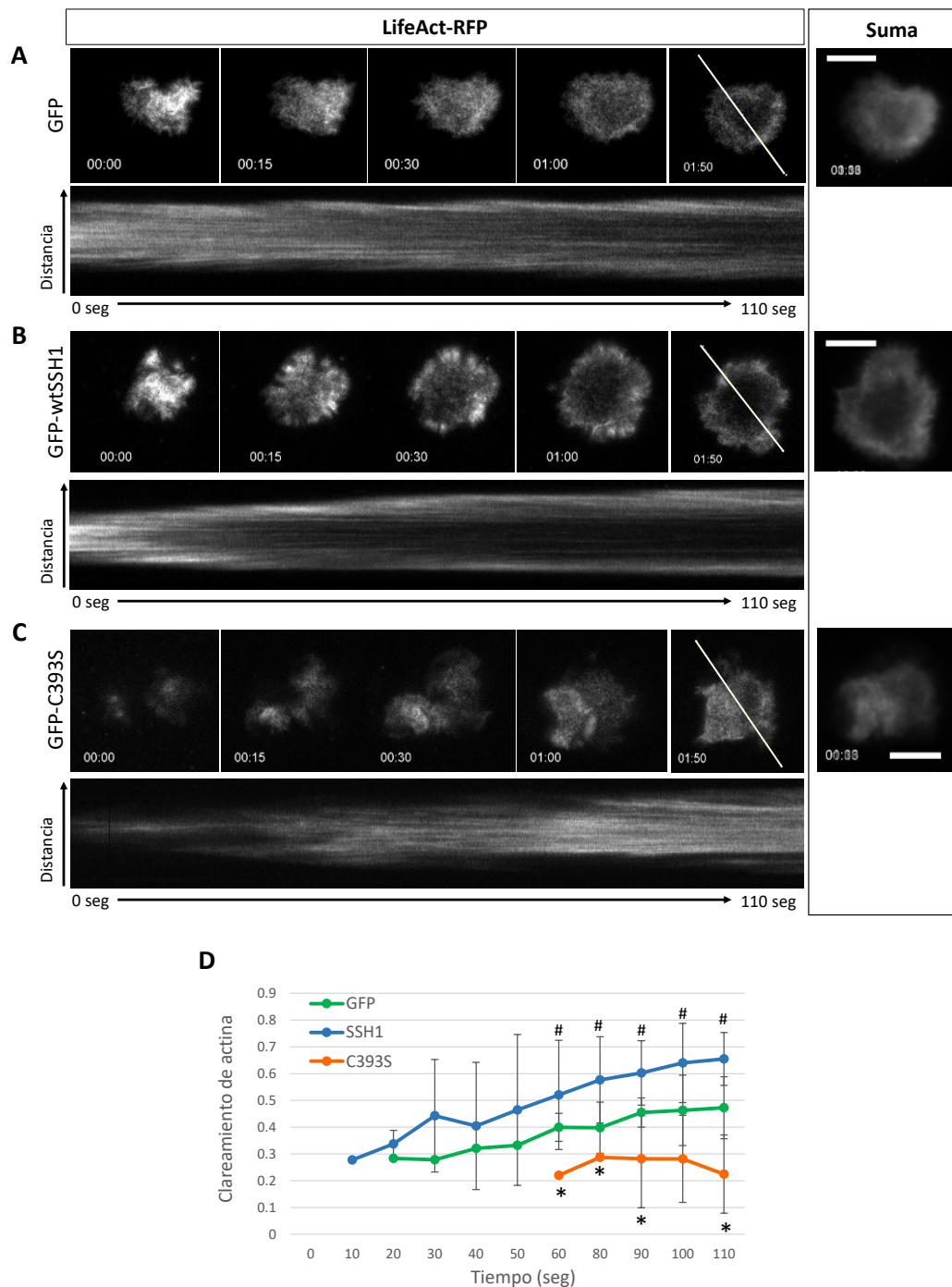


Figura R15: SSH1 acelera la dinámica de actina en la SI a tiempos cortos (<2 minutos), mientras que la expresión de GFP-C393S causa defectos en la reorganización de actina. Imágenes representativas de células CH7 cotransfectadas con LifeAct-RFP y GFP (A), GFP-SSH1 (B) o GFP-C393S (C) a diferentes tiempos de activación sobre placas recubiertas con anti-CD3 (UCHT-1) y grabadas cada 108 mseg utilizando un equipo TIRF. Bajo cada secuencia temporal, se muestra un kimograma (gráfico distancia frente a tiempo) obtenido de la línea blanca dibujada a través de la célula. Las imágenes en el panel derecho ("Suma") representan una superposición de todas las imágenes obtenidas en la secuencia de vídeo. **D)** Cuantificación del clareamiento de actina a distintos tiempos de la secuencia para cada construcción, calculado como área de la zona central sin actina dividido entre la intensidad de fluorescencia de actina en esa zona. La gráfica muestra la media de 2-3 células. Análisis estadístico: prueba T pareada. * y #: p-valor $\leq 0,05$. *: C393S vs. GFP; #: SSH1 vs. C393S. Barras de escala: 10 μm .

RESULTADOS

5 minutos, aunque a 7 minutos empezaban a retraer (Figura R16 B). Además, el clareamiento de actina del mutante era defectivo a 5 minutos (Figura R16 C).

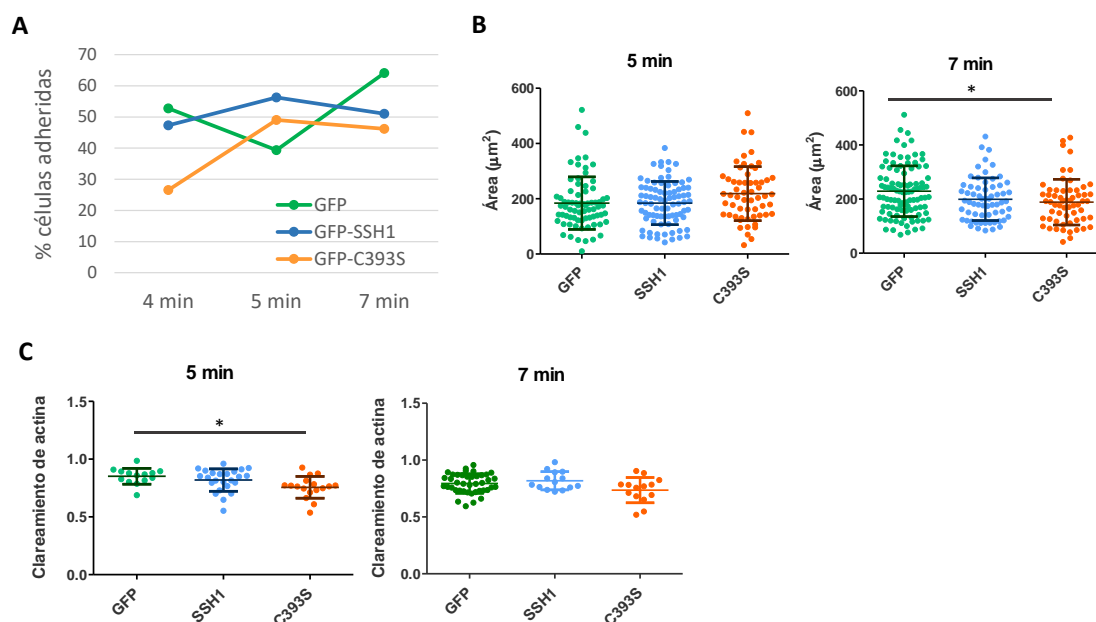


Figura R16: La sobreexpresión de C393S retrasa la adhesión celular y el clareamiento de actina tras activación por el TCR y acelera la retracción celular. Células CH7 cotransfectadas con GFP, GFP-SSH1 o GFP-C393S y LifeAct-RFP se estimularon sobre placas recubiertas con anti-CD3 (UCHT-1) y fueron fijadas a distintos tiempos. **A)** Porcentaje de células pegadas a la superficie con anticuerpos medido como número de células visualizadas en campo TIRF dividido por el número de células observadas en campo ancho. **B)** Expansión celular a distintos tiempos tras activación del TCR, medida como el área celular en el campo TIRF. **C)** Clareamiento de actina a distintos tiempos tras activación celular, medido como área del cSMAC dividido por la intensidad de actina en el cSMAC. En la figura se muestran las medias de **(A)** 43-53 células, **(B)** 58-101 células, o **(C)** 14-17 células, de 3 experimentos independientes). Análisis estadístico empleado: ANOVA de un factor con corrección de Bonferroni. * p-valor<0,05.

4.8. Papel de SSH1 en la señalización temprana de los linfocitos T

Debido al defecto en la centralización del TCR y en la dinámica de actina al sobreexpresar el mutante C393S, nos preguntamos si esta perturbación tendría algún efecto en la activación del linfocito, en concreto en la fosforilación de las moléculas de señalización CD3 ζ , PLC γ 1 y ERK. Con este fin, transfectamos células J77 con las construcciones de interés, las activamos con células Raji presentadoras de SEE y realizamos lisados para Western Blot según lo descrito en el apartado 3.11 de Materiales y métodos. En los resultados se puede observar

RESULTADOS

una mayor fosforilación de CD3 ζ respecto al valor de las células GFP tanto en el caso de GFP-SSH1 como de C393S (Figura R17 A). Sin embargo, resulta muy interesante que esa mayor activación inicial de CD3 ζ no se refleja en mayores niveles de pPLC γ 1 en el caso del C393S (el cual es similar a la GFP control) pero sí en el caso del GFP-SSH1 (Figura R17 B). En cuanto a pERK, no se observan diferencias en ninguna de las condiciones (Figura 17 C).

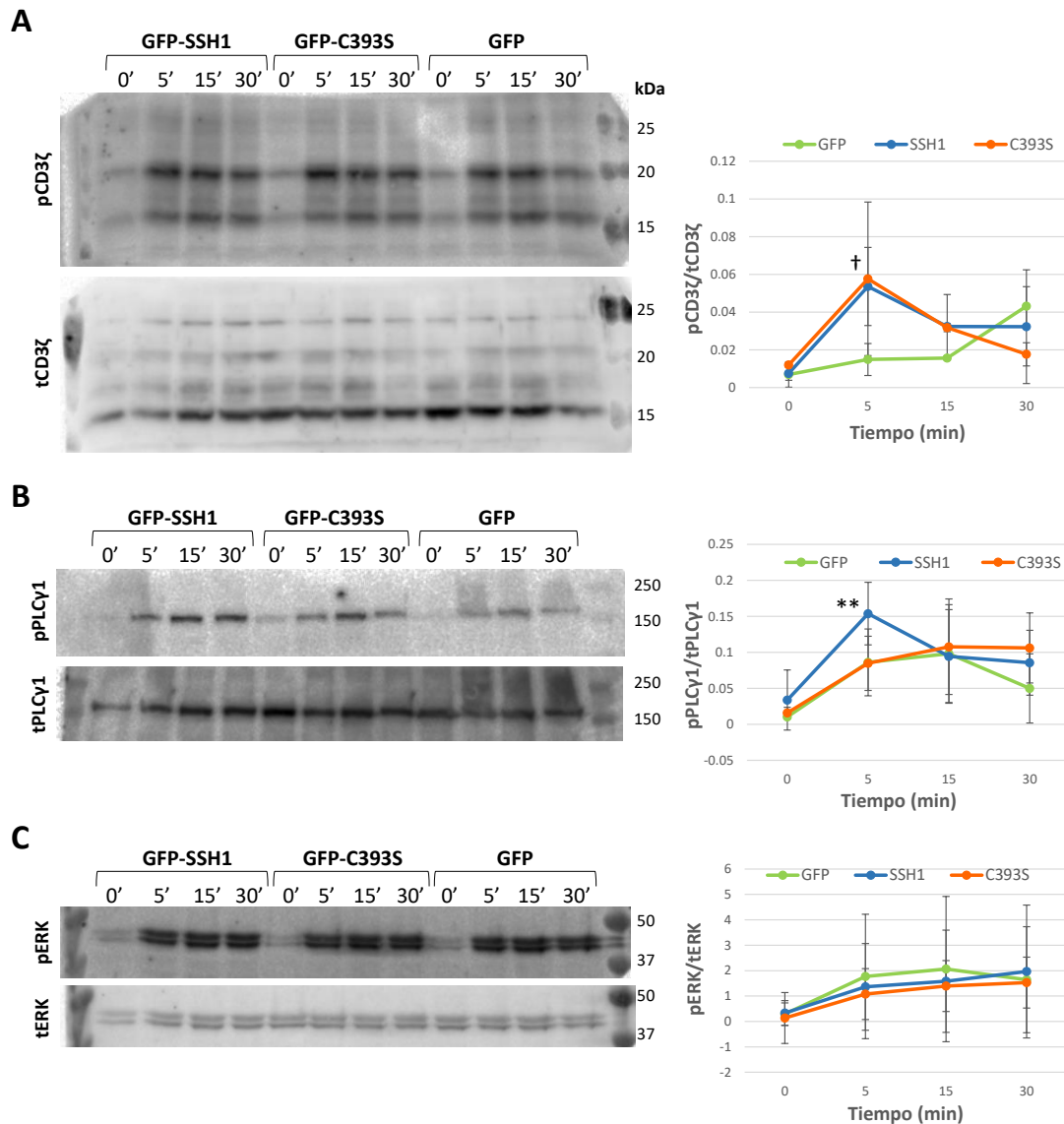


Figura R17: La sobreexpresión de SSH1 o de C393S aumenta la fosforilación de CD3 ζ y, en el caso de SSH1, también la de PLC γ 1. En la parte izquierda de la figura se muestra un Western Blot representativo de un total de 4, mostrando la fosforilación de CD3 ζ (A), PLC γ 1 (B) y ERK1/2 (C) a distintos tiempos en células sobreexpresando GFP-SSH1, GFP-C393S o GFP sola. A la derecha, se muestra la cuantificación de la señal de las bandas, relativizando los niveles de proteína fosforilada respecto a los niveles de proteína total. Análisis estadístico empleado: ANOVA de muestras repetidas con corrección de Bonferroni. *: wt vs GFP; #: wt vs C393S; †: C393S vs GFP. *p-valor <0,05; **p-valor <0,01.

Para profundizar más en el efecto de la sobreexpresión de SSH1 o C393S sobre la activación linfocitaria, nos propusimos estudiar la movilización de calcio tras la activación del TCR. Para ello, empleamos células Jurkat E6-1 transfectadas, marcadas con la sonda de calcio X-Rhod-1AM y activadas con tetrámeros anti-CD3/CD28 (apartado 3.12 de Materiales y métodos).

En las Figuras R18 A y R18 B puede observarse una elevación de calcio en todos los casos tras la activación del TCR y tras la adición del ionóforo de calcio, estabilizándose los niveles pasados 1-2 minutos tras cada estímulo. Aunque en la Figura R18 B parece que las células con GFP-C393S producían más calcio tras la adición de tetrámeros, al normalizar estos valores respecto a los valores basales (0) y a los valores máximos obtenidos con la ionomicina (100), observamos que en realidad el aumento de calcio en estas células era menor que en las células GFP, mientras que no existen diferencias con las células GFP-SSH1 (Figura R18 C). No observamos diferencias en ninguna de las condiciones al analizar los valores máximos de calcio alcanzados tras la adición de tetrámeros (Figura R18 D), así como tampoco al calcular el tiempo que tardan las células en alcanzar ese máximo (Figura R18 E).

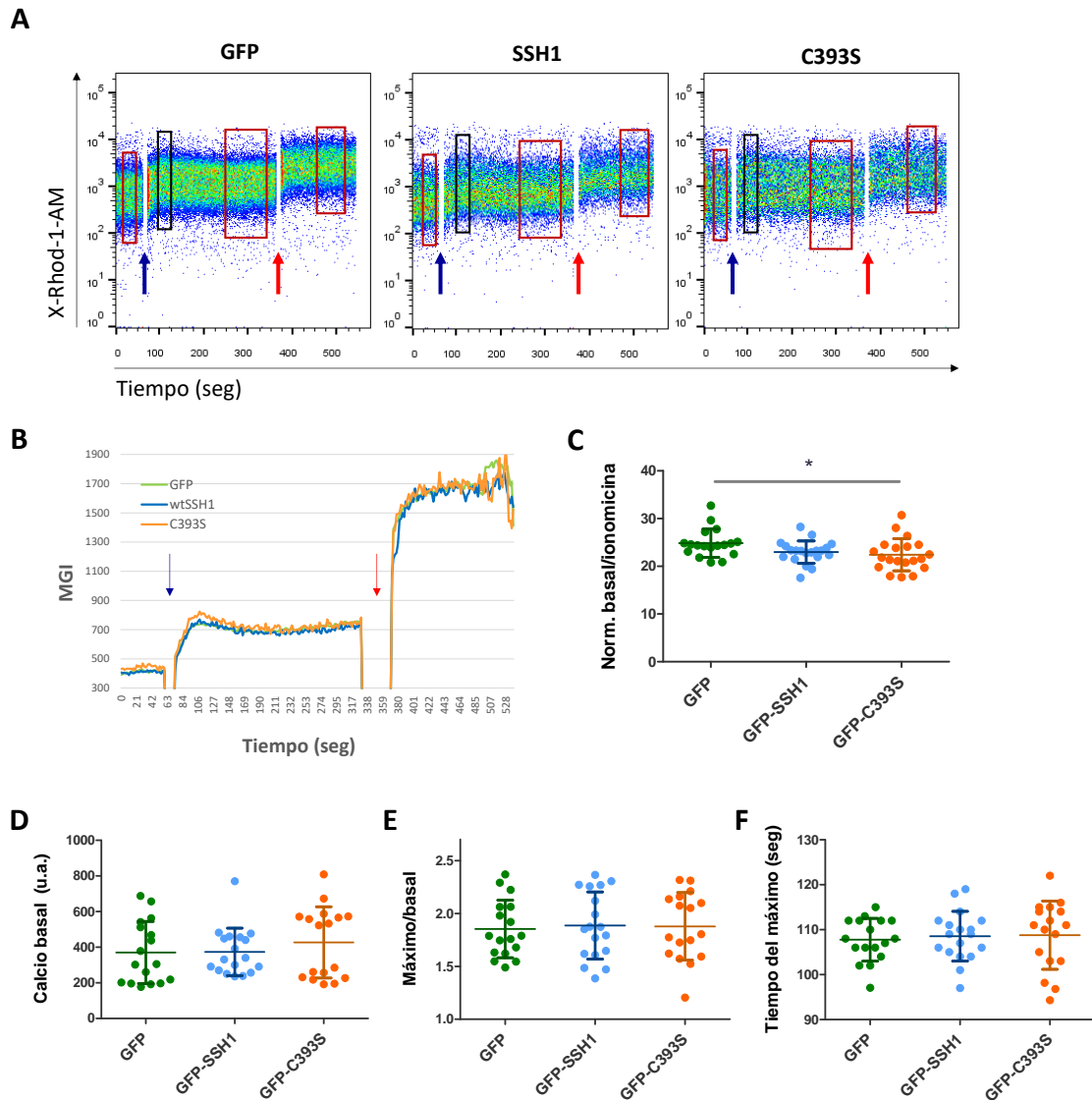


Figura R18: La sobreexpresión del mutante C393S disminuye la producción de calcio tras estimulación por el TCR. A) Dot plots de los niveles de calcio (X-Rhod-1-AM) basales (parte izquierda de cada gráfica), tras añadir tetrámeros anti-CD3/CD28 (flecha azul) y tras añadir ionomicina (flecha roja) en la población de células de alta expresión de cada construcción ($MGI > 10^3$). **B)** Gráfica mostrando el valor medio de la MGI para cada transfección, tomando todos los experimentos. Las flechas azul y roja indican, respectivamente, el momento de la adición de tetrámeros o de ionomicina. **C)** Se tomaron valores de zonas estables de los niveles basales, tras estimulación con tetrámeros y tras adición de ionomicina (recuadros rojos). Los valores tras la estimulación con tetrámeros se normalizaron entre 0 y 100 respecto a los valores basales (0) y a los valores tras la adición de ionomicina (100). **D)** Se calculó el valor máximo de la MGI de calcio tras la adición de tetrámeros (recuadros negros en A) para cada transfección y se normalizaron respecto a los valores. **E)** Tiempo que se tardó en alcanzar el máximo de calcio en cada transfección tras la adición de tetrámeros. Cada punto representa una réplica de un total de 5 experimentos (3-5 réplicas por experimento). Análisis estadístico empleado: ANOVA de un factor con corrección de Bonferroni. *p-valor $< 0,05$. MGI: Mediana Geométrica de la Intensidad de fluorescencia.

4.9. Papel de SSH1 en la migración celular

Dada la importancia del citoesqueleto de actina para el movimiento celular, nos propusimos estudiar si SSH1 tiene algún papel en este proceso. En primer lugar, estudiamos la migración en 2D analizando en el microscopio blastos CD8⁺ de ratones OT-I transfectados con GFP-SSH1 o GFP-C393S y colocados sobre microcanales de distintas anchuras recubiertos con ICAM-1 según el protocolo descrito en el apartado 3.9.1 de Materiales y métodos. Como control, utilizamos células GFP negativas de ambas transfecciones (GFP neg.). Para el análisis de la migración, se escogieron únicamente canales con una anchura superior a 3 μm , en los que las células no necesitan comprimirse para pasar. A pesar de que las diferencias no son significativas, las células que sobreexpresaban SSH1 (GFP-SSH1⁺) presentaron una velocidad de desplazamiento por el canal menor que el resto de condiciones, calculada como el desplazamiento a lo largo del canal entre el tiempo total que están migrando (Figura R19 B). Además, las células GFP-SSH1⁺ acumularon mayor distancia recorrida (Figura R189C), debido al mayor número de cambios de dirección y de pared (Figura R19 D). Estos datos indican que las células GFP-SSH1⁺ son menos direccionales.

En segundo lugar, estudiamos la migración en 3D mediante matrices de colágeno según lo descrito en el apartado 3.9.2 de Materiales y métodos. En la Figura R20, se muestran los resultados del análisis de la velocidad media, distancia acumulada y euclídea y direccionalidad. En este caso, no pudimos asegurar qué células no expresaban la proteína (GFP negativas) debido a la gran distancia de trabajo del objetivo empleado (20x de aire, en comparación con el 40x empleado en la migración 2D), por lo que únicamente se muestra la comparación entre las GFP⁺ (control), las GFP-SSH1⁺ y las GFP-C393S⁺. Como puede observarse, la sobreexpresión tanto de SSH1 como del mutante C393S aumentó la velocidad media de las células y la distancia total recorrida (distancia acumulada). La sobreexpresión de C393S produjo además un ligero pero significativo aumento de la distancia euclídea sin cambios en la direccionalidad de la migración en ningún caso.

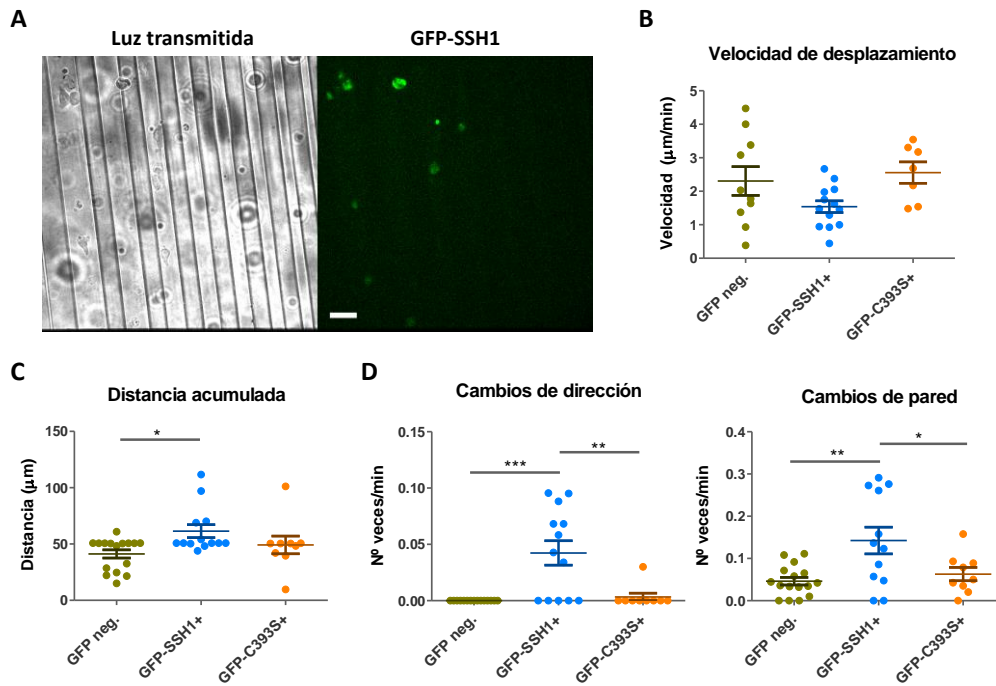


Figura R19: La sobreexpresión de SSH1 afecta a la migración en dos dimensiones. **A)** Fotograma de una secuencia de vídeo de células transfectadas con GFP-SSH1, mostrando la luz transmitida a la izquierda y el canal GFP a la derecha. **B)** Cuantificación de la velocidad de desplazamiento a lo largo del canal para cada condición, calculada como la distancia que avanza cada célula por el canal dividida entre el tiempo total que permanece en él. **C)** Cuantificación de la distancia total recorrida en cualquier dirección para cada célula en el tiempo que permanece en el campo de visión. **D)** Izquierda: número de veces que las células cambian de sentido en el microcanal con respecto al tiempo; derecha: número de veces que cada célula pasa de migrar a lo largo de una pared a migrar adherida a la pared opuesta. En todos los casos, cada punto corresponde a una célula ($n = 7-16$) de tres réplicas diferentes. Análisis estadístico empleado: ANOVA de un factor con corrección de Bonferroni. *p-valor $<0,05$; **p-valor $<0,01$; ***p-valor $<0,005$.

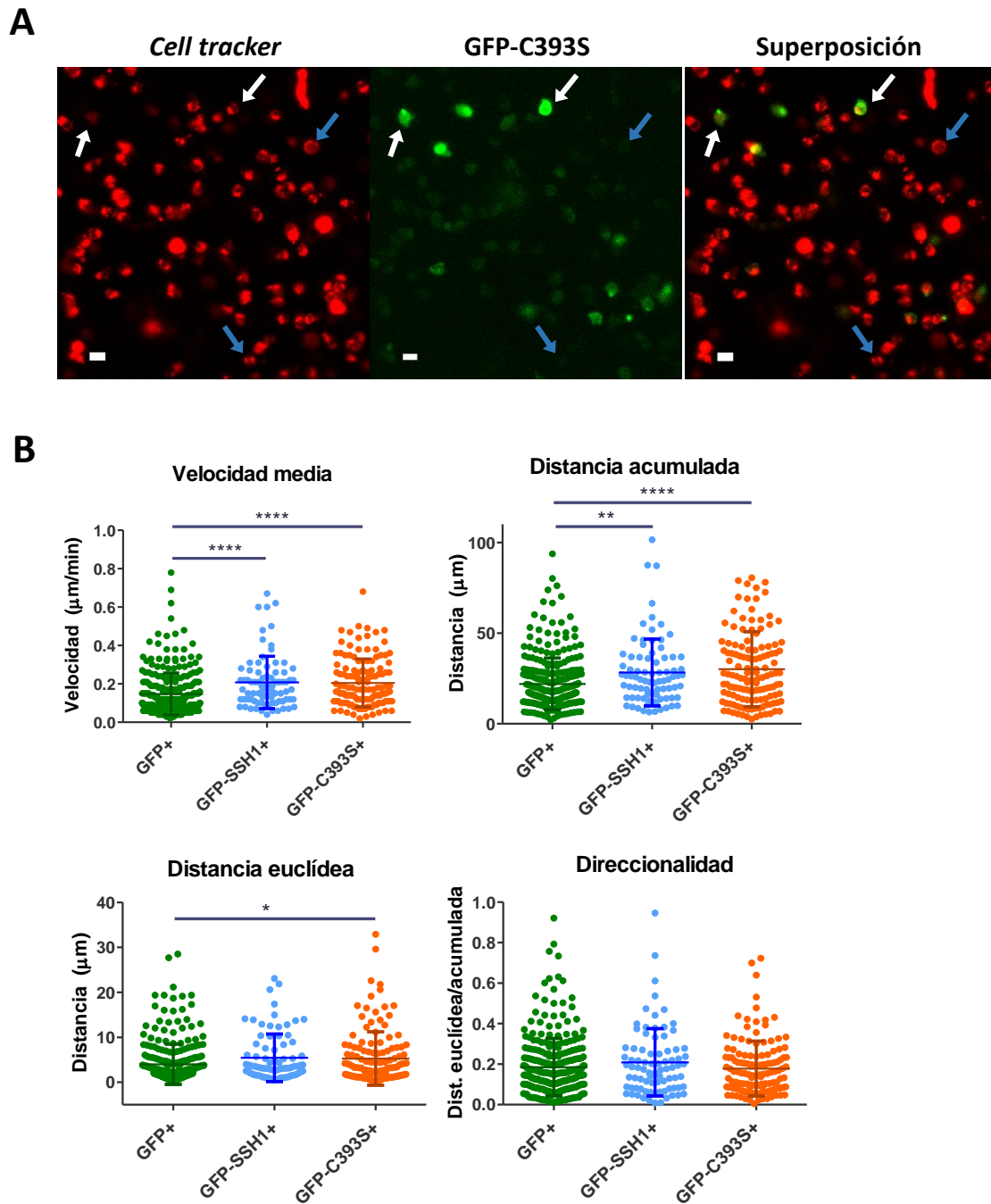


Figura R20: La sobreexpresión tanto de SSH1 como del mutante C393S favorecen la migración en 3D en matrices de colágeno. A) Imagen de una secuencia de vídeo mostrando células GFP-C393S marcadas con el colorante celular *Cell Tracker Far Red* (izquierda), el canal GFP del mismo campo de visión (centro) y la superposición de ambos (derecha). Las flechas blancas indican células GFP positivas marcadas con *Cell Tracker* y las flechas azules indican células en las que no se detecta señal GFP. **B)** Imagen de la misma secuencia de vídeo que **A** mostrando el análisis de las trayectorias. **C)** Cuantificación de la velocidad media, distancia total recorrida, distancia euclídea y direccionalidad de 82-295 células por condición, de un total de 3 experimentos. Análisis estadístico empleado: ANOVA de un factor con corrección de Bonferroni. *p-valor <0,05; **p-valor <0,01; ****p-valor <0,001.

DISCUSIÓN



5.1. Expresión de los SSHs en linfocitos T

Según los ensayos de qPCR, SSH3 fue el SSH de menor expresión en todas las subpoblaciones de células T estudiadas (Figura R1), quizá por tratarse de la isoforma con menor actividad sobre pCof y menor capacidad de unión a actina (Ohta *et al.*, 2003), lo que no le daría un papel celular tan relevante como los otros dos miembros. Los niveles de expresión de SSH1 y SSH2 fueron más similares entre sí en cada tipo celular estudiado, no encontrándose diferencias significativas en ningún caso.

Por otro lado, las células Jurkat fueron las de mayor expresión de SSH1, tanto a nivel de mRNA como de proteína, considerablemente por encima de los niveles encontrados en los linfocitos T CD4⁺. Estos altos niveles de expresión de SSH1 en las células Jurkat en comparación con las células primarias podrían deberse a una alta dinámica del citoesqueleto de actina por tratarse de una célula tumoral, que necesitaría altos niveles de actividad de proteínas promotoras de la remodelación del citoesqueleto.

En esta tesis nos centramos en el estudio de SSH1 por ser una de las dos isoformas con mayor expresión en linfocitos T y por sus propiedades de regulación sobre el módulo de cofilina (apartado 1.5.1 de la Introducción).

5.2. Anomalías morfológicas al sobreexpresar SSH1 o cofilina

Las alteraciones morfológicas observadas al sobreexpresar SSH1 o cofilina (Figura R3) son probablemente debidas a una alteración del citoesqueleto de actina originada por los altos niveles de expresión de dichas proteínas. Aunque en ambos casos las células presentaron anomalías morfológicas, estas no fueron exactamente iguales, ya que la sobreexpresión de SSH1 originaba principalmente formas bulbosas y pérdida de microvellosidades en la superficie mientras que la sobreexpresión de cofilina produjo microvellosidades más ensanchadas y con aspecto redondeado. Las microvellosidades en los linfocitos T son importantes para un escaneo adecuado de antígeno presentado por la APC (Cai *et al.*, 2017) y, por tanto, su pérdida o alteración podría dar lugar a un defecto en la respuesta a antígeno.

Las anomalías observadas en ambos casos recuerdan a las observadas por Gallego *et al.* (Gallego *et al.*, 1997) en células T de un paciente con Síndrome de Wiskott-Aldrich (WAS).

Este síndrome es causado por una mutación en el gen que codifica la proteína WAS (WASp), la cual es muy importante en el control de la organización del citoesqueleto de actina. Las células T de estos pacientes, además de presentar defectos en proliferación tras activación por el TCR, presentaron importantes anomalías morfológicas, incluyendo formas bulbosas o lamelares similares a las encontradas en nuestro estudio.

5.3. Ultrasensibilidad y biestabilidad del módulo de cofilina en linfocitos T

Los niveles de cofilina activa en función de los niveles de SSH1 siguen una respuesta ultrasensible (Figura R4). Este tipo de respuestas se caracteriza por la presencia de un umbral de respuesta, que dota a los módulos de señalización de la capacidad de ignorar y filtrar pequeños estímulos por debajo de ese umbral, a la vez que responder bruscamente a cambios pequeños por encima del mismo (Ferrell & Ha, 2014a). Esta característica es interesante en el caso de la activación de la célula T: los linfocitos T necesitan filtrar estímulos de baja afinidad (como autoantígenos) para mantener la tolerancia periférica, pero cuando reconocen un pMHC de suficiente afinidad, la respuesta debe ser rápida y eficiente. La ultrasensibilidad del módulo de cofilina, activado por debajo de la coestimulación (Lee *et al.*, 2000; Wabnitz *et al.*, 2006), podría participar en la ultrasensibilidad de la respuesta del linfocito T frente a estímulos externos, ayudando a reorganizar de manera rápida y eficiente el citoesqueleto de actina.

Existen varios mecanismos de regulación en el módulo de cofilina que podrían ser responsables de esta ultrasensibilidad (apartado 1.5.1 de la Introducción). Uno de ellos es el aumento de actividad de SSH1 tras su unión a actina (Nagata-Ohashi *et al.*, 2004), que supondría un bucle de retroalimentación positiva en el módulo. Los menores coeficientes de Hill obtenidos en el caso de la respuesta de cofilina activa frente al mutante de unión a actina GFP-W458A (Figura R6) nos hicieron pensar que esta característica es efectivamente un mecanismo que media, al menos en parte, la ultrasensibilidad del módulo.

La abrupta respuesta de ultrasensibilidad que observamos, sin estados intermedios (Figura R4), y los múltiples mecanismos de retroalimentación positiva presentes en el módulo (Figura In11) que podrían generar una memoria molecular (Ferrell & Ha, 2014b), nos hicieron pensar que podría existir biestabilidad e irreversibilidad en el módulo. La mayor activación

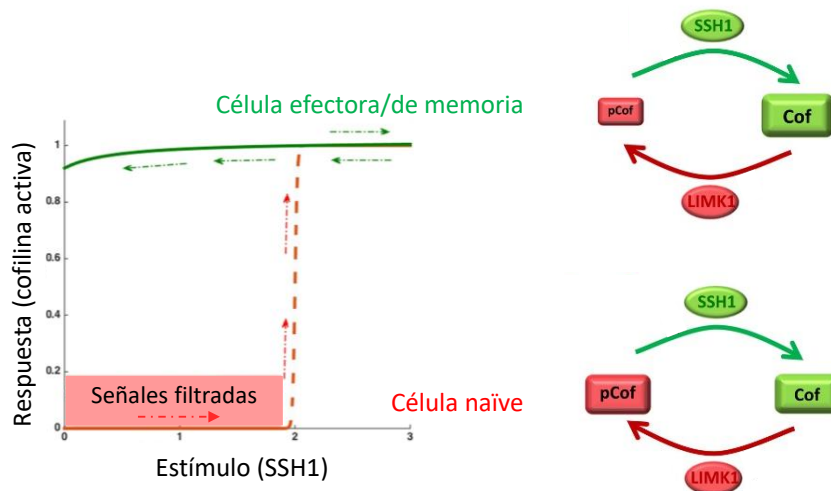


Figura D1: Biestabilidad e irreversibilidad del módulo de cofilina. Los mayores niveles de cofilina activa en células que han visto antígeno y que se mantienen aun después de eliminar el estímulo sugieren la presencia de biestabilidad e irreversibilidad en el módulo. Por tanto, existirían dos estados de respuesta en el módulo de cofilina: el de alta respuesta en células que han visto antígeno anteriormente (efectoras y de memoria), y el de baja respuesta en células naïve.

del módulo de cofilina en células que han sido previamente activadas con antígeno, incluso después de retirarlo, sugiere la existencia de una respuesta irreversible con un estado activo en estas células que no revierte al estado inactivo aun después de eliminar el estímulo (Figura D1). Los mayores niveles de cofilina activa en células efectoras y de memoria resultarían en un citoesqueleto más activo y laxo, que ayudaría a la formación y movimiento de oligómeros de TCR y de proteínas de señalización (Figura D2) (Gowrishankar *et al.*, 2012). Un citoesqueleto con mayor capacidad de remodelación además volvería las células más prontas a responder que si tuvieran un citoesqueleto rígido y estable (como sería el caso de las células naïve, que presentan niveles de pCof muy elevados) (Thauland *et al.*, 2017) debido a la presencia de fuerzas de tracción de actina más fuertes que promoverían uniones cortas seriadas TCR/pMHC, con una mejor discriminación de ligandos de baja afinidad (Huang & Ferrell, 1996). Nosotros proponemos, y recientemente se ha demostrado, que el estado activo del módulo por acción de SSH1 en células efectoras es responsable de una activación más eficiente en estas células (Thauland *et al.*, 2017). También se ha descrito en linfocitos B que la señalización por TLRs aumenta la dinámica de actina dependiente de cofilina y SSH1, reduciendo el confinamiento espacial del BCR (Freeman *et al.*, 2015).

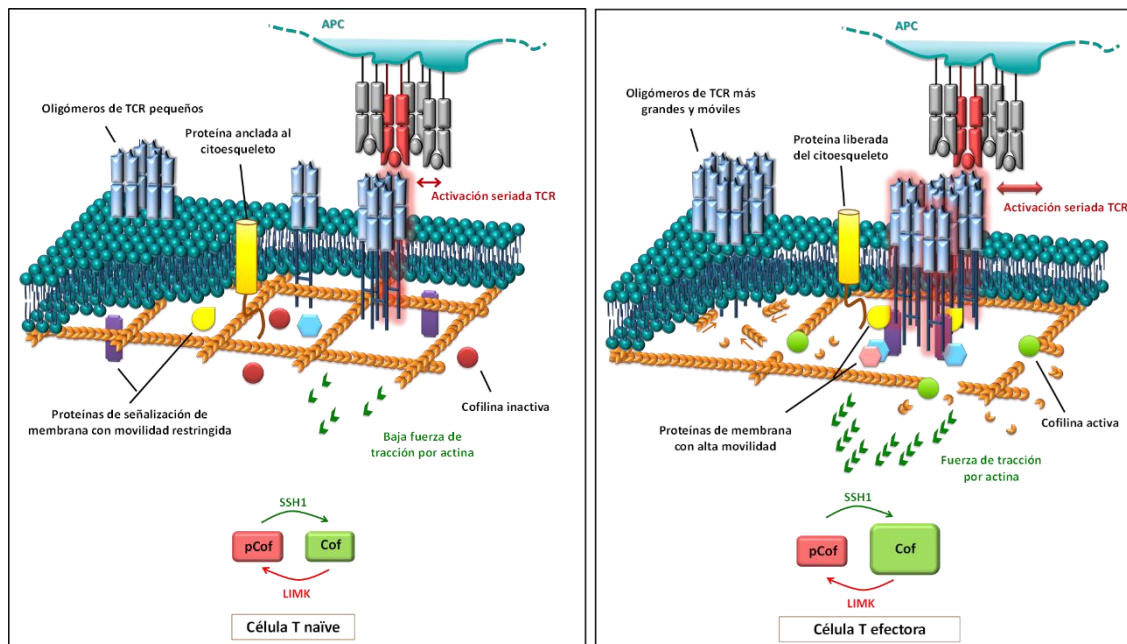


Figura D2: Relevancia fisiológica de la ultrasensibilidad del módulo de cofilina. En células que no han visto antígeno (panel izquierdo), el módulo de cofilina se encuentra en estado inactivo. Por ello, la dinámica de actina y las fuerzas de tracción son bajas y tanto los TCRs como otras moléculas de señalización están confinados espacialmente en la membrana. En una célula que ha visto antígeno (panel derecho), el módulo de cofilina se desplaza a un estado con mayores niveles de cofilina activa. Esto aumenta la dinámica del citoesqueleto y lo vuelve más laxo, ayudando al movimiento del TCR y otras moléculas, facilitando la formación de complejos de señalización y aumentando las fuerzas de tracción y la activación seriada del TCR por la APC.

5.4. Distribución dinámica de SSH1 a la SI

SSH1 se acumula en la SI (Figura R7), donde colocaliza con F-actina, según lo observado en reconstrucciones 3D a partir de imágenes de microscopía confocal de conjugados T/B (Figura R8). Esto indica que SSH1 se acumula en el dSMAC siguiendo un patrón de distribución similar al de su sustrato cofilina (Eibert *et al.*, 2004), aunque estos autores no estudian si cofilina se encuentra en el pSMAC o dSMAC. Sin embargo, es probable que enzima y sustrato colocalicen en la SI, lo que aumentaría la concentración local de ambas moléculas y, junto con el aumento de actividad de SSH1 tras su unión a la actina acumulada en el dSMAC, contribuiría a la ultrasensibilidad del módulo (Ferrell, 1998). Esta distribución de SSH1 sugiere además un papel en el flujo retrógrado de actina durante la activación de linfocitos T. La actividad catalítica de SSH1 también podría estar activada localmente por PI3K en la SI, aunque no se conoce exactamente cómo se produce esta regulación (Nagata-Ohashi *et al.*, 2004).

La acumulación de SSH1 en la SI no depende de su actividad catalítica pero sí de su unión a actina (Figura R7). Nuestros datos sugieren que la interacción con la APC causa la inmediata liberación de 14-3-3 y, una vez libre y desfosforilado, SSH1 podría unirse a actina (Nagata-Ohashi *et al.*, 2004). Esto causaría la translocación de SSH1 a la zona de interacción y aumentaría su actividad catalítica enormemente (Nagata-Ohashi *et al.*, 2004; Kurita *et al.*, 2008), de manera que cuando se encuentra en el dSMAC con cofilina y actina, estaría listo para desfosforilar y activar cofilina de manera muy eficiente. Es posible que la mutación W458A afecte además a la interacción con coronina 1B, implicada en la traslocación de SSH1 al lamelipodio (Cai *et al.*, 2007) y quizá también a la SI.

Por último, la rápida acumulación de SSH1 en zonas lamelares de la SI que comienza antes que la de CD3 (Figura R9 A y Vídeo 1) sugiere que SSH1 podría participar en la expansión inicial de la célula T sobre la B o en el escaneo de APCs en busca de pMHCs adecuados. En este contexto, SSH1 también podría estar activado por la activación local de PI3K en el lamelipodio (Nagata-Ohashi *et al.*, 2004; Kurita *et al.*, 2008).

5.5. Control de los niveles de actina por SSH1

Los altos niveles de expresión del mutante catalítico C393S produjeron un gran aumento en los niveles de F-actina totales (Figura R10 A). Esto concuerda con trabajos anteriores en los que tanto el silenciamiento de SSH1 como la sobreexpresión de formas catalíticamente inactivas de SSH1 o SSH2 produjo manojos gruesos y largos de actina (Niwa *et al.*, 2002; Ohta *et al.*, 2003).

Existen dos posibles explicaciones no excluyentes a este fenómeno: la primera es que a partir de ciertos niveles de expresión, el mutante C393S actúe como dominante negativo, impidiendo la actividad del SSH1 endógeno y por tanto el desensamblaje de actina por cofilina, lo que produciría un aumento neto en los niveles de actina filamentosa. La segunda es que la sobreexpresión de C393S a partir de ciertos niveles genere manojos gruesos de actina debido a su actividad de *bundling*, haciéndolos inaccesibles para cofilina y produciendo un aumento global de F-actina. Esto no ocurriría al sobreexpresar SSH1 *wild type* ya que esta actividad de formación de manojos se vería contrarrestada con la actividad catalítica de SSH1 y la activación de cofilina.

En este trabajo, hemos usado la sobreexpresión del mutante C393S como posible dominante negativo de la actividad del SSH1 endógeno, dado que nuestros resultados sobre los mayores niveles de actina filamentosa al sobreexpresarlo concuerdan con las alteraciones observadas por otros (formación de manojos de actina) al silenciar distintos SSHs (Niwa *et al.*, 2002).

5.6. Papel de SSH1 en el ensamblaje y dinámica molecular de la SI

La sobreexpresión de SSH1 o del mutante C393S no afectó a la acumulación de CD3, LFA1, LFA1 activa o el MTOC en la zona de interacción ni a su distribución en la SI (Figuras R11 y R12) a 20 min de interacción, por lo que no parece que una mayor activación de cofilina o una perturbación de los niveles totales de F-actina afecten a la maduración de la SI a estos tiempos. Sin embargo, trabajos anteriores muestran que al interferir directamente la actividad de cofilina mediante péptidos bloqueantes de su unión a actina se altera la polarización de LFA1 y F-actina (aunque no de CD3) a 30 minutos, impidiendo que la SI madure correctamente (Eibert *et al.*, 2004). Esto podría sugerir que interferir con la actividad de cofilina es una perturbación más agresiva que sobreexpresar un mutante catalítico de SSH1, quizá porque otras fosfatasa como SSH2, SSH3 (Ohta *et al.*, 2003), cronofina (Gohla *et al.*, 2005), PP1 o PP2A (Ambach *et al.*, 2000) puedan desfosforilar cofilina en el segundo caso. La acumulación de F-actina tampoco estaba alterada, aunque sí ligeramente su distribución en células que sobreexpresaban el mutante C393S, en las que el anillo de actina estaba menos abierto, con una zona clareada de actina más pequeña, aunque esto no parecía afectar a la distribución en la SI del resto de moléculas estudiadas.

En contraste con estos resultados en la SI madura, en los tiempos iniciales de la interacción observamos que mientras que la dinámica del TCR no parecía estar afectada por la sobreexpresión de SSH1, su centralización estaba totalmente impedida al sobreexpresar el mutante C393S (Figura R13 y Vídeo 5). Estas diferencias podrían deberse a la necesidad de la dinámica de actina para el movimiento de microcomplejos de TCR (Varma *et al.*, 2006; Kaizuka *et al.*, 2007), ya que la sobreexpresión del C393S aumenta los niveles de F-actina (Figura R10) y produce manojos gruesos de filamentos (Niwa *et al.*, 2002; Ohta *et al.*, 2003), posiblemente alterando la dinámica de la misma (Figura D3). Por tanto, nuestros resultados

sugieren que SSH1 tiene un papel regulador de la dinámica del TCR a través de su acción sobre los niveles de actina y la organización de los filamentos.

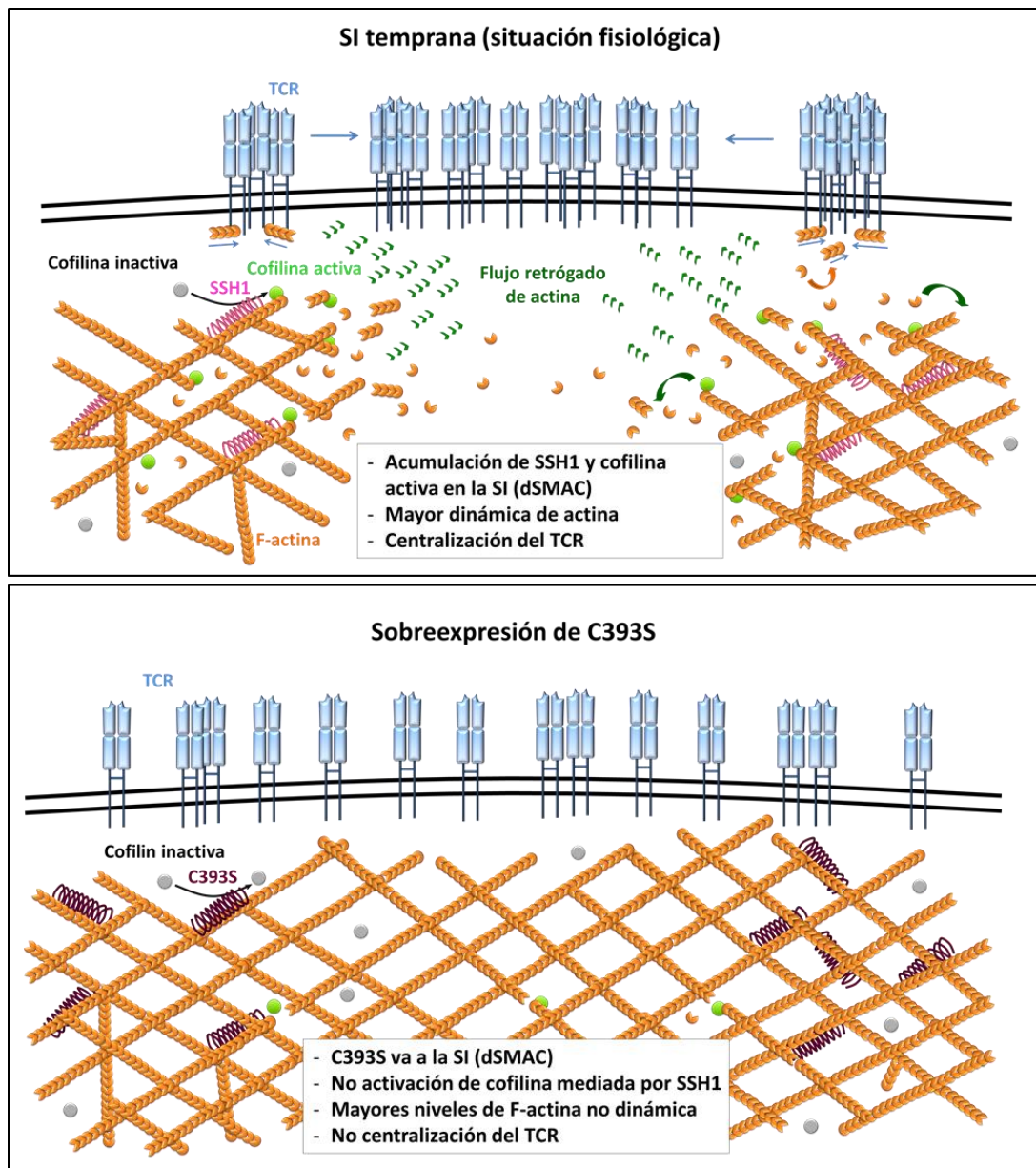


Figura D3: Efecto de la sobreexpresión del mutante C393S en el ensamblaje de la SI. En situaciones normales (panel superior), SSH1 es polarizado a la periferia del contacto en segundos. Cofilina también se polariza allí y es activada localmente por SSH1, lo que da como resultado el establecimiento de un flujo retrógrado de actina y la generación de filamentos cortos, que ayudan al movimiento de TCRs y otras moléculas. Cuando sobreexpresamos un mutante catalítico (panel inferior), cofilina no puede ser activada localmente en tiempos iniciales, lo que bloquea la dinámica de actina en la zona de contacto. Además, los niveles totales de F-actina están elevados. El resultado es el impedimento del movimiento de los TCRs al centro de la interacción.

Para investigar si la dinámica de actina a tiempos tempranos se encuentra efectivamente alterada con la sobreexpresión de C393S, estudiamos la dinámica de las lamelas en el contexto de la activación celular (Figura R14). Los lamelipodios avanzan gracias a un equilibrio entre polimerización de actina en el frente celular y despolimerización por la zona más cercana al interior celular (Begg *et al.*, 1978; Small *et al.*, 1978). Como se observa en la Figura R14 A y Vídeos 6 y 7, SSH1 se encuentra justo por detrás de este frente de actina y va avanzando con el flujo. Por ello, es probable que SSH1, mediante la activación de cofilina, participe en la despolimerización de filamentos que permite el establecimiento de un correcto flujo retrógrado de actina y la formación de lamelipodios productivos durante la activación celular. Este papel de SSH1 está apoyado por la formación de lamelipodios aberrantes al sobreexpresar el mutante catalítico C393S (Figura R14 B y Vídeo 8) y por la pérdida de colocalización de esta forma de SSH1 con F-actina (Figura R14 D), lo que además apoya la hipótesis de que la descentralización del TCR (Figura R13 y Vídeo 5) se debe a alteraciones en la dinámica de actina al sobreexpresar el C393S.

Llama la atención que esta alteración en la distribución del TCR no se aprecie en sinapsis maduras de 20 minutos (Figuras R11) y que la alteración en la distribución de actina a estos tiempos más tardíos sea muy sutil (Figura R12). Esto sugiere que el mutante catalítico no bloquea la dinámica de actina totalmente, sino que sólo afecta a los reordenamientos tempranos. Podría ser que otros mecanismos reguladores de cofilina intervinieran en su activación durante la activación celular y acabaran compensando la falta de actividad de SSH1 y las alteraciones de actina producidas por el mutante C393S; no sólo otras fosfatasa (Ambach *et al.*, 2000; Ohta *et al.*, 2003; Gohla *et al.*, 2005), sino también el ambiente reductor que se crea en la zona de interacción y que lleva al aumento de la capacidad despolimerizadora de cofilina (Yeoh *et al.*, 2002) y a su liberación de PIP₂ y de cortactina (Frantz *et al.*, 2008).

La actina también juega un papel esencial en el establecimiento de la adhesión celular, entre otros mediante fuerzas de tracción dinámicas que facilitan el contacto entre ambas células y estabilizan la interacción (apartado 1.2.1 de la Introducción; Li *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2014). Cuando alteramos la homeostasis de actina mediante la sobreexpresión del mutante C393S, las células tardan más tiempo en adherirse (Figura R16 A), además de presentar un retraso en el clareamiento de actina de la zona central de la SI en los tiempos iniciales de la interacción (Figuras R14 y R15 y Vídeos 8 y 11), lo que explicaría también el

problema en la centralización del TCR en estas células. Los mayores niveles de F-actina generados con altos niveles de C393S (Figura R10) podrían dotar a las células de una excesiva rigidez que dificultaría la adhesión y expansión celular (Freeman *et al.*, 2011; Thauland *et al.*, 2017). Al sobreexpresar GFP-SSH1 tendríamos el efecto contrario: los mayores niveles iniciales de cofilina activa (Figura R4) producirían una mayor dinámica y capacidad de reorganización del citoesqueleto, lo que se reflejaría en un mayor y más rápido clareamiento de actina en los momentos iniciales de la activación (Figura R15 B y Vídeo 10). Efectos similares a los observados con el mutante C393S se han visto en células deficientes en WASP (proteína implicada en la polimerización de actina): las células formaban SI normales en cuanto a la diferenciación de pSMAC y dSMAC, pero perdían estabilidad más rápidamente que las células control (Sims *et al.*, 2007), lo que apoya la importancia de un correcto funcionamiento de la dinámica de actina para la interacción celular.

En resumen, la sobreexpresión de SSH1 y el consiguiente aumento de cofilina activa aceleran el clareamiento de actina inicial, mientras que en el caso del C393S, el clareamiento de actina está muy retrasado, lo que afecta a la dinámica del TCR y acelera la retracción celular. Estos efectos observados en la dinámica de actina y del TCR podrían tener algún efecto en la señalización temprana de los linfocitos T, por lo que nos propusimos investigar este aspecto en más detalle.

5.7. Papel de SSH1 en la señalización temprana de los linfocitos T

El estudio de la señalización temprana en los linfocitos T CD4⁺ arroja resultados interesantes sobre el efecto de la alteración de la dinámica de actina en la activación celular. Como se observa en la Figura R17, tanto al sobreexpresar GFP-SSH1 como GFP-C393S se observó una mayor fosforilación de CD3 ζ a 5 y 15 minutos tras activación con células Jurkat con APCs. Los mayores niveles de fosforilación de CD3 ζ en las dos situaciones son probablemente debidos a motivos diferentes. En el caso del C393S, los mayores niveles de actina filamentosa retrasarían la centralización del TCR al cSMAC. Al ser ésta la zona de apagamiento de la señal (Lee *et al.*, 2003; Varma *et al.*, 2006), la permanencia del TCR en periferia daría lugar a unos mayores niveles de fosforilación de CD3 ζ . En el caso de las células con GFP-SSH1, la mayor fosforilación de CD3 ζ probablemente sea debida a una mayor dinámica de actina, que facilitaría el acceso de moléculas activas a los complejos de

señalización que se ensamblan durante la migración de los microcomplejos de TCR y los activan (Kaizuka *et al.*, 2007; Gowrishankar *et al.*, 2012).

Sin embargo, sólo en el caso del GFP-SSH1 los mayores niveles de pCD3 ζ se traducen en mayores niveles de pPLC γ 1 (Figura R17). Anteriormente se ha descrito que la dinámica de actina participa en la activación de PLC γ 1, aunque el mecanismo exacto no está claro (Babich *et al.*, 2012). Es posible que la mayor capacidad de reorganización del citoesqueleto de actina en las células GFP-SSH1 ayude a la activación de PLC γ 1 mediante un mayor reciclaje en la zona de la SI o facilitando su interacción con su activador I κ k en los complejos de señalización cerca de la membrana plasmática (Figura In1). En cuanto a las células C393S, observamos que el bloqueo de la centralización del TCR (Figura R13 y Vídeo 5) y la alteración de la dinámica de actina a tiempos tempranos (Figuras R15 y R16) no parecen afectar a la fosforilación de PLC γ 1. Puede que los mayores niveles de fosforilación de CD3 ζ en periferia contrarresten los defectos que la menor dinámica de actina produciría sobre la activación de PLC γ 1 según lo descrito en la literatura (Babich *et al.*, 2012).

Cuando realizamos experimentos de movilización de calcio, observamos menores niveles de calcio tanto en el caso del GFP-SSH1 como en el de GFP-C393S, aunque sólo este último presentó diferencias significativas respecto a las células control (aunque en cualquier caso las diferencias eran muy pequeñas) (Figura R18 C). El citoesqueleto de actina y sus reguladores participan en la movilización de calcio de varias maneras (Figura D4) (Babich & Burkhardt, 2013): en una primera fase, la dinámica de actina facilita la activación de PLC γ 1 y la liberación intracelular de calcio desde el retículo endoplasmático. Posteriormente, participa en la apertura de canales de calcio en la membrana plasmática para la entrada de calcio extracelular. La elevación de los niveles intracelulares de calcio promueven a su vez la remodelación del citoesqueleto (Babich & Burkhardt, 2013; Hartzell *et al.*, 2016), estableciendo así dos bucles de retroalimentación positiva entre la dinámica de actina y la movilización de calcio (Figura D4, bucle 1 y bucle 2). Los niveles normales de pPLC γ 1 en las células GFP-C393S sugieren que el defecto en la movilización de calcio ocurre a nivel del establecimiento del bucle de retroalimentación 2 debido quizá a la mayor estabilidad del citoesqueleto en estas células. Por su parte, los mayores niveles de pPLC γ 1 observados en las células GFP-SSH1 no se traducirían en mayores niveles de calcio porque la alteración del

citoesqueleto (dinámica demasiado elevada) compensaría esta mayor activación de PLC γ 1 con la alteración de la interacción calcio/citoesqueleto a nivel del bucle 2 (Figura D4).

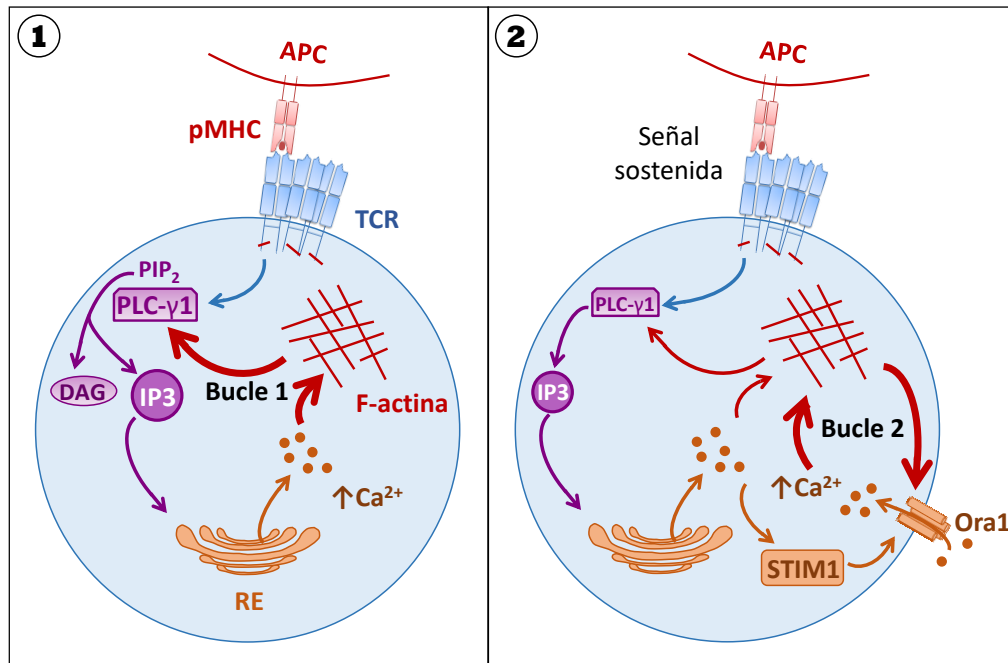


Figura D4: Relación entre la dinámica del citoesqueleto de actina y el aumento de calcio intracelular. 1) Ante una señal antigénica, se disparan rutas de señalización por debajo del TCR que llevan a la activación de PLC γ 1, a la cual contribuye la dinámica de actina. La producción de IP₃ a partir de PIP₂ promueve la liberación de calcio del retículo endoplasmático (RE), lo que puede durar minutos y a su vez promueve la dinámica de actina a través de su regulación de moléculas moduladoras del citoesqueleto (bucle de retroalimentación 1). **2)** Si existe una señal antigénica sostenida, el calcio liberado del RE promueve la apertura de los canales de calcio Ora1 por STIM1, en lo que también participa la dinámica de actina. La entrada masiva de calcio extracelular que se produce contribuye aún más a la dinámica de actina, estableciendo un segundo bucle de retroalimentación positiva (bucle 2).

Es importante tener en cuenta que mientras que en los ensayos de fosforilación de moléculas de señalización la activación se produjo en el contexto de una interacción linfocito T/APC, en el caso de los experimentos de movilización de calcio las células se estimularon utilizando tetrámeros anti-CD3/CD28 que entrecruzan TCRs a nivel de membrana. Sería interesante realizar estos experimentos funcionales (tanto fosforilación de moléculas por debajo del TCR como movilización de calcio) con un estímulo menos fuerte, ya que una señal antigénica demasiado fuerte podría estar enmascarando diferencias que quizá se apreciarían con estimulaciones del TCR menos potentes.

5.8. Papel de SSH1 en la migración celular

El citoesqueleto de actina es clave en el movimiento celular (apartado 1.2.2 de la Introducción). Por ello, creímos relevante estudiar el papel de SSH1 en el proceso de la migración.

Los resultados de la migración en 2D muestran que las células que sobreexpresaban GFP-SSH1 eran más lentas en su avance a lo largo del canal, aunque estas diferencias no son significativas (Figura R19 B). A pesar de esta menor velocidad de desplazamiento, las células GFP-SSH1⁺ acumularon más distancia total recorrida (Figura R19 C), lo que se explica por el mayor número de cambios de dirección y de pared observados (Figura R19 D), que son medidas indirectas de la direccionalidad de la célula: una célula que cambia de sentido repetidamente en su trayectoria a lo largo del canal, recorrerá más distancia total, aunque la distancia real que avanza a lo largo del canal será menor y su velocidad de avance será más lenta. Por el contrario, las células GFP negativas y las GFP-C393S⁺ tienden a recorrer el canal de manera unidireccional, entrando por un extremo y saliendo por el contrario sin cambiar de sentido en su movimiento. El mayor número de cambios de pared de las células GFP-SSH1⁺ podría indicar además una menor capacidad de adhesión a ICAM-1, por lo que sería interesante realizar ensayos de adhesión.

La relevancia fisiológica de estos parámetros va más allá de la mera capacidad de migrar. En trabajos del laboratorio del Dr. Krummel observaron un menor número de cambios de dirección en 2D y una mayor velocidad de desplazamiento en microcanales cuando deplecionaban miosina 1G (Jacobelli *et al.*, 2010; Gerard *et al.*, 2014), el efecto inverso al que obtenemos nosotros al sobreexpresar SSH1. Las células deplecionadas de miosina 1G mostraron además una menor capacidad de escanear y encontrar APCs, como sugiere la menor tasa de supervivencia observada en ratones inmunizados con números crecientes de APCs a los que se transfirieron células OT-I deplecionadas de miosina 1G (Gerard *et al.*, 2014). La menor direccionalidad y velocidad de avance de las células GFP-SSH1⁺ podría indicar que estas células son más eficientes a la hora de encontrar antígenos extraños y de escanear APCs.

Existen trabajos previos en los que estudian el papel del módulo de cofilina en el movimiento en 2D. En uno de ellos, la alteración del módulo de cofilina mediante siRNA de cofilina o activación de LIMK no produjo alteraciones en el movimiento (Klemke *et al.*, 2010).

Sin embargo, en otro observaron defectos en la direccionalidad del movimiento aleatorio (en ausencia de gradiente de quimioquinas) al silenciar tanto cofilina como LIMK1, pero no SSH1, mientras que en situaciones de quimiotaxis encontraron menor velocidad y direccionalidad al silenciar cualquiera de las tres (Nishita *et al.*, 2005). En nuestro caso, al sobreexpresar SSH1 observamos menor velocidad y direccionalidad en ausencia de quimiotaxis (Figura R19). En conjunto, parece que cualquier perturbación del módulo de cofilina (inhibición de cofilina, LIMK o SSH1, o sobreexpresión de SSH1) produce alteraciones en la direccionalidad, por lo que este módulo parece crítico para este aspecto del movimiento celular.

Llama la atención que las células que sobreexpresan el mutante catalítico C393S presenten un fenotipo normal en cuanto a migración, contrastando con lo observado al silenciar SSH1 (Nishita *et al.*, 2005). Es importante tener en cuenta las diferencias metodológicas en los ensayos: Nishita *et al.* emplearon *transwells* sin ICAM-1, con SDF-1 α en el pocillo inferior, o cámaras Dunn con un gradiente de SDF-1 α , mientras que en nuestro caso las células estaban en microcanales con ICAM-1 y en ausencia de quimioquinas. Además, no empleamos siRNAs sino que sobreexpresamos un mutante catalítico, por lo que se trata de una perturbación totalmente diferente pero quizá menos severa, ya que puede que la dinámica de actina no esté totalmente alterada en todas las células analizadas debido a los bajos niveles de expresión obtenidos en general en las transfecciones de blastos CD8⁺ de ratón.

Creímos relevante estudiar además la migración en 3D, donde el citoesqueleto de actina es crítico para poder modular la forma celular y adaptarla a espacios intersticiales pequeños (Lammermann *et al.*, 2008). En el caso de las células con GFP-SSH1, parece lógico que la mayor activación de cofilina produzca un aumento en la plasticidad del citoesqueleto y por tanto facilite la adaptación de la morfología celular a los espacios de la matriz de colágeno, aumentando así tanto la velocidad de migración como la distancia que recorren (Figura R20). En el trabajo de Klemke *et al.* mencionado anteriormente, estudiaron también la implicación del módulo de cofilina en la migración 3D mediante *transwells* cubiertos con una matriz gruesa de Matrigel y observaron que tanto el silenciamiento de cofilina como la activación de LIMK producían pérdida en la direccionalidad y velocidad del movimiento (Klemke *et al.*, 2010). Esto sería consistente con nuestros resultados al sobreexpresar SSH1, que sería la situación contraria al estudio mencionado y donde encontramos mayor velocidad de migración (Figura R20).

En cuanto a la sobreexpresión del mutante C393S, sería esperable que, al producir un citoesqueleto más estable y con menor capacidad de remodelación, hubiera un defecto en la migración. Es posible que los espacios de la matriz de colágeno sean demasiado estrechos y las células utilicen el citoesqueleto de tubulina para adaptarse a estos huecos tan pequeños (Lammermann *et al.*, 2008), llegando a ser incluso más eficientes que las células control. En cualquier caso, este resultado es sorprendente y difícil de explicar y merece ser investigado en mayor profundidad.

CONCLUSIONES &
CONCLUSION



Los resultados presentados en este trabajo permiten concluir:

1. Los niveles de cofilina activa siguen una respuesta ultrasensible y biestable en función de los niveles de SSH1 en la que existe además irreversibilidad al retirar el estímulo que activó el módulo de señalización. Esta ultrasensibilidad está mediada, al menos en parte, por el aumento de actividad de SSH1 tras su unión a F-actina y por la acumulación local de cofilina y SSH1 en la SI.
2. SSH1 se polariza a la periferia de la SI en tiempos tempranos de la interacción de manera dependiente de su unión a actina pero independiente de su actividad catalítica.
3. La sobreexpresión de SSH1 o cofilina produjo alteraciones morfológicas pero ni la sobreexpresión de SSH1 ni de su mutante catalítico C393S afectaron a la localización de CD3, LFA1 o el MTOC en SI maduras, aunque sí a la distribución de actina filamentosa.
4. La sobreexpresión del mutante catalítico C393S produjo un aumento en los niveles totales de F-actina, lo que se reflejó en una alteración en la dinámica de actina durante la activación celular, un retraso en la adhesión tras estimulación por anticuerpos y un bloqueo de la centralización del TCR en la SI.
5. La sobreexpresión de SSH1 produjo una mayor activación de CD3 ζ y de PLC γ 1 que no se tradujeron en mayores niveles de calcio. Por su parte, la sobreexpresión del mutante C393S produjo una mayor activación de CD3 ζ pero un defecto en la movilización de calcio debido probablemente a la alteración de bucles de retroalimentación entre calcio y dinámica de actina.
6. SSH1 regula la direccionalidad de la migración en dos dimensiones y la capacidad de migrar en matrices tridimensionales de colágeno.

CONCLUSIONES

The results presented in this work allow us to conclude the following:

1. Active cofilin levels follow an ultrasensitive and bistable response as a function of SSH1 levels, in which there is also irreversibility upon retrieval of the stimulus that activated the signaling module. This ultrasensitivity is mediated, at least in part, by the increase in SSH1 activity upon binding to F-actin and by the local accumulation of both cofilina and SSH1 at the IS.
2. SSH1 is polarized to the periphery of the IS in the early stages of the interaction in a manner dependent on its binding to actin but independent of its catalytic activity.
3. The overexpression of SSH1 or cofilin caused morphological alterations, but neither the overexpression of SSH1 nor its catalytic mutant C393S affected the localization of CD3, LFA1 or the MTOC in the mature IS, although F-actin distribution was altered.
4. The overexpression of the catalytic mutant C393S caused an increase in the total levels of F-actin, which was reflected in altered actin dynamics during cell activation, delayed adhesion upon antibody stimulation and a blockade of TCR centralization at the IS.
5. The overexpression of SSH1 caused higher activation of CD3 ζ and PLC γ 1, which was not translated in higher calcium levels. The overexpression of the C393S mutant caused higher activation of CD3 ζ but defective calcium mobilization probably due to the alteration of the feedback loop between calcium and actin dynamics.
6. SSH1 regulates the directionality of migration in two dimensions and the capacity to migrate in three-dimensional collagen matrices.

REFERENCIAS



REFERENCIAS

- Alonso, A., J. Sasin, N. Bottini, I. Friedberg, I. Friedberg, A. Osterman, A. Godzik, T. Hunter, J. Dixon, and T. Mustelin. 2004. 'Protein tyrosine phosphatases in the human genome', *Cell*, 117: 699-711.
- Ambach, A., J. Saunus, M. Konstandin, S. Wesselborg, S.C. Meuer, and Y. Samstag. 2000. 'The serine phosphatases PP1 and PP2A associate with and activate the actin-binding protein cofilin in human T lymphocytes', *Eur J Immunol*, 30: 3422-31.
- Andrianantoandro, E., and T. D. Pollard. 2006. 'Mechanism of actin filament turnover by severing and nucleation at different concentrations of ADF/cofilin', *Mol Cell*, 24: 13-23.
- Arber, S., F.A. Barbayannis, H. Hanser, C. Schneider, C.A. Stanyon, O. Bernard, and P. Caroni. 1998. 'Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase', *Nature*, 393: 805-9.
- Babich, A., S. Li, R. S. O'Connor, M. C. Milone, B. D. Freedman, and J. K. Burkhardt. 2012. 'F-actin polymerization and retrograde flow drive sustained PLCgamma1 signaling during T cell activation', *J Cell Biol*, 197: 775-87.
- Babich, A., and J. K. Burkhardt. 2013. 'Coordinate control of cytoskeletal remodeling and calcium mobilization during T-cell activation', *Immunol Rev*, 256: 80-94.
- Bamburg, J.R., H.E. Harris, and A.G. Weeds. 1980. 'Partial purification and characterization of an actin depolymerizing factor from brain', *FEBS Letters*, 121: 178-82.
- Barisic, S., A. C. Nagel, M. Franz-Wachtel, B. Macek, A. Preiss, G. Link, D. Maier, and A. Hausser. 2011. 'Phosphorylation of Ser 402 impedes phosphatase activity of slingshot 1', *EMBO Rep*, 12: 527-33.
- Beemiller, P., and M. F. Krummel. 2010. 'Mediation of T-cell activation by actin meshworks', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2: a002444.
- Beemiller, P., J. Jacobelli, and M. F. Krummel. 2012. 'Integration of the movement of signaling microclusters with cellular motility in immunological synapses', *Nat Immunol*, 13: 787-95.
- Begg, D.A., R. Rodewald, and L.I. Rebhun. 1978. 'The visualization of actin filament polarity in thin sections. Evidence for the uniform polarity of membrane-associated filaments', *J Cell Biol*, 79: 846-52.
- Bernstein, B.W., W.B. Painter, H. Chen, L.S. Minamide, H. Abe, and J.R. Bamburg. 2000. 'Intracellular pH modulation of ADF/cofilin proteins', *Cell Motil Cytoskeleton*, 47: 319-36.
- Billadeau, D.D., J.C. Nolz, and T.S. Gomez. 2007. 'Regulation of T-cell activation by the cytoskeleton', *Nat Rev Immunol*, 7: 131-43.
- Blanchoin, L., and T. D. Pollard. 1999. 'Mechanism of interaction of Acanthamoeba actophorin (ADF/cofilin) with actin filaments', *J Biol Chem*, 274: 15538-46.

REFERENCIAS

- Blanchoin, L., R.C. Robinson, S. Choe, and T.D. Pollard. 2000. 'Phosphorylation of Acanthamoeba actophorin (ADF/cofilin) blocks interaction with actin without a change in atomic structure', *J Mol Biol*, 295: 203-11.
- Bolte, S., and F.P. Cordelières. 2006. 'A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy', *J Microsc*, 224: 213-32.
- Brommage, R., J. Liu, G. M. Hansen, L. L. Kirkpatrick, D. G. Potter, A. T. Sands, B. Zambrowicz, D. R. Powell, and P. Vogel. 2014. 'High-throughput screening of mouse gene knockouts identifies established and novel skeletal phenotypes', *Bone Res*, 2: 14034.
- Bunnell, S.C., V. Kapoor, R.P. Tribble, W. Zhang, and L.E. Samelson. 2001. 'T cell receptor ligation induces the formation of dynamically regulated signaling assemblies', *Immunity*, 14: 315-29.
- Burkhardt, J. K., E. Carrizosa, and M. H. Shaffer. 2008. 'The actin cytoskeleton in T cell activation', *Annu Rev Immunol*, 26: 233-59.
- Cai, E., K. Marchuk, P. Beemiller, C. Beppler, M. G. Rubashkin, V. M. Weaver, A. Gerard, T. L. Liu, B. C. Chen, E. Betzig, F. Bartumeus, and M. F. Krummel. 2017. 'Visualizing dynamic microvillar search and stabilization during ligand detection by T cells', *Science*, 356.
- Cai, L., T. W. Marshall, A. C. Uetrecht, D. A. Schafer, and J. E. Bear. 2007. 'Coronin 1B coordinates Arp2/3 complex and cofilin activities at the leading edge', *Cell*, 128: 915-29.
- Calabia-Linares, C., J. Robles-Valero, H. de la Fuente, M. Perez-Martinez, N. Martín-Cofreces, M. Alfonso-Pérez, C. Gutierrez-Vázquez, M. Mittelbrunn, S. Ibiza, F.R. Urbano-Olmos, C. Aguado-Ballano, C.O. Sánchez-Sorzano, F. Sanchez-Madrid, and E. Veiga. 2011. 'Endosomal clathrin drives actin accumulation at the immunological synapse.', *J Cell Sci*, 124: 820-30.
- Campi, G., R. Varma, and M. L. Dustin. 2005. 'Actin and agonist MHC-peptide complex-dependent T cell receptor microclusters as scaffolds for signaling', *J Exp Med*, 202: 1031-6.
- Comrie, W. A., A. Babich, and J. K. Burkhardt. 2015. 'F-actin flow drives affinity maturation and spatial organization of LFA-1 at the immunological synapse', *J Cell Biol*, 208: 475-91.
- Das, V., B. Nal, A. Dujeancourt, M-I. Thoulouze, T. Galli, P. Roux, A. Dautry-Varsat, and A. Alcover. 2004. 'Activation-induced polarized recycling targets T cell antigen receptors to the immunological synapse: involvement of SNARE complexes', *Immunity*, 20: 577-88.
- Dawe, H.R., L.S. Minamide, J.R. Bamburg, and L.P. Cramer. 2003. 'ADF/cofilin controls cell polarity during fibroblast migration', *Curr Biol*, 13: 252-7.

REFERENCIAS

- Delon, J., N. Bercovici, R. Liblau, and A. Trautmann. 1998. 'Imaging antigen recognition by naive CD4+ T cells: compulsory cytoskeletal alterations for the triggering of an intracellular calcium response', *Eur J Immunol*, 28: 716-29.
- DeMond, A. L., K. D. Mossman, T. Starr, M. L. Dustin, and J. T. Groves. 2008. 'T cell receptor microcluster transport through molecular mazes reveals mechanism of translocation', *Biophys J*, 94: 3286-92.
- Donnadieu, E., G.; Bismuth, and A. Trautmann. 1994. 'Antigen recognition by helper T cells elicits a sequence of distinct changes of their shape and intracellular calcium', *Curr Biol*, 4: 584-95.
- Dustin, M. L. 2008. 'Hunter to gatherer and back: immunological synapses and kinapses as variations on the theme of amoeboid locomotion', *Annu Rev Cell Dev Biol*, 24: 577-96.
- Dustin, M. L.; S.K.; Bromley, Z.; Kan, D.A.; Peterson, and E.R. Unanue. 1997. 'Antigen receptor engagement delivers a stop signal to migrating T lymphocytes', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94: 3909-13.
- Dustin, M.L., M.W. Olszowy, A.D. Holdorf, J. Li, S. Bromley, N. Desai, P. Widder, F. Rosenberger, P.A. van der Merwe, P.M. Allen, and A.S. Shaw. 1998. 'A novel adaptor protein orchestrates receptor patterning and cytoskeletal polarity in T-cell contacts', *Cell*, 94: 667-77.
- Dustin, M.L., and T.A. Springer. 1989. 'T- cell receptor cross- linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1.', *Nature*, 341: 619-24.
- Eibert, S. M., K. H. Lee, R. Pipkorn, U. Sester, G. H. Wabnitz, T. Giese, S. C. Meuer, and Y. Samstag. 2004. 'Cofilin peptide homologs interfere with immunological synapse formation and T cell activation', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101: 1957-62.
- Eiseler, T., H. Doppler, I. K. Yan, K. Kitatani, K. Mizuno, and P. Storz. 2009. 'Protein kinase D1 regulates cofilin-mediated F-actin reorganization and cell motility through slingshot', *Nat Cell Biol*, 11: 545-56.
- Ferrell, J. E., Jr., and S. H. Ha. 2014a. 'Ultrasensitivity part I: Michaelian responses and zero-order ultrasensitivity', *Trends Biochem Sci*, 39: 496-503.
- . 2014b. 'Ultrasensitivity part II: multisite phosphorylation, stoichiometric inhibitors, and positive feedback', *Trends Biochem Sci*, 39: 556-69.
- . 2014c. 'Ultrasensitivity part III: cascades, bistable switches, and oscillators', *Trends Biochem Sci*, 39: 612-8.
- Ferrell, J.E. Jr. 1998. 'How regulated protein translocation can produce switch-like responses', *Trends Biochem Sci*, 23: 461-5.
- Ferrell, James E. 2002. 'Self-perpetuating states in signal transduction: positive feedback, double-negative feedback and bistability', *Current Opinion in Cell Biology*, 14: 140-48.

REFERENCIAS

- Frantz, C., G. Barreiro, L. Dominguez, X. Chen, R. Eddy, J. Condeelis, M.J. Kelly, M.P. Jacobson, and D. L. Barber. 2008. 'Cofilin is a pH sensor for actin free barbed end formation: role of phosphoinositide binding', *J Cell Biol*, 183: 865-79.
- Freeman, S.A., V. Jaumouillé, K. Choi, B.E. Hsu, H.S. Wong, L. Abraham, M.L. Graves, D. Coombs, C.D. Roskelley, R. Das, S. Grinstein, and M.R. Gold. 2015. 'Toll-like receptor ligands sensitize B-cell receptor signalling by reducing actin-dependent spatial confinement of the receptor', *Nat Commun*, 6: 6168.
- Freeman, S.A., V. Lei, M. Dang-Lawson, K. Mizuno, C.D. Roskelley, and M.R. Gold. 2011. 'Cofilin-mediated F-actin severing is regulated by the Rap GTPase and controls the cytoskeletal dynamics that drive lymphocyte spreading and BCR microcluster formation', *J Immunol*, 187: 5887-900.
- Freiberg, B.A., H. Kupfer, W. Maslanik, J. Delli, J. Kappler, D.M. Zaller, and A. Kupfer. 2002. 'Staging and resetting T cell activation in SMACs.', *Nat Immunol*, 3: 911-17.
- Friedl, P., S. Borgmann, and E. B. Brocker. 2001. 'Amoeboid leukocyte crawling through extracellular matrix: lessons from the Dictyostelium paradigm of cell movement', *J Leukoc Biol*, 70: 491-509.
- Friedl, P., and B. Weigelin. 2008. 'Interstitial leukocyte migration and immune function', *Nat Immunol*, 9: 960-9.
- Friedman, R. S., P. Beemiller, C. M. Sorensen, J. Jacobelli, and M. F. Krummel. 2010. 'Real-time analysis of T cell receptors in naive cells in vitro and in vivo reveals flexibility in synapse and signaling dynamics', *J Exp Med*, 207: 2733-49.
- Gallego, M.D., M. Santamaría, J. Peña, and I.J. Molina. 1997. 'Defective actin reorganization and polymerization of Wiskott-Aldrich T cells in response to CD3-mediated stimulation', *Blood*, 90: 3089-97.
- Garcia-Ortiz, A., N. B. Martin-Cofreces, S. Ibiza, A. Ortega, A. Izquierdo-Alvarez, A. Trullo, V. M. Victor, E. Calvo, B. Sot, A. Martinez-Ruiz, J. Vazquez, F. Sanchez-Madrid, and J. M. Serrador. 2017. 'eNOS S-nitrosylates beta-actin on Cys374 and regulates PKC-theta at the immune synapse by impairing actin binding to profilin-1', *PLoS Biol*, 15: e2000653.
- Geiger, B., D.; Rosen, and G. Berke. 1982. 'Spatial relationships of microtubule-organizing centers and the contact area of cytotoxic T lymphocytes and target cells', *J Cell Biol*, 95: 137-43.
- Gerard, A., G. Patino-Lopez, P. Beemiller, R. Nambiar, K. Ben-Aissa, Y. Liu, F. J. Totah, M. J. Tyska, S. Shaw, and M. F. Krummel. 2014. 'Detection of rare antigen-presenting cells through T cell-intrinsic meandering motility, mediated by Myo1g', *Cell*, 158: 492-505.
- Ghosh, M., X. Song, G. Mouneimne, M. Sidani, D.S. Lawrence, and J.S. Condeelis. 2004. 'Cofilin promotes actin polymerization and defines the direction of cell motility', *Science*, 304: 743-6.

REFERENCIAS

- Gohla, A., J. Birkenfeld, and G. M. Bokoch. 2005. 'Chronophin, a novel HAD-type serine protein phosphatase, regulates cofilin-dependent actin dynamics', *Nat Cell Biol*, 7: 21-9.
- Goldbeter, A., and D. E. Jr. Koshland. 1981. 'An amplified sensitivity arising from covalent modification in biological systems', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78: 9840-6844.
- Gowrishankar, K., S. Ghosh, S. Saha, C. Rumamol, S. Mayor, and M. Rao. 2012. 'Active remodeling of cortical actin regulates spatiotemporal organization of cell surface molecules', *Cell*.
- Grakoui, A.; Bromley, S.K.; Sumen, C.; Davis, M.M.; Shaw, A.S.; Allen, P.M. & Dustin, M.L. 1999. 'The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation', *Science*, 285: 221-7.
- Gurniak, C.B., E. Perlas, and W. Witke. 2005. 'The actin depolymerizing factor n-cofilin is essential for neural tube morphogenesis and neural crest cell migration', *Dev Biol*, 278: 231-41.
- Hartzell, C. A., K. I. Jankowska, J. K. Burkhardt, and R. S. Lewis. 2016. 'Calcium influx through CRAC channels controls actin organization and dynamics at the immune synapse', *Elife*, 5.
- Hashimoto-Tane, A., and T. Saito. 2016. 'Dynamic Regulation of TCR-Microclusters and the Microsynapse for T Cell Activation', *Front Immunol*, 7: 255.
- Hayashi, T., and W. Ip. 1976. 'Polymerization polarity of actin', *J Mechanochem Cell Motil*, 3: 163-9.
- Hayden, S.M., P.S. Miller, A. Brauweiler, and J.R. Bamburg. 1993. 'Analysis of the interactions of actin depolymerizing factor with G- and F-actin', *Biochemistry*, 32: 9994-10004.
- Hewitt, C.R., J.R. Lamb, J. Hayball, M. Hill, M.J. Owen, and R.E. O'Hehir. 1992. 'Major histocompatibility complex independent clonal T cell anergy by direct interaction of Staphylococcus aureus enterotoxin B with the T cell antigen receptor', *J Exp Med*, 175: 1493-9.
- Hill, A.V. 1910. 'The possible effects of the aggregation of the molecules of hæmoglobin on its dissociation curves', *J. Physiol.*, 40: iv-vii.
- Hogg, N., I. Patzak, and F. Willenbrock. 2011. 'The insider's guide to leukocyte integrin signalling and function', *Nat Rev Immunol*, 11: 416-26.
- Hosseini, B. H., I. Louban, D. Djandji, G. H. Wabnitz, J. Deeg, N. Bulbuc, Y. Samstag, M. Gunzer, J. P. Spatz, and G. J. Hammerling. 2009. 'Immune synapse formation determines interaction forces between T cells and antigen-presenting cells measured by atomic force microscopy', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106: 17852-7.
- Huang, C-Y. F. , and J. E. Ferrell, Jr. 1996. 'Ultrasensitivity in the mitogen-activated protein kinase cascade', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93: 10078-83.

REFERENCIAS

- Huxley, H.E. 1963. 'Electron microscope studies on the structure of natural and synthetic protein filaments from striated muscle', *J Mol Biol*, 7.
- Jacobelli, J., R. S. Friedman, M. A. Conti, A. M. Lennon-Dumenil, M. Piel, C. M. Sorensen, R. S. Adelstein, and M. F. Krummel. 2010. 'Confinement-optimized three-dimensional T cell amoeboid motility is modulated via myosin IIA-regulated adhesions', *Nat Immunol*, 11: 953-61.
- Kaizuka, Y., A. D. Douglass, R. Varma, M. L. Dustin, and R. D. Vale. 2007. 'Mechanisms for segregating T cell receptor and adhesion molecules during immunological synapse formation in Jurkat T cells', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 20296-301.
- Kaizuka, Y., A. D. Douglass, R. Varma, M. L. Dustin, and R. D. Vale. 2007. 'Mechanisms for segregating T cell receptor and adhesion molecules during immunological synapse formation in Jurkat T cells', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 20296-301.
- Klejnot, M., M. Gabrielsen, J. Cameron, A. Mleczak, S. K. Talapatra, F. Kozielski, A. Pannifer, and M. F. Olson. 2013. 'Analysis of the human cofilin 1 structure reveals conformational changes required for actin binding', *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 69: 1780-8.
- Klemke, M., E. Kramer, M. H. Konstandin, G. H. Wabnitz, and Y. Samstag. 2010. 'An MEK-cofilin signalling module controls migration of human T cells in 3D but not 2D environments', *EMBO J*, 29: 2915-29.
- Klemke, M., G.H. Wabnitz, F. Funke, B. Funk, H. Kirchgessner, and Y. Samstag. 2008. 'Oxidation of cofilin mediates T cell hyporesponsiveness under oxidative stress conditions', *Immunity*, 29: 404-13.
- Kligys, K., J. N. Claiborne, P. J. DeBiase, S. B. Hopkinson, Y. Wu, K. Mizuno, and J. C. Jones. 2007. 'The slingshot family of phosphatases mediates Rac1 regulation of cofilin phosphorylation, laminin-332 organization, and motility behavior of keratinocytes', *J Biol Chem*, 282: 32520-8.
- Kolmodin, K., and J. Aqvist. 2001. 'The catalytic mechanism of protein tyrosine phosphatases revisited', *FEBS Lett*, 498: 208-13.
- Kousaka, K., H. Kiyonari, N. Oshima, A. Nagafuchi, Y. Shima, O. Chisaka, and T. Uemura. 2008. 'Slingshot-3 dephosphorylates ADF/cofilin but is dispensable for mouse development', *Genesis*, 46: 246-55.
- 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: 181-94.
- Kupfer, A., and S.J. Singer. 1989. 'Cell biology of cytotoxic and helper T cell functions: immunofluorescence microscopic studies of single cells and cell couples', *Annu Rev Immunol*, 7: 309-37.

REFERENCIAS

- Kurita, S., E. Gunji, K. Ohashi, and K. Mizuno. 2007. 'Actin filaments-stabilizing and -bundling activities of cofilin-phosphatase Slingshot-1', *Genes Cells*, 12: 663-76.
- Kurita, S., Y. Watanabe, E. Gunji, K. Ohashi, and K. Mizuno. 2008. 'Molecular dissection of the mechanisms of substrate recognition and F-actin-mediated activation of cofilin-phosphatase Slingshot-1', *J Biol Chem*, 283: 32542-52.
- Lammermann, T., B.L. Bader, S.J. Monkley, T. Worbs, R. Wedlich-Soldner, K. Hirsch, M. Keller, R. Forster, D.R. Critchley, R. Fassler, and M. Sixt. 2008. 'Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing', *Nature*, 453: 51-5.
- Lee, K. H., A. R. Dinner, C. Tu, G. Campi, S. Raychaudhuri, R. Varma, T. N. Sims, W. R. Burack, H. Wu, J. Wang, O. Kanagawa, M. Markiewicz, P. M. Allen, M. L. Dustin, A. K. Chakraborty, and A. S. Shaw. 2003. 'The immunological synapse balances T cell receptor signaling and degradation', *Science*, 302: 1218-22.
- Lee, K. H., A.D. Holdorf, M. L. Dustin, A.C. Chan, P.M. Allen, and A.S. Shaw. 2002. 'T Cell Receptor Signaling Precedes Immunological Synapse Formation', *Science*, 295: 1539-42.
- Lee, K.H., S.C.; Meuer, and Y. Samstag. 2000. 'Cofilin: a missing link between T cell co-stimulation and rearrangement of the actin cytoskeleton', *Eur J Immunol*, 30: 892-9.
- Li, Y. C., B. M. Chen, P. C. Wu, T. L. Cheng, L. S. Kao, M. H. Tao, A. Lieber, and S. R. Roffler. 2010. 'Cutting Edge: mechanical forces acting on T cells immobilized via the TCR complex can trigger TCR signaling', *J Immunol*, 184: 5959-63.
- Liu, B., W. Chen, B. D. Evavold, and C. Zhu. 2014. 'Accumulation of dynamic catch bonds between TCR and agonist peptide-MHC triggers T cell signaling', *Cell*, 157: 357-68.
- Lowin-Kropf, B., V.S. Shapiro, and A. Weiss. 1998. 'Cytoskeletal polarization of T cells is regulated by an immunoreceptor tyrosine-based activation motif-dependent mechanism', *J Cell Biol*, 140: 861-71.
- Lub, M., Y. van Kooyk, S.J. van Vliet, and C.G. Figdor. 1997. 'Dual role of the actin cytoskeleton in regulating cell adhesion mediated by the integrin lymphocyte function-associated molecule-1', *Mol Biol Cell*, 8: 341-51.
- Maciver, S.K. 1991. 'Characterization of actin filament severing by actophorin from *Acanthamoeba castellanii*', *J Cell Biol*, 115: 1611-20.
- Maheswaranathan, M., H. K. Gole, I. Fernandez, B. Lassegue, K. K. Griendling, and A. San Martin. 2011. 'Platelet-derived growth factor (PDGF) regulates Slingshot phosphatase activity via Nox1-dependent auto-dephosphorylation of serine 834 in vascular smooth muscle cells', *J Biol Chem*, 286: 35430-7.
- Maly, I. V., and G. G. Borisy. 2001. 'Self-organization of a propulsive actin network as an evolutionary process', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 11324-9.

REFERENCIAS

- Marshall, T. W., H.L. Aloor, and J. E. Bear. 2009. 'Coronin 2A regulates a subset of focal-adhesion-turnover events through the cofilin pathway', *J Cell Sci*, 122: 3061-9.
- Martin-Cofreces, N. B., F. Baixauli, M. J. Lopez, D. Gil, A. Monjas, B. Alarcon, and F. Sanchez-Madrid. 2012. 'End-binding protein 1 controls signal propagation from the T cell receptor', *EMBO J*, 31: 4140-52.
- Martin-Cofreces, N. B., J. Robles-Valero, J. R. Cabrero, M. Mittelbrunn, M. Gordon-Alonso, C. H. Sung, B. Alarcon, J. Vazquez, and F. Sanchez-Madrid. 2008. 'MTOC translocation modulates IS formation and controls sustained T cell signaling', *J Cell Biol*, 182: 951-62.
- McGough, A., B. Pope, W. Chiu, and A. Weeds. 1997. 'Cofilin Changes the Twist of F-Actin: Implications for Actin Filament Dynamics and Cellular Function', *J Cell Biol*, 138: 771-81.
- Mempel, T.R., S.E. Henrickson, and U.H. von Andrian. 2004. 'T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases', *Nature*, 427: 154-9.
- Mizuno, K. 2013. 'Signaling mechanisms and functional roles of cofilin phosphorylation and dephosphorylation', *Cell Signal*, 25: 457-69.
- Monks, C.R., B.A. Freiberg, H. Kupfer, N. Sciaky, and A. Kupfer. 1998. 'Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells', *Nature*, 395: 82-6.
- Moriyama, K., Iida K., and I. Yahara. 1996. 'Phosphorylation of Ser-3 of cofilin regulates its essential function on actin', *Genes Cells*, 1: 73-86.
- Mugnier, B., B. Nal, C. Verthuy, C. Boyer, D. Lam, L. Chasson, V. Nieoullon, G. Chazal, X. J. Guo, H. T. He, D. Rueff-Juy, A. Alcover, and P. Ferrier. 2008. 'Coronin-1A links cytoskeleton dynamics to TCR alpha beta-induced cell signaling', *PLoS One*, 3: e3467.
- Nagata-Ohashi, K., Y. Ohta, K. Goto, S. Chiba, R. Mori, M. Nishita, K. Ohashi, K. Kousaka, A. Iwamatsu, R. Niwa, T. Uemura, and K. Mizuno. 2004. 'A pathway of neuregulin-induced activation of cofilin-phosphatase Slingshot and cofilin in lamellipodia', *J Cell Biol*, 165: 465-71.
- Ngo, K. X., N. Kodera, E. Katayama, T. Ando, and T. Q. Uyeda. 2015. 'Cofilin-induced unidirectional cooperative conformational changes in actin filaments revealed by high-speed atomic force microscopy', *Elife*, 4.
- Nishida, E., S. Maekawa, and H. Sakai. 1984. 'Cofilin, a protein in porcine brain that binds to actin filaments and inhibits their interactions with myosin and tropomyosin.', *Biochemistry*, 23: 5307-13.
- Nishita, M., H. Aizawa, and K. Mizuno. 2002. 'Stromal Cell-Derived Factor 1 Activates LIM Kinase 1 and Induces Cofilin Phosphorylation for T-Cell Chemotaxis', *Molecular and Cellular Biology*, 22: 774-83.

REFERENCIAS

- Nishita, M., C. Tomizawa, M. Yamamoto, Y. Horita, K. Ohashi, and K. Mizuno. 2005. 'Spatial and temporal regulation of cofilin activity by LIM kinase and Slingshot is critical for directional cell migration', *J Cell Biol*, 171: 349-59.
- Nishita, M., Y. Wang, C. Tomizawa, A. Suzuki, R. Niwa, T. Uemura, and K. Mizuno. 2004. 'Phosphoinositide 3-kinase-mediated activation of cofilin phosphatase Slingshot and its role for insulin-induced membrane protrusion', *J Biol Chem*, 279: 7193-8.
- Niwa, R., Masatoshi Nagata-Ohashi K Fau - Takeichi, Kensaku Takeichi M Fau - Mizuno, Tadashi Mizuno K Fau - Uemura, and T. Uemura. 2002. 'Control of actin reorganization by Slingshot, a family of phosphatases that dephosphorylate ADF/cofilin', *Cell*, 108: 233-46.
- Nolz, J.C., T.S. Gomez, P. Zhu, S. Lis, R.B. Medeiros, Y. Shimizu, J. K. Burkhardt, B. D. Freedman, and D.D. Billadeau. 2006. 'The WAVE2 complex regulates actin cytoskeletal reorganization and CRAC-mediated calcium entry during T cell activation', *Curr Biol*, 16: 24-34.
- Norcross, M.A. 1984. 'A synaptic basis for T-lymphocyte activation', *Ann Immunol (París)*, 135D: 113-34.
- Ohta, Y., K. Kousaka, K. Nagata-Ohashi, K. Ohashi, A. Muramoto, Y. Shima, R. Niwa, T. Uemura, and K. Mizuno. 2003. 'Differential activities, subcellular distribution and tissue expression patterns of three members of Slingshot family phosphatases that dephosphorylate cofilin', *Genes to Cells*, 8: 811-24.
- Oser, M., H. Yamaguchi, C. C. Mader, J. J. Bravo-Cordero, M. Arias, X. Chen, V. Desmarais, J. van Rheenen, A. J. Koleske, and J. Condeelis. 2009. 'Cortactin regulates cofilin and N-WASp activities to control the stages of invadopodium assembly and maturation', *J Cell Biol*, 186: 571-87.
- Peterburs, P., J. Heering, G. Link, K. Pfizenmaier, M. A. Olayioye, and A. Hausser. 2009. 'Protein kinase D regulates cell migration by direct phosphorylation of the cofilin phosphatase slingshot 1 like', *Cancer Res*, 69: 5634-8.
- Pfannstiel, J., M. Cyrklaff, A. Habermann, S. Stoeva, G. Griffiths, R. Shoeman, and H. Faulstich. 2001. 'Human cofilin forms oligomers exhibiting actin bundling activity', *J Biol Chem*, 276: 49476-84.
- Pollard, T. D. 1986. 'Rate constants for the reactions of ATP- and ADP- actin with the ends of actin filaments', *J Cell Biol*, 103: 2747-54.
- Pollard, T. D., L. Blanchoin, and R.D. Mullins. 2000. 'Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells', *Annu Rev Biophys Struct*, 29: 545-76.
- Pollard, T.D., and G. Borisy. 2003. 'Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments', *Cell*, 112: 453-65.

REFERENCIAS

- Ramirez-Munoz, R., P. Castro-Sanchez, and P. Roda-Navarro. 2016. 'Ultrasensitivity in the Cofilin Signaling Module: A Mechanism for Tuning T Cell Responses', *Front Immunol*, 7.
- Ridley, A. J., M. A. Schwartz, K. Burridge, R. A. Firtel, M. H. Ginsberg, G. Borisy, J. T. Parsons, and A. R. Horwitz. 2003. 'Cell migration: integrating signals from front to back', *Science*, 302: 1704-9.
- Samstag, Y., A. Bader, and S. C. Meuer. 1991. 'A serine phosphatase is involved in CD2-mediated activation of human T lymphocytes and natural killer cells', *J Immunol*, 147: 788-94.
- Samstag, Y., C. Eckerskorn, S. Wesselborg, S. Henning, R. Wallich, and S. C. Meuer. 1994. 'Costimulatory signals for human T-cell activation induce nuclear translocation of pp19/cofilin', *Proc Natl Acad Sci USA*, 91: 4494-98.
- Samstag, Y., S.W. Henning, A. Bader, and S.C. Meuer. 1992. 'Dephosphorylation of pp19: a common second signal for human T cell activation mediated through different accessory molecules', *Int Immunol*, 4: 1255-62.
- Schulte, B., I. John, B. Simon, C. Brockmann, S.A. Oelmeier, B. Jahraus, H. Kirchgessner, S. Riplinger, T. Carlomagno, G.H. Wabnitz, and Y. Samstag. 2013. 'A reducing milieu renders cofilin insensitive to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) inhibition', *J Biol Chem*, 288: 29430-9.
- Sedwick, C.E., M.M. Morgan, L. Jusino, J. L. Cannon, J. Miller, and J. K. Burkhardt. 1999. 'TCR, LFA-1, and CD28 play unique and complementary roles in signaling T cell cytoskeletal reorganization', *J Immunol*, 162: 1367-75.
- Sims, T. N., T. J. Soos, H. S. Xenias, B. Dubin-Thaler, J. M. Hofman, J. C. Waite, T. O. Cameron, V. K. Thomas, R. Varma, C. H. Wiggins, M. P. Sheetz, D. R. Littman, and M. L. Dustin. 2007. 'Opposing effects of PKCtheta and WASp on symmetry breaking and relocation of the immunological synapse', *Cell*, 129: 773-85.
- Small, J.V., G. Isenberg, and J.E. Celis. 1978. 'Polarity of actin at the leading edge of cultured cells', *Nature*, 272: 638-9.
- Soares, H., R. Lasserre, and A. Alcover. 2013. 'Orchestrating cytoskeleton and intracellular vesicle traffic to build functional immunological synapses', *Immunol Rev*, 256: 118-32.
- Soosairajah, J., S. Maiti, O. Wiggan, P. Sarmiere, N. Moussi, B. Sarcevic, R. Sampath, J.R. Bamburg, and O. Bernard. 2005. 'Interplay between components of a novel LIM kinase-slingshot phosphatase complex regulates cofilin', *EMBO J*, 24: 473-86.
- Spratley, S. J., L. I. Bastea, H. Doppler, K. Mizuno, and P. Storz. 2011. 'Protein kinase D regulates cofilin activity through p21-activated kinase 4', *J Biol Chem*, 286: 34254-61.

REFERENCIAS

- Sun, C. X., M. A. Magalhaes, and M. Glogauer. 2007. 'Rac1 and Rac2 differentially regulate actin free barbed end formation downstream of the fMLP receptor', *J Cell Biol*, 179: 239-45.
- Thauland, T.J., K.H. Hu, M.A. Bruce, and M.J. Butte. 2017. 'Cytoskeletal adaptivity regulates T cell receptor signaling', *Sci Signaling*, 10.
- Toshima, J., J.Y. Toshima, T. Amano, N. Yang, S. Narumiya, and K. Mizuno. 2001. 'Cofilin phosphorylation by protein kinase testicular protein kinase 1 and its role in integrin-mediated actin reorganization and focal adhesion formation', *Mol Biol Cell*, 12: 1131-45.
- Trunnell, N. B., A. C. Poon, S. Y. Kim, and J. E. Ferrell, Jr. 2011. 'Ultrasensitivity in the Regulation of Cdc25C by Cdk1', *Mol Cell*, 41: 263-74.
- Valitutti, S., M. Dessing, K. Aktories, H. Gallati, and A. Lanzavecchia. 1995. 'Sustained signaling leading to T cell activation results from prolonged T cell receptor occupancy. Role of T cell actin cytoskeleton', *J Exp Med*, 181: 577-84.
- van Rheenen, J., X. Song, W. van Roosmalen, M. Cammer, X. Chen, V. Desmarais, S. C. Yip, J. M. Backer, R. J. Eddy, and J. S. Condeelis. 2007. 'EGF-induced PIP2 hydrolysis releases and activates cofilin locally in carcinoma cells', *J Cell Biol*, 179: 1247-59.
- Van Troys, M., L. Huyck, S. Leyman, S. Dhaese, J. Vandekerkhove, and C. Ampe. 2008. 'Ins and outs of ADF/cofilin activity and regulation', *Eur J Cell Biol*, 87: 649-67.
- Varma, R., G. Campi, T. Yokosuka, T. Saito, and M.L. Dustin. 2006. 'T cell receptor-proximal signals are sustained in peripheral microclusters and terminated in the central supramolecular activation cluster', *Immunity*, 25: 117-27.
- Wabnitz, G. H., G. Nebl, M. Klemke, A. J. Schroder, and Y. Samstag. 2006. 'Phosphatidylinositol 3-Kinase Functions as a Ras Effector in the Signaling Cascade That Regulates Dephosphorylation of the Actin-Remodeling Protein Cofilin after Costimulation of Untransformed Human T Lymphocytes', *The Journal of Immunology*, 176: 1668-74.
- Wang, Y., F. Shibasaki, and K. Mizuno. 2005. 'Calcium signal-induced cofilin dephosphorylation is mediated by Slingshot via calcineurin', *J Biol Chem*, 280: 12683-9.
- Wu, J., H. Wang, X. Guo, and J. Chen. 2016. 'Cofilin-mediated actin dynamics promotes actin bundle formation during Drosophila bristle development', *Mol Biol Cell*, 27: 2554-64.
- Xiao, K., J. Sun, J. Kim, S. Rajagopal, B. Zhai, J. Villen, W. Haas, J. J. Kovacs, A. K. Shukla, M. R. Hara, M. Hernandez, A. Lachmann, S. Zhao, Y. Lin, Y. Cheng, K. Mizuno, A. Ma'ayan, S. P. Gygi, and R. J. Lefkowitz. 2010. 'Global phosphorylation analysis of beta-arrestin-mediated signaling downstream of a seven transmembrane receptor (7TMR)', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 15299-304.

REFERENCIAS

- Yaffe, M.B. 2002. 'How do 14-3-3 proteins work?-- Gatekeeper phosphorylation and the molecular anvil hypothesis', *FEBS Lett*, 513: 53-7.
- Yamamoto, M., K. Nagata-Ohashi, Y. Ohta, K. Ohashi, and K. Mizuno. 2006. 'Identification of multiple actin-binding sites in cofilin-phosphatase Slingshot-1L', *FEBS Lett*, 580: 1789-94.
- Yang, N., O. Higuchi, K. Ohashi, K. Nagata, A. Wada, K. Kangawa, E. Nishida, and K. Mizuno. 1998. 'Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization', *Nature*, 393: 809-12.
- Yeoh, S., Pope. B., Mannherz H.G., and A. Weeds. 2002. 'Determining the differences in actin binding by human ADF and cofilin'.
- Yi, J., X.S. Wu, T. Crites, and J.A. III Hammer. 2012. 'Actin retrograde flow and actomyosin II arc contraction drive receptor cluster dynamics at the immunological synapse in Jurkat T cells', *Mol Biol Cell*, 23: 834-52.
- Yokosuka, T., W. Kobayashi, K. Sakata-Sogawa, M. Takamatsu, A. Hashimoto-Tane, M. L. Dustin, M. Tokunaga, and T. Saito. 2008. 'Spatiotemporal regulation of T cell costimulation by TCR-CD28 microclusters and protein kinase C theta translocation', *Immunity*, 29: 589-601.
- Yokosuka, T., K. Sakata-Sogawa, W. Kobayashi, M. Hiroshima, A. Hashimoto-Tane, M. Tokunaga, M. L. Dustin, and T. Saito. 2005. 'Newly generated T cell receptor microclusters initiate and sustain T cell activation by recruitment of Zap70 and SLP-76', *Nat Immunol*, 6: 1253-62.
- Yonezawa, N., K. Nishida E Fau - Iida, I. Iida K Fau - Yahara, H. Yahara I Fau - Sakai, and H. Sakai. 1990. 'Inhibition of the interactions of cofilin, destrin, and deoxyribonuclease I with actin by phosphoinositides', *J Biol Chem*, 265: 8382-6.
- Zebda, N., O. Bernard, M. Bailly, S. Welti, DS. Lawrence, and JS. Condeelis. 2000. 'Phosphorylation of ADF/cofilin abolishes EGF-induced actin nucleation at the leading edge and subsequent lamellipod extension', *J Cell Biol*, 151: 1119-28.

ANEXO I:
INFORMACIÓN
SUPLEMENTARIA



- **Vídeo 1: Dinámica de SSH1 y CD3 en la SI entre células Jurkat y células Raji.** Se cotransfectaron células J77 con las construcciones GFP-SSH1 (verde) y CD3 ζ -mCherry (rojo) y se activaron con células Raji cargadas con SEE y marcadas con CMAC (azul). La interacción celular se observó mediante microscopía confocal a tiempo real, con un intervalo temporal de 5 minutos desde el momento inicial de la interacción. El vídeo muestra un ejemplo representativo de 3 células. Barras de escala: 5 μ m.
- **Vídeo 2: Dinámica de SSH1 y actina en la SI entre células Jurkat y células Raji.** Se cotransfectaron células J77 con las construcciones GFP-SSH1 (verde) y LifeAct-RFP (rojo) y se activaron con células Raji cargadas con SEE y marcadas con CMAC (azul). La interacción celular se observó mediante microscopía confocal a tiempo real, con un intervalo temporal de 5 minutos desde el momento inicial de la interacción. El vídeo muestra un ejemplo representativo de 3 células. Barras de escala: 5 μ m.
- **Vídeo 3: Dinámica de centralización del TCR en SI de blastos CD8⁺ sin transfectar, activados sobre bicapas lipídicas presentadoras de antígeno.** Se tiñeron blastos CD8⁺ de ratones OT-I con un anticuerpo anti-TCR β (pseudocolor) y se activaron sobre bicapas lipídicas presentadoras de un antígeno específico (OVA). La activación celular se observó mediante microscopía de TIRF, adquiriendo imágenes cada 116 ms desde momentos iniciales de la interacción con la bicapa. El vídeo muestra un ejemplo representativo de 3 células. Barras de escala: 5 μ m.
- **Vídeo 4: Dinámica de centralización del TCR en células que sobreexpresan SSH1 activadas sobre bicapas lipídicas presentadoras de antígeno.** Se transfectaron blastos CD8⁺ de ratones OT-I con la construcción GFP-SSH1 (verde) y se tiñeron con un anticuerpo anti-TCR β (rojo). Estas células se activaron sobre bicapas lipídicas presentadoras de OVA y se observaron mediante microscopía de TIRF, adquiriendo imágenes cada 743 ms desde momentos iniciales de la interacción con la bicapa. El vídeo muestra un ejemplo representativo de 3 células. Barras de escala: 5 μ m.
- **Vídeo 5: Dinámica de centralización del TCR en células que sobreexpresan el mutante catalítico C393S activadas con bicapas lipídicas presentadoras de antígeno.** Se transfectaron blastos CD8⁺ de ratones OT-I con la construcción GFP-C393S (verde) y se tiñeron con un anticuerpo anti-TCR β (rojo). Estas células se activaron sobre bicapas lipídicas presentadoras de OVA y se observaron mediante microscopía de TIRF, adquiriendo imágenes cada 718 ms desde momentos iniciales de la interacción con la bicapa. El vídeo muestra un ejemplo representativo de 4 células. Barras de escala: 5 μ m.
- **Vídeos 6 y 7: Dinámica de actina en la SI de células que sobreexpresan SSH1 activadas sobre bicapas lipídicas presentadoras de antígeno.** Se cotransfectaron blastos CD8⁺ de ratones OT-I con la construcción GFP-SSH1 (verde) y LifeAct-RFP (rojo). Estas células se activaron sobre bicapas lipídicas presentadoras de OVA y se observaron mediante microscopía de TIRF,

adquiriendo imágenes cada 597 ó 574 ms (Vídeo 6 y Vídeo 7, respectivamente) desde momentos iniciales de la interacción con la bicapa. El vídeo muestra un ejemplo representativo de 4 células. Barras de escala: 5 μ m.

- **Vídeo 8: Dinámica de actina en la SI de células que sobreexpresan el mutante C393S activadas sobre bicapas lipídicas presentadoras de antígeno.** Se cotransfectaron blastos CD8⁺ de ratones OT-I con la construcción GFP-C393S (verde) y LifeAct-RFP (rojo). Estas células se activaron sobre bicapas lipídicas presentadoras de OVA y se observaron mediante microscopía de TIRF, adquiriendo imágenes cada 598 ms desde momentos iniciales de la interacción con la bicapa. El vídeo muestra un ejemplo representativo de 3 células. Barras de escala: 5 μ m.
- **Vídeo 9: Dinámica de actina en células que sobreexpresan GFP sola (control) activadas con anticuerpos.** Se cotransfectaron células Jurkat CH7 con una construcción de GFP sola y con el plásmido LifeAct-RFP. Estas células se activaron sobre cristales con anti-CD3 (UCHT-1) y se observaron mediante microscopía de TIRF desde el momento inicial de la interacción, adquiriendo imágenes cada 108 ms. En el vídeo se muestra únicamente la dinámica de actina (LifeAct-RFP), en un ejemplo representativo de 3 células. Barras de escala: 5 μ m.
- **Vídeo 10: Dinámica de actina en células que sobreexpresan GFP-SSH1 activadas con anticuerpos.** Se cotransfectaron células Jurkat CH7 con la construcción de GFP-SSH1 y con el plásmido LifeAct-RFP. Estas células se activaron sobre cristales con anti-CD3 (UCHT-1) y se observaron mediante microscopía de TIRF desde el momento inicial de la interacción, adquiriendo imágenes cada 108 ms. En el vídeo se muestra únicamente la dinámica de actina (LifeAct-RFP), en un ejemplo representativo de 3 células. Barras de escala: 5 μ m.
- **Vídeo 11: Dinámica de actina en células que sobreexpresan GFP-C393S activadas con anticuerpos.** Se cotransfectaron células Jurkat CH7 con la construcción de GFP-C393S y con el plásmido LifeAct-RFP. Estas células se activaron sobre cristales con anti-CD3 (UCHT-1) y se observaron mediante microscopía de TIRF desde el momento inicial de la interacción, adquiriendo imágenes cada 108 ms. En el vídeo se muestra únicamente la dinámica de actina (LifeAct-RFP), en un ejemplo representativo de 3 células. Barras de escala: 5 μ m.

ANEXO II:
PUBLICACIONES





Ultrasensitivity in the Cofilin Signaling Module: A Mechanism for Tuning T Cell Responses

Rocio Ramirez-Munoz, Patricia Castro-Sánchez and Pedro Roda-Navarro*

Department of Microbiology I (Immunology), School of Medicine, Complutense University and '12 de Octubre' Health Research Institute, Madrid, Spain

OPEN ACCESS

Edited by:

Michael Loran Dustin,
Harvard University, USA

Reviewed by:

Balbino Alarcon,
Consejo Superior de Investigaciones
Científicas, Spain
Omer Dushek,
University of Oxford, UK
Paula M. Oliver,
University of Pennsylvania, USA
Yvonne Samstag,
University of Heidelberg, Germany

*Correspondence:

Pedro Roda-Navarro
prode@med.ucm.es

Specialty section:

This article was submitted to
T Cell Biology,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 17 October 2015

Accepted: 05 February 2016

Published: 19 February 2016

Citation:

Ramirez-Munoz R, Castro-Sánchez P
and Roda-Navarro P (2016)
Ultrasensitivity in the Cofilin Signaling
Module: A Mechanism for Tuning T
Cell Responses.
Front. Immunol. 7:59.
doi: 10.3389/fimmu.2016.00059

Ultrasensitivity allows filtering weak activating signals and responding emphatically to small changes in stronger stimuli. In the presence of positive feedback loops, ultrasensitivity enables the existence of bistability, which convert graded stimuli into switch-like, sometimes irreversible, responses. In this perspective, we discuss mechanisms that can potentially generate a bistable response in the phosphorylation/dephosphorylation monocyclus that regulates the activity of cofilin in dynamic actin networks. We pay particular attention to the phosphatase Slingshot-1 (SSH-1), which is involved in a reciprocal regulation and a positive feedback loop for cofilin activation. Based on these signaling properties and experimental evidences, we propose that bistability in the cofilin signaling module might be instrumental in T cell responses to antigenic stimulation. Initially, a switch-like response in the amount of active cofilin as a function of SSH-1 activation might assist in controlling the naïve T cell specificity and sensitivity. Second, high concentrations of active cofilin might endow antigen-experienced T cells with faster and more efficient responses. We discuss the cofilin function in the context of T cell receptor triggering and spatial regulation of plasma membrane signaling molecules.

Keywords: ultrasensitivity, bistability, cofilin, Slingshot-1, T cell receptor

ACTIN DYNAMICS AND ACTIVATION OF T CELLS

Initial signaling events triggered by the T cell receptor (TCR) after the specific engagement of antigenic peptide-MHC complexes (pMHC) occur in dynamic TCR microclusters organized at the periphery of the immunological synapse (IS) (1). TCR microclusters migrate to the center of the IS, where they are endocytosed for signaling downmodulation (2). The actin cytoskeleton is essential for the early signaling and centripetal movement of TCR molecules and integrins that precedes TCR downmodulation (1, 3, 4). TCR early signaling promotes the formation of a dynamic network of filamentous actin (F-actin), which, in turn, mediates the maturation of the IS with the formation of a central and a peripheral supramolecular activation cluster (cSMAC and pSMAC, respectively) (5).

Beyond the function in the initial signaling events and IS maturation, actin dynamics have been suggested to regulate the kinetics of the TCR/pMHC engagement. Experiments based on Förster resonance energy transfer (FRET) in live cells have demonstrated that the affinity of the TCR/pMHC interaction is higher but yet short-lived than previously detected by *in vitro* experiments

Abbreviations: ac, active cofilin; Ag-e, antigen-experienced; APCs, antigen-presenting cells; F-actin, filamentous actin; pCof, phospho-cofilin; pMHC, peptide-MHC complex; SEE, staphylococcal E enterotoxin; tCof, total cofilin.

(6). The actin cytoskeleton was proved to promote a high dissociation rate. These data pose the question about how brief TCR interactions can efficiently activate T cells that are scanning antigen-presenting cells (APCs), which frequently contain low densities of surface antigenic pMHC compared with endogenous pMHC. High affinity and brief interactions might assist the serial-specific engagement of TCR molecules compacted together in surface oligomers, so-called nanoclusters or "protein islands" (6, 7). TCR clustering can also help to keep specificity while raising sensitivity of T cells by ensuring the effective half-life or "confinement time" of a TCR-pMHC interaction as predicted by the rebinding model that was recently proposed (8, 9). Antigen-experienced (Ag-e) T cells exhibit bigger TCR nanoclusters that parallel a lower activation threshold than the observed in naïve T cells (10). Thus, it seems that an avidity-maturation process mediates enhanced responses seen in effector or memory T cells (10, 11). The mechanism regulating the organization of cell surface nanoclusters is nonetheless not known. Interestingly, it has been recently proposed that dynamic short actin filaments promote the formation of surface protein oligomers (12). Thus, in addition to controlling kinetic parameters of the TCR/pMHC engagement and the molecular dynamics during early T cell activation, actin dynamics might also be involved in the spatial and temporal organization of cell surface oligomers of signaling molecules.

REGULATION OF ACTIN DYNAMICS BY COFILIN

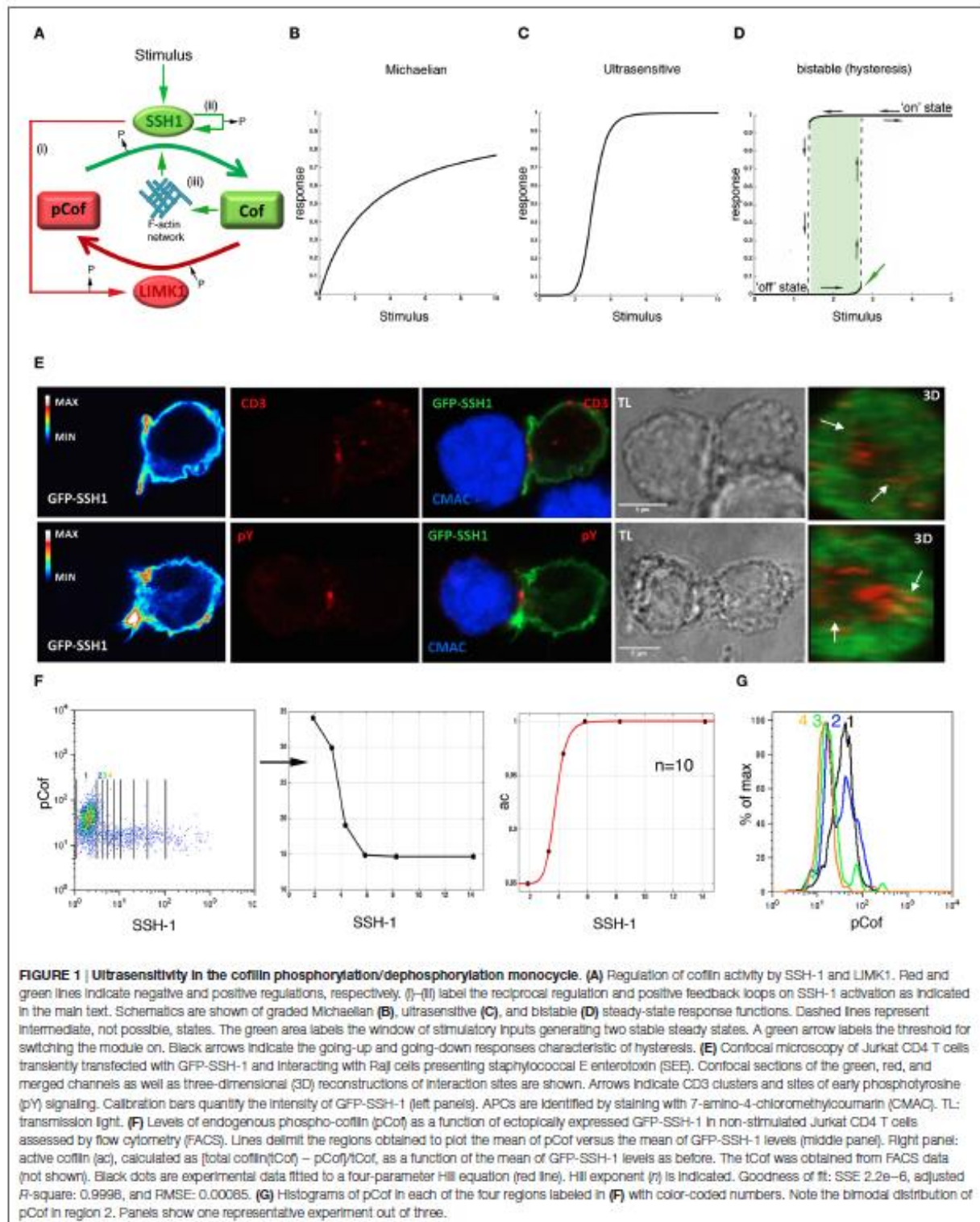
Cofilin depolymerizes and severs F-actin, being in this way one of the major regulators of actin dynamics in the cell. Activity of cofilin is regulated by a phosphorylation/dephosphorylation monocycle of the serine residue in position 3 (Ser-3) (Figure 1A). Phosphorylation of Ser-3 by LIM kinases 1 and 2 (LIMK1 and LIMK2) and testicular protein kinases 1 and 2 (TESK1 and TESK2) inactivates cofilin. By contrast, activation of cofilin is mediated by several phosphatases, including serine-threonine phosphatases PP1 and PP2A, chronophin, and a subfamily of dual-specific phosphatases, called Slingshots (SSH-1, SSH-2, and SSH-3) (13). Among Slingshots, SSH-3 does not bind F-actin and shows a less efficient cofilin-phosphatase activity (14). Beyond the regulation by phosphorylation cofilin is also inactivated by PIP₂ binding at membranes (15) and by oxidative stress conditions (16). Cofilin action on F-actin generates both new barbed ends ready to polymerize and a pool of globular actin to feed polymerization (17–19). In this way, cofilin promotes the formation of a dynamic network of F-actin (20), which is essential for the stimulation of T cells (21). In fact, agents that perturb cofilin dynamics inhibit IS assembly and T cell effector functions (22). Despite the significance of cofilin recruitment to the IS (22), there is no information about the molecular dynamics of cofilin regulators during IS assembly and T cell activation.

ULTRASENSITIVITY IN THE COFILIN SIGNALING MODULE

Signaling modules based on opposing enzymes, such as the cofilin phosphorylation/dephosphorylation monocycle (Figure 1A), can

exhibit different steady-state response functions (Figures 1B–D). When enzymes are working far from saturation and mass action kinetics are assumed, the steady-state response function exhibits a Michaelian shape, which is linear at low stimulatory inputs and tends to a plateau when the amount of substrate decreases with stronger stimulation (Figure 1B). However, properties, such as reciprocal regulations, positive feedback loops, and multiphosphorylation reactions, are known to generate ultrasensitive responses (23), which are characterized by a sigmoidal, switch-like relation between the stimulus and the response, frequently described by the cooperative Hill equation (Figure 1C) (24). In addition to the above-mentioned properties, ultrasensitivity is also generated when substrate levels make both the inhibitory and the activating enzyme to operate close to saturating conditions (so-called zero-order ultrasensitivity) (24), and when a signaling molecule and its activator are concomitantly located to a particular cell compartment (25). Thus, both enzyme levels and molecular dynamics (spatial and temporal regulation) are essential for the output of signaling modules and, consequently, for the cell response. One of the benefits of ultrasensitivity is that it enables cells to filter low stimulatory inputs and to get fast and efficient responses as the stimulus increases. Most importantly, in the presence of positive feedback or double negative feedback loops, ultrasensitivity can also facilitate bistable responses, which constitute real switches in which two stable steady-states are possible (low/"off" and high/"on") for one particular stimulatory input and an intermediate response cannot take place (Figure 1D) (26). As soon as a threshold is reached, the system turns to the "on" state, where it stays even when the stimulus falls under the threshold level, a property called hysteresis. When positive feedback loops are very strong, bistable responses can be irreversible. In this situation, the "on" state is maintained even when the stimulus is completely depleted. Bistability indicates the existence of a molecular memory controlling the response of the signaling module.

The cofilin signaling module has several of the above-mentioned properties that generate ultrasensitivity (Figure 1A), including (i) a reciprocal regulation mediated by Slingshot-1 (SSH-1) activation, which activates cofilin and inactivates LIMK1 (27); (ii) a positive feedback loop on SSH-1, which can be self-activated by auto-dephosphorylation (28); and (iii) a positive feedback loop due to the enhanced (1200-fold) cofilin-phosphatase activity of SSH-1 when it is bound to F-actin networks (29), whose organization is promoted by cofilin action (20). These positive feedback loops could promote a bistable response showing hysteresis, especially at high local concentrations of active cofilin that would make LIMK1 to work close to saturation (26). It seems then probable that any stimulus triggering SSH-1 activation will generate an ultrasensitive or bistable response. These regulatory mechanisms of SSH-1 have not been established in either SSH-2 or SSH-3. Supporting a TCR-mediated activation of SSH-1, we found that although an even distribution, with partial colocalization with F-actin, was found in non-stimulated cells (data not shown), GFP-SSH-1 accumulated at peripheral sites in the IS (Figure 1E), as previously described for cofilin (22). These data support the notion that TCR signals could generate an ultrasensitive response of the cofilin signaling module due to the accumulation of cofilin and its activator SSH-1

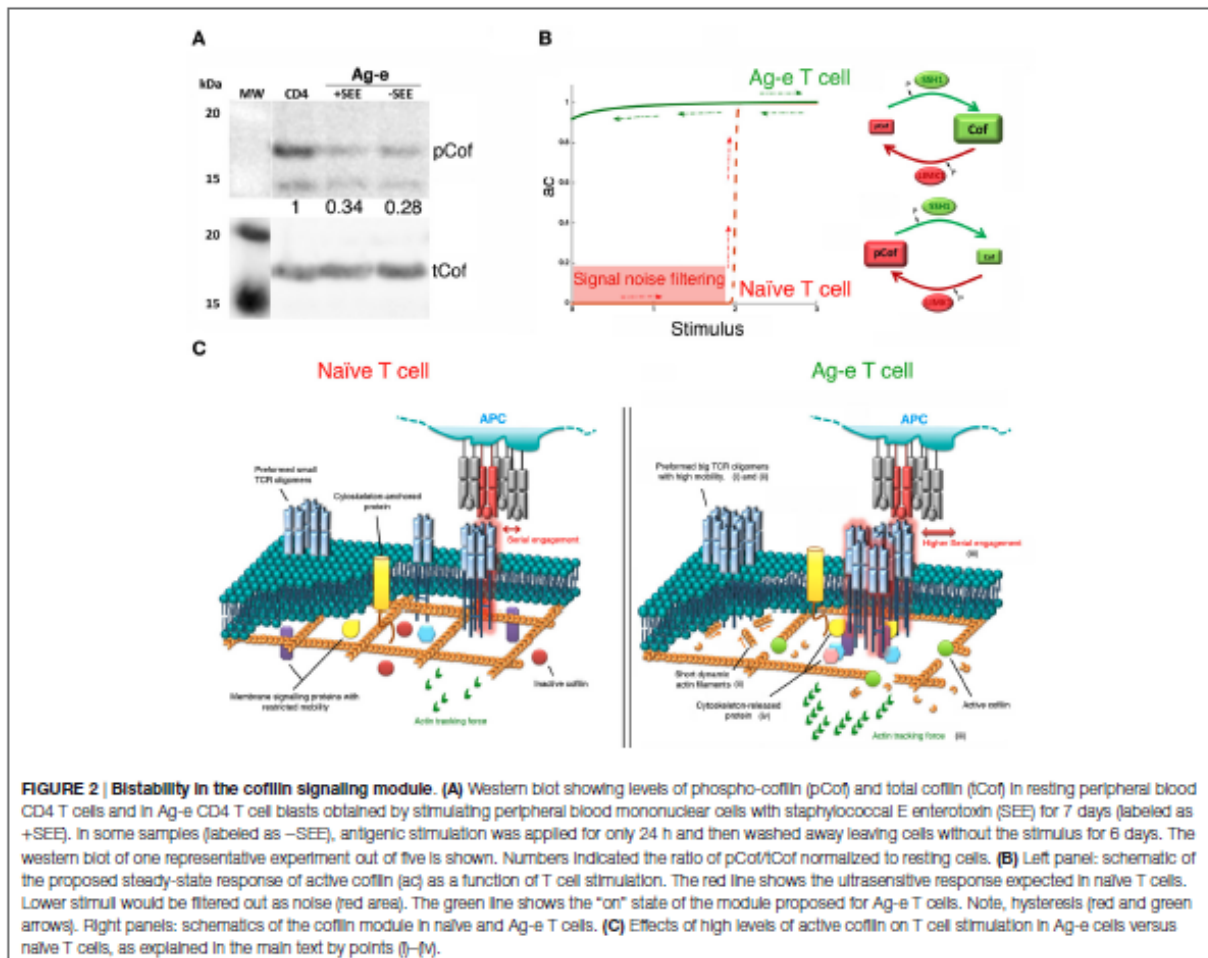


at the IS. Nonetheless, cofilin-activating signals, such as costimulation (30), might also regulate the dynamics of SSH-1 during T cell activation. It is also plausible that local SSH-1 will be on its highest activation state bound to cortical F-actin. Thus, an efficient inhibition of LIMK1 and, consequently, a reciprocal regulation, is expected at these sites. Consistent with ultrasensitivity, we have found a sharp decrease in the mean of phospho-cofilin amount in T cells as a function of SSH-1 levels (Figure 1F; Figures S1 and S2 in Supplementary Material). Interestingly, the detection at the lowest SSH-1 levels of two discrete populations of active and inactive cofilin with no intermediate states suggests the existence of a bistable response (Figure 1G; Figure S2 in Supplementary Material). In agreement with irreversible bistability and hysteresis, we have found a higher proportion of active cofilin in Ag-e than in resting T cells, even when they were deprived from the antigenic stimulus for 6 days (Figure 2A). In order to further demonstrate irreversibility, it will be needed to design experiments for the complete deprivation of peptide antigenic stimulation by, for example, combining antigen washing and pharmacological inhibition of early TCR signals as previously done (31).

PHYSIOLOGICAL RELEVANCE

We propose that the steady-state response of active cofilin as a function of SSH-1 activation may be an irreversible bistable switch (Figure 2B). A fast increase in the actin dynamics is expected once an activation threshold is reached due to TCR and costimulatory signals. Other environmental clues may participate in the regulation of active cofilin during T cell activation. For example, the local reducing environment promoted by dendritic cells at inflammatory sites (32) has been proposed to prevent the inhibition of cofilin activity by PIP₂ in antigen-specific T cells (33). Interestingly, this might also prevent inhibition of SSH-1 by reactive oxygen species (34). Cofilin ultrasensitive response in coordination with other signaling modules may have potential effects in the sensitivity, specificity, rapidity, and efficiency of switch-like T cell responses.

In naïve T cells, ultrasensitivity might be instrumental in maintaining the peripheral tolerance to low signals emanating from self-peptides while endowing cells with enough sensitivity to foreign antigens. Switching the module to the "on" state will



rapidly increase actin dynamics to assist on the early assembly of TCR microclusters after the engagement of antigenic pMHC. This will enable an efficient organization of initial signaling complexes.

Slingshot-1 may participate in the molecular memory that keeps the cofilin signaling module in the “on” state in Ag-e T cells even when the antigenic stimulus is depleted. Although recent findings challenge the notion that Ag-e T cells have lower activation thresholds (35), there is a general agreement about the faster and more efficient responses seen in these cells when compared to their naïve counterparts. High levels of active cofilin will increase the depolymerization and severing of actin. This might promote the following effects in tuning TCR triggering and signaling during the activation of Ag-e T cells (Figure 2C): (i) a higher mobility of TCR nanoclusters. This may raise the chance of finding and engaging antigenic pMHC; (ii) the formation of big TCR oligomers at the cell surface due to abundant short dynamic actin filaments, as described for other surface molecules (12). A bistable response of the cofilin module might then represent a mechanism for the avidity-maturation or for the rebinding model mentioned above; (iii) the generation of stronger actin tracking forces. This would ensure both, more efficient T cell responses by promoting enough short-lived serial engagements of TCR molecules at the larger nanoclusters and the discrimination of low quality ligands; and (iv) a more efficient release of molecules participating in initial events of signaling by the TCR. Recently, it has been shown that TLR signaling in B cells increases the cofilin-dependent actin dynamics and, consequently, reduces the BCR confinement enhancing signaling (36). The same mechanism might also operate in T cells.

In summary, while the cofilin signaling module at the “off” state may guarantee the auto-tolerance and sensitivity of naïve T cells, the “on” state may mediate faster and more efficient responses exerted by Ag-e T cells. Regulation of SSH-1 activity is expected to be essential for switching the cofilin signaling module to the on state. Thus, regulators and dynamics of SSH-1 during the activation of primary T cells should be investigated. A described regulator of SSH-1 during insulin signaling is PI3K (37). PI3K is an effector of ras (38), whose activation is characterized by

a bistable response (31). Thus, it seems that T cell responses are tuned by bistability in several signaling modules operating in early steps downstream the TCR (31, 39–41). In order to formally demonstrate the existence of hysteresis, we will need models that enable us to reach maximal stimulation of primary T cells with physiological antigenic peptides and then be able to go down in the stimulation before re-testing the activation state of the signaling module (31). Acute perturbation of signaling components and the cell machinery (such as cytoskeleton and endosomal compartment) should inform about the key players and the dynamics controlling the ultrasensitive response. In this context, dynamic regulation of cofilin by slingshots is under further investigation in our group.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

RR-M performed experiments, analyzed data, and revised the manuscript. PC-S setup experimental protocols, analyzed data, and revised the manuscript. PR-N contributed to the research design, analyzed data, and wrote the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

RR-M (FPI fellowship) and PC-S are supported by the project SAF2012-33218, and PR-N by the “Ramón y Cajal” Spanish program (RYC-2011-08664) of the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO). Research of the group is supported by grants to PR-N of MINECO (SAF2012-33218 and SAF2013-49743-EXP) and the European Union (CIG2012-321858). We thank Dr. James Bamburg and Dr. Francisco Sánchez-Madrid for kindly providing anti-cofilin and anti-CD3 antibodies, respectively. We thank the technical support contributed by the Centre for assistance to research in fluorescence microscopy and flow cytometry of the University Complutense of Madrid.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2016.00059>

REFERENCES

- Yokosuka T, Sakata-Sogawa K, Kobayashi W, Hiroshima M, Hashimoto-Tane A, Tokunaga M, et al. Newly generated T cell receptor microclusters initiate and sustain T cell activation by recruitment of Zap70 and SLP-76. *Nat Immunol* (2005) 6:1253–62. doi:10.1038/ni1272
- Varma R, Campi G, Yokosuka T, Saito T, Dustin ML. T cell receptor-proximal signals are sustained in peripheral microclusters and terminated in the central supramolecular activation cluster. *Immunity* (2006) 25:117–27. doi:10.1016/j.immuni.2006.04.010
- Campi G, Varma R, Dustin ML. Actin and agonist MHC-peptide complex-dependent T cell receptor microclusters as scaffolds for signaling. *J Exp Med* (2005) 202:1031–6. doi:10.1084/jem.20051182
- Kaizuka Y, Douglass AD, Varma R, Dustin ML, Vale RD. Mechanisms for segregating T cell receptor and adhesion molecules during immunological synapse formation in Jurkat T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2007) 104:20296–301. doi:10.1073/pnas.0710258105
- Billadeau DD, Nolz JC, Gomez TS. Regulation of T-cell activation by the cytoskeleton. *Nat Rev Immunol* (2007) 7:131–43. doi:10.1038/nri2021
- Huppa JB, Axmann M, Mortelmaier MA, Lillemeier BF, Newell EW, Brameshuber M, et al. TCR-peptide-MHC interactions in situ show accelerated kinetics and increased affinity. *Nature* (2010) 463:963–7. doi:10.1038/nature08746
- Lillemeier BF, Mortelmaier MA, Forstner MB, Huppa JB, Groves JT, Davis MM. TCR and Lat are expressed on separate protein islands on T cell membranes and concatenate during activation. *Nat Immunol* (2010) 11:90–6. doi:10.1038/ni.1832
- Aleksic M, Dushek O, Zhang H, Shenderov E, Chen JL, Cerundolo V, et al. Dependence of T cell antigen recognition on T cell receptor-peptide MHC confinement time. *Immunity* (2010) 32:163–74. doi:10.1016/j.immuni.2009.11.013
- Dushek O, van der Merwe PA. An induced rebinding model of antigen discrimination. *Trends Immunol* (2014) 35:153–8. doi:10.1016/j.it.2014.02.002
- Kumar R, Ferez M, Swamy M, Arechaga I, Rejas MT, Valpuesta JM, et al. Increased sensitivity of antigen-experienced T cells through the enrichment

- of oligomeric T cell receptor complexes. *Immunity* (2011) 35:375–87. doi:10.1016/j.immuni.2011.08.010
11. Schamel WW, Arechaga I, Rисуeno RM, van Santen HM, Cabezas P, Risco C, et al. Coexistence of multivalent and monovalent TCRs explains high sensitivity and wide range of response. *J Exp Med* (2005) 202:493–503. doi:10.1084/jem.20042155
 12. Gowrishankar K, Ghosh S, Saha S, C R, Mayor S, Rao M. Active remodeling of cortical actin regulates spatiotemporal organization of cell surface molecules. *Cell* (2012) 149:1353–67. doi:10.1016/j.cell.2012.05.008
 13. Mizuno K. Signaling mechanisms and functional roles of cofilin phosphorylation and dephosphorylation. *Cell Signal* (2013) 25:457–69. doi:10.1016/j.celsig.2012.11.001
 14. Ohta Y, Kousaka K, Nagata-Ohashi K, Ohashi K, Muramoto A, Shima Y, et al. Differential activities, subcellular distribution and tissue expression patterns of three members of Slingshot family phosphatases that dephosphorylate cofilin. *Genes Cells* (2003) 8:811–24. doi:10.1046/j.1365-2443.2003.00678.x
 15. Yonezawa N, Nishida E, Iida K, Yahara I, Sakai H. Inhibition of the interactions of cofilin, destrin, and deoxyribonuclease I with actin by phosphoinositides. *J Biol Chem* (1990) 265:8382–6.
 16. Klemke M, Wabnitz GH, Funke F, Funk B, Kirchgessner H, Samstg Y. Oxidation of cofilin mediates T cell hyporesponsiveness under oxidative stress conditions. *Immunity* (2008) 29:404–13. doi:10.1016/j.immuni.2008.06.016
 17. Chan AY, Bailly M, Zebda N, Segall JE, Condeelis JS. Role of cofilin in epidermal growth factor-stimulated actin polymerization and lamellipod protrusion. *J Cell Biol* (2000) 148:531–42. doi:10.1083/jcb.148.3.531
 18. Ichetovkin I, Grant W, Condeelis J. Cofilin produces newly polymerized actin filaments that are preferred for dendritic nucleation by the Arp2/3 complex. *Curr Biol* (2002) 12:79–84. doi:10.1016/S0960-9822(01)00629-7
 19. Van Troys M, Huyck L, Leyman S, Dhase S, Vandekerckhove J, Ampe C. Ins and outs of ADF/cofilin activity and regulation. *Eur J Cell Biol* (2008) 87:649–67. doi:10.1016/j.ejcb.2008.04.001
 20. Ghosh M, Song X, Mouneimne G, Sidani M, Lawrence DS, Condeelis JS. Cofilin promotes actin polymerization and defines the direction of cell motility. *Science* (2004) 304:743–6. doi:10.1126/science.1094561
 21. Huang Y, Burkhardt JK. T-cell-receptor-dependent actin regulatory mechanisms. *J Cell Sci* (2007) 120:723–30. doi:10.1242/jcs.000786
 22. Eibert SM, Lee KH, Pipkorn R, Sester U, Wabnitz GH, Giese T, et al. Cofilin peptide homologs interfere with immunological synapse formation and T cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2004) 101:1957–62. doi:10.1073/pnas.0308282100
 23. Ferrell JE Jr, Ha SH. Ultrasensitivity part II: multisite phosphorylation, stoichiometric inhibitors, and positive feedback. *Trends Biochem Sci* (2014) 39:556–69. doi:10.1016/j.tibs.2014.09.003
 24. Ferrell JE Jr, Ha SH. Ultrasensitivity part I: Michaelian responses and zero-order ultrasensitivity. *Trends Biochem Sci* (2014) 39:496–503. doi:10.1016/j.tibs.2014.08.003
 25. Ferrell JE Jr. How regulated protein translocation can produce switch-like responses. *Trends Biochem Sci* (1998) 23:461–5. doi:10.1016/S0968-0004(98)01316-4
 26. Ferrell JE Jr, Ha SH. Ultrasensitivity part III: cascades, bistable switches, and oscillators. *Trends Biochem Sci* (2014) 39:612–8. doi:10.1016/j.tibs.2014.10.002
 27. Soosairajah J, Maiti S, Wiggan O, Sarmiere P, Moussi N, Sarcevic B, et al. Interplay between components of a novel LIM kinase-slingshot phosphatase complex regulates cofilin. *EMBO J* (2005) 24:473–86. doi:10.1038/sj.emboj.7600543
 28. Maheswaranathan M, Gole HK, Fernandez I, Lassegue B, Griendling KK, San Martin A. Platelet-derived growth factor (PDGF) regulates Slingshot phosphatase activity via Nox1-dependent auto-dephosphorylation of serine 834 in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* (2011) 286:35430–7. doi:10.1074/jbc.M111.268284
 29. Kurita S, Watanabe Y, Gunji E, Ohashi K, Mizuno K. Molecular dissection of the mechanisms of substrate recognition and F-actin-mediated activation of cofilin-phosphatase Slingshot-1. *J Biol Chem* (2008) 283:32542–52. doi:10.1074/jbc.M804627200
 30. Samstg Y, Eibert SM, Klemke M, Wabnitz GH. Actin cytoskeletal dynamics in T lymphocyte activation and migration. *J Leukoc Biol* (2003) 73:30–48. doi:10.1189/jlb.0602272
 31. Das J, Ho M, Zikherman J, Govern C, Yang M, Weiss A, et al. Digital signaling and hysteresis characterize ras activation in lymphoid cells. *Cell* (2009) 136:337–51. doi:10.1016/j.cell.2008.11.051
 32. Angelini G, Gardella S, Ardy M, Ciriolo MR, Filomeni G, Di Trapani G, et al. Antigen-presenting dendritic cells provide the reducing extracellular microenvironment required for T lymphocyte activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2002) 99:1491–6. doi:10.1073/pnas.022630299
 33. Schulte B, John I, Simon B, Brockmann C, Oelmeier SA, Jahraus B, et al. A reducing milieu renders cofilin insensitive to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) inhibition. *J Biol Chem* (2013) 288:29430–9. doi:10.1074/jbc.M113.479766
 34. Meng TC, Fukada T, Tonks NK. Reversible oxidation and inactivation of protein tyrosine phosphatases in vivo. *Mol Cell* (2002) 9:387–99. doi:10.1016/S1097-2765(02)00445-8
 35. Huang J, Brameshuber M, Zeng X, Xie J, Li QJ, Chien YH, et al. A single peptide-major histocompatibility complex ligand triggers digital cytokine secretion in CD4(+) T cells. *Immunity* (2013) 39:846–57. doi:10.1016/j.immuni.2013.08.036
 36. Freeman SA, Jaumouille V, Choi K, Hsu BE, Wong HS, Abraham L, et al. Toll-like receptor ligands sensitize B-cell receptor signalling by reducing actin-dependent spatial confinement of the receptor. *Nat Commun* (2015) 6:6168. doi:10.1038/ncomms7168
 37. Nishita M, Wang Y, Tomizawa C, Suzuki A, Niwa R, Uemura T, et al. Phosphoinositide 3-kinase-mediated activation of cofilin phosphatase Slingshot and its role for insulin-induced membrane protrusion. *J Biol Chem* (2004) 279:7193–8. doi:10.1074/jbc.M312591200
 38. Wabnitz GH, Nebl G, Klemke M, Schroder AJ, Samstg Y. Phosphatidylinositol 3-kinase functions as a Ras effector in the signaling cascade that regulates dephosphorylation of the actin-remodeling protein cofilin after costimulation of untransformed human T lymphocytes. *J Immunol* (2006) 176:1668–74. doi:10.4049/jimmunol.176.3.1668
 39. Stefanova I, Hemmer B, Vergelli M, Martin R, Biddison WE, Germain RN. TCR ligand discrimination is enforced by competing ERK positive and SHP-1 negative feedback pathways. *Nat Immunol* (2003) 4:248–54. doi:10.1038/ni895
 40. Chan C, Stark J, George AJ. Feedback control of T-cell receptor activation. *Proc Biol Sci* (2004) 271:931–9. doi:10.1098/rspb.2003.2587
 41. Acuto O, Di Bartolo V, Michel F. Tailoring T-cell receptor signals by proximal negative feedback mechanisms. *Nat Rev Immunol* (2008) 8:699–712. doi:10.1038/nri2397
- Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.
- Copyright © 2016 Ramírez-Munoz, Castro-Sánchez and Roda-Navarro. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

