

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

**ICAP-1 regula la adhesión celular mediada por VLA-4
y el desarrollo del sistema inmunitario.
Caracterización de relaciones entre VLA-4 y resistencia a
bortezomib en mieloma múltiple**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Silvia Sevilla Movilla

DIRECTOR

Joaquín Teixidó Calvo

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



**ICAP-1 regula la adhesión celular mediada por VLA-4
y el desarrollo del sistema inmunitario.
Caracterización de relaciones entre VLA-4 y
resistencia a bortezomib en mieloma múltiple**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

presentada por

Silvia Sevilla Movilla

Bajo la dirección del Doctor

Joaquín Teixidó Calvo

Madrid, 2019

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

**ICAP-1 regula la adhesión celular mediada por VLA-4
y el desarrollo del sistema inmunitario.
Caracterización de relaciones entre VLA-4 y
resistencia a bortezomib en mieloma múltiple**

Este trabajo ha sido realizado por **Silvia Sevilla Movilla** para optar al Grado de Doctor, en el Centro de Investigaciones Biológicas, bajo la dirección del Doctor Joaquín Teixidó Calvo.



Fdo. Dr. Joaquín Teixidó Calvo





UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS
PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

D./Dña. Silvia Sevilla Movilla
estudiante en el Programa de Doctorado en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina
de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de
Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y
titulada:

ICAP-1 regula la adhesión celular mediada por VLA-4 y el desarrollo del sistema inmunitario.
Caracterización de relaciones entre VLA-4 y resistencia a bortezomib en mieloma múltiple

y dirigida por: Dr. Joaquín Teixidó Calvo

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 2 de septiembre de 2019

Fdo.:

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en
la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

**ICAP-1 regula la adhesión celular mediada por VLA-4
y el desarrollo del sistema inmunitario.
Caracterización de relaciones entre VLA-4 y
resistencia a bortezomib en mieloma múltiple**

Silvia Sevilla Movilla

2019

AGRADECIMIENTOS

¡GRACIAS!

En primer lugar, a mi jefe y mentor, el Doctor Joaquín Teixidó Calvo, que me ha guiado durante el desarrollo de este trabajo. Gracias por la oportunidad que me diste al ofrecermelo realizar la Tesis Doctoral formando parte de tu grupo de investigación y dirigirme a lo largo de dos proyectos tan alucinantes.

A M^a José Feito. Mi tutora. Gracias por la amabilidad con la que siempre me has tratado y la ayuda que me has brindado en los quehaceres universitarios. Ha sido un placer haber podido contar contigo.

A los doctores Reinhard Fässler, Markus Moser y Peter Krenn, quienes me acogieron durante la estancia y me enseñaron cosas desconocidas para nosotros hasta el momento. Su apoyo y sus consejos han sido cruciales para la consecución de este trabajo. Gracias a todas las personas que hicieron de mi estancia una experiencia inolvidable.

A todos los colaboradores que han participado en el desarrollo de este proyecto, considerados compañeros. Gracias por vuestras recomendaciones, por todos los reactivos y anticuerpos prestados, y por mostrar tan alto grado de motivación por este nuestro trabajo.

A Nohemí Arellano Sánchez. Más que compañera, amiga. Saber que estabas a mi lado en cada momento ha sido por lo que tener esto entre las manos es posible. Esta tesis es tan mía como tuya. Siéntelo así. Yo no puedo dejar de estar agradecida por haber podido contar con alguien como tú durante estos años. GRACIAS, amiga.

A mis compañeras de laboratorio y a las vecinas del laboratorio de al lado. Sin vuestro apoyo y refuerzo diario, este paseo por esta Tesis y por la “Tesis de la Vida” habría sido otra cosa, pero no ESTO.

A Pedro Lastres, cabeza del servicio de citometría de flujo del CIB. Gracias por hacer que hasta le haya cogido el gustillo a una técnica que me parecía aburrida y abstracta en la carrera. Gracias por tu paciencia y por tu entrega. También va un poquito de ti en esta Tesis.

Al personal del animalario. A las que estuvieron y a los que están. Habéis sido imprescindibles para la realización de estos proyectos. Nos habéis facilitado siempre el trabajo y habéis hecho que fuera una experiencia muy enriquecedora. Gracias.

A mi familia. En especial a mis padres y a mi hermana. Principales pilares que me sustentan en la distancia. Menuda proeza. Y a ti, abuela. Por tus “besines”.

Gracias, a todos los que me habéis acompañado a lo largo de estos años. Este es el fruto de los buenos, pero también de los malos ratos. Por suerte, estos últimos han sido pocos. Pero es por haber estado muy cerquita mía precisamente en esos momentos, por los que os agradezco infinito. Espero que disfrutéis con el resultado. Gracias.

ÍNDICE

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ABREVIATURAS	1
SUMMARY	11
RESUMEN	15
INTRODUCCIÓN	19
I. EL SISTEMA INMUNE. ADHESIÓN Y MIGRACIÓN LEUCOCITARIA	21
Las integrinas	24
Regulación de la activación de las integrinas	26
- “Señalización <i>inside-out</i> ”	27
- Proteínas intracelulares reguladoras de la activación de las integrinas	28
Talina	28
Kindlin	30
ICAP-1	31
La integrina $\alpha 4\beta 1$	32
- VCAM-1	34
- Fibronectina	35
Las quimioquinas y sus receptores	35
- CXCL12/CXCR4	38
II. EL MIELOMA MÚLTIPLE Y RESISTENCIA A QUIMIOTERAPIA	41
Las células plasmáticas y el origen del mieloma múltiple	41
Papel del microambiente medular en el desarrollo del mieloma múltiple	43
- Implicación de la integrina $\alpha 4\beta 1$ en la migración de las células de MM	45
Tratamiento del mieloma múltiple	46
- El proteasoma y su relevancia en mieloma múltiple	47
El bortezomib	48
- Mecanismos de acción del bortezomib	49
- Mecanismos de resistencia a bortezomib	52
Futuro de los inhibidores de proteasoma	53
OBJETIVOS	55
MATERIALES Y MÉTODOS	59
Líneas celulares	61
Reactivos y anticuerpos	61
Ratones ICAP-1 ^{-/-}	63
Selección de células T y B presentes en bazo de ratón	64
Citometría de flujo	65
Ensayos de migración linfocitaria hacia órganos linfoides	65
Modelo de inflamación peritoneal	65
Generación de líneas celulares resistentes a bortezomib	66
Ensayos de viabilidad y proliferación celular	66
Ensayos de adhesión celular	66
Ensayos de unión soluble a VCAM-1	67
Análisis de la activación de integrinas $\beta 1$	68
<i>Western blotting</i>	68
Ensayos de fraccionamiento celular	69
Ensayos de actividad GTPasa (<i>Pull Down</i>)	69
Inmunoprecipitación	70
Ensayos de RT-qPCR	70
Transfección celular	72

Modelos <i>in vivo</i> de mieloma múltiple	72
Análisis estadístico	73
	75
RESULTADOS	
I. PAPEL DE ICAP-1 EN LA ADHESIÓN LINFOCITARIA Y EN EL DESARROLLO DEL SISTEMA INMUNITARIO. IMPLICACIÓN DE ICAP-1 EN EL TRÁFICO DE CÉLULAS DE MIELOMA MÚLTIPLE	77
Caracterización del fenotipo adhesivo de linfocitos deficientes en ICAP-1	78
La ausencia de ICAP-1 afecta al desarrollo de las células T CD8 ⁺ de timo	84
Disminución de la población de células CD8 ⁺ en bazo de ratones ICAP-1 ^{-/-}	93
Distribución normal de poblaciones de células madre y progenitoras hematopoyéticas en médula ósea de ratones ICAP-1 ^{-/-}	97
La linfopoyesis B en médula ósea no se altera por la ausencia de ICAP-1	99
Los ratones ICAP-1 ^{-/-} muestran alteraciones en la frecuencia de células marginales y foliculares del bazo	102
ICAP-1 regula negativamente la adhesión dependiente de $\alpha 4\beta 1$ de células de MM a la microvasculatura de la médula ósea	105
II. CARACTERIZACIÓN DE RELACIONES FUNCIONALES ENTRE LA RESISTENCIA DE CÉLULAS DE MIELOMA MÚLTIPLE AL BORTEZOMIB Y LA EXPRESIÓN Y FUNCIÓN DE LA INTEGRINA $\alpha 4\beta 1$	109
Caracterización de líneas de mieloma múltiple resistentes a bortezomib	109
Las células de mieloma múltiple resistentes a BTZ muestran niveles superiores de expresión y función de $\alpha 4\beta 1$ que las células parentales	118
Estudio de la expresión de $\alpha 4\beta 1$ en resistencia a bortezomib en otras neoplasias hematológicas	124
Caracterización <i>in vivo</i> de las células de mieloma múltiple resistentes a bortezomib	126
Identificación de mecanismos moleculares que regulan la expresión de $\alpha 4\beta 1$ en células de mieloma múltiple resistentes a bortezomib	129
DISCUSIÓN	133
Papel de ICAP-1 en la adhesión linfocitaria y en el desarrollo del sistema inmunitario	135
ICAP-1 regula negativamente la adhesión dependiente de $\alpha 4\beta 1$ de células de mieloma múltiple a la microvasculatura de la médula ósea	140
Caracterización de relaciones funcionales entre la resistencia de células de mieloma múltiple al bortezomib y la expresión y función de la integrina $\alpha 4\beta 1$	141
CONCLUSIONES	147
BIBLIOGRAFÍA	151
ANEXOS	
	179
Anexo I: Sevilla-Movilla S., Arellano-Sánchez N., Isern de Val S., Krenn P. W., Fuentes P., Gardeta S. R., Barrio-Alonso C., Crainiciuc G., Hidalgo A., Fässler R., Carrasco Y., Toribio M. L., Teixidó J. ICAP-1 loss affects thymic positive selection causing reduced CD8 ⁺ cell levels and decreases marginal zone B cells. En preparación.	183
Anexo II: Martínez-Moreno M., Leiva M., Aguilera-Montilla N., Sevilla-Movilla S., Isern de Val S., Arellano-Sánchez N., Gutiérrez N. C., Maldonado R., Martínez-López J., Buno I., <i>et al.</i> (2016). In vivo adhesion of malignant B cells to bone marrow microvasculature is regulated by alpha4beta1 cytoplasmic-binding proteins. <i>Leukemia</i> , 30 (4): 861-872.	211
Anexo III: Teixido J., Martínez-Moreno M., Díaz-Martínez M., Sevilla-Movilla S. (2018). The good and bad faces of the CXCR4 chemokine receptor. <i>The international journal of biochemistry & cell biology</i> , 95: 121-131.	225

Anexo IV: Sosa-Costa A., Isern de Val S., Sevilla-Movilla S., Borgman K. J., Manzo C., Teixidó J., García-Parajo M. F. (2016). Lateral mobility and nanoscale spatial arrangement of chemokine-activated $\alpha 4\beta 1$ integrins on T cells. <i>The Journal of Biological Chemistry</i> , 291 (40): 21053-21062.	239
Anexo V: Dios-Esponera A., Isern de Val S., Sevilla-Movilla S., García-Verdugo R., García-Bernal D., Arellano-Sánchez N., Cabañas C., Teixidó J. (2015) Positive and negative regulation by SLP-76/ADAP and Pyk2 of chemokine-stimulated T-lymphocyte adhesion mediated by integrin $\alpha 4\beta 1$. <i>Molecular Biology of the Cell</i> , 26 (18): 3215-3228.	255

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelo de migración leucocitaria	23
Figura 2. Familia de las integrinas	24
Figura 3. Estructura de las integrinas	25
Figura 4. Regulación de la activación de las integrinas y señalización a través de las mismas	27
Figura 5. Estructura de la talina	29
Figura 6. Estructura de las proteínas kindlin	30
Figura 7. Estructura de ICAP-1	31
Figura 8. Estructura de VCAM-1 y fibronectina, ligandos para $\alpha 4\beta 1$	34
Figura 9. Vías de señalización intracelular estimuladas por la interacción quimioquina-receptor	38
Figura 10. Inicio y progresión del mieloma	42
Figura 11. $\alpha 4\beta 1$ y CAM-DR en MM	45
Figura 12. Estructura del proteasoma 26S	47
Figura 13. Mecanismos de acción del bortezomib	50
Figura 14. Vía de señalización NF- κ B	51
Figura 15. BTZ y la integrina $\alpha 4\beta 1$	52
Figura 16. Ratones ICAP-1 ^{+/+} y ICAP-1 ^{-/-} en diferentes franjas de edad	78
Figura 17. Expresión de ICAP-1 en células de bazo	78
Figura 18. Expresión de talina y kindlin-3 en esplenocitos de ratones ICAP-1 ^{+/+} y ICAP-1 ^{-/-}	79
Figura 19. Expresión de $\beta 1$ en la superficie de linfocitos de bazo de ratones ICAP-1 ^{+/+} y ICAP-1 ^{-/-}	79
Figura 20. Expresión de $\alpha 4$ en la superficie de linfocitos de bazo de ratones ICAP-1 ^{+/+} y ICAP-1 ^{-/-}	80
Figura 21. Adhesión de células de bazo de ratones ICAP-1 ^{+/+} y ICAP-1 ^{-/-} a ligandos de $\alpha 4\beta 1$ y de $\alpha L\beta 2$	81
Figura 22. Análisis de la activación de integrinas $\beta 1$ en linfocitos ICAP-1 ^{+/+} y ICAP-1 ^{-/-}	82
Figura 23. Análisis de la migración de esplenocitos ICAP-1 ^{+/+} y ICAP-1 ^{-/-}	83
Figura 24. Infiltración de células T en modelos de peritonitis en ratones ICAP-1 ^{+/+} y ICAP-1 ^{-/-}	83
Figura 25. Tamaño y celularidad de timos de ratones ICAP-1 ^{+/+} y ICAP-1 ^{-/-}	84
Figura 26. Expresión de ICAP-1 en timocitos	84
Figura 27. Caracterización de poblaciones celulares en los timos de ratones ICAP-1 ^{-/-} y ICAP-1 ^{+/+}	86
Figura 28. Expresión de CD69 y TCR $\alpha\beta$ en timocitos CD4 ⁺ y CD8 ⁺ de ratones ICAP-1 ^{+/+} y ICAP-1 ^{-/-}	87
Figura 29. Análisis de la tasa de proliferación de diferentes poblaciones celulares tímicas de ratones ICAP-1 ^{+/+} y ICAP-1 ^{-/-}	87
Figura 30. Expresión de talina, kindlin-3 y $\beta 1$ en timocitos de ratones ICAP-1 ^{+/+} y ICAP-1 ^{-/-}	88
Figura 31. Expresión de $\beta 1$ en la membrana de timocitos	89
Figura 32. Ensayos de adhesión de timocitos a CS-1/FN	90
Figura 33. Análisis de la expresión de los receptores de quimioquinas CCR7, CCR9 y CXCR4 en diferentes poblaciones celulares del timo	91
Figura 34. Distribución celular de ICAP-1	92

Figura 35. La expresión de Runx3 está reducida en el timo de ratones ICAP-1 ^{-/-}	93
Figura 36. Análisis de la expresión de <i>c-MYC</i> en el timo de ratones ICAP-1 ^{-/-}	93
Figura 37. Tamaño y celularidad de bazo y NL de ratones ICAP-1 ^{+/+} y ICAP-1 ^{-/-}	94
Figura 38. Disminución de los porcentajes de células CD8 ⁺ en bazo y NL de ratones ICAP-1 ^{-/-}	95
Figura 39. Análisis por citometría de flujo de la distribución de neutrófilos en bazo	96
Figura 40. Distribución de células CD4 ⁺ y CD8 ⁺ en sangre periférica	96
Figura 41. Expresión de β1 en las poblaciones celulares CD4 ⁺ y CD8 ⁺ de bazo	97
Figura 42. Esquema del programa de diferenciación de HSCs y HPCs	97
Figura 43. Caracterización de la población HSCs en MO de ratones ICAP-1 ^{-/-} y ICAP-1 ^{+/+}	98
Figura 45. Caracterización de la población de células B220 ⁺ en médula ósea de ratones deficientes en ICAP-1. Análisis de la expresión de la subunidad β1 en células B220 ⁺	99
Figura 46. Esquema del programa de diferenciación y maduración de células B	100
Figura 47. Diferenciación de células B en la médula ósea de ratones ICAP-1 ^{-/-}	101
Figura 48. Análisis de la población granulocítica (CD11b ⁺ Gr1 ⁺) y de células T en la médula ósea de ratones ICAP-1 ^{-/-}	101
Figura 49. Análisis de la frecuencia de células B220 ⁺ en órganos linfoides y sangre periférica de ratones ICAP-1 ^{-/-}	102
Figura 50. Porcentajes de células B220 ⁺ en los bazos de ratones deficientes de ICAP-1	103
Figura 51. Análisis de la expresión en superficie de las subunidades β1 y α4 en células B220 ⁺ de bazos de ratones ICAP-1 ^{+/+} y ICAP-1 ^{-/-}	103
Figura 52. Análisis de la distribución de las poblaciones de células MZ y FO basado en la expresión de IgM e IgD	104
Figura 53. Análisis de la distribución de las poblaciones de células MZ y FO basado en la expresión de CD21 y CD23	104
Figura 54. Análisis de la expresión de <i>ICAP-1</i> en células de MM	105
Figura 55. Análisis de la asociación de ICAP-1 con β1	106
Figura 56. Análisis de la regulación por ICAP-1 de la adhesión de células de MM dependiente de α4β1	106
Figura 57. Análisis de la regulación por ICAP-1 de la adhesión de células de MM a células estromales HS-27A	107
Figura 58. Activación de integrinas β1 en células de MM silenciadas para ICAP-1	107
Figura 59. Microscopía intravital con células de MM silenciadas para ICAP-1	108
Figura 60. Caracterización de las células NCI-H929 resistentes a BTZ	110
Figura 61. Las células NCI-H929-R20.1 muestran resistencia al CFZ	110
Figura 62. Caracterización de las células RPMI-8226, RPMI-8226-R7 y RPMI-8226-R100	111
Figura 63. Apoptosis celular tras tratamientos con inhibidores del proteasoma	112
Figura 64. Análisis de la sensibilidad de las células NCI-H929-R20.1 al tratamiento con apilidina, doxorubicina o <i>melphalan</i>	112
Figura 65. Análisis de la expresión de P-gP en células NCI-H929 y NCI-H929-R20.1	113
Figura 66. Análisis de la viabilidad de células resistentes a BTZ tras tratamiento con verapamilo	114
Figura 67. Análisis de ubiquitinación en las células de MM parentales y resistentes a BTZ	114
Figura 68. Análisis de la expresión de la subunidad β5 del proteasoma en células NCI-H929 parentales y resistentes	115
Figura 69. Análisis de la ubiquitinización en células RPMI-8226 parentales, RPMI-8226-R7 y RPMI-8226-R100 tras el tratamiento con BTZ	116
Figura 70. Caracterización de la activación de las vías Ras-MAPK y PI3K-Akt en células de MM resistentes a BTZ	117
Figura 71. Expresión y activación de IGF1R en células RPMI-8226 resistentes a BTZ	117
Figura 72. Análisis de la expresión de las subunidades α4, β1 y α5, así como de CXCR4 y de CD44, en la membrana de células NCI-H929 resistentes a BTZ	118
Figura 73. Análisis de la expresión proteica y de mRNA de α4, β1 y CXCR4 en células NCI-H929 resistentes a BTZ	119
Figura 74. Análisis de la expresión de las subunidades α4, β1 y α5, así como de CXCR4, en la membrana de células RPMI-8226 resistentes a BTZ	120

Figura 75. Análisis de la expresión proteica y de mRNA de $\alpha 4$, $\beta 1$ y CXCR4 en células RPMI-8226 parentales y resistentes a BTZ	121
Figura 76. La resistencia a BTZ y el aumento de expresión de $\alpha 4\beta 1$ es independiente de la presencia del inhibidor	122
Figura 77. Expresión de $\beta 1$ tras tratamiento con cicloheximida de células RPMI-8226 parentales y resistentes a BTZ	122
Figura 78. Adhesión dependiente de $\alpha 4\beta 1$ de células de MM resistentes a BTZ	123
Figura 79. Generación de líneas celulares de T-ALL y MCL resistentes a BTZ	124
Figura 80. Análisis de la expresión de $\alpha 4$, $\beta 1$ y CXCR4 en la membrana de células MOLT-4 parentales y resistentes a BTZ	125
Figura 81. Análisis de la expresión de $\alpha 4$, $\beta 1$ y CXCR4 en la membrana células Z-138 parentales y resistentes a BTZ	125
Figura 82. Adhesión de células MOLT-4 y Z-138 parentales y resistentes a BTZ a ligandos de $\alpha 4\beta 1$	126
Figura 83. Caracterización de la infiltración de células RPMI-8226 parentales y R7 en la MO de ratones NSG	127
Figura 84. Cuantificación mediante RT-qPCR de la infiltración por células de MM de la MO de ratones NSG	128
Figura 85. Caracterización del crecimiento tumoral en ratones inoculados con células NCI-H929 parentales y resistentes a BTZ	129
Figura 86. Análisis de la fosforilación de I κ B y NF- κ B (p65) en las células NCI-H929-R20.1	130
Figura 87. Expresión de <i>ITGA4</i> tras el silenciamiento de <i>NFKB1</i> y <i>FOXO3a</i>	131
Figura 88. Adhesión dependiente de $\alpha 4\beta 1$ de los transfectantes de NCI-H929-R20.1 silenciados para $\alpha 4$, NF- κ B o FOXO3a	131

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Anticuerpos empleados en los ensayos de citometría de flujo. Se muestra la especificidad y la procedencia	62
Tabla 2. Anticuerpos empleados en los ensayos de <i>western blotting</i>	63
Tabla 3. Protocolo de PCR convencional aplicado en el genotipado de los ratones ICAP-1 ^{+/+} , ICAP-1 ^{+/-} , ICAP-1 ^{-/-}	64
Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en el análisis por PCR convencional para el genotipado de los ratones ICAP-1 ^{+/+} , ICAP-1 ^{+/-} , ICAP-1 ^{-/-}	64
Tabla 5. Protocolo empleado para los análisis por RT-qPCR	71
Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados en los ensayos de RT-qPCR	71
Tabla 7. Relación de los siRNAs utilizados	72

ABREVIATURAS

A

AC	<i>Adenylyl cyclase</i> , adenil ciclasa
ACKR3	<i>Atypical Chemokine Receptor 3</i> , receptor de quimioquinas atípico 3
AF	Adhesiones focales
Akt	<i>Protein kinase B</i> , proteínas quinasa B
Anti-Ub	Anticuerpo frente a ubiquitinas
APC	<i>Allophycocyanin</i> , alofococianina
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i> , adenosín trifosfato

B

BAFF	<i>B-cell activating factor</i> , factor de activación de células B
Bax	<i>Bcl2 associated X protein</i> , proteína X asociada a Bcl2
BCECF-AM	(2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(6')-carboxyfluorescein-acetoxymethyl ester), 2'7'-bis (carboxietil)-5(6')-carboxifluoresceinato de acetoximetil éster
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i> , linfoma de células B 2
BCR	<i>B-cell receptor</i> , receptor de células B
Bid	<i>BH3 Interacting Domain Death Agonist</i>
BLIMP1	<i>PR domain zinc finger protein 1</i>
BM	<i>Bone marrow</i> , medula ósea
BMSCs	<i>Bone Marrow Stromal Cells</i> , células estromales del microambiente medular
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> , albúmina de suero bovino
BTZ	Bortezomib
BV	<i>Brilliant Violet</i>

C

CAM-DR	<i>Cell Adhesion-Mediated Drug Resistance</i> , resistencia a droga dependiente de adhesión celular
CaMKII	<i>Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II</i> , calmodulina proteína quinasa II
cAMP	<i>Cyclic adenosine monophosphate</i> , adenosín monofosfato cíclico
CAR-T cells	<i>Chimeric antigen receptor T cells</i> , células T con receptores de antígenos quiméricos
CBMSO	Centro De Biología Molecular Severo Ochoa
CCK-8	<i>Cell counting kit-8, Water Soluble Tetrazolium Salt</i> , (2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium
CCL-	<i>C-C motif chemokine ligand</i> , quimioquina ligando con motivo C-C
CCM1	<i>Cerebral cavernous malformation 1</i> , malformacion cavernosa cerebral
CCR-	<i>C-C motif chemokine receptor</i> , receptor de quimioquinas con motivo C-C
CD-	<i>Cluster of differentiation</i> , cúmulo de diferenciación
CD40L	<i>CD40 ligand</i> , ligando CD40
Cdc42	<i>Cell división control protein 42</i> , proteína de control de la división celular 42
cDNA	<i>Complementary DNA</i> , DNA complementario

CFSE	<i>Carboxyfluorescein succinimidyl ester</i> , éster de succinimidil-carboxifluoresceína
CFZ	Carfilzomib
CG	Centro germinal
ChIP	<i>Chromatin immunoprecipitation</i> , inmunoprecipitación de la cromatina
CHX	Cicloheximida
CIB	Centro de Investigaciones Biológicas
c-Kit	<i>Mast/stem cell growth factor receptor</i> , receptor del factor de células madre
CNIC	Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares
CREB	<i>cAMP response element-binding</i> , elementos de respuesta a cAMP
CS-1	<i>Connecting segment 1</i> , segmento conector 1
CSIC	Consejo Superior de Investigaciones Científicas de Madrid
Ctrol	Control
CXCL-	<i>C-X-C motif chemokine ligand</i> , quimioquina ligando con motivo C-X-C
CXCR-	<i>C-X-C motif chemokine receptor</i> , receptor de quimioquinas con motivo C-X-C

D

DAMPs	<i>Damage Associated Molecular Patterns</i> , patrones moleculares asociados a daño
DAPI	<i>4'6'-diamidino-2-phenylindole</i> , 4'6'-diamidino-2-fenilindol
DD	Dominio de dimerización
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> , medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimethyl sulfoxide, dimetilsulfóxido
DN	<i>Double negative</i> , doble negativo
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Deoxyribonucleotide triphosphates, desoxirribonucleótidos trifosfato
DP	<i>Double positive</i> , doble positivo
DTT	<i>Dithiothreitol</i> , ditiotreitól

E

EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> , ácido etileno-diamino-tetraacético
ERK1/2	<i>Extracellular signal-regulated kinase 1 and 2</i> , quinasa regulada por señales extracelulares
ETS1	<i>E26 transformation-specific or E-twenty-six Proto-Oncogene 1 Transcription Factor</i>

F

FAK	<i>Focal Adhesion Kinase</i> , quinasa de adhesión focal
FBS	<i>Fetal bovine serum</i> , suero fetal bovino
Fc	Región constante de las Ig
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> , Administración de Alimentos y Medicamentos
FERM	F: proteína 4.1, E: ezrina, R: radixina, M: moesina
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i> , isotiocianato de fluoresceína

FN	Fibronectina
FN-H89	<i>Fibronectin fragment H89</i> , fragmento H89 de la fibronectina
FO	Células B foliculares maduras
FOXO3a	<i>Forkhead box O3</i>

G

GAG	Glicosaminoglicano
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i> , gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GATA	G: Guanina, A: Adenina, T: Timina
G-CSF	<i>Granulocyte-colony stimulating factor</i> , factor estimulante de colonias de granulocitos
GDI	<i>GDP-dissociation inhibitor</i> , inhibidor de disociación de GDP
GDP	<i>Guanosine diphosphate</i> , guanosín difosfato
GPCRs G	<i>G-protein coupled receptor</i> , receptor acoplado a proteínas G heterotriméricas
GRK	<i>G-protein associated kinase</i> , quinasas asociadas a los receptores acoplados a proteínas G
GSK3-β	<i>G-protein coupled receptor</i> , receptor acoplado a proteínas G heterotriméricas
GST	<i>Gluthation sulphur transferase</i> , transferasa de azufre a glutatión
GTP	<i>Guanosine triphosphate</i> , guanosín trifosfato
GTPasa	<i>Guanosine triphosphatase</i> , guanosín trifosfatasa

H

HEPES	<i>4-(2-hidroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid</i> , ácido 4-(2-hidroxietyl) piperacina-1-etanosulfónico
HEV	<i>High endothelial venules</i> , vénulas de órganos linfoides secundarios
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i> , factor de crecimiento de hepatocitos
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i> , antígeno leucocitario humano
HPC	<i>Hematopoietic Progenitor Cells</i> , progenitores hematopoyéticos
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> , peroxidasa de rábano
HSC	<i>Hematopoietic Stem Cells</i> , células madre hematopoyéticas
HSPC	<i>Hematopoietic Stem and Progenitor Cells</i> , células madre y progenitores hematopoyéticas
HZ	Heterocigoto

I

<i>i.p.</i>	Intra-peritoneal
<i>i.v.</i>	Intra-venosa
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i> , molécula 1 de adhesión intercelular
ICAP-1	<i>Integrin cytoplasmic domain-associated protein-1 or integrin beta 1 binding protein 1</i> , proteína 1 asociada al dominio citoplasmático de la integrina o proteína 1 de unión a integrinas beta 1
IFN-γ	Interferón gamma
Ig	Inmunoglobulina

IGF-1	<i>Insulin-like growth factor</i> , factor de crecimiento insulínico
IGF1R	<i>Insulin-like growth factor receptor</i> , receptor del factor de crecimiento insulínico
IGH locus	<i>Immunoglobulin heavy locus</i> , locus pesado de inmunoglobulina
IKK	<i>IκB kinase</i> , quinasa de IκB
IL-	Interleuquina
iNF-κB	Inhibidor de NF-κB
IP	Inhibidores del proteasoma
IP₃	<i>Inositol trisphosphate</i> , inositol trisfosfato
ITGA4	<i>Integrin subunit alpha 4</i> , subunidad alpha4 de la integrina
ITGB1	<i>Integrin subunit beta 1</i> , subunidad beta1 de la integrina
IVM	<i>Intravital microscopy</i> , microscopía intravital
IκB	<i>NF-κB Inhibitor</i> , inhibidor de NF-κB

J

Jak	<i>Janus kinase</i> , quinasa janus
Jnk	<i>c-Jun N-terminal kinase</i> , quinasa N-terminal de c-Jun

K

KO	<i>Knockout</i>
KRIT1	<i>Krev interaction trapped 1</i> , proteína 1 atrapada por la interacción de Krev

L

LacZ	Operón lactosa
LAD III	<i>Leukocyte adhesion deficiency-III</i> , deficiencia de adhesión leucocitaria de tipo III
LFA-1	<i>Leukocyte function-associated antigen 1</i> , antígeno 1 asociado a la función de leucocitos (αLβ2)
Lin⁻	<i>Lineage⁻</i> , células negativas de linaje
LSK	Lin ⁻ Sca-1 ⁺ c-Kit ⁺

M

Mac-1	<i>Macrophage-1 antigen</i> , antígeno macrófago-1 (αMβ2)
MadCAM-1	<i>Mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1</i> , molécula de adhesión celular de adresinas mucosas 1
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i> , proteínas quinasa activadas por mitógenos
Mcl-1	<i>Induced myeloid leukemia cell differentiation protein</i> , proteína de diferenciación de células leucémicas mieloides
MEC	Matriz extracelular
MFI	<i>Mean fluorescence intensity</i> , intensidad media de fluorescencia
MGUS	<i>Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance</i> , gammapatía monoclonal de significado incierto
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> , complejo mayor de histocompatibilidad

MIDAS	<i>Metal ion-dependent adhesion site</i> , sitio de adhesión dependiente de iones metálicos
miRNA	microRNA
MLP	<i>Melphalan</i>
MM	<i>Multiple myeloma</i> , mieloma múltiple
MO	Médula ósea
MPP	<i>Multipotent progenitors</i> , progenitores multipotentes
mRNA	Messenger RNA
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i> , diana de rapamicina en mamíferos
MZ	<i>Marginal zone</i> , zona marginal

N

NEMO	<i>NF-κB essential modulator</i> , modulador esencial de NF- κ B
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T-cells</i> , factor nuclear de células T activadas
NF-κB	<i>Nuclear factor-κB</i> , factor nuclear κ B
NIK	<i>NF-κB inducing kinase</i> , quinasa inductora de NF- κ B
NK	<i>Natural Killer cells</i> , célula asesina natural
NL	Nódulos linfáticos
NLS	<i>Nuclear localization sequence</i> , secuencia de localización nuclear
NOD	<i>Nonobese diabetic</i> , diabético no obeso
NOXA	<i>Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1</i>
ns	no significativo
NSG	<i>NOD scid gamma</i>

P

p	<i>p-value</i> , p-valor
PAGE	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i> , electroforesis en geles de poliacrilamida
PAK	<i>p-21 activated kinase</i> , quinasa activada por p-21
PAMPs	<i>Pathogen associated molecular patterns</i> , patrones moleculares asociados a patógenos
PB	<i>Peripheral blood</i> , sangre periférica
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , solución salina tamponada con fosfatos
PDK	<i>3-Phosphoinositide-dependent protein kinase</i> , proteína quinasa dependiente de 3-fosfoinosítidos
PE	<i>Phycocerythrin</i> , ficoeritrina
PerCP	<i>Peridinin Chlorophyll Protein Complex</i> , complejo de proteínas de clorofila peridinina
PFA	Paraformaldehído
P-gP	P-glicoproteína 1
PH	<i>Pleckstrin-homology domain</i> , dominio de homología con pleckstrina
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i> , fosfatidilinositol 3-quinasa
PIP₂	<i>Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate</i> , fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PKA	<i>cAMP-dependent protein-kinase</i> , proteína quinasa dependiente de cAMP
PKC	<i>Calcium-dependent protein-kinase</i> , proteína quinasa dependiente de calcio
PKG	Proteína quinasa G
PLC	<i>Phospholipase C</i> , fosfolipasa C

PLL	Poli-L-Lisina
PSMB5	<i>Proteasome Subunit Beta 5</i> , subunidad beta 5 del proteasoma
PTB	<i>Phosphotyrosine-binding domain</i> , dominio de unión a fosfotirosina
PTEEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i> , homólogo de fosfatasa y tensina
PVDF	<i>Polyvinylidene difluoride</i> , difluoruro de polivinilideno

R

Rac	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate</i> , sustrato de la toxina botulínica C3 relacionado con Ras
RAF	<i>Rapidly accelerated fibrosarcoma</i> , fibrosarcoma rápidamente acelerado
RANKL	<i>Receptor Activator for NF-κB Ligand</i> , ligando de receptor activador para NF-κB
Ras	<i>Rat sarcoma</i> , sarcoma de rata
RB	Retinoblastoma
RBD	<i>Ras-binding domain</i> , dominio de unión a Ras
RE	Retículo endoplasmático
RGD	<i>Arg-Gly-Asp</i> , arginina-glicina-aspártico
RIAM	<i>Rap1-GTP-interacting adaptor molecule</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> , ácido ribonucleico
RPMI 1640	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> médium, medio Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR	<i>Reverse transcription-polymerase chain reaction</i> , transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa
RT-qPCR	<i>Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction</i> , transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RUNX3	<i>Runt-related transcription factor 3</i> , factor de transcripción 3 relacionado con Runt

S

SAM68	<i>Src-Associated substrate in Mitosis of 68 kDa</i> , sustrato asociado a Src en mitosis de 68 kDa
Sca-1	<i>Stem cells antigen-1</i> , antígeno 1 de células madre
SCID	<i>Severe combined immunodeficiency</i> , inmunodeficiencia combinada severa
SD	<i>Standard deviation</i> , desviación estándar
SDF-1	<i>Stromal cell-derived factor-1</i> , factor derivado de células estromales-1
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> , dodecilsulfato de sodio
SEM	<i>Standard error of the mean</i> , error estándar
siRNA	<i>Small interfering RNA</i> , RNA de interferencia
SLAMF	<i>Signaling lymphocytic activation molecule family</i> , familia de moléculas de activación de la señal linfocítica
SMM	<i>Smoldering multiple myeloma</i> , mieloma latente
SOCS1	<i>Suppressor of cytokine signaling 1</i> , supresor de señalización de citoquinas 1
SP	<i>Single positive</i> , único positivo
Src	<i>Sarcoma tyrosine-kinase</i> , tirosina quinasa sarcoma
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i> , transductor de señal y activador de transcripción

T

TBP	<i>TATA-binding protein</i> , proteína de unión a TATA
TBS	<i>Tris-buffered saline</i> , solución salina tamponada con Tris
TBS-T	TBS-Tween® 20
TCR	T-cell receptor, receptor de células T
TG	Tioglicolato
Th-	<i>T helper</i> , T colaborador
ThPOK	<i>Zinc finger and BTB domain containing 7B</i>
TMD	<i>Transmembrane domain</i> , región transmembrana
TNF-α	<i>Tumor necrosis factor-α</i> , factor de necrosis tumoral α
TRAF3	<i>TNF receptor associated factor 3</i> , factor asociado con el receptor de TNF
TRIS	Trisaminometano

U

UPR	<i>Unfolded protein response</i> , respuesta a proteínas desplegadas
------------	--

V

VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule-1</i> , molécula de adhesión de células endoteliales-1
VLA-4	<i>Very Late Antigen-4</i> ($\alpha 4\beta 1$)
VP	Verapamilo

W

WB	<i>Western Blotting</i>
WT	<i>Wild type</i> , salvaje

X

XBP-1	<i>X-Box Binding Protein 1</i> , proteína 1 de unión a <i>X-Box</i>
--------------	---

SUMMARY

INTRODUCTION

The integrin $\alpha 4\beta 1$ plays important roles during lymphocyte migration to sites of inflammation and at distinct steps in hematopoiesis. The activity of this integrin is regulated by intracellular proteins which associate with the $\beta 1$ subunit cytoplasmic domain. While much is known on positive regulators such as talin and kindlin, less is known about those which negatively regulate integrin activation, such as ICAP-1. As $\alpha 4\beta 1$ is expressed on lymphocytes, we have studied the effects of the lack of ICAP-1 on $\alpha 4\beta 1$ -dependent lymphocyte adhesion and on immune cell differentiation in thymus, spleen and bone marrow (BM).

$\alpha 4\beta 1$ also mediates the interaction between multiple myeloma (MM) cells and the BM microvasculature, as well as with BM stromal cells. This interaction favours MM cell proliferation, survival and resistance to chemotherapy, leading to BM colonization and disease progression. Given the potential role of ICAP-1 as negative regulator of $\beta 1$ integrin activation, it is important to study its role on $\alpha 4\beta 1$ -dependent MM cell adhesion. Bortezomib (BTZ) is a proteasome inhibitor widely used in the treatment against MM. Unfortunately, many patients develop resistance to BTZ, and therefore is crucial to investigate the mechanisms that the MM cells use to bypass this inhibitor, including the possible relationships between BTZ and $\alpha 4\beta 1$.

OBJECTIVES AND RESULTS

In the first objective of this Doctoral Thesis we have characterized the ICAP-1 implication in $\alpha 4\beta 1$ -mediated lymphocyte adhesion, and in the development and maturation of cells of the immune system. In addition, we have analyzed the $\alpha 4\beta 1$ -dependent MM cell adhesion to the BM microvasculature.

To address the first part of this objective, we used mice lacking ICAP-1. $CD3^+$ and $CD19^+$ splenic cells from ICAP-1^{-/-} mice displayed higher adhesion levels to $\alpha 4\beta 1$ ligands than ICAP-1^{+/+} cells. ICAP-1-deficient mice showed a specific reduction of $TCR\alpha\beta^+ CD8^+ CD69^{hi}$ cells in comparison with control mice, suggesting an involvement of ICAP-1 in thymocyte positive selection. The decreased $CD8^+$ T cell frequency was also evident in spleen and lymph nodes from ICAP-1^{-/-} mice. Contrary to spleen cells, there were no differences in adhesion to CS-1/FN between thymocytes from ICAP-1^{-/-} and ICAP-1^{+/+} mice. Interestingly, we observed a preferential distribution of ICAP-1 in the nucleus of control thymocytes, suggesting that ICAP-1 function in these cells might be more relevant in the nucleus than in the cytosol. Analyzing regulatory elements of the thymocyte development program, we found that lack of ICAP-1 caused a specific reduction in the expression of Runx3, an important transcription factor controlling the generation of $CD8^+$ cells in thymus. We did not detect alterations in stem and progenitor cells frequencies in BM from ICAP-1^{-/-} mice relative to control counterparts, and B lymphopoiesis was neither affected. Of note, we observed a reduction of marginal zone B cells and an increase in follicular B cells in spleen from ICAP-1^{-/-} mice comparing to control mice. These data suggest that ICAP-1 might have a role as modulator of B cell trafficking in spleen, thus regulating B cell maturation.

In the second part of this objective we demonstrated that ICAP-1 is expressed in MM bone marrow primary samples, and that silencing ICAP-1 in MM cell lines led to enhanced $\alpha4\beta1$ -dependent adhesion together with increased integrin activation. Furthermore, intravital microscopy assays revealed that ICAP-1 knockdown led to upregulated MM cell adhesion to the BM microvasculature.

The second objective consisted in the characterization of functional relationships between MM cell resistance to BTZ and the expression and function of the $\alpha4\beta1$ integrin. To this purpose we have used two MM cell lines resistant to BTZ. We found that the expression of $\alpha4\beta1$ in these BTZ-resistant cells was higher than that of the original parental cells, which resulted in increased $\alpha4\beta1$ -dependent cell adhesion and enhanced cell infiltration in the BM of immunodeficient mice, which caused disease progression. A partial involvement of NF- κ B and FOXO3a in enhanced $\alpha4$ expression in the resistant cells was found. Upregulation of $\alpha4\beta1$ expression in BTZ-resistant cells was not a general effect, as it was not observed in BTZ-resistant cells which served as models for acute lymphoblastic leukemia T and B cell lymphoma.

CONCLUSIONS

ICAP-1 is proposed to be involved in the development of CD8⁺ T cells in thymus, by regulating Runx3 expression and modulating thymocyte positive selection. In T and B spleen cells, ICAP-1 negatively regulates $\alpha4\beta1$ -dependent adhesion. Furthermore, ICAP-1 regulates the frequency of spleen marginal zone and follicular B cells, potentially involving a control of cell trafficking. We also demonstrate a negative role for ICAP-1 in $\alpha4\beta1$ -mediated MM cell adhesion.

BTZ-resistant MM cells display higher $\alpha4\beta1$ expression than parental cells linked to upregulated adhesion mediated by this integrin, and by enhanced BM infiltration and disease progression. A partial role for NF- κ B and FOXO3a in increased $\alpha4\beta1$ expression in resistant cells is proposed.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

La integrina $\alpha 4\beta 1$ desempeña importantes funciones durante la migración linfocitaria hacia sitios de inflamación y en diferentes etapas de la hematopoyesis. La actividad de esta integrina está regulada por proteínas intracelulares que se asocian al dominio citoplasmático de la subunidad $\beta 1$. Mientras que se han realizado numerosos estudios acerca de los reguladores positivos de las integrinas tales como talina y kindlin, aquellas proteínas que regulan negativamente su activación han sido menos caracterizadas, como es el caso de ICAP-1. Puesto que $\alpha 4\beta 1$ se expresa en linfocitos, hemos estudiado el efecto de la falta de ICAP-1 en la adhesión dependiente de $\alpha 4\beta 1$ en estas células, así como en la diferenciación de células del sistema inmunitario en el timo, bazo y médula ósea (MO).

Otra de las funciones conocidas de $\alpha 4\beta 1$ es su participación en la interacción entre células de mieloma múltiple (MM) y la microvasculatura de la MO y células del estroma medular. Esta interacción favorece la proliferación, supervivencia y resistencia a quimioterapia de las células de MM, promoviendo la colonización de la MO y la progresión de la enfermedad. Debido a que ICAP-1 se postula como regulador negativo de la activación de integrinas $\beta 1$, es importante estudiar su papel en la adhesión de células de MM dependiente de $\alpha 4\beta 1$.

El Bortezomib (BTZ) es un inhibidor del proteasoma ampliamente utilizado en el tratamiento frente al MM. Desafortunadamente, muchos pacientes acaban desarrollando resistencia al BTZ, por lo que es crucial investigar los mecanismos que utilizan las células de MM para sobrevivir al tratamiento con este agente, incluyendo una posible relación entre el BTZ y la integrina $\alpha 4\beta 1$.

OBJETIVOS Y RESULTADOS

En el primer objetivo de esta Tesis Doctoral hemos caracterizado la implicación de ICAP-1 en la adhesión linfocitaria dependiente de $\alpha 4\beta 1$, y en el desarrollo y maduración de células del sistema inmunitario. A su vez, hemos analizado la regulación por ICAP-1 de la adhesión de células de MM a la microvasculatura de la MO a través de $\alpha 4\beta 1$.

Para abordar la primera parte de este objetivo hemos utilizado ratones deficientes en ICAP-1. Esplenocitos $CD3^+$ y $CD19^+$ procedentes de ratones ICAP-1^{-/-} mostraron niveles mayores de adhesión a ligandos de $\alpha 4\beta 1$ que las células ICAP-1^{+/+}. Detectamos una reducción específica de la población de células $TCR\alpha\beta^+ CD8^+ CD69^{hi}$ en muestras de timos de ratones ICAP-1^{-/-} en comparación con muestras ICAP-1^{+/+}, sugiriendo un posible papel de ICAP-1 en la selección positiva de los timocitos. El descenso de la frecuencia de células T $CD8^+$ también fue notorio en bazo y nódulos linfáticos de ratones ICAP-1^{-/-}. Contrariamente a lo observado para los esplenocitos, no se encontraron diferencias en los niveles de adhesión a CS-1/FN entre timocitos ICAP-1^{-/-} y ICAP-1^{+/+}. Notablemente, detectamos una distribución preferencial de ICAP-1 en el núcleo de los timocitos, sugiriendo que la función desempeñada por esta proteína en estas células podría ser más

relevante en el núcleo que en el citoplasma. Analizamos elementos reguladores del programa de desarrollo por el que los timocitos se determinan hacia los distintos linajes de células T, y encontramos que la falta de ICAP-1 causaba una reducción específica de la expresión de Runx3, un factor de transcripción crítico para la generación de células CD8⁺ en el timo. No detectamos alteraciones en la frecuencia de células madre y progenitoras presentes en la MO de ratones ICAP-1^{-/-}, ni en la linfopoyesis de células B. El análisis de los bazo de ratones ICAP-1^{-/-} mostraron una reducción de las células B de la zona marginal (MZ) y un incremento de las células B foliculares (FO), en comparación con los bazo de ratones control. Estos datos sugieren la posibilidad de que ICAP-1 actúe como modulador del tráfico de células B en bazo, por lo que pudiera regular la maduración de las células B.

En la segunda parte de este objetivo silenciamos ICAP-1 en líneas celulares de MM, lo que supuso un incremento de la adhesión dependiente de $\alpha 4\beta 1$ junto con una mayor activación de la integrina. Ensayos de microscopía intravital revelaron que la reducción de la expresión de ICAP-1 correlacionaba con un aumento de la adhesión de las células de MM a la microvasculatura de la MO.

El segundo objetivo de esta Tesis consistió en la caracterización de relaciones funcionales entre la resistencia de células de MM a BTZ y la expresión y función de $\alpha 4\beta 1$. Para desarrollar este trabajo hemos utilizado líneas celulares de MM resistentes a BTZ. Hemos observado que la expresión de $\alpha 4\beta 1$ en estas células resistentes era mayor que la de las células parentales, lo que se tradujo en un aumento en los niveles de adhesión mediada por esta integrina y en una mayor infiltración de la MO de ratones inmunodeficientes, contribuyendo al progreso de la enfermedad. Los factores de transcripción NF- κ B y FOXO3a están involucrados en el aumento de la expresión de $\alpha 4$ en las poblaciones celulares de MM resistentes a BTZ. El incremento de expresión de $\alpha 4\beta 1$ en las células de MM resistentes a BTZ no resultó ser un efecto extensible a otras neoplasias hematológicas, ya que no se observó en células resistentes a BTZ utilizadas como modelos de leucemia linfobástica aguda de células T y linfoma de células B del manto.

CONCLUSIONES

Nuestros resultados indican que ICAP-1 está implicado en el desarrollo de células T CD8⁺ en el timo, regulando la expresión de Runx3 y modulando la selección positiva de los timocitos. ICAP-1 controla negativamente la adhesión dependiente de $\alpha 4\beta 1$ de células T y B del bazo, y regula el tráfico de células B en este órgano afectando a la frecuencia de células MZ y FO. Demostramos asimismo que ICAP-1 regula negativamente la adhesión de células de MM mediada por $\alpha 4\beta 1$.

Las células de MM resistentes a BTZ muestran mayor expresión de $\alpha 4\beta 1$ en comparación a las células parentales, lo que causa un aumento de la adhesión mediada por esta integrina, así como una mayor infiltración de la MO y progresión del mieloma. Proponemos a NF- κ B y FOXO3a como reguladores del aumento de la expresión de $\alpha 4$ en células de MM resistentes a BTZ.

INTRODUCCIÓN

I. EL SISTEMA INMUNE. ADHESIÓN Y MIGRACIÓN LEUCOCITARIA

El sistema inmune comprende un conjunto de moléculas, células, tejidos y órganos que trabajan de manera colectiva con el fin de coordinar la respuesta inmune, la cual se divide en dos grandes ramas relacionadas entre sí: la inmunidad innata y la adaptativa (Abbas *et al.*, 2014; Murphy, 2012). La inmunidad innata representa una respuesta de defensa que actúa de forma inmediata para eliminar patógenos. Constituye la primera barrera de defensa del organismo, y su activación es esencial para poder desencadenar una posterior respuesta inmune adaptativa (Abbas *et al.*, 2014; Murphy, 2012). Las respuestas de inmunidad innata comprenden tanto barreras físicas como químicas, y en ellas tienen un papel esencial las células fagocíticas como los neutrófilos y los macrófagos, así como las *Natural Killer cells* (NK). Asimismo, el sistema del complemento y diferentes mediadores de inflamación y citoquinas regulan y coordinan la funcionalidad de las células de la inmunidad innata (Murphy, 2012). Las respuestas moleculares de la inmunidad innata se centran en el reconocimiento de patrones conservados presentes en los agentes infecciosos y que son conocidos como *Pathogen Associated Molecular Patterns* (PAMPs), o en moléculas que indican que hay un daño en un tejido, denominadas *Damage Associated Molecular Patterns* (DAMPs) (Abbas *et al.*, 2014; Medzhitov, 2001).

La respuesta inmunitaria adaptativa actúa posteriormente a la innata, y es capaz de adaptarse a antígenos concretos de forma específica. A su vez, genera memoria contra estos antígenos de modo que, si existe un segundo proceso infeccioso con el mismo agente, la respuesta que se genere sea más eficaz. Las células responsables de desencadenar la inmunidad adaptativa son los linfocitos T y B. En el caso de los linfocitos B, estos pueden diferenciarse a células plasmáticas, que son las encargadas de la producción de anticuerpos específicos, conformando la inmunidad humoral (Iwasaki & Medzhitov, 2015; Vale *et al.*, 2015; Abbas *et al.*, 2014; Hardy & Hayakawa, 2001).

Las células del sistema inmune proceden inicialmente de la diferenciación celular que tiene lugar en la médula ósea (MO). A través de este proceso, denominado hematopoyesis, se producen los diferentes linajes sanguíneos a partir de células madre hematopoyéticas (*Hematopoietic Stem Cells*, HSCs), y de progenitores hematopoyéticos (*Hematopoietic Progenitor Cells*, HPCs) (Laurenti & Gottgens, 2018; Wei & Frenette, 2018; Hoggatt *et al.*, 2016; Cumano & Godin, 2007). Las HSCs son capaces de auto-renovarse y de diferenciarse, generando células sanguíneas maduras de manera constante. Las células HSCs pluripotentes de la MO pueden diferenciarse a progenitores mieloides y linfoides, manteniendo la homeostasis de los diferentes linajes hematopoyéticos a lo largo de la vida del individuo (Wei & Frenette, 2018; Laurenti & Gottgens, 2018; Orkin & Zon, 2008). Los progenitores linfoides del linaje B producen linfocitos B inmaduros en la MO capaces de migrar a bazo, lugar donde culmina su proceso de maduración (Pillai & Cariappa, 2009; Weill *et al.*, 2009; Nagasawa, 2006; Rolink *et al.*, 2004). Por otro lado, los progenitores linfoides para el linaje T migran desde la MO al timo, otro órgano linfóide primario, en donde se diferencian a células maduras CD4⁺ y CD8⁺ (Takaba & Takayanagi, 2017; von Boehmer, 2014; Gascoigne & Palmer, 2011; Carpenter & Bosselut, 2010; Singer *et al.*, 2008; Ladi *et al.*, 2006). Una vez diferenciados, los

linfocitos emigran al torrente sanguíneo y recirculan a través de órganos linfoides periféricos secundarios (bazo, nódulos linfáticos y tejido linfoide asociado a mucosas), los cuales son tejidos especializados en concentrar los antígenos que entran en el organismo. Los linfocitos que no han tenido un contacto previo con antígenos (linfocitos *naïve*), migran a estos órganos, donde reconocen a los antígenos e inician la respuesta inmunitaria, derivando finalmente en linfocitos efectores y de memoria (Abbas *et al.*, 2014; Murphy, 2012). Estos linfocitos activados circulan por la sangre y se dirigen a zonas periféricas de entrada de antígenos o a lugares de rotura tisular, garantizando la inmunidad sistémica y la especificidad y memoria de la respuesta inmune adaptativa. Gran parte de las células efectoras acaban muriendo tras eliminar al agente infeccioso, si bien algunas de ellas sobreviven como células memoria que defienden al organismo frente a posteriores infecciones causadas por el mismo patógeno (Abbas *et al.*, 2014; Kinashi, 2007).

Estos procesos migratorios de los linfocitos son dependientes de receptores de adhesión y moléculas quimioatrayentes que facilitan la infiltración al tejido dañado (Miyasaka & Tanaka, 2004; Butcher *et al.*, 1999; Butcher & Picker, 1996; Springer, 1994). Ambos tipos de moléculas funcionan conjuntamente para regular y optimizar el tráfico leucocitario a través de los endotelios con el objetivo de desarrollar una respuesta inmune eficiente. Las moléculas de adhesión principales durante la migración leucocitaria transendotelial son las integrinas y selectinas y sus respectivos ligandos, y las quimioquinas y sus receptores. Las quimioquinas activan transitoriamente la adhesión leucocitaria mediada por las integrinas, lo cual es clave durante la migración leucocitaria (Vestweber, 2015; Nourshargh & Alon, 2014; Alon & Ley, 2008; Laudanna & Alon, 2006; Johnston & Butcher, 2002).

Los linfocitos circulantes presentan en su membrana ligandos que reconocen selectinas expresadas por las células endoteliales. Este reconocimiento favorece la captura inicial o *tethering* de los linfocitos sobre la superficie vascular (Zarbock *et al.*, 2011; McEver, 2002). Tras este contacto inicial, los linfocitos ruedan sobre la superficie vascular disminuyendo su velocidad, un proceso denominado *rolling*, el cual está mediado principalmente por selectinas y sus ligandos (Rosen, 2004). Finalmente, los linfocitos se adhieren de manera firme y estable al endotelio vascular, mediante la acción coordinada de las integrinas y quimioquinas, lo que les permite resistir el flujo sanguíneo (**Figura 1**) (Vestweber, 2015; Ley *et al.*, 2007; Campbell *et al.*, 1998).

La coordinación funcional entre las integrinas y quimioquinas es fundamental para evitar una migración leucocitaria descontrolada. Los leucocitos circulantes presentan integrinas en su superficie celular en una conformación basalmente inactiva de baja afinidad por sus ligandos, lo que impide la adhesión de estas células al endotelio. Este estado se modifica tras la acción de las quimioquinas presentes en el endotelio vascular (Alon & Feigelson, 2012; Alon & Ley, 2008), las cuales se unen a sus receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) expresados por los linfocitos durante su proceso de *rolling*, causando una señalización intracelular (*inside-out*) que aumenta rápida y transitoriamente la activación de las integrinas y conduce a un incremento de la adhesión celular (Alon & Feigelson, 2012; Alon & Dustin, 2007; Middleton *et al.*, 2002; Hidalgo *et al.*, 2001; Grabovsky *et al.*, 2000). La adhesión estable de los leucocitos al endotelio

mediada por integrinas es reversible, por lo que si las señales de activación y migración transendotelial no se mantienen, el leucocito retornará al flujo sanguíneo (Ley *et al.*, 2007). Con una señalización adecuada, estas células se polarizan y adquieren una morfología que aumenta su capacidad migratoria transendotelial siguiendo un gradiente de factores quimioatrayentes (Kinashi, 2005; von Andrian & Mackay, 2000). De esta manera, los linfocitos acaban extravasándose y alcanzando lugares de inflamación o de presentación antigénica (**Figura 1**) (Alon & Ley, 2008; Kinashi, 2007).

Las integrinas $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 4\beta 7$, LFA-1 ($\alpha L\beta 2$) y Mac-1 ($\alpha M\beta 2$) son los principales receptores de adhesión responsables de la adhesión estable de los leucocitos al endotelio, interaccionando con moléculas de la superfamilia de inmunoglobulinas como VCAM-1, MadCAM-1 e ICAM-1, lo que facilita la extravasación posterior leucocitaria a los tejidos de destino (Shulman *et al.*, 2009; García-Bernal *et al.*, 2009; Ley *et al.*, 2007; Luster *et al.*, 2005). En el caso de los linfocitos T, las integrinas $\alpha 4$ y $\alpha L\beta 2$ son esenciales para la migración de estas células hacia lugares de inflamación, mientras que $\alpha L\beta 2$ y en menor medida $\alpha 4\beta 1$ participan en la migración hacia tejidos linfoides secundarios (Alon & Ley, 2008; Kinashi, 2007; Rose *et al.*, 2002; Berlin-Rufenach *et al.*, 1999).

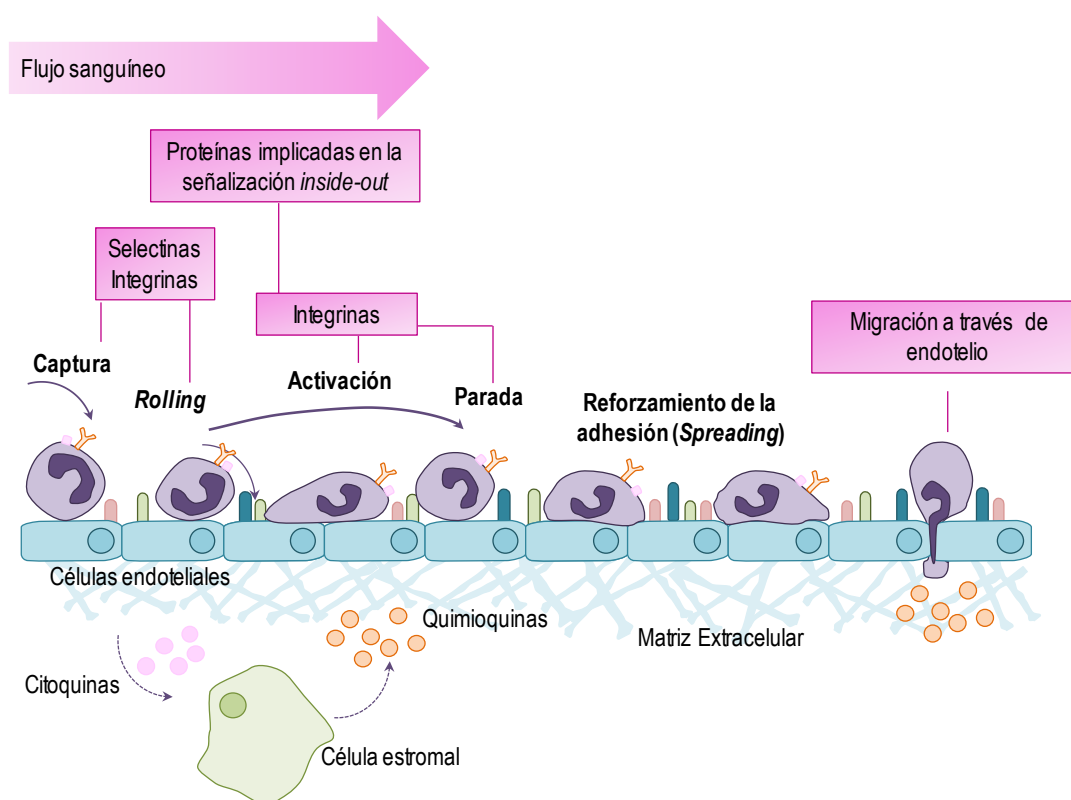


Figura 1. Modelo de migración leucocitaria. Las moléculas de adhesión presentes en la superficie celular de los leucocitos, así como sus ligandos expuestos por el endotelio vascular, juegan un papel crucial durante la migración leucocitaria. A su vez, las quimioquinas y sus receptores son determinantes para la consecución de las etapas secuenciales para que un leucocito migre a sitios de inflamación o a tejidos linfoides (Ley *et al.*, 2007).

Las integrinas

Los componentes de la familia de las integrinas median adhesión celular en procesos de homeostasis, diferenciación, desarrollo y organogénesis, así como durante el tráfico leucocitario y la respuesta inmune. Asimismo, contribuyen a la progresión tumoral y están implicadas en diversas patologías inflamatorias (Sun *et al.*, 2019; Moreno-Layseca *et al.*, 2019; Hamidi & Ivaska, 2018; Hynes, 2002). Las integrinas son glicoproteínas transmembrana heterodiméricas que participan en interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular (MEC), y que conectan la MEC con las adhesiones focales y el citoesqueleto de actina. A su vez, son capaces de transducir señales hacia el interior celular, activando múltiples vías de señalización relacionadas con proliferación, supervivencia, apoptosis, morfología y polarización celular, expresión génica y diferenciación. Entre las vías activadas por las integrinas destacan la señalización a través de las MAP quinasas, la vía PI3K-Akt y el sistema NF- κ B (Cooper & Giancotti, 2019; Hynes, 2002; Giancotti & Ruoslahti, 1999).

Las integrinas se componen de dos subunidades denominadas α y β , unidas de manera no covalente. Se han descrito 8 subunidades β y 18 subunidades α en mamíferos, que pueden combinarse y formar 24 dímeros $\alpha\beta$ diferentes. La especificidad de las integrinas por sus ligandos reside en ambas subunidades, confiriendo a cada uno de los miembros de esta familia una función específica no redundante y una distribución tisular determinada (**Figura 2**) (Moreno-Layseca *et al.*, 2019; Calderwood *et al.*, 2013; Hynes, 2002).

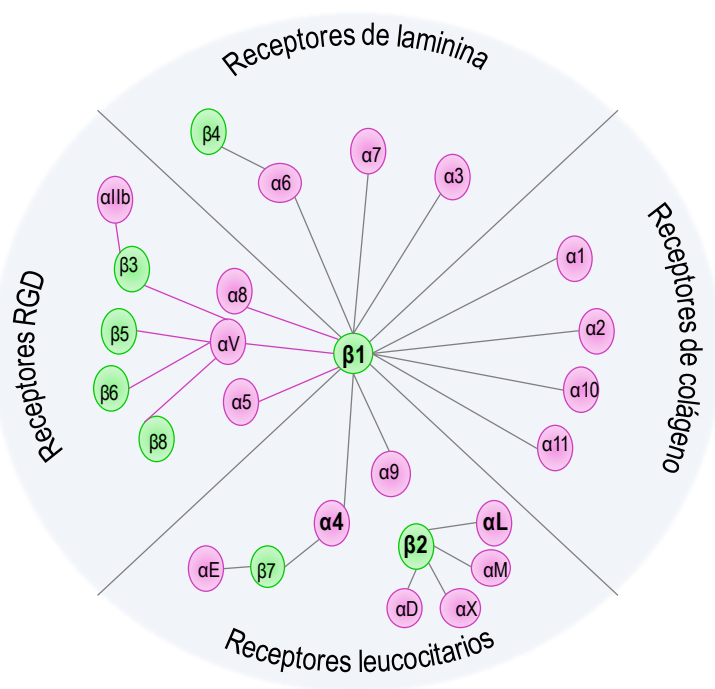


Figura 2. Familia de las integrinas. Subdivisión funcional de las integrinas. Se han destacado en negrita las integrinas importantes para el desarrollo de este trabajo (Hynes, 2002).

Las integrinas presentan un dominio extracelular que contiene la región de unión al ligando formado por ambas subunidades α y β , una región transmembrana (*transmembrane domain*, TMD), y un corto dominio intracelular con capacidad de interacción directa con diferentes proteínas intracelulares, las cuales pueden regular la activación de las integrinas (Calderwood *et al.*, 2013; Hynes, 2002). En la mitad de la región extracelular de algunas subunidades α se expresa el dominio αA o I, homólogo al dominio βA , dentro de los dominios β -propeller, constituyendo el principal sitio de unión al ligando (Dong *et al.*, 2012). Este dominio posee una región conservada de unión a cationes divalentes conocida como región MIDAS, la cual es crítica para la unión del ligando a la integrina (Figura 3) (Dong *et al.*, 2012; Zhang & Chen, 2012).

Los dominios TMD de las subunidades α y β pueden asociarse entre sí a través de interacciones electrostáticas de sus estructuras en hélice, promoviendo un estado de inactivación o de baja afinidad por los ligandos. La unión de estos TMD se desestabiliza cuando se produce la interacción de proteínas activadoras al dominio intracelular de las subunidades β (Moreno-Layseca *et al.*, 2019; Calderwood *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2011; Shattil *et al.*, 2010), lo que se traduce en la activación de las integrinas (Figura 3). Este dominio presenta dos motivos bien definidos y caracterizados: una secuencia NPxY próxima a la membrana celular, y otra secuencia NxxP más alejada de la membrana. Dichos motivos forman parte de dominios PTB (*phosphotyrosine-binding*), los cuales representan sitios de unión para proteínas reguladoras del estado de activación de las integrinas, como la talina, kindlin e ICAP-1 (Calderwood *et al.*, 2003; Calderwood & Ginsberg, 2003).

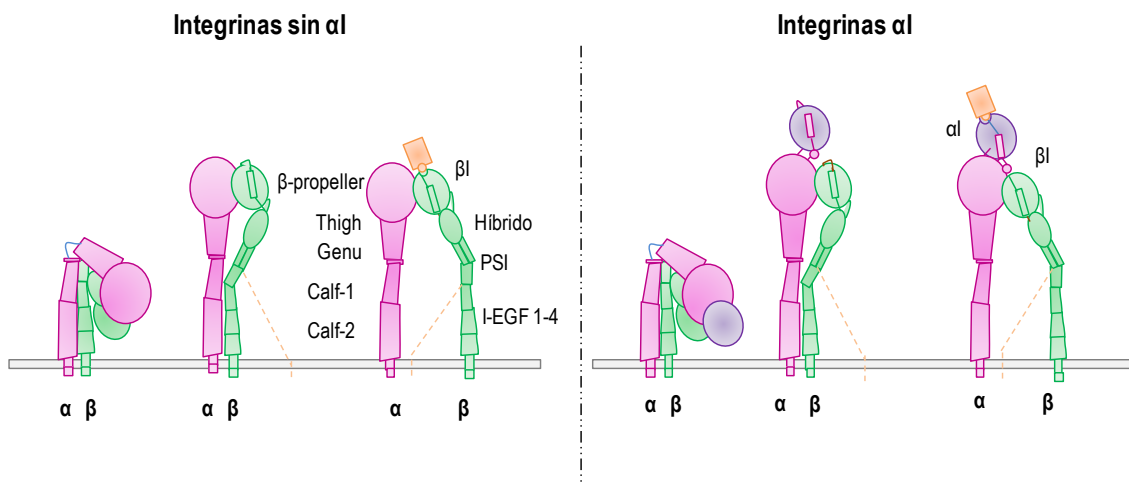


Figura 3. Estructura de las integrinas. Se muestran los diferentes dominios que conforman cada subunidad de la integrina, distinguiendo entre integrinas sin αI e integrinas αI . Además, se muestran las diferentes conformaciones según el estado de afinidad: baja afinidad o conformación plegada (izquierda), afinidad intermedia con conformación extendida pero dominios citoplasmáticos y TMD interaccionando (medio), y estado de alta afinidad con conformación extendida y dominios TMD y citoplasmáticos separados (derecha) (Shattil *et al.*, 2010).

Regulación de la activación de las integrinas

La activación de las integrinas refleja la afinidad por sus ligandos, y se asocia íntimamente con cambios dinámicos y reversibles de su conformación estructural. Como ya se ha mencionado, las integrinas leucocitarias presentan normalmente una conformación inactiva plegada incapaz de unirse a sus ligandos, mostrando los dominios TMD y citoplasmáticos de las subunidades α y β interaccionando entre sí. Las integrinas alcanzan la conformación de alta afinidad una vez que los dominios citoplasmáticos y la región TMD dejan de interaccionar y se separan (**Figuras 3 y 4**) (Calderwood *et al.*, 2013; Schurpf & Springer, 2011; Shattil *et al.*, 2010; Carman & Springer, 2003; Takagi *et al.*, 2002).

En base a estos datos, se han propuesto dos modelos de activación de las integrinas. En el primero de ellos, las integrinas adquieren una conformación extendida de alta afinidad como resultado de la señalización *inside-out*, interaccionando eficientemente y de forma monovalente con el ligando. El segundo modelo propone que la extensión de la integrina hacia conformaciones de alta afinidad viene dada posteriormente a la unión inicial del ligando o por cationes divalentes como el Mn^{2+} . Tras la interacción integrina-ligando de alta afinidad, el “*clustering*” o agrupamiento de varias moléculas de integrina en la membrana celular promueve un aumento de avidéz por los ligandos que se traduce en un reforzamiento de la adhesión. Conjuntamente, el aumento de afinidad y avidéz de las integrinas hace que diferentes proteínas de señalización intracelular y citoesqueleto, como FAK (*Focal Adhesion Kinase*), paxillina y Erk1/2, se asocien indirectamente a las integrinas para estimular señalización hacia el interior celular, lo que se denomina señalización *outside-in*. Dicha señalización induce la regulación de la polarización y dinámica del citoesqueleto de actina, expresión génica y supervivencia y proliferación celular (**Figura 4**) (Shattil *et al.*, 2010; Moser *et al.*, 2009; Ginsberg *et al.*, 2005).

Recientemente, se ha descrito un tercer tipo de señalización denominada “*inside-in*”, por el cual las integrinas que han sido endocitadas son asimismo capaces de transmitir señales intracelulares reclutando FAK u otros efectores, o aumentando la señalización de receptores de factores de crecimiento cercanos (**Figura 4**) (Wilson *et al.*, 2018; Hamidi & Ivaska, 2018; Nader *et al.*, 2016; Barrow-McGee *et al.*, 2016; Alanko *et al.*, 2015).

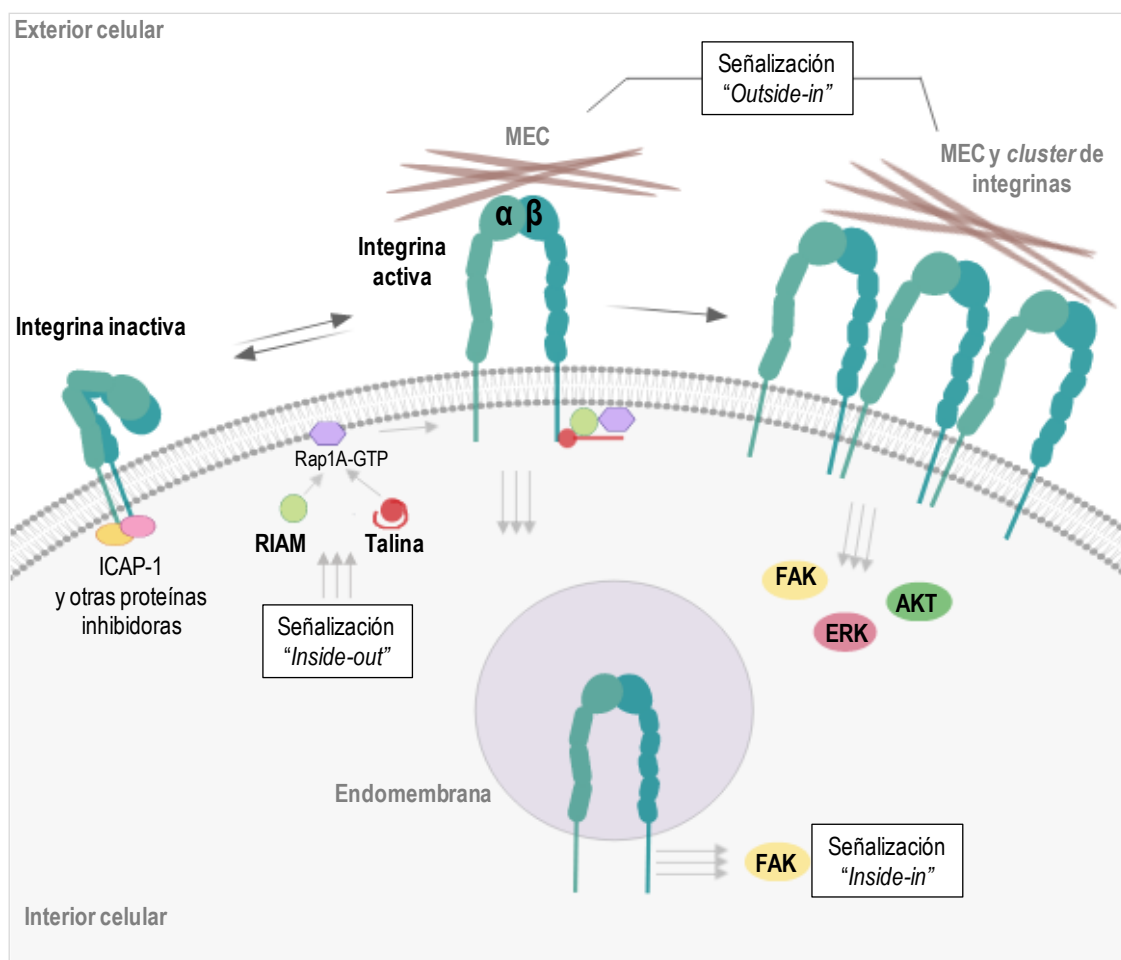


Figura 4. Regulación de la activación de las integrinas y señalización a través de las mismas. En la señalización *inside-out*, tras la activación de receptores acoplados a proteínas G presentes en la membrana celular, diferentes activadores intracelulares interaccionan con los dominios citoplasmáticos de las integrinas, promoviendo una variación conformacional que resulta en el aumento de la afinidad de estos heterodímeros por sus ligandos. La señalización *outside-in* se desencadena una vez que las integrinas transducen la señal hacia el interior celular tras haber reconocido y haber interactuado con sus ligandos extracelulares. La formación de *clusters* de integrinas en la membrana plasmática también promueve la señalización *outside-in*. Por último, se representa la señalización *inside-in*, por la cual, integrinas endocitadas transducen la señal al interior celular (Hamidi & Ivaska, 2018).

“Señalización *inside-out*”

La interacción de las quimioquinas con sus receptores, o la activación de otros receptores de membrana como el TCR en las células T o el BCR en células B, desencadena una señalización *inside-out*, que se traduce en conformaciones de alta afinidad de las integrinas (Alon & Ley, 2008; Batista *et al.*, 2007; Carman & Springer, 2003; Takagi *et al.*, 2002). En esta señalización, las proteínas talina y kindlin se unen a los motivos NPxY y NxxP del dominio citoplasmático de la subunidad β de las integrinas, respectivamente (Sun *et al.*, 2019; Shattil *et al.*, 2010; Moser *et al.*, 2009; Tadokoro *et al.*, 2003), favoreciendo la separación de los dominios intracelulares del heterodímero, y estimulando la unión al ligando (Calderwood *et al.*, 2013; Anthis *et al.*, 2009). En la

señalización *inside-out* dependiente de quimioquinas se reduce la difusión lateral de las integrinas en el plano de la membrana, mediante el anclaje de los dominios intracelulares de las integrinas al citoesqueleto de actina, lo que influye asimismo en la afinidad y avidéz de las integrinas. Esto ha sido observado para las integrinas $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha L\beta 2$ mediante la técnica de *single-particle tracking* (Sosa-Costa *et al.*, 2016; Cairo *et al.*, 2006).

Proteínas intracelulares reguladoras de la activación de las integrinas

La caracterización de moléculas que regulan la activación de las integrinas es de gran importancia por el papel clave de las integrinas en la polarización, morfología y motilidad celular (Sun *et al.*, 2019; Klapholz & Brown, 2017; Calderwood *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2012; Moser *et al.*, 2009). Talina y kindlin actúan como moléculas estimuladoras de la activación de las integrinas, mientras que ICAP-1 y filamina inhiben la activación de las mismas mediante competición por los sitios de unión de talina y kindlin. Se ha mostrado que cuando los residuos tirosina de los motivos NPxY y NxxY/F de las integrinas se encuentran fosforilados, los grupos fosfato conforman un impedimento estérico para la unión de proteínas activadoras, como talina y kindlin, lo que se traduce en una inhibición de la activación de las integrinas (Calderwood *et al.*, 2013; Ye *et al.*, 2011).

Talina

Se han descrito dos isoformas de talina en vertebrados codificadas por distintos genes: talina-1 y talina-2. La talina-1 participa en procesos de adhesión y *spreading* celular (Pridde *et al.*, 1998) y, desde ahora nos referiremos a ella como talina.

La talina presenta un dominio globular en su extremo amino-terminal, conocido como *talín head*, unido a una región carboxi-terminal denominado *talín rod* (filamentoso). Cuando ambos dominios interaccionan, se genera una conformación cerrada e inactiva de talina, que se localiza en el citoplasma (Hamidi & Ivaska, 2018; Banno *et al.*, 2012; Goksoy *et al.*, 2008). El dominio *talín head* contiene una región FERM (proteína 4.1, ezrina, radixina, moesina) conservada con tres subdominios (F1, F2 y F3), de los cuales el subdominio F3 incluye un motivo de tipo PTB con capacidad de unirse directamente a los motivos NPxY de los dominios citoplasmáticos de las subunidades β (**Figura 5**) (Wegener *et al.*, 2007; Czuchra *et al.*, 2006; Garcia-Alvarez *et al.*, 2003; Tadokoro *et al.*, 2003; Calderwood *et al.*, 2002; Calderwood *et al.*, 1999; O'Toole *et al.*, 1995). El puente salino entre las subunidades α y β , así como interacciones *van der Waals* entre las regiones transmembrana de estas subunidades, son probablemente responsables de mantener las integrinas en conformaciones de baja afinidad (Anthis *et al.*, 2009; Imai *et al.*, 2008). La unión de talina a los motivos NPxY interrumpe dichas interacciones, lo que induce una separación de los dominios citoplasmáticos, promoviendo cambios conformacionales que se propagan a través de la membrana celular, lo que finalmente se traduce en activación de las integrinas (Calderwood *et al.*, 2013; Ye *et al.*, 2011; Critchley, 2009; Tadokoro *et al.*, 2003; Calderwood *et al.*, 1999).

En la región carboxilo-terminal, la talina presenta un motivo de dimerización (DD) que facilita el *clustering* de integrinas (Sun *et al.*, 2019; Gingras *et al.*, 2008).

Para que la talina pueda unirse al dominio citoplasmático de la subunidad $\beta 1$, tiene que ser previamente activada. En leucocitos, esto tiene lugar mediante competición de la interacción de los dominios *head-rod* por la proteína RIAM, causando una conformación abierta de la talina. RIAM recluta talina a la membrana celular mediante la unión RIAM-Rap1, lo que finalmente conduce a la activación de las integrinas (**Figura 4**) (Bromberger *et al.*, 2018; Zhu *et al.*, 2017; Lagarrigue *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2014; Chang *et al.*, 2014; Banno *et al.*, 2012).

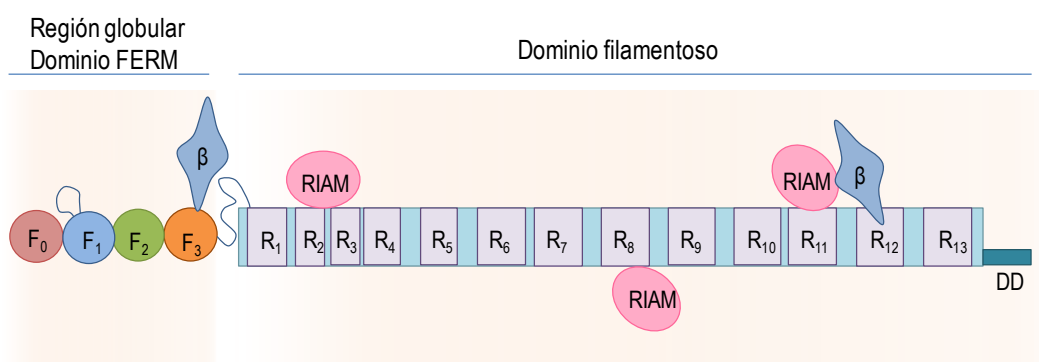


Figura 5. Estructura de la talina. La región globular (*talina-head*) amino-terminal de la talina contiene un dominio FERM capaz de unirse a los motivos NPxY de las subunidades β de las integrinas. En el dominio filamentoso o *rod*, existen sitios de unión a actina y vinculina, así como un segundo sitio de unión para las integrinas. En este dominio existen diferentes sitios de reconocimiento y unión para RIAM, una proteína que activa y recluta talina a la membrana plasmática. El dominio DD presente en el extremo carboxilo-terminal facilita la dimerización de talina (Calderwood *et al.*, 2013).

Los ratones *knockout* para talina son letales durante el desarrollo embrionario debido a defectos en la gastrulación (Monkley *et al.*, 2000). Estudios en modelos de ratón en los que se ha eliminado talina de manera condicional en linfocitos T o B, muestran que la talina es requerida para la migración de las células B a nódulos linfáticos (NL), pero su función no es esencial para la maduración folicular de estas células en bazo (Manevich-Mendelson *et al.*, 2010). Asimismo, la talina es necesaria para que se produzca una sinapsis inmune eficiente (Calderwood *et al.*, 2013; Wernimont *et al.*, 2011), y para agregación plaquetaria y formación de trombo (Nieswandt *et al.*, 2007; Petrich *et al.*, 2007).

Kindlin

Las proteínas kindlin presentan dominios FERM similares a los presentes en el *talin-head*. Estas proteínas reconocen los motivos NPxY distales del dominio citoplasmático de las subunidades β de las integrinas a través del subdominio F3 y, en cooperación con talina, promueven la activación de integrinas tales como α L β 2 y α 4 β 1 (**Figura 6**) (Rognoni *et al.*, 2016; Calderwood *et al.*, 2013; Moser *et al.*, 2009).

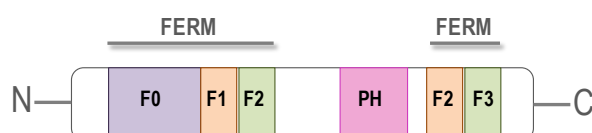


Figura 6. Estructura de las proteínas kindlin. Constan de dos dominios FERM y un dominio de homología con pleckstrina (PH). Se ha propuesto que el subdominio F3 es el responsable de la unión de kindlin al motivo distal NPxY de las subunidades β de las integrinas. (Rognoni *et al.*, 2016).

Dentro de la familia de proteínas kindlin se han descrito los miembros kindlin-1, kindlin-2 y kindlin-3 en vertebrados (Rognoni *et al.*, 2016). Su expresión no es ubicua, y en concreto, kindlin-3 se expresa en humanos mayoritariamente en células del sistema hematopoyético, aunque también se ha detectado su expresión en células endoteliales (Ruppert *et al.*, 2015; Bialkowska *et al.*, 2010).

Las proteínas kindlin impiden estéricamente la unión de proteínas inhibitoras de las integrinas, como la filamina (Takala *et al.*, 2008) y *sorting nexin 17* (Bottcher *et al.*, 2012). Una vez se produce la unión de kindlin y talina a las integrinas, estos complejos tienen una vida media corta, pudiendo estabilizarse tras la unión de la integrina a sus ligandos extracelulares (Alon, 2010).

En estudios detallados de la contribución de kindlin-3 en la migración y adhesión de las poblaciones celulares linfoides, se ha demostrado que es esencial en el refuerzo de la adhesión de células T especialmente vía α L β 2, pero no en la activación de estas células ni en la extravasación de las mismas (Morrison *et al.*, 2013; Cohen *et al.*, 2013; Moretti *et al.*, 2013). Kindlin-3 también juega un papel determinante en el *homing* linfocitario hacia NL mediante activación de integrinas β 2 (Morrison *et al.*, 2013).

Los ratones deficientes para kindlin-3 mueren pronto tras nacer debido a hemorragias severas, anemia, leucocitosis, pérdida de células madre y progenitoras hematopoyéticas en la MO, y osteoporosis (Rognoni *et al.*, 2016; Ruppert *et al.*, 2015; Schmidt *et al.*, 2011; Moser *et al.*, 2009; Moser *et al.*, 2008). Esto, junto con los defectos en la adhesión leucocitaria, son distintivos de la deficiencia de adhesión leucocitaria de tipo III (LAD III), para la que se ha descrito una pérdida de expresión de kindlin-3 (Rognoni *et al.*, 2016; Kuijpers *et al.*, 2009; Malinin *et al.*, 2009; Svensson *et al.*, 2009; Mory *et al.*, 2008).

ICAP-1

ICAP-1 compete con talina y kindlin por la unión al dominio intracelular de integrinas $\beta 1$, lo que se traduce en una regulación negativa de la activación de estas integrinas (Bouvard *et al.*, 2007; Zhang & Hemler, 1999; Chang *et al.*, 1997). En esta Tesis hemos caracterizado el posible papel de ICAP-1 en la regulación de la adhesión mediada por la integrina $\alpha 4\beta 1$, así como su potencial implicación en procesos de diferenciación del sistema inmune.

Integrin cytoplasmic domain-associated protein-1 (también conocido como *integrin beta 1 binding protein 1*, ITGB1BP1) se expresa ubicuamente, y se ha detectado su presencia tanto en el citoplasma como en el núcleo. En humanos, ICAP-1 se expresa en dos isoformas tras *splicing* alternativo: la isoforma ICAP-1 α , de 200 aminoácidos, y una isoforma de menor tamaño llamada ICAP-1 β , de 150 aminoácidos (Chang *et al.*, 1997). ICAP-1 α posee un dominio PTB que permite su interacción con un residuo de valina presente en el extremo 5' del motivo NPxY de la subunidad $\beta 1$ (Figura 7) (Liu *et al.*, 2013; Bouvard *et al.*, 2006; Chang *et al.*, 2002; Zhang & Hemler, 1999; Chang *et al.*, 1997). Por el contrario, ICAP-1 β carece de dicho dominio, por lo que no puede unirse a dicha subunidad. En el presente trabajo, hemos centrado nuestra atención en el estudio de la isoforma ICAP-1 α , a la que nos referiremos desde ahora como ICAP-1. El extremo N-terminal de ICAP-1 presenta sitios de fosforilación para quinasas como PKC, PKA/PKG, PAKs y CaMKII. Durante la adhesión celular, ICAP-1 es fosforilado por CaMKII, provocando la apertura de la proteína y la exposición del dominio PTB, el cual puede unirse a la subunidad $\beta 1$ e inducir la inactivación de las integrinas $\beta 1$ (Figura 7) (Millon-Fremillon *et al.*, 2013).

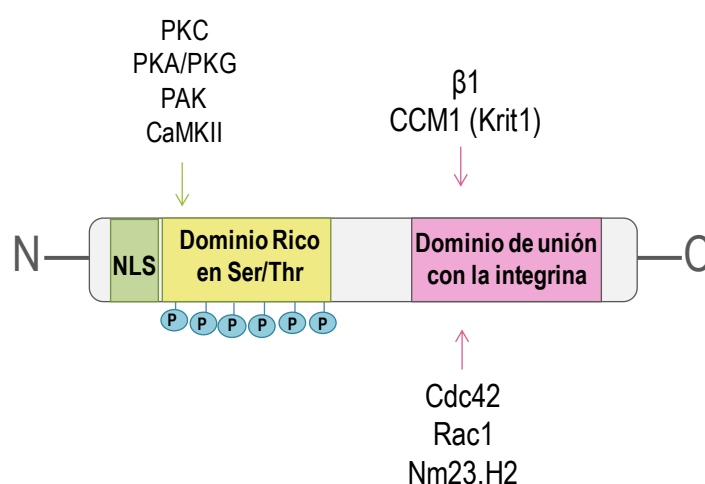


Figura 7. Estructura de ICAP-1. La región amino-terminal es rica en serinas y treoninas, presentando múltiples sitios de fosforilación para diferentes quinasas. En esta región se encuentra a su vez una secuencia de localización nuclear (NLS). La región carboxilo-terminal contiene el dominio de unión a la subunidad $\beta 1$ (Millon-Fremillon *et al.*, 2013; Bouvard *et al.*, 2006; Fournier *et al.*, 2005; Zhang & Hemler, 1999).

En las adhesiones focales (AF), lugar de *clustering* de integrinas, proteínas de citoesqueleto y adaptadoras, no se detecta la expresión de ICAP-1. Cuando se sobre-expresa ICAP-1, las AF se desorganizan y desaparecen, aumentando la movilidad celular, lo que sugiere un papel inhibitorio de ICAP-1 en la adhesión mediada por integrinas $\beta 1$, probablemente al interferir con la unión de talina a $\beta 1$ (Bouvard *et al.*, 2003).

El dominio PTB de ICAP-1 es asimismo reconocido por KRIT1 (*Krev interaction trapped 1* o CCM1), lo que provoca una aparente competición entre KRIT y $\beta 1$ por la unión a ICAP-1. Cuando KRIT se une a ICAP-1 lo secuestra, impidiendo su unión a la integrina, facilitando de este modo la interacción de talina con la subunidad $\beta 1$ y posterior activación de las integrinas $\beta 1$ (Calderwood *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2013). Además, la unión entre ICAP-1 y KRIT1 facilita la presentación de sitios de localización nuclear (NLS) presentes en ambas moléculas, promoviendo la translocación de ICAP-1 del citosol al núcleo (Draheim *et al.*, 2017; Fournier *et al.*, 2005). La localización nuclear de ICAP-1 parece depender de los niveles de expresión de integrinas $\beta 1$, dado que cuando se sobre-expresan dichas integrinas se reduce la localización nuclear de ICAP-1, sugiriendo que $\beta 1$ secuestraría a ICAP-1 en el citoplasma (Fournier *et al.*, 2005). Adicionalmente, la expresión de ICAP-1 ha sido asociada con estimulación de proliferación celular dependiente de su localización nuclear, observándose que ICAP-1 es capaz de activar a c-Myc *in vitro* (Fournier *et al.*, 2005).

ICAP-1 puede unirse asimismo a las GTPasas Cdc42 y Rac1, pudiendo actuar como un *Guanine Dissociation Inhibitor* al inhibir el intercambio de GDP por GTP, manteniendo las GTPasas en la conformación inactiva unida a GDP (Degani *et al.*, 2002). Cuando se sobre-expresa ICAP-1, se observa un defecto en el *spreading* celular, lo que podría deberse a la reducción en la actividad de Rac1 y Cdc42 (Bouvard *et al.*, 2003; Degani *et al.*, 2002).

Los ratones deficientes en ICAP-1 muestran letalidad perinatal, además de una deficiencia en el proceso de osteoblastogénesis. Asimismo, se observó un retraso en la formación de estructuras óseas debido a una reducción de la proliferación de los osteoblastos, así como a un retraso en el proceso de mineralización ósea (Bouvard *et al.*, 2007). Otras alteraciones descritas para los ratones carentes de ICAP-1, fueron la disminución del tamaño de los ratones y un dimorfismo craneofacial, consecuencias de la disfunción en el programa de osteoblastogénesis (Bouvard *et al.*, 2007). Adicionalmente, los osteoblastos de los ratones *knockout* (KO) para ICAP-1 mostraron un aumento de la activación de integrinas $\beta 1$ en comparación con ratones control (Bouvard *et al.*, 2007).

La integrina $\alpha 4\beta 1$

$\alpha 4\beta 1$, también conocida como *Very Late Antigen-4* (VLA-4), se expresa en progenitores hematopoyéticos de MO, en linfocitos, mastocitos, basófilos, monocitos y macrófagos, en células dendríticas y NK, en neutrófilos y eosinófilos (Rose *et al.*, 2007; Rose *et al.*, 2002; Lobb & Hemler, 1994). Adicionalmente, se expresa en células de la

cresta neural (Kirby & Hutson, 2010; P Tucker, 2004) y en melanoma (Klemke *et al.*, 2007; Makarem *et al.*, 1994; Bednarczyk & McIntyre, 1992).

$\alpha 4\beta 1$ desempeña un papel crucial en la vigilancia inmunitaria al controlar el tráfico leucocitario, participando en la adhesión y extravasación de linfocitos a sitios de inflamación, y coopera con la integrina $\alpha L\beta 2$ en la migración linfocitaria a órganos linfoides secundarios (Rose *et al.*, 2007; Laudanna & Alon, 2006; Rose *et al.*, 2002). Durante la hematopoyesis en la MO, $\alpha 4\beta 1$ contribuye a la generación de progenitores linfoides (Arroyo *et al.*, 2000; Arroyo *et al.*, 1996), regulando su adhesión al estroma medular (Teixidó *et al.*, 1992; Simmons *et al.*, 1992; Ryan *et al.*, 1991). También es relevante en patologías inflamatorias como la esclerosis múltiple (Luster *et al.*, 2005), y en neoplasias hematológicas como en el caso del mieloma múltiple o la leucemia linfocítica crónica de células B (Martinez-Moreno *et al.*, 2016; Garcia-Bernal *et al.*, 2013; Ugarte-Berzal *et al.*, 2012; Hartmann *et al.*, 2009; Pleyer *et al.*, 2009; Redondo-Munoz *et al.*, 2006; Mori *et al.*, 2004; Sanz-Rodriguez *et al.*, 1999; Lokhorst *et al.*, 1994).

La delección de $\alpha 4$ conlleva la mortalidad de los ratones al implicar defectos en la placenta y en el corazón (Yang *et al.*, 1995). En modelos de ratón en los que $\alpha 4\beta 1$ se expresa de forma condicional en el sistema hematopoyético, se determinó que su ausencia no afectaba a la linfopoyesis y mielopoyesis, si bien alteraba el número y distribución de progenitores hematopoyéticos al afectar a la transmigración de los mismos (Bungartz *et al.*, 2006; Gribi *et al.*, 2006; Scott *et al.*, 2003). Sin embargo, el estudio con ratones KO para $\alpha 4$ determinó que $\alpha 4\beta 1$ era requerida tan solo durante estadios fetales y neonatales del desarrollo durante el comienzo en la producción de las HSCs (Gribi *et al.*, 2006), un proceso esencial para la posterior producción de los distintos linajes hematopoyéticos. Por otro lado, utilizando ratones quiméricos para la expresión de $\alpha 4$, se observó que $\alpha 4\beta 1$ no parecía desenvolver un papel relevante en la timopoyesis durante el desarrollo embrionario (Arroyo *et al.*, 2000).

Los principales ligandos para $\alpha 4\beta 1$ son VCAM-1 y la fibronectina (Figura 8) (Rose *et al.*, 2002).

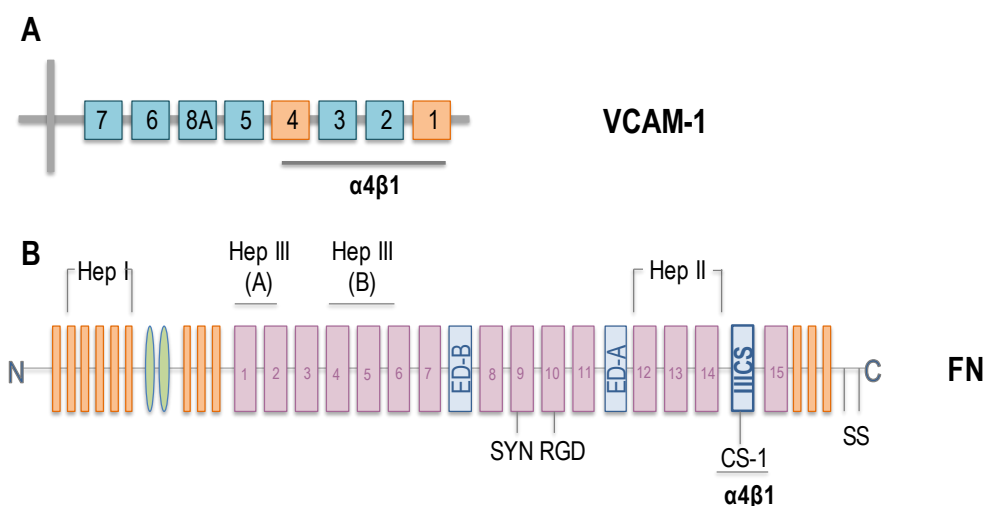


Figura 8. Estructura de VCAM-1 y fibronectina, ligandos para $\alpha 4\beta 1$. (A) Se muestra la forma de 8 dominios de tipo Ig de VCAM-1. Los dominios de interacción con la integrina $\alpha 4\beta 1$ son el 1 y el 4. (B) Esquema representativo de los dominios estructurales de la fibronectina. En el extremo carboxilo-terminal se encuentra el dominio IIICS que integra el motivo CS-1 de alta afinidad para la interacción con $\alpha 4\beta 1$.

VCAM-1

VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule-1*) es una glicoproteína de membrana perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas, y que está formada por 8 repeticiones de dominios tipo inmunoglobulina, aunque pueden aparecer variantes de 3, 6, y 7 dominios de este tipo, según determine el *splicing* alternativo. Dos de estos dominios, el 1 y el 4, son los responsables de la unión a $\alpha 4\beta 1$ (Figura 8A) (Osborn *et al.*, 1992; Polte *et al.*, 1990; Osborn *et al.*, 1989).

VCAM-1 se expresa en células endoteliales, en la microvasculatura medular y en células estromales de la MO, en macrófagos del bazo y en células dendríticas, así como en células epiteliales de la corteza y de la zona cortico-medular del timo (Salomon *et al.*, 1997; Castro *et al.*, 1997; Jacobsen *et al.*, 1996; Osborn *et al.*, 1989). La expresión de VCAM-1 es inducida por diferentes citoquinas, entre las que se incluyen TNF- α , IL-1, IL-4 e IL-13 (Sironi *et al.*, 1994; Neish *et al.*, 1992; Swerlick *et al.*, 1992; Osborn *et al.*, 1992; Osborn *et al.*, 1989).

La delección homocigota de VCAM-1 es letal durante la embriogénesis (Gurtner *et al.*, 1995). En ratones con delección condicional de VCAM-1 en células hematopoyéticas y en células endoteliales, se detectó una reducción de la población de células B inmaduras presentes en la MO, mientras que en sangre periférica se observó un aumento de los niveles de esta población celular (Koni *et al.*, 2001). Además, el reclutamiento de células T y B maduras a la MO es menor en los ratones condicionales para VCAM-1 (Koni *et al.*, 2001). Estos datos, junto con otros estudios, fueron determinantes para concluir que VCAM-1 desarrollaba un papel relevante durante la migración linfocitaria hacia la MO así como en la producción y desarrollo de células B,

al afectar a la movilización de las mismas (Koni *et al.*, 2001; Mazo *et al.*, 1998; Koopman *et al.*, 1994; Miyake *et al.*, 1991; Koopman *et al.*, 1991).

En diferentes patologías como la esclerosis múltiple, la artritis reumatoide, la aterogénesis, el asma, la apendicitis y la dermatitis, se observa un aumento en la expresión de VCAM-1. Se ha propuesto que dicho aumento podría facilitar el reclutamiento y retención de leucocitos en el tejido inflamado de manera exacerbada mediante adhesión dependiente de $\alpha 4\beta 1$ (Carter *et al.*, 2001; Iiyama *et al.*, 1999; Baron *et al.*, 1993).

Aunque la interacción $\alpha 4\beta 1$ /VCAM-1 puede participar en el *rolling* de los leucocitos sobre el endotelio vascular, destaca notablemente su papel en la adhesión estable de estas células al endotelio, lo que constituye un factor crítico en el inicio de la extravasación leucocitaria tanto en condiciones fisiológicas como durante procesos inflamatorios y autoinmunes (Rose *et al.*, 2002).

Fibronectina

La fibronectina (FN) es una glicoproteína secretada por múltiples tipos celulares y que está presente en la MEC, detectándose asimismo en forma soluble en plasma (Pankov & Yamada, 2002). Tras *splicing* alternativo se originan dos cadenas polipeptídicas A y B de la FN que interactúan entre ellas a través de puentes disulfuro en sus extremos carboxilo-terminales. A lo largo de la molécula de FN existen dominios estructurales y funcionales que participan en la unión a macromoléculas presentes en la MEC como la fibrina, heparina y proteoglicanos, y a receptores de adhesión celular (**Figura 8B**). La FN interactúa con $\alpha 4\beta 1$ a través de varios dominios siendo el de mayor afinidad el denominado IIICS que contiene la región CS-1 y se localiza en el extremo carboxilo-terminal de la molécula (**Figura 8B**) (García-Pardo & Ferreira, 1990; Guan & Hynes, 1990; Wayner *et al.*, 1989). $\alpha 4\beta 1$ también reconoce los dominios Hep II y Hep III presentes en la FN (**Figura 8B**) (Moyano *et al.*, 1997). Cuando la integrina $\alpha 4\beta 1$ se encuentra en su conformación activa es capaz de reconocer la secuencia RGD, situada en el dominio central de la FN (Sanchez-Aparicio *et al.*, 1994) que asimismo interactúa con las integrinas $\alpha 5\beta 1$ y $\alpha V\beta 3$ (Sanchez-Aparicio *et al.*, 1994). Durante el desarrollo de este trabajo se ha utilizado el fragmento recombinante FN-H89 (Mould *et al.*, 1994), denominado como CS-1/FN en la presente Tesis Doctoral, el cual contiene la región CS-1 de la fibronectina.

Las quimioquinas y sus receptores

Las moléculas quimioatrayentes son esenciales en procesos de inflamación, vigilancia inmunitaria y desarrollo, así como en procesos tumorales. Las quimioquinas constituyen una familia de citoquinas de bajo peso molecular, inicialmente descritas como mediadoras del tráfico de poblaciones leucocitarias (Lopez-Cotarelo *et al.*, 2017; Schulz *et al.*, 2016; Griffith *et al.*, 2014; Zlotnik & Yoshie, 2012; Proudfoot, 2002; Gerard & Rollins, 2001; Rossi & Zlotnik, 2000). Asimismo, pueden influir en el tránsito de otros tipos celulares,

y participar en la angiogénesis (Belperio *et al.*, 2000; Campbell *et al.*, 1998), en la hematopoyesis (Lim *et al.*, 2017), en el desarrollo del sistema nervioso (Campbell *et al.*, 1998), en enfermedades autoinmunes e incluso durante la invasión y metástasis de células tumorales (Robledo *et al.*, 2001; Gerard & Rollins, 2001; Rossi & Zlotnik, 2000). Las quimioquinas promueven señalización celular que se traduce en activación y estimulación de la adhesión celular mediada por integrinas (Mellado *et al.*, 2001; Hidalgo *et al.*, 2001; Grabovsky *et al.*, 2000; von Andrian & Mackay, 2000; Peled *et al.*, 2000; Sallusto *et al.*, 1998; Campbell *et al.*, 1998). Asimismo, tienen una función importante en la diferenciación de los linfocitos T y en la modulación de la respuesta Th1/Th2 (Sallusto *et al.*, 1998).

Las quimioquinas presentan cuatro residuos de cisteínas altamente conservados en el extremo amino-terminal. La primera y la tercera cisteína, así como la segunda y la cuarta, se unen entre sí mediante un puente disulfuro, y la posición relativa de las cisteínas próximas al extremo amino-terminal sirve para clasificar a las quimioquinas en cuatro familias: C, CC, CXC y CX3C. En el grupo de quimioquinas CC, sus componentes muestran las cisteínas de manera contigua; en el grupo CXC, aparece un aminoácido entre ambas cisteínas, mientras que en el grupo CX3C hay tres aminoácidos entre las cisteínas; finalmente, en el grupo C aparece un sólo residuo de cisteína (Zlotnik & Yoshie, 2012; Zlotnik & Yoshie, 2000; Rossi & Zlotnik, 2000).

Actualmente, existe otra clasificación que se basa en el tipo de función ejercida por las quimioquinas diferenciando entre quimioquinas inflamatorias o inducibles, quimioquinas homeostáticas y quimioquinas con función dual. Las primeras aumentan su expresión durante procesos inflamatorios, e inducen el reclutamiento leucocitario a sitios de inflamación. Mediadores inflamatorios como el TNF- α o el IFN- γ , promueven la expresión de estas quimioquinas. El segundo grupo de quimioquinas se expresa de manera constitutiva en órganos linfoides, y participan en la migración homeostática de distintos tipos celulares a nivel basal, contribuyendo al correcto funcionamiento del sistema inmune (Zlotnik & Yoshie, 2012; Allen *et al.*, 2007). Las quimioquinas de dicho grupo están implicadas en el tráfico de linfocitos T y B a través de áreas especializadas de los órganos linfoides secundarios y durante procesos de vigilancia inmunitaria en zonas expuestas constantemente al medio externo, como pueden ser los pulmones, la piel o la mucosa intestinal. Las quimioquinas con función dual deben su nombre a que algunas de ellas que se expresan constitutivamente pueden ver regulada su expresión por estímulos dependiendo del contexto biológico o patológico (Griffith *et al.*, 2014; Zlotnik & Yoshie, 2012).

Una característica de las quimioquinas y sus receptores es su promiscuidad, de modo que una misma quimioquina puede unirse a diferentes receptores, y un mismo receptor puede transducir señales concretas procedentes de diferentes quimioquinas, aunque siempre manteniendo la especificidad por la familia. Esto genera una elevada capacidad regulatoria de las quimioquinas sobre diferentes poblaciones celulares, aunque estas moléculas pueden mostrar especificidad tisular (Zlotnik & Yoshie, 2012). Las quimioquinas interaccionan asimismo con glicosaminoglicanos (GAGs), los cuales pueden estar unidos a proteínas presentes en la superficie celular o formando parte de la MEC (Kufareva *et al.*, 2015). Esta interacción conlleva la retención de quimioquinas en

la superficie de vasos sanguíneos pertenecientes a órganos linfoides secundarios (*high endothelial venules*, HEV), un evento esencial para que los linfocitos puedan migrar desde la sangre a estos tejidos linfoides. A su vez, los GAGs también contribuyen a la generación de gradientes de quimioquinas que permiten la correcta migración leucocitaria (Schumann *et al.*, 2010; Allen *et al.*, 2007).

Las quimioquinas se unen a receptores de membrana acoplados a GPCRs. Estos receptores poseen siete dominios transmembrana, de modo que para la unión con las quimioquinas interviene el dominio amino-terminal y tres bucles extracelulares, mientras que el extremo carboxilo-terminal y bucles intracelulares actúan como acopladores de moléculas transductoras de señal (Allen *et al.*, 2007; Proudfoot, 2002; Murdoch & Finn, 2000).

Cuando una quimioquina interacciona con su receptor se produce un cambio conformacional en la región intracelular del mismo que desencadena una señalización que incluye diversas vías implicadas en la activación celular. Los cambios en la conformación del receptor favorecen el intercambio de GDP por GTP por parte de las proteínas G heterotriméricas ($G\alpha\beta\gamma$). Cuando el receptor se activa, la subunidad $G\alpha$ se disocia de $G\beta\gamma$, y ambas proteínas actúan sobre sus moléculas efectoras respectivas de manera independiente. La actividad GTPasa intrínseca de la subunidad $G\alpha$ limita la activación de las proteínas G, dado que la hidrólisis de GTP causa la re-asociación de GDP- $G\alpha$ con $G\beta\gamma$, de manera que la señalización finaliza (Oldham & Hamm, 2008; Neves *et al.*, 2002).

Existen diferentes subunidades $G\alpha$ ($G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_q$ y $G\alpha_{12/13}$) que pueden acoplarse a los receptores de las quimioquinas (Pierce *et al.*, 2002; Julia Marinissen & Gutkind, 2001), lo que se traduce en la activación de distintas rutas de señalización tales como Jak/STAT, las MAP quinasas, la vía PI3K/Akt, y la estimulación de miembros de la familia de las Rho-GTPasas (**Figura 9**) (Mellado *et al.*, 2001; Vicente-Manzanares *et al.*, 1999).

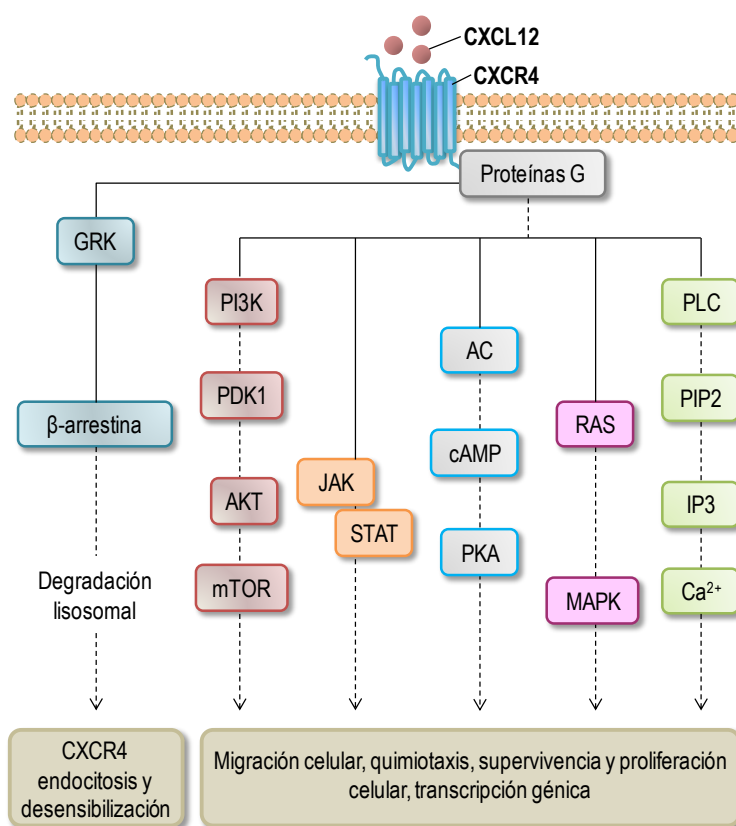


Figura 9. Vías de señalización intracelular estimuladas por la interacción quimioquina-receptor. Se muestra el ejemplo de la unión entre la quimioquina CXCL12 y su receptor CXCR4. Dicha unión activa diferentes vías de señalización intracelulares entre las que destacan PI3K-Akt-mTOR, Jak-STAT, Ras-MAPK y PLC, mientras que se bloquea la adenilato ciclasa y la producción de cAMP. Esta regulación afecta a la migración, proliferación y supervivencia celular, así como a la expresión génica. Las quinasas asociadas a los receptores acoplados a proteínas G (GRKs), tras la unión con β-arrestina, desensibilizan el receptor al promover su internalización (Teixidó *et al.*, 2018).

La activación de los receptores de quimioquinas es transitoria, por lo que son desensibilizados rápidamente y no responden a estimulaciones posteriores. Este proceso es regulado mediante la fosforilación de los dominios intracelulares del receptor por parte de las *G-protein associated kinases* (GRKs), causando la unión de β-arrestinas a estos receptores fosforilados, lo que provoca su internalización y degradación en los lisosomas (Figura 9) (Shenoy & Lefkowitz, 2011). Se ha demostrado asimismo que la homodimerización o heterodimerización dinámica de los receptores de quimioquinas puede aumentar la sensibilidad de los mismos y ampliar las respuestas dependientes de quimioquinas (Martinez-Munoz *et al.*, 2018; Mellado *et al.*, 2001).

CXCL12/CXCR4

CXCL12, también denominada *Stromal cell-Derived Factor-1* (SDF-1), pertenece a la familia CXC de las quimioquinas y está altamente conservada entre las especies

murina y humana (Crump *et al.*, 1997). Se han descrito diferentes isoformas de CXCL12 resultado de *splicing* alternativo, si bien las principales son la α y la β . La isoforma con la que hemos desarrollado este trabajo es CXCL12 α , la cual se expresa abundantemente en médula ósea, así como en timo y ganglios linfáticos, en pulmón, hígado, riñones, encéfalo, piel e intestino delgado (Yu *et al.*, 2006; Sugiyama *et al.*, 2006; Shirozu *et al.*, 1995). Desde ahora denominaremos como CXCL12 a la isoforma α . CXCL12 tiene un papel importante en la homeostasis del sistema inmune, puesto que actúa como quimioatrayente de linfocitos *naïve* y de células memoria B y T, de monocitos y de precursores hematopoyéticos (Teixidó *et al.*, 2018; Pawig *et al.*, 2015). Asimismo, regula la cardiogénesis, neurogénesis y la metástasis tumoral. Al igual que otras quimioquinas, CXCL12 puede ser secuestrada por glicosaminoglicanos presentes en las superficies endoteliales, facilitando gradientes de la quimioquina que estimulan la diapédesis leucocitaria (Netelenbos *et al.*, 2003; Amara *et al.*, 1999).

CXCL12 se expresa constitutivamente, pero su expresión puede ser inhibida por TGF- β 1 en células estromales de MO, lo que afecta la adhesión y la migración de precursores hematopoyéticos y de células de mieloma múltiple (MM) (Wright *et al.*, 2003). IL-1 β y TNF- α causan asimismo una reducción en la expresión de esta quimioquina, lo que se ha relacionado con la movilización de células B y con un aumento de la población granulocítica (Ueda *et al.*, 2004). De manera opuesta, otros agentes como el G-CSF aumentan la expresión de CXCL12 de forma transitoria en osteoblastos de MO y en bazo (Petit *et al.*, 2002).

CXCR4 es el principal receptor de CXCL12, dado su papel clave durante el desarrollo neural, la hematopoyesis y la vigilancia inmunitaria, de modo similar a los procesos regulados por dicha quimioquina. CXCR4 se expresa en linfocitos T y B, progenitores hematopoyéticos, células endoteliales, y en monocitos y macrófagos, entre otros tipos celulares (Gupta *et al.*, 1998; Bleul *et al.*, 1996; Oberlin *et al.*, 1996). Su implicación en procesos tumorales ha sido ampliamente caracterizada, y se ha propuesto en múltiples ocasiones como diana terapéutica (Teixidó *et al.*, 2018; Bartolome *et al.*, 2004; Balkwill, 2004; Epstein, 2004; Robledo *et al.*, 2001; Muller *et al.*, 2001). CXCR4 se une inicialmente a los residuos 12-17 de la región amino-terminal de CXCL12, lo que se traduce en un cambio conformacional del receptor, el cual interacciona posteriormente con los residuos 1-8 N-terminales de la quimioquina, de los cuales los residuos 1 (Lys) y 2 (Pro) están directamente involucrados en la activación de CXCR4 (Crump *et al.*, 1997). Tras la interacción CXCL12/CXCR4 se activa la maquinaria intracelular que permite la unión de proteínas G heterotriméricas a dicho receptor, estimulando numerosas vías de señalización que regulan la migración, y la viabilidad y proliferación celular (**ver Figura 9**) (Teixidó *et al.*, 2018; Mellado *et al.*, 2001). Dicha interacción controla asimismo la distribución celular de diversos componentes de las adhesiones focales, e induce la reorganización del citoesqueleto de actina (García-Bernal *et al.*, 2005; Bartolome *et al.*, 2004; Mellado *et al.*, 2001). El eje CXCL12/CXCR4 regula la capacidad adhesiva de integrinas α 4 β 1, α L β 2 y α 4 β 7 mediante señalización *inside-out*, influyendo de este modo en la migración y la extravasación leucocitaria (Wright *et al.*, 2003; Hidalgo *et al.*, 2001; Grabovsky *et al.*, 2000; von Andrian & Mackay, 2000).

Los ratones *knockout* para CXCL12 o CXCR4 presentan letalidad durante el desarrollo embrionario al mostrar una vascularización defectuosa del tracto gastrointestinal y una formación errónea del tabique cardíaco y el cerebelo (Tachibana *et al.*, 1998; Zou *et al.*, 1998; Nagasawa *et al.*, 1996). También han sido descritos defectos en la generación de linfocitos de linaje B y de la población mieloide, al afectar a la distribución y colonización de la MO por progenitores hematopoyéticos (Teixidó *et al.*, 2018; Ara *et al.*, 2003; Kawabata *et al.*, 1999; Ma *et al.*, 1998).

Si bien CXCR4 constituye el receptor principal para CXCL12, CXCR7 (también denominado ACKR3) se ha descrito como otro receptor capaz de interactuar con CXCL12. Inicialmente se clasificó CXCR7 como receptor atípico o *decoy receptor*, con capacidad de secuestro de CXCL12 sin desencadenar una señalización. Sin embargo, se ha demostrado que CXCR7 puede señalizar a través de la ruta de las MAP quinasas (Graham *et al.*, 2012; Maksym *et al.*, 2009). Adicionalmente, se ha demostrado recientemente que MIF (*macrophage migration inhibitory factor*) puede unirse a CXCR4, lo que se traduce en activación del receptor, quimiotaxis y adhesión de linfocitos T (Bernhagen *et al.*, 2007).

II. EL MIELOMA MÚLTIPLE Y RESISTENCIA A QUIMIOTERAPIA

El MM es una neoplasia hematológica caracterizada por la acumulación de linfocitos B maduros, conocidos también como células plasmáticas, malignos en la MO. La colonización multifocal de la MO por parte de las células tumorales afecta la hematopoyesis de los pacientes con MM, provocando anemia, inmunodeficiencias y lesiones óseas, y, posteriormente, enfermedad renal e hipercalcemia (Pawlyn & Morgan, 2017; Bianchi & Munshi, 2015; Kuehl & Bergsagel, 2012; Anderson & Carrasco, 2011). En Estados Unidos y Europa, el MM constituye el segundo tumor hematológico más frecuente, con una incidencia de 6/100000, y representa más del 1% del total de procesos cancerígenos (Moreau *et al.*, 2015; Bianchi *et al.*, 2012). Según la *American Cancer Society*, en Estados Unidos se diagnosticarán más de 32000 nuevos casos de MM en el transcurso de 2019, y casi 13000 personas morirán debido a esta enfermedad. Además, como consecuencia del aumento en la esperanza de vida de la población en países desarrollados, se estima que la incidencia de esta patología aumente en los próximos años (van Nieuwenhuijzen *et al.*, 2018). Aún con todos los avances conseguidos mediante el desarrollo de terapias anti-MM, como los inhibidores del proteasoma, agentes inmunomoduladores, anticuerpos monoclonales, CAR-T *cells* y trasplante autólogo de HSCs (Dong & Ghobrial, 2019; Hoyos & Borrello, 2016; Kumar & Anderson, 2016; Orłowski & Lonial, 2016; Atanackovic *et al.*, 2016), el MM sigue siendo incurable. Esto hace necesario identificar nuevas dianas terapéuticas, tanto en las células de MM como en el microambiente tumoral para desarrollar nuevos tratamientos que consigan detener la progresión de la enfermedad, así como reducir las respuestas de resistencia a las terapias contra el MM (Bianchi & Munshi, 2015).

Dado que las células de MM dependen de moléculas de adhesión y receptores de quimioquinas para su retención y tráfico en la MO, así como para la progresión de la enfermedad y respuestas de resistencia, el diseño de terapias dirigidas frente a estas moléculas constituye una posible alternativa para el tratamiento de dicha neoplasia. Así, se están desarrollando estrategias basadas en anticuerpos monoclonales y CAR-T *cells* frente a moléculas implicadas en el tráfico de células de MM, como CXCR4, CD44 y SLAMF1, las cuales pueden aumentar las oportunidades de tratamiento del MM (Redondo-Muñoz *et al.*, 2019).

Las células plasmáticas y el origen del mieloma múltiple

Tras su interacción con células T, las células B de los centros germinales (CGs) se activan y proliferan, y parte de la población acaba diferenciándose en células B plasmáticas de vida corta, las cuales producen y secretan anticuerpos de baja afinidad por los antígenos (Melchers, 2015; Hardy & Hayakawa, 2001). Otra población de células B presente en los CGs prolifera activamente y experimenta numerosas rondas de hipermutación somática y recombinación de las cadenas formadoras de las inmunoglobulinas (Ig), además de cambios en el isotipo y maduración de la afinidad de los anticuerpos. Durante estos procesos se pueden producir deleciones o inserciones, mutaciones puntuales e incluso duplicaciones de los genes de las inmunoglobulinas. Todo

esto confiere a estas células la capacidad de secretar una elevada variedad de anticuerpos que hagan frente a una amplia diversidad de antígenos. Tras esta etapa, se generan células B de memoria y células plasmáticas de vida larga en los CGs. Estas últimas no son capaces de proliferar y se caracterizan por secretar una elevada cantidad de anticuerpos. Finalmente, las células plasmáticas maduras migran mayoritariamente a la MO y se asientan en nichos ricos en IL-6 producida por el estroma medular, lo que contribuye a que estas células sobrevivan en dicho ambiente (Melchers, 2015; Hardy & Hayakawa, 2001).

El MM está considerada como una neoplasia de células plasmáticas post-CG (Kuehl & Bergsagel, 2012). Se desarrolla frecuentemente precedido de estadios iniciales asintomáticos sin una clara manifestación clínica. Estos estadios se conocen como gammapatía monoclonal de significado incierto (*Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance*, MGUS) y mieloma latente (*Smoldering Multiple Myeloma*, SMM). En una gran parte de los casos, el MGUS progresa a SMM y acaba evolucionando a MM (Figura 10) (van Nieuwenhuijzen *et al.*, 2018; Moreau *et al.*, 2015; Bianchi & Munshi, 2015; Kuehl & Bergsagel, 2012; Morgan *et al.*, 2012).

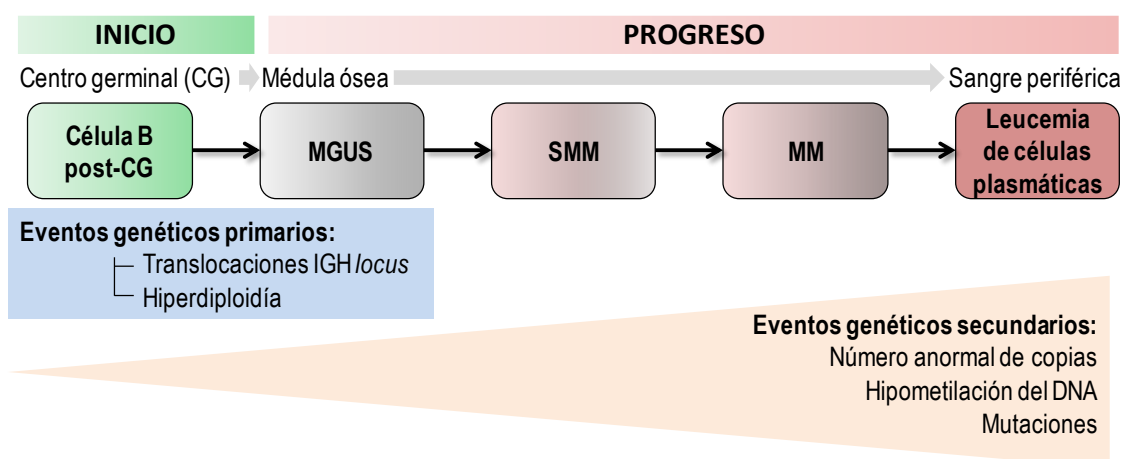


Figura 10. Inicio y progresión del mieloma. EL MGUS y el SMM son estadios asintomáticos previos al MM. En etapas avanzadas de la enfermedad, las células plasmáticas tumorales dejan de estar confinadas en la MO y aparecen en periferia. La transición entre estos estadios requiere alteraciones genéticas, comenzando en las células clonales que conforman el MGUS. Estas variaciones genéticas proporcionan una ventaja selectiva que promueve la expansión y evolución clonal de las células de MM hacia estadios de la enfermedad más avanzados (Morgan *et al.*, 2012).

El MGUS se detecta en un porcentaje de alrededor de un 4% de individuos mayores de 50 años, y presenta una infiltración menor del 10% de células plasmáticas malignas en MO. Debido a que dichas células infiltradas proceden de un mismo clon, éstas son capaces de producir muchas copias de un solo anticuerpo, lo que confiere el nombre de gammapatía monoclonal a esta etapa. Este anticuerpo se denomina proteína M o paraproteína, y en esta discrasia se detecta en niveles menores de 3 g/dl en sangre. El MGUS no siempre acaba desarrollándose en MM (Bianchi & Munshi, 2015; Morgan

et al., 2012). El SMM aparece con una infiltración entre el 10 y el 60% de células plasmáticas clonales en médula, pero continúa siendo asintomático, si bien el riesgo de desarrollar MM aumenta considerablemente (Bianchi & Munshi, 2015; Rajkumar *et al.*, 2015; Morgan *et al.*, 2012).

La clasificación más frecuente en MM se basa en los subtipos hiperdiploide y no-hiperdiploide (Morgan *et al.*, 2012; Fonseca *et al.*, 2009). El MM hiperdiploide tiene mejor pronóstico que el no-hiperdiploide, y se caracteriza por la presencia de trisomías en cromosomas impares. El MM no-hiperdiploide está asociado principalmente con translocaciones de la cadena IgH y monosomías en los cromosomas 8, 13, 14, 16, 17 y 22. Un rasgo común en el MM es la presencia de mutaciones en genes que actúan como supresores tumorales (Morgan *et al.*, 2012; Anderson & Carrasco, 2011). Las primeras alteraciones génicas pueden aparecer en los ciclos de hipermutación somática, cambio de isotipo y translocaciones que afecten al *locus* de la IGH. También puede verse afectada la compleja maquinaria transcripcional que regula la diferenciación de las células plasmáticas. Factores de transcripción como BLIMP1 y XBP-1 son esenciales para la supervivencia de las células plasmáticas, y diversos estudios han detectado un aumento de su expresión en líneas celulares de MM así como en muestras procedentes de pacientes con MM (Prideaux *et al.*, 2014; Iwakoshi *et al.*, 2003; Davies *et al.*, 2003). Otros cambios observados son de índole epigenética, como alteraciones en el patrón de metilación de distintos genes, y se producen asimismo variaciones en la expresión de micro-RNAs (miRs) (Ohguchi *et al.*, 2018; Bianchi & Munshi, 2015; Morgan *et al.*, 2012; Roccaro *et al.*, 2009; Pichiorri *et al.*, 2008). La transición MGUS-MM incluye aberraciones citogenéticas o mutaciones en genes codificantes para proteínas de las vías de señalización de las MAP quinasas, de NF- κ B, del ciclo celular como ciclina D1, de respuesta a daño en el DNA, así como en *c-Myc* y *RB1* (van Nieuwenhuijzen *et al.*, 2018; Morgan *et al.*, 2012). También se han descrito mutaciones que afectan a la expresión de proteínas supresoras tumorales como p53 y PTEN (Pawlyn & Morgan, 2017; Bianchi & Munshi, 2015; Morgan *et al.*, 2012).

Mientras que en el MM la proliferación de las células tumorales ocurre en diferentes nichos de la MO, en los plasmacitomas tiene lugar una proliferación celular incontrolada en lugares concretos de tejidos blandos o en puntos del esqueleto axial (Ghobrial, 2012). Los pacientes con plasmacitomas desarrollan frecuentemente el MM (Morgan *et al.*, 2012).

Papel del microambiente medular en el desarrollo del mieloma múltiple

Durante el desarrollo de la enfermedad, las células de MM establecen un íntimo contacto con componentes celulares, solubles y de MEC del microambiente medular. Dicho microambiente está formado por dos elementos principales: el elemento endosteal y el elemento vascular (Tripodo *et al.*, 2011; Nagasawa *et al.*, 2011). El elemento endosteal está formado por fibroblastos y osteoblastos, y constituye el nicho donde se localizan células HSCs renovando el sistema hematopoyético. El elemento vascular se compone por células endoteliales y células reticulares, así como de músculo liso, y

transmite señales de maduración y activación a las células HSPCs que han entrado en programas de diferenciación hacia diferentes linajes hematopoyéticos. A su vez, este nicho es también esencial en la regulación de los procesos de intravasación y extravasación celular al ambiente medular (Tripodo *et al.*, 2011). Los macrófagos y adipocitos forman parte asimismo del microambiente medular, siendo esenciales para la hematopoyesis. Todo este microambiente proporciona a las células de MM señales que estimulan su proliferación, supervivencia y resistencia a quimioterapia (Bianchi & Munshi, 2015; Kawano *et al.*, 2015; Anderson & Carrasco, 2011).

Las células plasmáticas malignas utilizan moléculas de adhesión para interactuar con las células estromales del microambiente medular (*Bone Marrow Stromal Cells, BMSCs*) “educándolas” para que secreten proteínas que favorezcan el progreso del MM, así como la diseminación a otros tejidos en estadios más avanzados de la enfermedad. De esta manera, las células neoplásicas afectan al microambiente en provecho propio (Tripodo *et al.*, 2011; Mendez-Ferrer *et al.*, 2010; Zheng *et al.*, 2009; Wilson & Trumpp, 2006). Las citoquinas más relevantes secretadas por las BMSCs en el MM son la IL-6, HGF e IGF (Mitsiades *et al.*, 2006; Vanderkerken *et al.*, 1999; Chauhan *et al.*, 1996; Borset *et al.*, 1996). Las células del microambiente celular también son capaces de estimular la expresión de proteínas antiapoptóticas, como Mcl-1, y chaperonas por parte de las células plasmáticas tumorales, lo que favorece la supervivencia de las mismas (Gupta *et al.*, 2017). El resultado de la interacción de las células de MM con el microambiente de la MO es la activación de diferentes rutas de señalización en las células de MM, como las vías de las MAP quinasas, PI3K/Akt, Jak/STAT3, NF- κ B y Wnt (Kuehl & Bergsagel, 2012; Anderson & Carrasco, 2011; Hideshima *et al.*, 2007). Con todo ello, el estudio de la activación de estas rutas ha identificado múltiples dianas para el diseño de drogas tanto frente a las células de MM como a componentes del microambiente medular, lo que señala la importancia clínica de este componente en la progresión del MM (Podar, 2012).

La identificación y caracterización funcional de moléculas requeridas para el tráfico de las células de MM es vital para profundizar en los mecanismos que regulan la supervivencia, proliferación y resistencia de estas células. Uno de los mecanismos de resistencia a diferentes tratamientos frente al MM es el conocido como “*Cell Adhesion-Mediated Drug Resistance*” o CAM-DR, el cual surge como consecuencia de la adhesión de las células tumorales al estroma medular, lo que contribuye a la supervivencia y proliferación de estas células (**Figura 11**) (Waldschmidt *et al.*, 2017; Di Marzo *et al.*, 2016; Noborio-Hatano *et al.*, 2009; Meads *et al.*, 2008; Landowski *et al.*, 2003; Hazlehurst *et al.*, 2000; Damiano *et al.*, 1999). Cuando las células de MM dejan de depender del ambiente medular para su supervivencia y proliferación, salen al torrente sanguíneo diseminándose a otros órganos y tejidos. Esta etapa extramedular del MM se conoce como *Plasma Cell Leukaemia* (**Figura 10**) (Mina *et al.*, 2017).

Implicación de la integrina $\alpha 4\beta 1$ en el tráfico de las células de MM

Las células de MM migran y se localizan en distintos nichos de la MO. En este proceso son fundamentales las señales quimiotácticas, entre las que destaca el CXCL12, y moléculas de adhesión, especialmente $\alpha 4\beta 1$. Ambas moléculas facilitan la interacción entre las células tumorales y el microambiente medular, favoreciendo la proliferación de las células de MM y su resistencia a terapias anti-MM (Ghobrial, 2012; Anderson & Carrasco, 2011; Hideshima *et al.*, 2007; Wright *et al.*, 2003; Sanz-Rodríguez *et al.*, 2001).

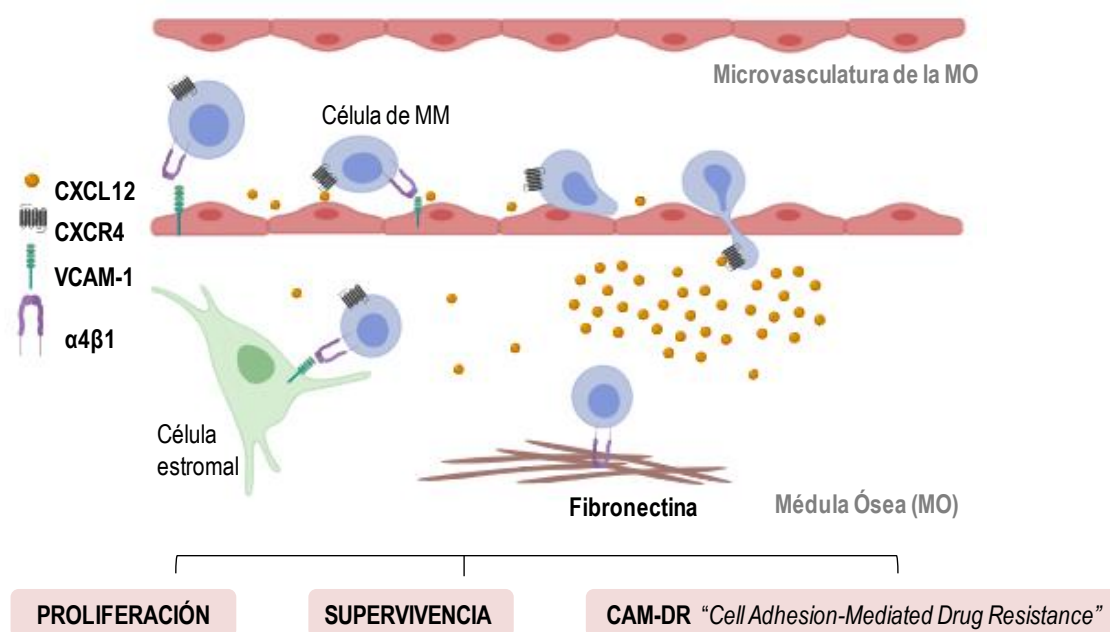


Figura 11. $\alpha 4\beta 1$ y CAM-DR en MM. La adhesión entre células de MM y el microambiente medular dependiente de la integrina $\alpha 4\beta 1$ y de CXCL12 otorga a las células de MM una ventaja proliferativa y de supervivencia, promoviendo la progresión del MM y protegiendo a las células tumorales frente a agentes terapéuticos.

La integrina $\alpha 4\beta 1$ juega un papel crucial en la adhesión de las células de MM a la microvasculatura de la MO, así como en la posterior adhesión a las BMSCs (Redondo-Muñoz *et al.*, 2019; Martínez-Moreno *et al.*, 2016; García-Bernal *et al.*, 2013). Además, esta integrina juega un papel esencial en la CAM-DR lo que contribuye a resistencia a quimioterapia (Figura 11) (Noborio-Hatano *et al.*, 2009; Damiano *et al.*, 1999). La importancia de $\alpha 4\beta 1$ en MM fue demostrada *in vivo* mediante la utilización de un anticuerpo anti- $\alpha 4$ el cual redujo el crecimiento tumoral y la osteolisis asociada (Olson *et al.*, 2005; Mori *et al.*, 2004). La adhesión de las células de MM dependiente de $\alpha 4\beta 1$ al estroma medular induce la activación de la vía de las MAP quinasas y de NF- κ B, aumenta la expresión de proteínas que activan el ciclo celular y de proteínas anti-apoptóticas, y

promueve la secreción de IL-6, lo que en conjunto estimula la proliferación y supervivencia de las células de MM (Anderson & Carrasco, 2011; Uchiyama *et al.*, 1993).

CXCL12 es producida abundantemente en el microambiente medular y, tras la unión a su receptor CXCR4 en las células de MM, activa $\alpha 4\beta 1$ mediante señalización *inside-out*, lo que se traduce en un aumento en la interacción de esta integrina con sus ligandos presentes en la MO (Sanz-Rodriguez *et al.*, 2001). Esta señalización *inside-out* favorece la unión de talina y de kindlin-3 a la subunidad $\beta 1$, las cuales cooperan para estimular la adquisición de estados de conformación de alta afinidad de la integrina por sus ligandos (Martinez-Moreno *et al.*, 2016). El tratamiento del MM con bortezomib (BTZ), un inhibidor del proteasoma, inhibe el proceso de CAM-DR provocando la disminución de la expresión de $\alpha 4\beta 1$ en la superficie de las células de MM (Noborio-Hatano *et al.*, 2009). Estos datos en conjunto resaltan la importancia de comprender la regulación de la función de $\alpha 4\beta 1$ en MM, así como el control de su expresión en MM resistente al tratamiento con BTZ y su posible implicación en la recaída posterior de la enfermedad, objetivos de la presente Tesis Doctoral.

Tratamiento del MM

Los tratamientos más frecuentes del MM incluyen el uso de agentes alquilantes, como el *melphalan*, inhibidores del proteasoma (IP), agentes inmunomoduladores, inhibidores de deacetilasas, anticuerpos monoclonales y el trasplante autólogo de células *stem* (Dong & Ghobrial, 2019; Moreau *et al.*, 2017; Hoyos & Borrello, 2016; Kumar & Anderson, 2016; Orlowski & Lonial, 2016; Nooka *et al.*, 2015; Moreau *et al.*, 2015; Richardson *et al.*, 2014; Dimopoulos *et al.*, 2013). La elección del tratamiento depende, entre otros factores, del perfil bioquímico y genético de los pacientes, de su edad y de su estado de salud general. Actualmente, se siguen protocolos de tratamientos combinados utilizando fármacos incluidos en los grupos mencionados más arriba, junto con dexametasona (Nooka *et al.*, 2015; Petrucci *et al.*, 2013).

El tratamiento con IPs constituye uno de los protocolos terapéuticos más frecuentes aplicados a pacientes con MM. Entre estos inhibidores se incluye el bortezomib, el cual fue caracterizado inicialmente como un potente IP, capaz de inducir apoptosis en células de MM (San Miguel *et al.*, 2008; Hideshima *et al.*, 2007; Adams, 2004; Richardson *et al.*, 2003b; Hideshima *et al.*, 2003; Richardson *et al.*, 2003a; Adams, 2001). Adicionalmente al BTZ, otros dos IP más recientes son el ixazomib, un análogo oral del BTZ; y el carfilzomib, cuya acción es irreversible. Estos dos inhibidores fueron generados para aumentar la eficacia anti-tumoral en comparación con el BTZ, además de incrementar su nivel de penetración en los tejidos y disminuir efectos adversos (Nooka *et al.*, 2015; Chauhan *et al.*, 2011). El efecto beneficioso de los IP se basa en que muestran una mayor citotoxicidad sobre las células plasmáticas malignas que sobre células plasmáticas normales (Gandolfi *et al.*, 2017; Kyle & Rajkumar, 2008). Los agentes inmunomoduladores más frecuentemente utilizados en MM son la talidomida (Garderet *et al.*, 2012) y la lenalidomida (Richardson *et al.*, 2014), mientras que los anticuerpos

monoclonales frente a CD38, CD138 y SLAMF7 muestran asimismo resultados prometedores contra dicha neoplasia (Nooka *et al.*, 2015).

A pesar de que la utilización de todos estos fármacos haya aumentado la tasa de supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global de los pacientes, éstos presentan frecuentemente resistencia a la terapia recibida, siendo una de las resistencias más comunes la que aparece frente al BTZ (Wallington-Beddoe *et al.*, 2018; Migkou *et al.*, 2018; Robak *et al.*, 2018a).

El proteasoma y su relevancia en MM

El proteasoma es un complejo multienzimático que está presente tanto en el citoplasma como en el núcleo de células eucariotas. El proteasoma 26S se forma tras un proceso dependiente de ATP cuando un núcleo catalítico (20S) se une a dos subunidades regulatorias (19S) en cada uno de sus extremos (**Figura 12**) (Collins & Goldberg, 2017; Ciechanover, 2015). La subunidad 20S se compone de cuatro anillos, dos α y dos β , en forma de barril con un túnel central. Tres de las 7 subunidades que componen los anillos β contienen actividad enzimática: actividad quimi tripsina ($\beta 5$), actividad tripsina ($\beta 2$) y actividad de tipo caspasa ($\beta 1$) (**Figura 12**) (Frankland-Searby & Bhaumik, 2012; Murata *et al.*, 2009; Arendt & Hochstrasser, 1997). La función del proteasoma es la de degradar proteínas intracelulares implicadas especialmente en la regulación del ciclo celular, supervivencia y proliferación celular, estrés celular, moléculas de adhesión y respuesta inmune, entre otras (Collins & Goldberg, 2017; Ciechanover, 2015). Específicamente, el proteasoma se encarga de la eliminación de proteínas desnaturalizadas, agregadas o que se han producido de manera defectuosa, y que podrían interferir con el buen funcionamiento celular (Hershko & Ciechanover, 1998). El proteasoma es el responsable de la degradación de entre 80-90% de las proteínas celulares, siendo esencial para el mantenimiento de la homeostasis celular (Rock *et al.*, 1994).

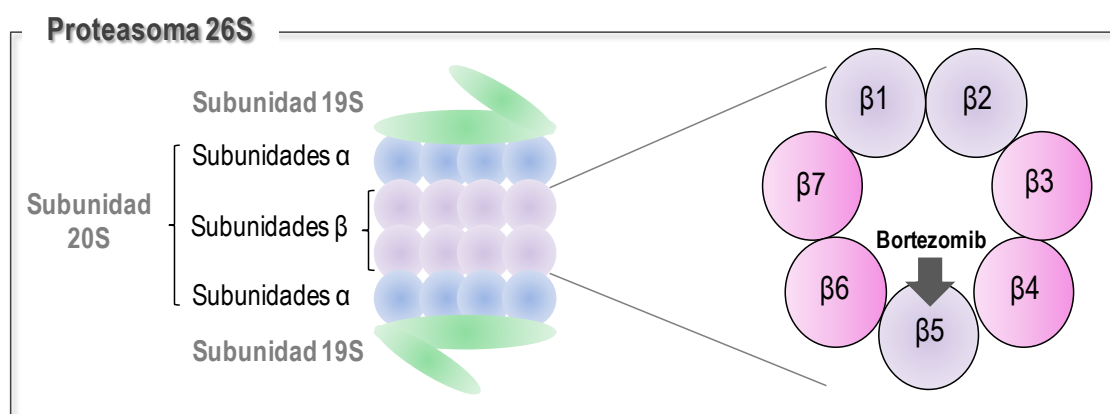


Figura 12. Estructura del proteasoma 26S. Está formado por un centro catalítico 20S, junto con dos subunidades 19S regulatorias. En la representación transversal de los anillos β se señalan las subunidades $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 5$, las cuales poseen las actividades catalíticas tipo caspasa, tripsina y quimi tripsina, respectivamente. El BTZ es capaz de inhibir la actividad de la subunidad $\beta 5$ (Chari *et al.*, 2010).

Para hacer de este programa degradativo un proceso totalmente coordinado, rápido y específico, las proteínas a degradar son marcadas de manera covalente con cadenas de poli-ubiquitina. De esta forma, estas proteínas quedan señaladas para su reconocimiento por las subunidades reguladoras del proteasoma y, posteriormente, serán desnaturalizadas, en un proceso dependiente de energía, por parte de la subunidad proteolítica del proteasoma (Inobe & Matouschek, 2014; Tanaka, 2009; Murata *et al.*, 2009; Hershko & Ciechanover, 1998).

Las células plasmáticas tienen un retículo endoplasmático (RE) rugoso muy desarrollado y una gran cantidad de chaperonas activas, asociado con una elevada producción de anticuerpos por segundo (Pelletier *et al.*, 2006). En situaciones normales, si se produce una acumulación de proteínas mal plegadas o que se han generado de manera defectuosa en el RE, se activa la señalización por estrés de RE, iniciándose la respuesta conocida como *Unfolded Protein Response* (UPR), la cual, si no se revierte, puede derivar en muerte celular (Hetz *et al.*, 2013; Davenport *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2003). Cuando se activa la UPR, las proteínas mal plegadas son procesadas por el proteasoma para evitar la entrada de las células en apoptosis. De este modo, o bien las chaperonas del complejo pliegan correctamente estas proteínas defectuosas, o bien son desnaturalizadas y degradadas a través de la actividad catalítica del proteasoma. Como las células de MM producen enormes cantidades de proteína M, muestran una alta actividad proteasómica para evitar la acumulación de esta proteína defectuosa. Esto las hace muy sensibles a los IP, de manera que el tratamiento con estos agentes facilita la entrada de las células de MM en apoptosis al inhibir el mecanismo por el que se recuperarían de la UPR (Gandolfi *et al.*, 2017; Obeng *et al.*, 2006).

El bortezomib

La compañía Myogenics fue fundada por Alfred Goldberg en 1993 con el objetivo de desarrollar IP frente al desgaste muscular o caquexia. Un grupo de enzimólogos de Myogenics desarrolló los primeros fármacos análogos a substratos para la subunidad con actividad quimi tripsina del proteasoma, generándose un dipéptido del ácido bórico análogo a substratos reconocidos por la subunidad $\beta 5$, al que se denominó bortezomib (PS-341, comercialmente conocido como Velcade, $C_{19}H_{25}BN_4O_4$) (Adams *et al.*, 1999). Este compuesto inhibe la actividad del proteasoma 26S al unirse de manera reversible a la subunidad $\beta 5$ del complejo multienzimático, lo que causa una acumulación de proteínas mal plegadas y, consecuentemente, estrés de RE, promoviendo finalmente apoptosis celular (**Figura 12**) (Podar, 2012; Lee *et al.*, 2003).

El BTZ fue inicialmente testado en un amplio grupo de líneas celulares tumorales, mostrando una potente inhibición de la proliferación celular (Chari *et al.*, 2010; Adams, 2001). Originalmente, el uso del BTZ en cáncer tenía como objetivo inhibir a NF- κ B, el cual aparece activado en distintos tipos tumorales (Chen *et al.*, 2011; Chari *et al.*, 2010). En líneas celulares de MM y muestras primarias de MO obtenidas de pacientes con dicha enfermedad, el BTZ inhibía la proliferación celular e inducía la apoptosis de las células de MM, contribuyendo a superar la resistencia a fármacos por parte del tumor (Chari *et*

al., 2010; Hideshima *et al.*, 2003; Hideshima *et al.*, 2001). Posteriormente, en modelos *xenografts* en ratones utilizando muestras de plasmacitomas humanos, el BTZ fue capaz de inhibir el crecimiento tumoral y mejorar la supervivencia de los ratones que recibían el tratamiento (Chari *et al.*, 2010; LeBlanc *et al.*, 2002). Este fármaco fue aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration*) en 2003 como tratamiento frente a recaídas del MM y al MM refractario, y posteriormente para pacientes a diagnóstico o que habían recibido previamente otro tipo de terapia (Podar, 2012; Chari *et al.*, 2010; Hideshima *et al.*, 2003). Cuando se compararon los beneficios de administrar BTZ o dexametasona a pacientes de MM en recaída, se observó una mayor respuesta por parte de los que recibieron BTZ, además de un enlentecimiento en la progresión de la enfermedad y una supervivencia mayor de los pacientes (Richardson *et al.*, 2014; Richardson *et al.*, 2003b). Sin embargo, la toxicidad derivada del tratamiento con BTZ resultó ser notoria, apareciendo casos de neuropatía periférica, pirexia, trombocitopenia, problemas cardíacos y pulmonares (Richardson *et al.*, 2003a). Actualmente, el BTZ se aplica de manera combinada con otros agentes quimioterapéuticos, disminuyendo los efectos secundarios observados y la aparición de resistencia a la terapia recibida (Orlowski & Lonial, 2016; Kubiczakova *et al.*, 2014).

Mecanismos de acción del bortezomib

Además de promover la respuesta a estrés de RE descrita por Obeng en 2006 en células de MM, el BTZ afecta a distintas rutas de señalización relacionadas con su proliferación y supervivencia, así como a proteínas reguladoras de ciclo celular y moléculas de adhesión, lo que se traduce en una reducción de la progresión de la enfermedad. A continuación, se describen algunos de los efectos del BTZ sobre células de mieloma (**Figura 13**).

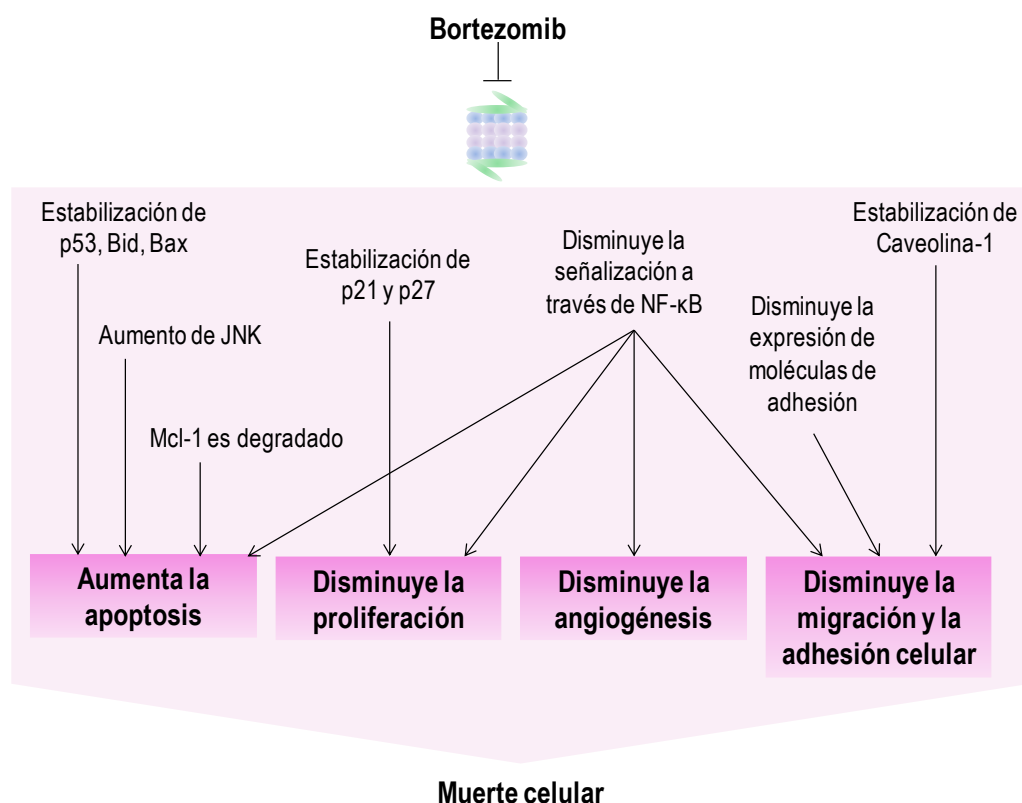


Figura 13. Mecanismos de acción del bortezomib. El tratamiento con BTZ inhibe la actividad del proteasoma afectando a múltiples vías de señalización. El BTZ promueve la activación de JNK, la estabilización de p53, NOXA, Bax, p21, p27 y caveolina-1, y la disminución en la expresión de moléculas de adhesión. Asimismo, al no degradarse, $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ bloquea la vía de NF- κB . Todo esto conlleva la inhibición de la proliferación, migración y angiogénesis en respuesta a BTZ, promoviendo la apoptosis de las células de MM (Gandolfi *et al.*, 2017; Wright, 2010).

La vía de señalización NF- κB aparece desregulada en múltiples procesos tumorales, incluido el MM (Matthews *et al.*, 2016; Chapman *et al.*, 2011; Demchenko *et al.*, 2010; Sunwoo *et al.*, 2001; Cusack *et al.*, 2001). Esto causa la activación constitutiva de NF- κB en muchas líneas celulares de MM, y se observa asimismo en muestras de MO obtenidas de pacientes con mieloma. Adicionalmente, muchos de los componentes de esta ruta están sobre-expresados en estas células (Keats *et al.*, 2007; Annunziata *et al.*, 2007). NF- κB es un factor de transcripción que regula la expresión de genes codificantes para citoquinas, factores de crecimiento, quimioquinas, moléculas de adhesión y diferentes receptores (Ben-Neriah & Karin, 2011; Oeckinghaus *et al.*, 2011; Pahl, 1999). Se han descrito dos rutas que activan esta vía (**Figura 14**) (Oeckinghaus *et al.*, 2011). La “ruta canónica” se activa por moléculas mediadoras de inflamación, como RANKL y TNF α . En ausencia de estímulo, los dímeros de NF- κB , formado por las subunidades p50 y p65 (Rel A), se encuentran secuestrados en el citoplasma celular por el inhibidor $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$. El regulador principal de esta ruta es el complejo IKK, formado por la proteína NEMO (IKK γ) y por las quinasas IKK α e IKK β . Cuando este complejo fosforila $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, lo marca para su degradación por el proteasoma, liberando NF- κB para su movilización al núcleo, donde se unirá a determinados promotores a través de su sitio de unión a DNA. La ruta

alternativa, también denominada como “ruta no canónica”, puede ser activada por una parte de los miembros de la familia de citoquinas TNF, incluyendo CD40L, BAFF y linfotoxina β . En esta ruta es esencial la función de la quinasa NIK, la cual, en condiciones basales interactúa con TRAF3, quien ubiquitina a NIK para su posterior degradación en el proteasoma. Tras estimulación, TRAF3 es degradado, liberando y estabilizando NIK, la cual activa a IKK α , que es responsable de la fosforilación de p100, lo que causa su ubiquitinación y procesamiento hacia p52. Esta subunidad muestra un NLS y dimeriza con RelB, haciendo posible su translocación al núcleo y la posterior regulación de la expresión génica.

En MM, la vía NF- κ B aparece frecuentemente desregulada por mutaciones en componentes reguladores de esta ruta (Matthews *et al.*, 2016). Dichas mutaciones afectan especialmente a la vía no canónica de NF- κ B, y en menor grado a la vía canónica, aunque se han observado asimismo pacientes con alteraciones genéticas de ambas vías.

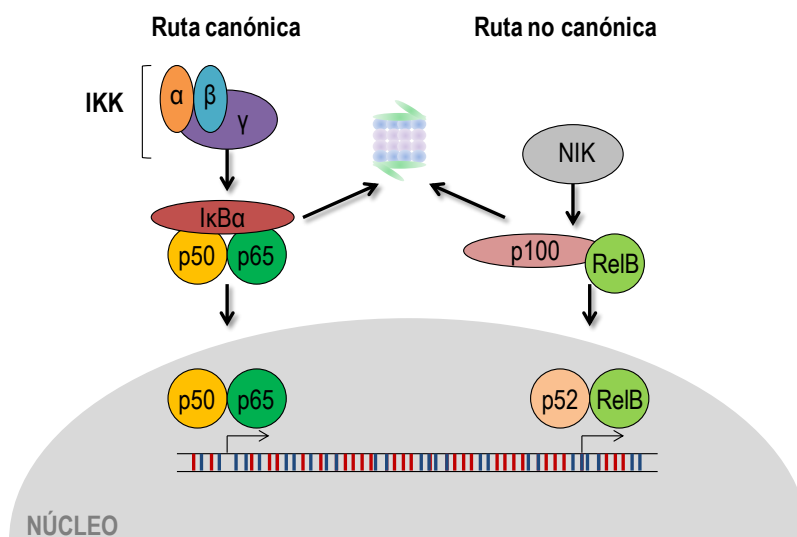


Figura 14. Vía de señalización NF- κ B. Tras diferentes estímulos, se activan las rutas canónicas y no canónicas, permitiendo la translocación de NF- κ B al núcleo, el cual regula la expresión de genes implicados en proliferación y supervivencia celular, así como en migración celular.

Dado que el BTZ inhibe al proteasoma, el tratamiento de células de MM con BTZ implicaría la acumulación de I κ B α , lo que se traduciría en un bloqueo de la vía canónica de NF- κ B y, por consiguiente, en apoptosis celular (**Figura 13**). Sin embargo, se ha demostrado que el tratamiento de células de MM con BTZ induce la activación de la ruta canónica al promover la disminución de los niveles de I κ B α (Hideshima *et al.*, 2009). En base a estos resultados, se ha sugerido que la inhibición de la viabilidad de las células de MM tratadas con BTZ no parece deberse a la inhibición de esta vía de señalización (Chen *et al.*, 2011; Hideshima *et al.*, 2009).

Otro de los mecanismos descritos por el que el BTZ inhibe la progresión del MM es por su capacidad de alterar la expresión de moléculas de adhesión implicados en la interacción de las células de MM con el estroma medular (**Figura 15**) (Noborio-Hatano

et al., 2009; Yanamandra *et al.*, 2006; Rajkumar *et al.*, 2005; Mitsiades *et al.*, 2003). En concreto, Noborio-Hatano *et al.* describieron que el BTZ superaba la respuesta CAM-DR de células de MM mediante la reducción de la expresión de la integrina $\alpha 4\beta 1$.

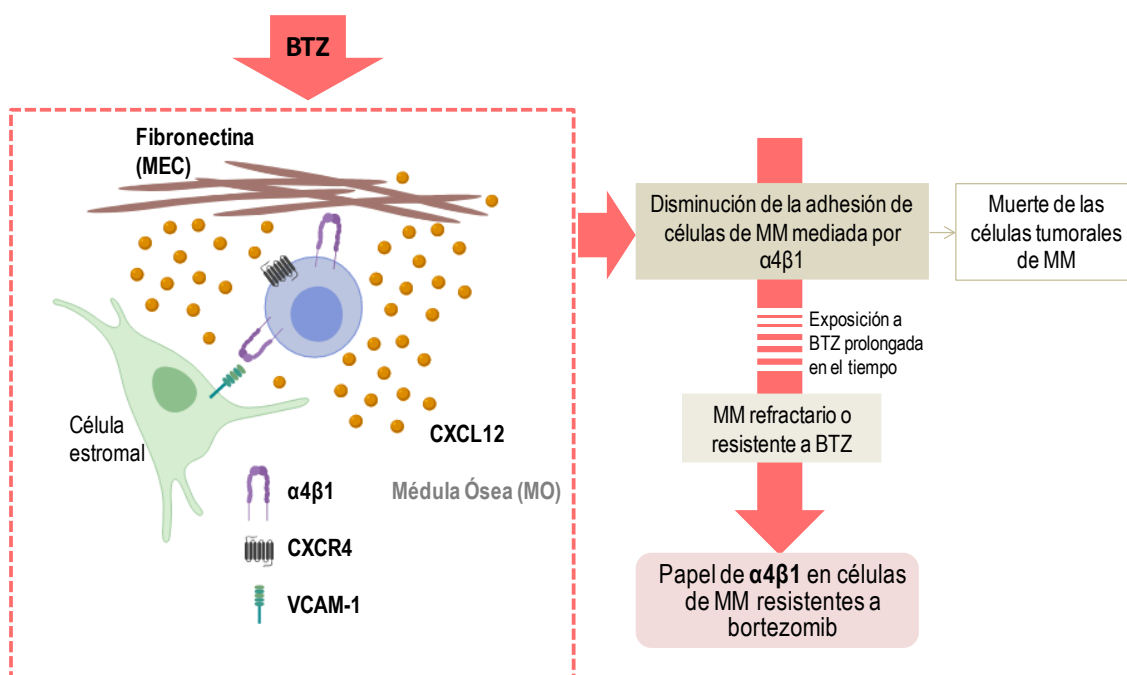


Figura 15. BTZ y la integrina $\alpha 4\beta 1$. El tratamiento de células de MM con BTZ provoca una disminución de la expresión de $\alpha 4\beta 1$, lo que causa una reducción en la adhesión dependiente de esta integrina entre las células de MM y el estroma medular. Esto se traduce en una desventaja proliferativa y de supervivencia celular mediada por esta adhesión, y en una mayor sensibilidad a terapias anti-MM. Se desconocen las posibles relaciones funcionales entre $\alpha 4\beta 1$ y la resistencia a BTZ en células de MM.

Por otro lado, la exposición de células de MM a BTZ induce la expresión de factores proapoptóticos como NOXA, p53 y Bax, y reprime la expresión de factores antiapoptóticos como Bcl-2, lo que promueve la entrada en apoptosis de estas células disminuyendo finalmente la población tumoral (**Figura 13**) (Gandolfi *et al.*, 2017; Adams, 2004). Asimismo, dado que el proteasoma controla la expresión de proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular, como es el caso de los supresores tumorales p21 y p27 (**Figura 13**), la inhibición del proteasoma por el BTZ causa la estabilización de estas proteínas, lo que implica un bloqueo en la progresión del ciclo celular, favoreciendo la apoptosis de las células de MM (Lu & Hunter, 2010).

Mecanismos de resistencia a bortezomib

Uno de los principales problemas derivados del tratamiento del MM con agentes quimioterapéuticos es la adquisición de resistencia por parte de las células tumorales. En el caso del BTZ, gran parte de los pacientes tratados con este agente muestran resistencia

a este fármaco y acaban recayendo en la enfermedad, convirtiéndose en resistentes para este compuesto. Además, un número importante de pacientes diagnosticados con MM son inicialmente refractarios al tratamiento con BTZ, lo que implica la existencia de resistencia intrínseca por parte de las células tumorales de dichos pacientes, limitando en gran medida su tratamiento (Wallington-Beddoe *et al.*, 2018; Gandolfi *et al.*, 2017; Lub *et al.*, 2016; Murray *et al.*, 2014; Richardson *et al.*, 2003a).

Se han utilizado múltiples líneas celulares de MM resistentes al BTZ para caracterizar los mecanismos de resistencia desarrollados por estas células. Uno de estos mecanismos lo constituye la presencia de mutaciones puntuales en el gen *PSMB5* codificante para la subunidad $\beta 5$ del proteasoma, lo que impide la unión del BTZ a dicha subunidad (Franke *et al.*, 2012; Ri *et al.*, 2010). Se desconoce la relevancia funcional de estas mutaciones en los sitios de unión del BTZ en las células de MM, ya que análisis extensivos en células tumorales derivadas de pacientes con MM no pudieron identificar estas mutaciones (Lichter *et al.*, 2012). Sin embargo, un reciente estudio ha mostrado la existencia de 4 mutaciones somáticas en *PSMB5* en un paciente con MM tratado con IP (Barrio *et al.*, 2019). Adicionalmente, se ha descrito la sobre-expresión de la subunidad $\beta 5$ del proteasoma como otro mecanismo de resistencia (Balsas *et al.*, 2012).

Diferentes líneas celulares de MM resistentes a BTZ han mostrado diversas alteraciones en la expresión de proteínas relacionadas con respuestas a estrés, de supervivencia celular y de apoptosis (Wallington-Beddoe *et al.*, 2018; Gandolfi *et al.*, 2017; Lub *et al.*, 2016). Así, se ha descrito la reducción en la expresión de NOXA y una disminución de la actividad de diferentes caspasas (Balsas *et al.*, 2012), así como la sobre-activación de la ruta PI3K/Akt en células de MM resistentes a BTZ (Spencer *et al.*, 2014; Kale & Moore, 2012; Markovina *et al.*, 2008). A su vez, la sobre-expresión de transportadores que facilitan la expulsión de agentes quimioterapéuticos, como P-gP, descrita para algunas líneas celulares de MM, puede favorecer la resistencia a BTZ, si bien no constituye uno de los mecanismos principales para la supervivencia tras el tratamiento con este agente (Verbrugge *et al.*, 2012; Lu & Hunter, 2010; Rumpold *et al.*, 2007).

Como se ha explicado previamente, la relación que establecen las células tumorales con el microambiente medular es vital durante la progresión del MM. Las células estromales expresan IL-6 e IGF-1, promoviendo la supervivencia de la población tumoral además de facilitar su resistencia a BTZ. El receptor para IGF-1 está sobre-expresado en células de MM resistentes a BTZ, influyendo en el desarrollo de la enfermedad y en una peor prognosis, por lo que se ha propuesto como diana terapéutica (Kuhn *et al.*, 2012; Bataille *et al.*, 2005).

Futuro de los inhibidores de proteasoma

Dada la sensibilidad específica de las células de MM a los IP, la búsqueda de fármacos que bloqueen más eficientemente al proteasoma parece una propuesta razonable. Tratar a los pacientes que han adquirido resistencia al BTZ con compuestos de nuevo diseño parece una estrategia más eficaz que intentar restaurar la sensibilidad a este fármaco en pacientes que muestran dicha resistencia. Algunos de estos nuevos fármacos

han sido aprobados recientemente o se están testando en ensayos clínicos y pretenden superar la resistencia generada contra el BTZ, así como disminuir los efectos secundarios del tratamiento con este agente. Así, se han diseñado agentes contra otras subunidades del proteasoma, como la $\alpha 7$, con el objetivo de inhibir más eficientemente al proteasoma (Franke *et al.*, 2012). No sólo se están generando IP, sino también anticuerpos que inhiban este complejo multienzimático (Kubiczkova *et al.*, 2014; Frankland-Searby & Bhaumik, 2012).

Como se ha mencionado anteriormente, el carfilzomib es un nuevo inhibidor del proteasoma que presenta actividad epoxomicina. Este agente fue desarrollado por la empresa Proteolix Inc. en California con el objetivo de producir un inhibidor más específico de la actividad quimiotripsina del proteasoma que el BTZ. Asimismo, se buscó una mejora de la tolerancia de los pacientes a este tratamiento, intentando disminuir los efectos secundarios del BTZ (Wallington-Beddoe *et al.*, 2018; Gandolfi *et al.*, 2017).

OBJETIVOS

La integrina $\alpha 4\beta 1$ juega un papel crítico tanto en desarrollo inmunitario y en el tráfico leucocitario durante la vigilancia inmune, así como en diferentes tumores hematológicos tales como el mieloma múltiple.

- ~ El primer objetivo de la presente Tesis Doctoral ha consistido en la caracterización del papel de ICAP-1 en la adhesión linfocitaria dependiente de la integrina $\alpha 4\beta 1$, y en el desarrollo del sistema inmunitario. En la segunda parte de este objetivo se ha estudiado la implicación de ICAP-1 en el tráfico de células de mieloma múltiple.
- ~ El segundo objetivo se centró en la caracterización de células de mieloma múltiple resistentes a bortezomib, y de las relaciones funcionales entre la resistencia de estas células y la expresión y función de la integrina $\alpha 4\beta 1$.

MATERIALES Y MÉTODOS

Líneas celulares

La línea endotelial murina bEnd.3 fue cultivada en medio DMEM (Gibco Invitrogen, Paisley, Reino Unido) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) (Biowest, Nuaille, Francia), 100 U/ml de penicilina y 100 U/ml de estreptomina (Gibco Invitrogen). Las líneas celulares humanas de mieloma múltiple RPMI-8226, MM.1S y NCI-H929, la línea estromal de médula ósea humana HS-27A, la línea MOLT-4 de leucemia linfoblástica aguda de células T (T-ALL), y la línea Z-138 de linfoma no Hodgkin de células B, fueron cultivadas en medio RPMI 1640 (Lonza, Verviers, Belgium) suplementado con 10% de FBS (Linus, Cultek, Madrid, España), 100 U/ml de penicilina y 100 U/ml de estreptomina (Gibco Invitrogen) (medio completo). La línea NCI-H929 fue cultivada en presencia de 2-mercaptoetanol (0.05 mM) (Sigma-Aldrich, San Luis, MO). Las células resistentes a BTZ fueron mantenidas en las mismas condiciones de cultivo que las líneas celulares parentales de procedencia, en presencia del inhibidor.

Reactivos y anticuerpos

VCAM-1-Fc e ICAM-1-Fc, y la quimioquina CXCL12, fueron adquiridos a R&D Systems (Minneapolis, MN). El fragmento recombinante de la fibronectina FN-H89, que contiene la región CS-1 (denominado como CS-1/FN en este trabajo) y que presenta capacidad de unión a la integrina $\alpha 4\beta 1$, fue purificado tal y como se había descrito previamente (García-Bernal *et al.*, 2005). El inhibidor de NF- κ B *InSolutionTM NF- κ B Activation Inhibitor* (iNF- κ B) fue obtenido de Calbiochem Millipore (San Diego, CA). La cicloheximida y el *melfalan* fueron adquiridos a Sigma-Aldrich, mientras que el bortezomib y el carfilzomib se compraron a Selleckchem (Munich, Alemania). La doxorubicina, el verapamilo y la aplidina fueron cedidos por PharmaMar (Madrid, España). Hemos utilizado *Alexa FluorTM 488 Streptavidin conjugate*, *APC Streptavidin conjugate* y *Pacific Blue Streptavidin conjugate*, todos ellos de BioLegend (San Diego, CA), para detectar en ensayos de citometría de flujo aquellos anticuerpos primarios conjugados con biotina. Los anticuerpos utilizados en citometría de flujo se muestran en la **tabla 1**, mientras que los anticuerpos utilizados en ensayos de *western blotting*, se encuentran en la **tabla 2**.

Tabla 1. Anticuerpos empleados en los ensayos de citometría de flujo. Se muestra la especificidad y la procedencia.

ANTICUERPO (Clon)	PROCEDENCIA
FITC rat anti-mouse CD29 (HM β 1)	BioLegend
Purified rat anti-mouse CD29 (HM β 1)	BioLegend
PE/Cy7 rat anti-mouse CD29 (HM β 1)	BioLegend
Purified rat anti-mouse CD29 (9EG7)	BD Pharmingen (Franklin Lakes, NJ)
PE/Cy7 Armenian hamster anti-mouse CD49d	BioLegend
BV421 rat anti-mouse CD8a (53-6.7)	BioLegend
PE rat anti-mouse CD8a (53-6.7)	BioLegend
FITC rat anti-mouse CD8a (53-6.7)	Southern Biotech (Birmingham, AL)
FITC rat anti-mouse CD4 (GK1.5)	Southern Biotech
Biotin rat anti-mouse CD4 (GK1.5)	Southern Biotech
PerCP rat anti-mouse CD4 (RM4-5)	BD Pharmingen
PE rat anti-mouse CD184 (CXCR4) (L276F12)	BioLegend
FITC mouse anti-mouse CD199 (CCR9) (eBioCW-1.2)	ThermoFisher Scientific (Waltham, MA)
Biotin anti-mouse CD197 (CCR7) (4B12)	ThermoFisher Scientific
PE anti-mouse Ki-67 (B56)	BD Pharmingen
eFluor450 mouse Hematopoietic Lineage Antibody	ThermoFisher Scientific
PE Ly-6A/E (Sca-1) rat anti-mouse (D7)	ThermoFisher Scientific
PE-Cyanine7 rat anti-mouse/pig CD117 (c-Kit) (2B8)	ThermoFisher Scientific
FITC rat anti-mouse CD34 (RAM34)	ThermoFisher Scientific
APC Armenian hamster anti-mouse CD48 (HM48-1)	BioLegend
PerCP/Cy5.5 rat anti-mouse CD150 (SLAM) (TC15-12F12.2)	BioLegend
FITC rat anti-mouse Ly-6G/Ly-6C (Gr-1) (RB6-8C5)	ThermoFisher Scientific
PE anti-mouse CD11b (M1/70)	ThermoFisher Scientific
PE-Cyanine5.5 rat anti-mouse/human CD45R (B220) (RA3-6B2)	ThermoFisher Scientific
FITC rat anti-mouse CD45R/B220 (RA3-6B2)	Southern Biotech
PE rat anti-mouse CD45R/B220 (RA3-6B2)	Southern Biotech
Biotin rat anti-mouse/human CD45R/B220 (RA3-6B2)	BioLegend
PE rat anti-mouse CD19 (6D5)	Southern Biotech
APC rat anti-mouse CD19 (6D5)	Southern Biotech
PE rat anti-mouse IgM (RMM-1)	BioLegend
FITC rat anti-mouse IgD (11-26)	ThermoFisher Scientific
DyLight 647 goat anti-mouse IgM	Jackson I. Laboratories (Bar Harbor, ME)
PE/Cy7 rat anti-mouse CD25 Antibody (PC61)	BioLegend
Biotin rat anti-mouse CD43 (S7)	BD Pharmingen
FITC rat anti-mouse CD21/CD35 (7G)	BD Pharmingen
PE rat anti-mouse CD23 (B3B4)	ThermoFisher Scientific
Biotin anti-mouse CD69 (H1.2F3)	BD Pharmingen
FITC hamster anti-mouse TCR $\alpha\beta$ (H57-597)	Immunotools (Friesoythe, Alemania)
Anti-human α 4 (ALC 1.63)	Dr. Ángel L. Corbí (CIB, España)
Anti-human β 1 (TS2/16)	Dr. Francisco Sánchez Madrid (Hospital La Princesa)
Anti-human CXCR4	ThermoFisher Scientific
Anti-human α 5 (P1D6)	Dra. Ángeles García Pardo (CIB)
Anti-human P-gP	PharmaMar
Anti-human CD44 (HP2/9)	Dr. Francisco Sánchez Madrid (Hospital La Princesa)
Anti-HLA (W6/32)	Dra. Ángeles García Pardo (CIB)
Alexa Fluor ^R 488 anti-mouse	Molecular Probes (Leiden, Países Bajos)
Alexa Fluor ^R 647 anti-mouse	Molecular Probes
Alexa Fluor ^R 488 anti-rat	Molecular Probes

Tabla 2. Anticuerpos empleados en los ensayos de *western blotting*.

ANTICUERPO	PROCEDENCIA
Anti-ICAP-1	Dr. Daniel Bouvard (<i>Institut pour l'Avancée des Biosciences</i> , La Tronche, Francia)
Anti-Talina	Sigma-Aldrich
Anti-Kindlin-3	Dr. Markus Moser (MPI, Munich, Alemania)
Anti- α 4	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)
Anti- β 1	Santa Cruz Biotechnology
Anti- β 1	Abcam (Cambridge, Reino Unido)
Anti-Ras	Dr. Ignacio Casal (CIB)
Anti-Ub	ThermoFisher Scientific
Anti-Fosfo-Akt (Ser 473)	Cell Signalling Technology (Danvers, MA)
Anti-Akt	Cell Signalling Technology
Anti-Fosfo-ERK1/2 (p44/42 MAPK, Thr202/Tyr204)	Cell Signalling Technology
Anti-ERK1/2 (p44/42 MAPK)	Cell Signalling Technology
Anti-Mcl-1	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Fosfo-IGF-1-R β (Tyr1131)	Cell Signalling Technology
Anti-IGF1R	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Runx3	R&D Systems
Anti-SAM68	Dr. Patricio Aller (CIB)
Anti-Fosfo-I κ B α (Ser32/36)	Cell Signalling Technology
Anti-I κ B α	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Fosfo-NF- κ B	Cell Signalling Technology
Anti-NF- κ B	Cell Signalling Technology
Anti- β -Actina	Sigma-Aldrich
Anti-Vinculina	Sigma-Aldrich
Anti-GAPDH	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Tubulina	Santa Cruz Biotechnology

Ratones ICAP-1^{-/-}

Los ratones ICAP-1^{+/-} (heterocigotos, HZ) fueron cedidos por el Dr. Daniel Bouvard (*Institut pour l'Avancée des Biosciences*, La Tronche, Francia). Para obtener los ratones ICAP-1^{-/-} (KO), los ratones HZ fueron cruzados y la descendencia fue genotipada tal y como se describe en Bouvard *et al.*, 2007. De manera resumida, el DNA genómico de la descendencia de estos cruces fue extraído del tejido endotelial de las colas de animales según se producía el destete de los mismos. El genotipado se llevó a cabo mediante análisis por PCR convencional (Tabla 3), utilizando los oligonucleótidos expuestos en la Tabla 4.

	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Pre-amplificación	95	3 min	1
Amplificación	94	30 s	10
	62	30 s	
	72	30 s	
	95	30 s	35
	52	30 s	
72	30 s		
Melting	72	5 min	1
Cooling	20	1 h	1

Tabla 3. Protocolo de PCR convencional aplicado en el genotipado de los ratones ICAP-1^{+/+}, ICAP-1^{+/-} y ICAP-1^{-/-}.

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en el análisis por PCR convencional para el genotipado de los ratones ICAP-1^{+/+}, ICAP-1^{+/-} y ICAP-1^{-/-}.

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')
ICAP-1 <i>forward</i>	CTGCCTCTGTCTTTTCGAGTGC
ICAP-1 <i>reverse</i>	ACCCTGGCCTCTTACCTTGC
LacZ <i>reverse</i>	CATTCAGGCTGCGCAACTGTT

Adicionalmente, la ausencia de ICAP-1 en los ratones KO fue corroborada en ensayos de *western blotting* utilizando anticuerpos frente a ICAP-1. Los bazo, NLs, timos y las MO fueron obtenidos de ratones de entre 3-5 o de 8-10 semanas de edad. Las muestras procedentes de MO se obtuvieron a partir de los fémures y las tibias de los ratones. El bazo, NLs y timos fueron disgregados hasta obtener una suspensión celular utilizando filtros de nailon con poros de 40 µm de diámetro (LifeSciences, Falcon, NY). La sangre periférica se obtuvo tras punción cardiaca o del seno retro-orbital de los ratones utilizando PBS-EDTA. Posteriormente, se procedió con la lisis de eritrocitos de las diferentes suspensiones celulares con solución de lisis de eritrocitos (170 mM NH₄Cl, 12 mM KHCO₃ y 0.5 M EDTA) durante 5 minutos en hielo. El conteo celular se realizó mediante azul de tripano (Sigma-Aldrich).

Los ratones fueron mantenidos en condiciones asépticas libres de patógenos, en el Animalario del Centro de Investigaciones Biológicas. Los experimentos con estos ratones fueron aprobados por el Comité Ético del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Selección de células T y B presentes en bazo de ratón

Para el enriquecimiento de células T CD3⁺ de bazo, obtuvimos la fracción mononuclear mediante gradiente de densidad utilizando *Ficoll-Paque* (GE Healthcare Bio-Sciences, Pittsburgh, PA), y posteriormente, se realizó una selección negativa de la muestra utilizando el kit *EasySep* (Stem Cell Technologies, Vancouver, Canadá) específico para dichas células CD3⁺. Por otro lado, las células B CD19⁺ fueron seleccionadas a partir de poblaciones mononucleares procedentes de suspensiones celulares de los bazo obtenidas tras un proceso de separación por gradiente de densidad, utilizando *Lympholyte* (Cederlane Laboratories, Burlington, Canadá), y empleándose

pan-T Dynabeads (ThermoFisher Scientific) para la selección negativa. En ambos aislamientos, la pureza de las poblaciones celulares seleccionadas superó el 85%.

Citometría de flujo

Las células fueron inicialmente incubadas durante 10 min en hielo con un anticuerpo bloqueante de receptores Fc (*Purified Rat anti-mouse CD16/CD32*, clon 2.4G2, BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ) en solución de citometría de flujo (PBS con 1% de FBS y azida sódica). Posteriormente, las células se incubaron durante 30 min en hielo con los correspondientes anticuerpos monoclonales primarios purificados (5-10 µg/ml), o conjugados a fluorocromos o biotina, y preparados en solución de citometría de flujo, excepto para el anticuerpo anti-CCR7 que requirió de una incubación de 30 min a 37°C. A continuación, tras un lavado con PBS y posterior centrifugación, las muestras fueron incubadas con los anticuerpos secundarios correspondientes o estreptavidina conjugada con fluorocromos. Las inmunoglobulinas IgG2b, κ de rata e IgG de hámster armenio, purificadas o conjugadas al fluorocromo correspondiente o biotina, fueron utilizadas como controles de isotipo. Los anticuerpos utilizados en los ensayos de citometría de flujo están listados en la **tabla 1**. Se utilizaron los citómetros de flujo *Coulter Epics XL* o *FC500* (ambos de Beckman Coulter, Brea, CA) para el análisis de las muestras, y los datos fueron analizados con los programas CXP, FlowLogic y FlowJo.

Ensayos de migración linfocitaria hacia órganos linfoides

La migración de esplenocitos a bazos y NLs fue determinada siguiendo el método descrito (Klapproth *et al.*, 2015). Los esplenocitos de ratones ICAP-1^{+/+} y ICAP-1^{-/-} fueron incubados separadamente durante 20 min a 37°C con los marcadores CellTrace CFSE (0.8 µM) o CellTrace Far Red (0.3 µM) (ThermoFisher Scientific). Tras dos lavados con PBS, se mezclaron esplenocitos ICAP-1^{+/+} y ICAP-1^{-/-} (1x10⁷) y posteriormente fueron inyectados intravenosamente (i.v.) en ratones receptores ICAP-1^{+/+}. A lo largo de los experimentos, las células procedentes de los distintos ratones fueron marcadas intercambiando los colorantes para evitar posibles efectos intrínsecos de los marcadores. Una hora y media después de la inyección, los ratones receptores fueron sacrificados, y se extrajeron sus bazos y los NLs axilares e inguinales, los cuales se procesaron como se ha descrito anteriormente, y la suspensión celular obtenida se analizó mediante citometría de flujo. En estos ensayos se analizó asimismo la presencia de linfocitos marcados en sangre periférica obtenida de la región retro-orbital de los ratones. Los datos fueron referidos a la migración de las células ICAP-1^{+/+}, a la que se le otorgó un valor de 1.

Modelo de inflamación peritoneal

Para analizar el reclutamiento de linfocitos en la cavidad peritoneal durante un proceso inflamatorio, los ratones fueron inyectados intraperitonealmente (i.p.) con 1 ml de tioglicolato al 3% (cedido por la Dra. Alicia G. Arroyo, CIB) en PBS estéril. Tras 24 horas, los ratones fueron sacrificados e inyectados i.p. con 10 ml de PBS frío con 1%

BSA y 5 mM EDTA, lavando posteriormente el peritoneo durante 3 min. Las suspensiones celulares obtenidas se pasaron por un filtro de nailon para evitar agregados celulares, se cuantificó la celularidad total de las muestras, las cuales fueron posteriormente analizadas mediante citometría de flujo.

Generación de líneas celulares resistentes a bortezomib

La línea celular de mieloma NCI-H929 fue expuesta a concentraciones crecientes de bortezomib a partir de 5 nM. Las células se cultivaron siempre en presencia de BTZ, el cual fue renovado cada 48 horas con medio fresco completo. La concentración del inhibidor fue aumentada periódicamente tras observarse una tasa de proliferación celular similar a la de las células parentales en ausencia del compuesto. Se generaron dos poblaciones de células NCI-H929 resistentes a 20 nM de BTZ (NCI-H929-R20.1 y NCI-H929-R20.2; ver Resultados), además de una población resistente a 35 nM de BTZ (NCI-H929-R35). De manera similar a las células NCI-H929, generamos líneas de leucemia linfoblástica aguda de células T (T-ALL) y linfoma de células B no Hodgkin (*mantle cell lymphoma*, MCL) resistentes a BTZ. Como modelo de T-ALL se utilizaron células MOLT-4, obteniéndose una población resistente a 7 nM de BTZ (MOLT-4-R7), y como modelo de MCL se utilizaron células Z-138, generándose una población resistente a 10 nM de BTZ (Z-138-R10).

Ensayos de viabilidad y proliferación celular

Para determinar la viabilidad celular se utilizaron Anexina V-FITC (Immunostep, Salamanca, España) e yoduro de propidio (Sigma-Aldrich). Las células (3×10^5 por condición) fueron centrifugadas y lavadas con PBS frío. Tras otra centrifugación adicional, las células fueron resuspendidas en 300 μ l de solución de unión a Anexina V (10 mM HEPES pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl_2), e incubadas durante 10 min a temperatura ambiente y en oscuridad con Anexina V-FITC. Finalmente, y previo al análisis de las muestras por citometría de flujo, se añadió yoduro de propidio (10 μ g/ml) a cada una de ellas. Para ensayos de proliferación celular, se utilizó el reactivo CCK-8 (Sigma-Aldrich). Las células en suspensión (100 μ l) a valorar fueron añadidas por triplicado a pocillos de placas de 96 pocillos, añadiéndose a continuación 5 μ l de la sal de tetrazolio (*water soluble tetrazolium salt*, WST-8 o CCK-8), y las placas fueron finalmente incubadas a 37°C durante 2 horas. La sal de tetrazolio fue reducida por la actividad deshidrogenasa de las células, proceso por el que se obtenía una sal amarillenta soluble en el medio de cultivo que hacía virar el color del medio. La absorbancia fue determinada a 450 nm en un lector de fluorescencia (*Titertek Multiskan PLUS MK II Microplate Reader*).

Ensayos de adhesión celular

Utilizamos el método descrito por Garcia-Bernal *et al.* (2005) para desarrollar los experimentos de adhesión a los ligandos de la integrina $\alpha 4\beta 1$. Las placas de 96 pocillos (High Binding, Costar, Corning Incorporated, Kennebunk, ME) fueron tapizadas por

triplicado para cada condición con el fragmento recombinante de la fibronectina FN-H89 (CS-1/FN, 5 µg/ml), el cual contiene la región de unión a dicha integrina, o con VCAM-1-Fc (1.25-5 µg/ml), tanto en ausencia como en presencia de CXCL12 inmovilizado (650 ng/ml). Asimismo, se realizaron experimentos de adhesión sobre ICAM-1 recombinante (5 µg/ml). Para el tapizado de los pocillos, los ligandos fueron preparados en solución de *coating* (0.1 M NaHCO₃, pH 8.8), incubándose a 4°C durante 16 horas. A continuación, las placas fueron incubadas durante 1.5 h a 37°C y, posteriormente, se procedió a bloquear los pocillos durante 40 min a 37°C utilizando 0.25% BSA (Roche, Basilea, Suiza) en 0.1 M NaHCO₃, pH 8.8. Paralelamente, las células a analizar fueron marcadas durante 30 min a 37°C con BCECF-AM (Molecular Probes), a una concentración de 2.8 µg/ml en medio RPMI 1640/0.5% BSA. Tras eliminar mediante centrifugación el marcador no incorporado, se añadieron por triplicado 75000-125000 células en un volumen de 100 µl por pocillo. En adhesiones de tiempos cortos en presencia de CXCL12 (2-4 min a 37°C), para facilitar el decantamiento de las células al fondo de los pocillos para contactar los ligandos, se realizó una centrifugación rápida de 5 segundos previa a la incubación de la placa. Si el ensayo de adhesión se realizó en ausencia de la quimioquina (20 min a 37°C), se evitó el paso de centrifugación. Posteriormente, se procedió al lavado de los pocillos con medio RPMI 1640 para eliminar las células no adheridas, y las células adheridas fueron lisadas en PBS-SDS 0.1%, cuantificándose la adhesión celular en un analizador de fluorescencia *Varioskan Flash Multimode Reader* (ThermoFisher Scientific). Los datos de adhesión se han representado relativos a las células control.

Para los experimentos de adhesión sobre estroma de MO, utilizamos la línea celular estromal HS-27A, las cuales fueron cultivadas 24-48 horas antes de la adhesión en placas de 96 pocillos. Dichas células fueron expuestas a TNF-α (1.5 µg/ml, Immunotools) durante 16 h a 37°C para estimular la expresión de VCAM-1. Posteriormente, 75000 células marcadas con BCECF-AM fueron añadidas sobre la monocapa de las células HS-27A en un volumen de 100 µl. Tras 20 min de adhesión, se procedió a la lisis celular y cuantificación de la adhesión tal y como se expone más arriba.

Ensayos de unión soluble a VCAM-1

Las células fueron sometidas a *starving* (privadas de suero) durante 2 horas, y resuspendidas posteriormente en medio de unión HBSS carente de cationes (Gibco Invitrogen) y suplementado con 2% de FBS. A continuación, las células fueron estimuladas durante 40 segundos a 37°C con CXCL12 (200 ng/ml) en medio de unión, y seguidamente se añadió VCAM-1-Fc (10 µg/ml) durante 2 min a 37°C. Como control positivo de unión a VCAM-1-Fc, las células fueron incubadas en medio de unión suplementado con 1 mM de MnCl₂. Para detener la unión de VCAM-1-Fc, se realizó un lavado con medio de unión frío. En el caso del control positivo expuesto a manganeso, estos lavados fueron realizados con medio de unión suplementado con MnCl₂ (0.5 mM). Finalmente, las células fueron incubadas durante 20 min a 22°C con el anticuerpo secundario anti-IgGfc humano (Jackson Immunoresearch Lab.), para posteriormente analizar las muestras mediante citometría de flujo.

Análisis de la activación de integrinas $\beta 1$

Los esplenocitos de ratones ICAP-1^{+/+} y ICAP-1^{-/-} fueron cultivados durante 1 hora a 37°C y 5% CO₂ en cámaras de Ibidi GmbH (Planegg, Germany) pre-tratadas con poli-L-Lisina (PLL; Sigma-Aldrich), o con proteína A (Sigma-Aldrich) y VCAM-1-Fc de ratón. Posteriormente, las células fueron fijadas con 4% de paraformaldehído (PFA, Sigma-Aldrich) en PBS durante 10 min a temperatura ambiente, y a continuación, fueron incubadas con un anticuerpo bloqueante de receptores Fc (*Purified Rat anti-mouse CD16/CD32*, clon 2.4G2, BD Bioscience) durante 10 min en hielo. Tras varios lavados con TBS-T (TBS-Tween 0.1%), las células fueron incubadas con el anticuerpo monoclonal 9EG7 (10 µg/ml, BD Biosciences), el cual reconoce un epítipo presente en las integrinas $\beta 1$ de ratón en su conformación activa, o con el correspondiente anticuerpo control, seguido de una incubación con anticuerpos secundarios (goat anti-rat Alexa Fluor 488, Molecular Probes). Una vez se realizaron varios lavados consecutivos con TBS-T, TBS y agua, las muestras fueron montadas utilizando *ProLongTM Diamond Antifade Mountant with DAPI* (Molecular Probes), siendo analizadas utilizando el objetivo 100x con aceite de inmersión en un microscopio Zeiss Axioplan acoplado a una cámara CCD Digital Leica DFC 350 FX.

Para determinar el estado de activación de integrinas $\beta 1$ en células humanas, éstas fueron sometidas a *starving* en medio HBSS libre de cationes para evitar una estimulación basal de la integrina. Posteriormente, las células fueron incubadas durante 40 segundos en ausencia o presencia de CXCL12 (200 ng/ml) previo a la incubación durante 30 min a 4°C con el anticuerpo monoclonal HUTS-21 (10 µg/ml, Becton Dickinson, San Diego, CA), el cual reconoce un epítipo de la subunidad $\beta 1$ en su conformación activa. Como control positivo para la activación de las integrinas, las células fueron incubadas con medio HBSS con 1 mM MnCl₂. Tras un lavado, las células fueron incubadas durante 30 min a 4°C con anticuerpos secundarios frente a IgG de ratón conjugado con Alexa Fluor 488 (Jackson Immunoresearch Lab., Cambridge, UK). Las muestras fueron analizadas por citometría de flujo y la intensidad de fluorescencia se representa como la diferencia entre los valores referidos a las células control, a las que se les otorgó un valor de 1.

Western blotting

Tras sedimentar, por centrifugación, las células en el medio de cultivo, el *pellet* celular fue solubilizado en solución GST-FISH: 1% Nonidet P-40 (Sigma-Aldrich), 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 10% glicerol, suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa (Sigma-Aldrich). Tras 30 min a 4°C, las muestras fueron centrifugadas a 13000 rpm durante 15 min a 4°C. Se utilizó el reactivo Bradford (Protein Assay, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) para la cuantificación de la concentración proteica presente en los sobrenadantes de los lisados, midiendo la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro. Las muestras (50-100 µg de proteína total) fueron hervidas a 100°C durante 5 min en solución de carga (10% SDS, 50% glicerol, 100 mM de DTT o de β -mercaptoetanol, 100 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.05% de azul de bromofenol). Las proteínas se separaron mediante electroforesis en geles de

poliacrilamida (8-15%) en presencia de SDS (SDS-PAGE; PanReac AppliChem, Darmstadt, Alemania). Posteriormente, las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (Bio-Rad Laboratories), las cuales fueron bloqueadas con BSA al 3% en TBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Las membranas fueron incubadas durante 16 horas a 4°C con los anticuerpos primarios indicados en la **tabla 2**, y tras tres lavados de 5 min con TBS-T, se llevó a cabo la incubación con los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano (*horseradish peroxidase*, HRP) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Las bandas proteicas fueron visualizadas con el sustrato quimioluminiscente *Immobilon Western* (Millipore, Billerica, MA) utilizando un detector de quimioluminiscencia Fujifilm LAS 3000 *Image Reader*. El densitometrado de las bandas se realizó utilizando los programas ImageJ y Fujifilm Multi Gauge. Cuando fueron necesarios posteriores análisis sobre las mismas membranas, éstas fueron sometidas a un proceso de *stripping* para liberar los anticuerpos unidos con anterioridad. Para ello, las membranas fueron incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente en una solución con 1% de glicina, 1% de SDS, 0.05% de Nonidet P-40, a pH 2.2. Seguidamente, las membranas fueron lavadas tres veces con TBS-T, y a continuación, fueron bloqueadas con 3% BSA en TBS-T, para finalmente ser incubadas con los anticuerpos primarios, tal y como se ha descrito más arriba.

Ensayos de fraccionamiento celular

Las células (5-10 millones) fueron centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos, y el *pellet* celular fue resuspendido en 300 µl de solución de lisis: 10 mM HEPES pH 8 (Gibco Invitrogen), 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 34 mM sacarosa, 10% glicerol, 1 mM DTT y 0.1% Tritón X-100 (Sigma-Aldrich), suplementado con inhibidores de proteasas. Tras su incubación durante 5 minutos en hielo, las muestras fueron centrifugadas a 3500 rpm durante 5 min a 4°C. El sobrenadante obtenido tras este paso corresponde a la fracción citoplasmática. El *pellet* fue lavado con otros 300 µl de solución de lisis, y tras la centrifugación, el sobrenadante fue descartado y el resto fue resuspendido en 150 µl de solución GST-FISH e incubado en hielo durante 15 minutos. Tras 3 etapas de sonicación, las muestras fueron centrifugadas durante 15 min a 4°C. El sobrenadante obtenido representa la fracción nuclear de las células. Tras la cuantificación proteica de ambas fracciones mediante Bradford, se procedió a realizar SDS-PAGE y *western blotting*. Como control de carga para la fracción citoplasmática se utilizó un anticuerpo frente a vinculina, y como control de carga de la fracción nuclear se utilizó un anticuerpo frente a SAM-68.

Ensayos de actividad GTPasa (*Pull Down*)

El vector codificante para la proteína de fusión GST-RAF-RBD fue cedido por el Dr. Johannes L. Bos (*University Medical Center Utrecht*, Utrecht, Países Bajos). Esta proteína se une a formas de Ras activas, y fue generada siguiendo un procedimiento descrito anteriormente (Sander *et al.*, 1998). Las células (25-30 millones) fueron solubilizadas en solución GST-FISH suplementado con inhibidores de proteasas, y tras

25 min a 4°C, los lisados fueron centrifugados a 15000 rpm durante 15 min a 4°C, cuantificándose los sobrenadantes mediante Bradford. Se utilizaron 40 µg de proteína por cada condición como control de carga del lisado total. El lisado procedente de las bacterias que contenía la proteína GST-RAF-RBD fue incubado 2 horas a 4°C con *beads* de glutatión-sefarosa (GE Healthcare Bio-Sciences). Posteriormente, estas *beads* fueron lavadas con GST-FISH a 4°C, y a continuación, 1 mg de proteína procedente de los lisados celulares fue incubado durante 16 horas a 4°C con las *beads* unidas a la proteína de fusión. Seguidamente, las *beads* fueron lavadas de nuevo con GST-FISH a 4°C, y finalmente las muestras fueron hervidas durante 15 min en solución de carga, resolviéndose en geles de poliacrilamida al 12% en presencia de SDS, siguiendo el protocolo de *western blotting* detallado anteriormente. Las membranas de PVDF a las que se transfirieron las proteínas fueron incubadas con el anticuerpo anti-Ras.

Inmunoprecipitación

Los ensayos de inmunoprecipitación se realizaron para analizar la asociación de ICAP-1 con la subunidad β1, siguiendo el protocolo ya descrito (Ticchioni *et al.*, 2002). Las células NCI-H929 se sometieron a *starving* durante 2-3 horas y, posteriormente fueron solubilizadas durante 25 min a 4°C en solución de lisis (0.5% NP-40, 20 mM trietanolamina pH 8, 300 mM NaCl, 2 mM EDTA, 20% glicerol) en presencia de inhibidores de proteasas y fosfatasas. Las muestras fueron centrifugadas a 13000 rpm durante 15 minutos a 4°C, y los lisados se incubaron inicialmente durante 1.5 h a 4°C con *beads* de proteína G-sefarosa (GE Healthcare Bio-Sciences) para eliminar uniones inespecíficas. Posteriormente, se cuantificó el contenido proteico mediante el reactivo Bradford, incubándose a continuación 1 mg del lisado durante 16 horas a 4°C con un anticuerpo anti-β1. Finalmente, se añadieron las *beads* de proteína G-sefarosa durante 2 horas a 4°C para permitir la unión entre los anticuerpos y las *beads*. Tras lavar tres veces con la solución de lisis y hervir las muestras con solución de carga durante 15 minutos, las proteínas se resolvieron por SDS-PAGE y fueron analizadas por *western blotting*, utilizando anti-β1 como control de carga.

Ensayos de RT-qPCR

Las células fueron lisadas utilizando el reactivo TriReagent (Sigma-Aldrich), y el RNA total celular se extrajo con cloroformo, precipitándose posteriormente con isopropanol y etanol. La concentración de RNA fue cuantificada midiendo la absorbancia del extracto a 260 nm (A_{260}) en el Nanodrop ND-1000. El cDNA se obtuvo a partir del RNA utilizando la transcriptasa inversa M-MLV (Promega, Madison, WI), dNTPs (Roche) y hexámeros aleatorios de desoxirribonucleótidos (ThermoFisher Scientific), siguiendo las especificaciones del fabricante. La amplificación del cDNA se realizó por RT-qPCR utilizando el protocolo detallado en la **tabla 5** en el termociclador LightCycler 480 (Roche) usando los oligonucleótidos listados en la **tabla 6**, *Fast Start Essential DNA Green Master* (Roche), compuesta por la Taq DNA polimerasa FastStart y el fluoróforo SYBR Green I. Este fluoróforo se une a la doble hebra de DNA generado tras los

diferentes ciclos de amplificación, lo que aumenta la señal de manera proporcionalmente directa a la cantidad de producto de la PCR en la reacción, haciendo posible monitorizar el proceso. Los análisis se realizaron por triplicado y los resultados fueron normalizados a los niveles de expresión para TBP (*TATA binding protein*).

Tabla 5. Protocolo empleado para los análisis por RT-qPCR.

	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Pre-amplificación	95	5 min	1
Amplificación	95 (desnaturalización)	10 s	45
	60 (anillamiento y extensión)	30 s	
Melting	95	1 min	1
	60	1min	
	97	Continuo	
Cooling	4		

Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados en los ensayos de RT-qPCR.

Diana	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
<i>msTBP</i>	GGGGAGCTGTGATGTGAAGT	CCAGGAAATAATTCTGGCTCA
<i>msThpok (5)</i>	GACTTGGTGGGAGCTTAACCC	TCCCCATCTTCTCACTTCCTGGT
<i>msThpok (3)</i>	GGGGACTTGGTGGGAGCTTA	CTCCCCATCTTCTCACTTCCTG
<i>msIl-7R (5)</i>	AGGCTCCCTCTGACCTGAAA	AGATACATGCGTCCAGTTGCT
<i>msETS1 (1)</i>	CCCCTTCCACTGGGTTCAAA	ACATTCCATGTCCGGGGAAG
<i>msETS1 (6)</i>	CTCAAGCCGACTCTCACCAT	GCACATTCCATGTCCGGGG
<i>msMYC (6)</i>	CGATTCCACGGCCTTCTCTC	CTTGCTCTTCTCAGAGTCGCT
<i>msMYC (1)</i>	CAGCGACTCTGAAGAAGAGCA	TTGTGCTGGTGAGTGGAGAC
<i>msSOCS1 (1)</i>	CCGCCAGATGAGCCCAC	GGTTGCGTGCTACCATCCTA
<i>msSOCS1 (2)</i>	GTCCTGCCGCCAGATGAG	GAGACAGAGGCAGTGAGCC
<i>msRunx3 (71)</i>	GCTCTCTCAGCACCACGAG	TCAGGTCTGAGGAGCCTTG
<i>msRunx3 (4)</i>	TCTGAACCCAACCCCCTGA	GTGCTCGGGTCTCGTATGAAG
<i>hICAP-1</i>	ACCGTCATCGTAACACACCA	AAAACCTTGCAAATGGCTTG
<i>hTBP</i>	CGGCTGTTTAACTTCGCTTC	CACACGCCAAGAAACAGTGA
<i>hGAPDH</i>	AGCCACATCGCTCAGACAC	GCCAATACGACCAAATCC
<i>hITGA4</i>	GATGAAAATGAGCCTGAAACG	GCCATACTATTGCCAGTGTTGA
<i>hITGB1</i>	CAAGTTGCAGTTTGTGGATCA	AGTGAAACCCGGCATCTG
<i>hCXCR4</i>	GGTGGTCTATGTTGGCTCT	ACTGACGTTGGCAAAGATGA
<i>hPSMB5</i>	GATGATCTGTGGCTGGGATA	TTCCCTTCACTGTCCACGTA
<i>hNFKB1</i>	CTGGCAGCTCTTCTCAAAGC	TCCAGGTCATAGAGAGGCTCA
<i>hFOXO3a</i>	CTCGAACCTCTGCGAACAC	GATGGGCCCTTGTCACTTC

Transfección celular

La línea celular NCI-H929 fue transfectada de forma transitoria mediante nucleofección con diferentes oligos de siRNA (**Tabla 7**), los cuales fueron utilizados a una concentración final de entre 200 y 400 nM. Las células (10-15 millones) en crecimiento exponencial se centrifugaron y fueron nucleofectadas con el dispositivo *Amaxa NucleofectorTM* (Amaxa, Colonia, Alemania), utilizando el protocolo T-01 especificado por el fabricante para la transfección de dichas células. Tras la transfección, las células fueron cultivadas entre 24-48 horas en medio completo, analizándose la eficiencia del silenciamiento por citometría de flujo o por *western blotting*. Estos transfectantes se usaron en ensayos de adhesión celular, análisis de la activación de $\beta 1$ utilizando el anticuerpo HUTS-21, RT-qPCR y ensayos de microscopía intravital (IVM). La viabilidad de los distintos transfectantes fue comprobada mediante análisis de ciclo celular con yoduro de propidio y Anexina V-FITC, y ensayos de CCK-8.

Tabla 7. Relación de los siRNAs utilizados.

siRNA	Secuencia (5'-3')	Casa comercial
Control siRNA	AUUGUAUGCGAUCGCAGACdTdT	Sigma-Aldrich
ICAP-1 siRNA(1)	CAGUGAGUUAACUCUCAAUdTdT	Sigma-Aldrich
ICAP-1 siRNA(2)	GUGAGUUAACUCUCAAUdTdT	Sigma-Aldrich

Modelos *in vivo* de mieloma múltiple

Para analizar la infiltración de células de MM en la MO y la formación de plasmacitomas utilizamos ratones inmunodeprimidos NSG, los cuales fueron mantenidos en condiciones de esterilidad y libres de patógenos, con alimento y agua *ad libitum*, y sometidos a un fotoperiodo 12/12. Toda la experimentación desarrollada con estos animales fue implementada siguiendo las directrices del Comité de Ética del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Para los estudios de infiltración en la MO de células de MM resistentes a BTZ, se utilizaron las células RPMI-8226 y RPMI-8226-R7, siguiendo el protocolo establecido (Gutiérrez-González *et al.*, 2016). Estas fueron incubadas durante 20 min a 37°C con anticuerpos control (P3) o anticuerpos anti- $\alpha 4$ (ALC 1.63), a una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$, previo a la inoculación en los ratones. Las células (2 millones por grupo) resuspendidas en 100 μl de medio RPMI 1640 en presencia de los anticuerpos previamente especificados, fueron inyectadas en la vena de la cola de los ratones NSG, utilizando entre 7 y 9 animales por grupo. El tratamiento con ambos anticuerpos se inició 2 días tras la inoculación celular, administrándose vía peritoneal cada 2-3 días. Los anticuerpos fueron preparados a una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$ en un volumen final de 150 μl de PBS. Estos animales fueron pesados y examinados de 2 a 3 veces por semana, y cuando se observó una disminución en su peso y posteriormente una parálisis de las extremidades traseras, se sacrificó al conjunto de ratones utilizados. La MO fue extraída y utilizada para el análisis por citometría de flujo del porcentaje de células humanas

(HLA⁺), además de la expresión de $\alpha 4$ por parte de estas células utilizando el anticuerpo ALC 1.63, el cual reconoce esta proteína de origen humano. Estas muestras fueron asimismo procesadas y utilizadas en ensayos de RT-qPCR para analizar la relación entre el mRNA para la GAPDH humana y la TBP murina.

Para los experimentos de formación de plasmacitomas, se resuspendieron 1.5 millones de células NCI-H929 y NCI-H929-R20.1 en 200 μ l de medio RPMI 1640, las cuales fueron posteriormente inyectadas subcutáneamente en el flanco derecho de los ratones. Estos fueron examinados diariamente con el fin de detectar el comienzo del crecimiento tumoral, y las medidas de los tumores fueron tomadas cada 2-3 días. El tratamiento con BTZ (0.8 mg/kg) en DMSO empezó el mismo día en el que se detectó inicialmente el crecimiento del tumor (aproximadamente día 6), administrándose vía i.p. cada 2-3 días, y tratando en paralelo con PBS/DMSO a otro grupo de ratones control. Los ratones fueron sacrificados a los 19 días de la inoculación celular, los tumores extraídos fueron pesados y medidos, y posteriormente utilizados para análisis por RT-qPCR.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa GraphPad Prism 5. Los valores aislados fueron excluidos de acuerdo al test de Grubbs. Dos grupos de datos distribuidos de manera normal fueron comparados utilizando el test t-Student. Los resultados fueron considerados como significativos cuando las diferencias encontradas mostraban un *p value* menor que 0.05 ($p < 0.05$). Las diferencias que resultaron no tener significancia estadística se denominan como ns. Cuando se trataba de una disminución y las diferencias eran significativas, fueron representadas como *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ y * $p < 0.05$. En el caso de aumentos significativos, fueron representadas como $\Delta\Delta\Delta p < 0.001$, $\Delta\Delta p < 0.01$ y $\Delta p < 0.05$. En las gráficas se representa la media poblacional, así como el error estándar (SEM), especificándose en la leyenda de la figura en el caso de representar la desviación estándar (SD).

RESULTADOS

OBJETIVO 1: PAPEL DE ICAP-1 EN LA ADHESIÓN LINFOCITARIA Y EN EL DESARROLLO DEL SISTEMA INMUNITARIO. IMPLICACIÓN DE ICAP-1 EN EL TRÁFICO DE CÉLULAS DE MIELOMA MÚLTIPLE

La activación de las integrinas está regulada por proteínas intracelulares que interaccionan con los dominios citoplasmáticos de las subunidades β . Como ya se ha mencionado, la talina y las proteínas kindlin se unen a dicho dominio y actúan como reguladores positivos de la activación de las integrinas y de la adhesión celular. Por el contrario, ICAP-1 compite con talina y kindlin por la unión a la subunidad $\beta 1$, por lo que podría tener un papel negativo en dicha activación.

La regulación por ICAP-1 de la activación de las integrinas fue inicialmente demostrada en células epiteliales (Liu *et al.*, 2000) y en osteoblastos (Bouvard *et al.*, 2007; Bouvard *et al.*, 2003). Resultados preliminares del grupo del Dr. Joaquín Teixidó mostraron un aumento de la activación de integrinas $\beta 1$ y de la adhesión dependiente de $\alpha 4\beta 1$ en células T humanas silenciadas para ICAP-1 (Tesis Doctoral, Soledad Isern de Val, 2016). Utilizando ratones deficientes en ICAP-1, se observó que la ausencia de esta proteína correlacionaba con un aumento significativo de la adhesión a VCAM-1 de linfocitos de bazo de ratones ICAP-1^{-/-} (KO) en comparación con células de ratones ICAP-1^{+/+} (WT). Este efecto pudo detectarse asimismo en ensayos de adhesión en presencia de la quimioquina CXCL12. Colectivamente, estos datos sugirieron que ICAP-1 regulaba negativamente la adhesión dependiente de $\alpha 4\beta 1$ en linfocitos T primarios.

Posteriormente, se determinó el papel de ICAP-1 en distintas etapas de la adhesión leucocitaria, utilizando ensayos de adhesión en condiciones de flujo y determinación del *spreading* linfocitario. Estos experimentos indicaron que la falta de ICAP-1 se traducía en un aumento de linfocitos adheridos de manera estable o realizando *rolling*, en comparación con células WT. Adicionalmente, aunque sólo pudo llevarse a cabo un solo experimento (n=1), los ensayos de adhesión en flujo indicaron que no existían diferencias en el reforzamiento de la adhesión entre linfocitos ICAP-1^{+/+} y ICAP-1^{-/-}. Asimismo, tanto los linfocitos ICAP-1^{-/-} como los WT mostraron cinéticas similares de *spreading* sobre VCAM-1/CXCL12. En conjunto, estos resultados sugerían que ICAP-1 regula las primeras etapas del proceso de adhesión linfocitaria dependiente de $\alpha 4\beta 1$.

Dado que $\alpha 4\beta 1$ contribuye al tráfico linfocitario, el cual juega un importante papel en desarrollo, nos propusimos estudiar el efecto de la ausencia de ICAP-1 en la generación de células del sistema inmune. Para la obtención de los ratones ICAP-1^{-/-}, se cruzaron entre sí ratones heterocigotos debido a la baja fertilidad mostrada por los ratones KO. La descendencia fue genotipada por PCR convencional y los productos de la reacción fueron resueltos en geles de agarosa. El presente trabajo ha contado con la colaboración de Nohemí Arellano Sánchez, con una amplia experiencia en investigación con animales de experimentación, y cuyo esfuerzo y dedicación han sido muy importantes para el óptimo progreso de este estudio.

En este objetivo se ha profundizado en el estudio de la regulación de la adhesión dependiente de $\alpha 4\beta 1$ de linfocitos deficientes para ICAP-1, y se han analizado las consecuencias de la falta de ICAP-1 en desarrollo y maduración en timo, bazo y médula

ósea. Por otro lado, se ha caracterizado asimismo el papel desempeñado por ICAP-1 en los procesos migratorios de las células de MM dependientes de la integrina $\alpha 4\beta 1$.

Caracterización del fenotipo adhesivo de linfocitos deficientes en ICAP-1

Como ya se había descrito con anterioridad (Bouvard *et al.*, 2007), los ratones ICAP-1^{-/-} mostraban un tamaño bastante inferior a ratones ICAP-1^{+/+}, y esta diferencia era especialmente notable en ratones de 3 a 5 semanas de edad (Figura 16).

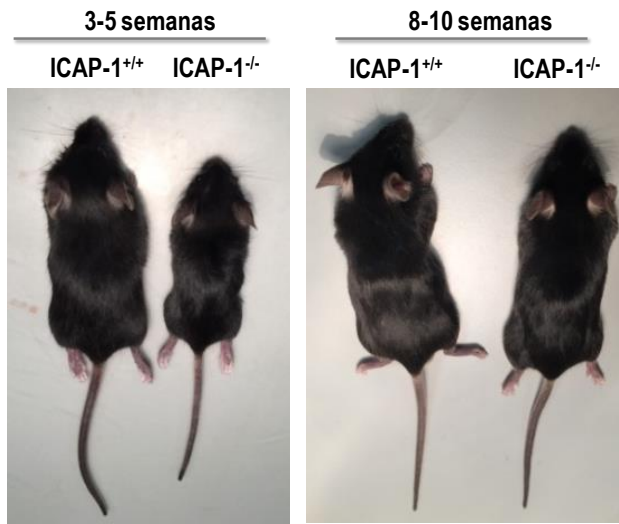
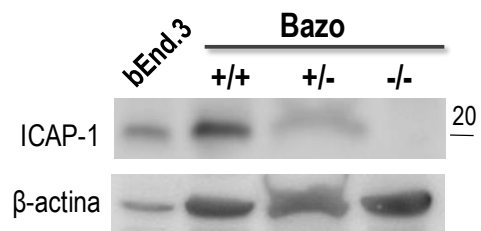


Figura 16. Ratones ICAP-1^{+/+} y ICAP-1^{-/-} en diferentes franjas de edad.

En la Tesis Doctoral de Soledad Isern de Val (2016), se utilizó *western blotting* para analizar la expresión de ICAP-1 en células de bazo de ratones ICAP-1^{+/+}, ICAP-1^{+/-} y ICAP-1^{-/-} (Figura 17).

Figura 17. Expresión de ICAP-1 en células de bazo. Análisis mediante *western blotting* de la expresión de ICAP-1 en bazo de los grupos indicados. Se utilizaron las células bEnd.3 como control positivo para la expresión de ICAP-1 y β -actina como control de carga (Tesis Doctoral Soledad Isern de Val, 2016).



En el presente trabajo hemos analizado la expresión de talina y kindlin-3 mediante *western blotting* utilizando células de bazo, sin detectar alteraciones significativas en sus niveles de expresión ni en su migración electroforética, entre ratones ICAP-1^{+/+} y ICAP-1^{-/-} (Figura 18).

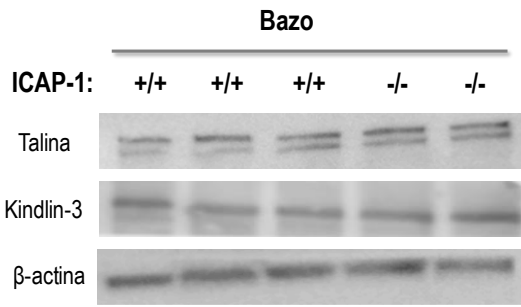


Figura 18. Expresión de talina y kindlin-3 en esplenocitos de ratones ICAP-1^{+/+} y ICAP-1^{-/-}. Análisis por *western blot* de la expresión de talina y kindlin-3. Se utilizó β -actina como control de carga.

Utilizando citometría de flujo, determinamos los niveles de integrina $\beta 1$ presente en la superficie de diferentes poblaciones celulares del bazo. Mientras que no se observaron diferencias en cuanto a la expresión de $\beta 1$ en las poblaciones de células T CD4⁺ y CD8⁺ entre ratones ICAP-1^{+/+} y ICAP-1^{-/-}, se detectó un pequeño incremento, aunque no significativo, de la expresión de $\beta 1$ en células B220⁺ deficientes en ICAP-1 (Figura 19).

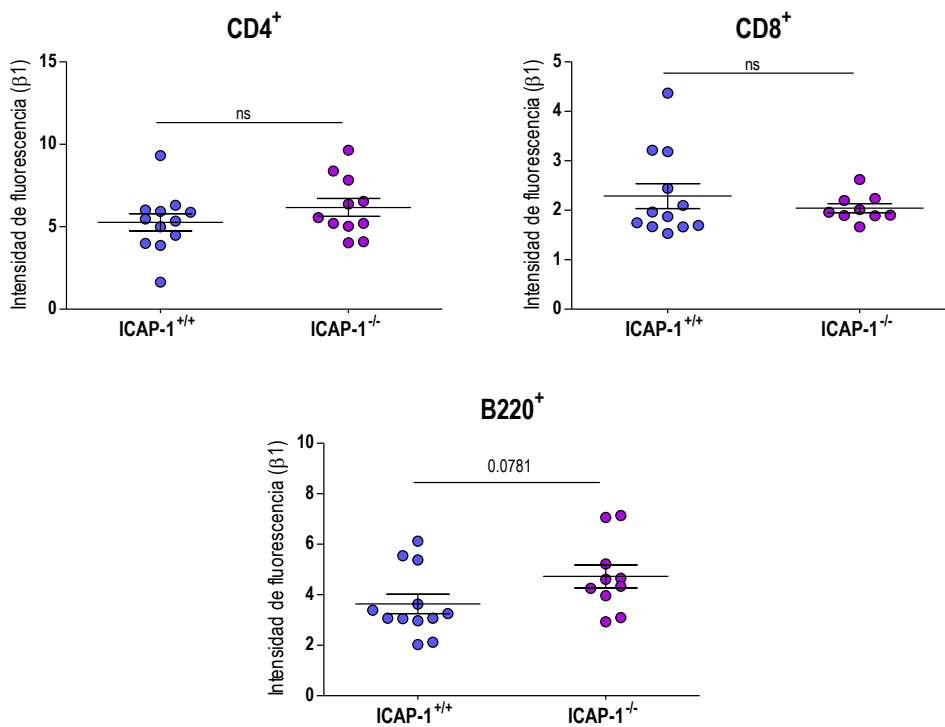


Figura 19. Expresión de $\beta 1$ en la superficie de linfocitos de bazo de ratones ICAP-1^{+/+} y ICAP-1^{-/-}. Se representa la intensidad de fluorescencia detectada en ensayos de citometría de flujo en las poblaciones esplénicas indicadas.

Por otra parte, detectamos un mínimo, pero significativo, aumento en los valores de intensidad de fluorescencia para $\alpha 4$ en linfocitos T CD8⁺ de ratones ICAP-1^{-/-}, en comparación con esplenocitos WT (1.8 y 1.5, respectivamente), mientras que para las células B220⁺ ICAP-1^{-/-} se observaba de nuevo un aumento de la expresión de $\alpha 4$ no

significativo, en comparación con las células control (**Figura 20**). En conjunto, estos datos indican que la expresión de $\alpha 4\beta 1$ es similar en linfocitos T y B de ratones ICAP-1^{-/-} y ICAP-1^{+/+}.

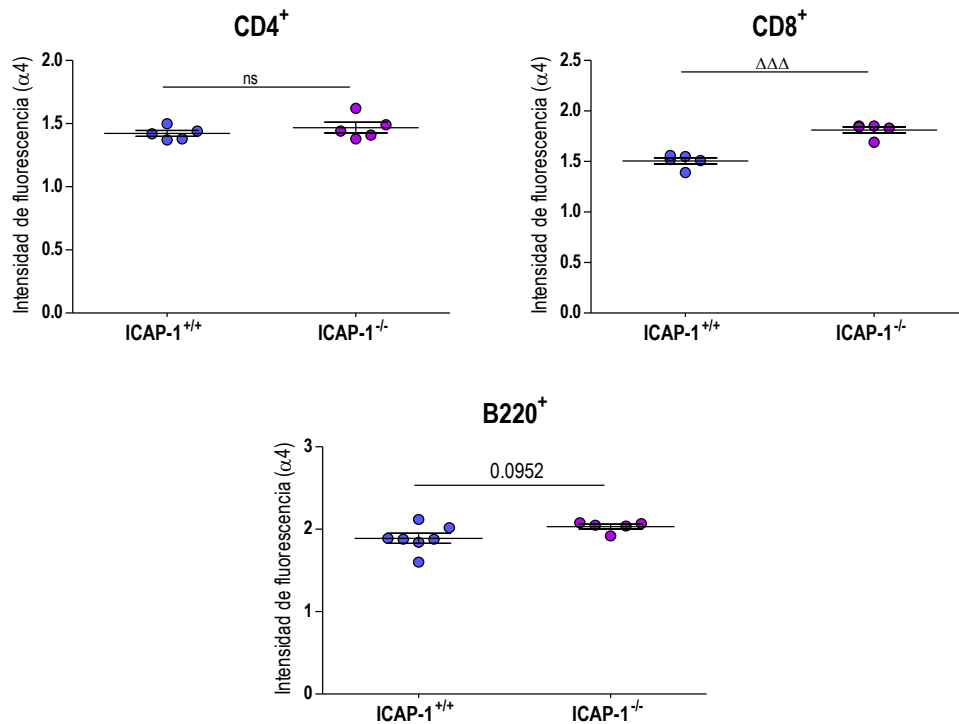


Figura 20. Expresión de $\alpha 4$ en la superficie de linfocitos de bazo de ratones ICAP-1^{+/+} y ICAP-1^{-/-}. La expresión de $\alpha 4$ fue analizada mediante citometría de flujo.

Para analizar si la falta de ICAP-1 alteraba la adhesión de determinadas poblaciones del bazo, aislamos mediante selección negativa células T CD3⁺ y células B CD19⁺ realizando, a continuación, ensayos de adhesión estática al fragmento recombinante de la fibronectina que contiene la región CS-1 (CS-1/FN), y a VCAM-1, en ausencia o presencia de CXCL12. Los resultados mostraron que las células CD3⁺ y CD19⁺ de ratones ICAP-1^{-/-} presentaban un aumento de la adhesión a ambos ligandos de $\alpha 4\beta 1$ en comparación con la adhesión de las células de ratones ICAP-1^{+/+} (**Figura 21A**). Confirmando la especificidad de la unión de ICAP-1 a la subunidad $\beta 1$, pero no a la $\beta 2$ (Zhang & Hemler, 1999; Chang *et al.*, 1997), no se detectaron cambios significativos en la adhesión de esplenocitos a ICAM-1 (**Figura 21B**), un ligando de la integrina $\alpha L\beta 2$, ni en ausencia ni en presencia de CXCL12.

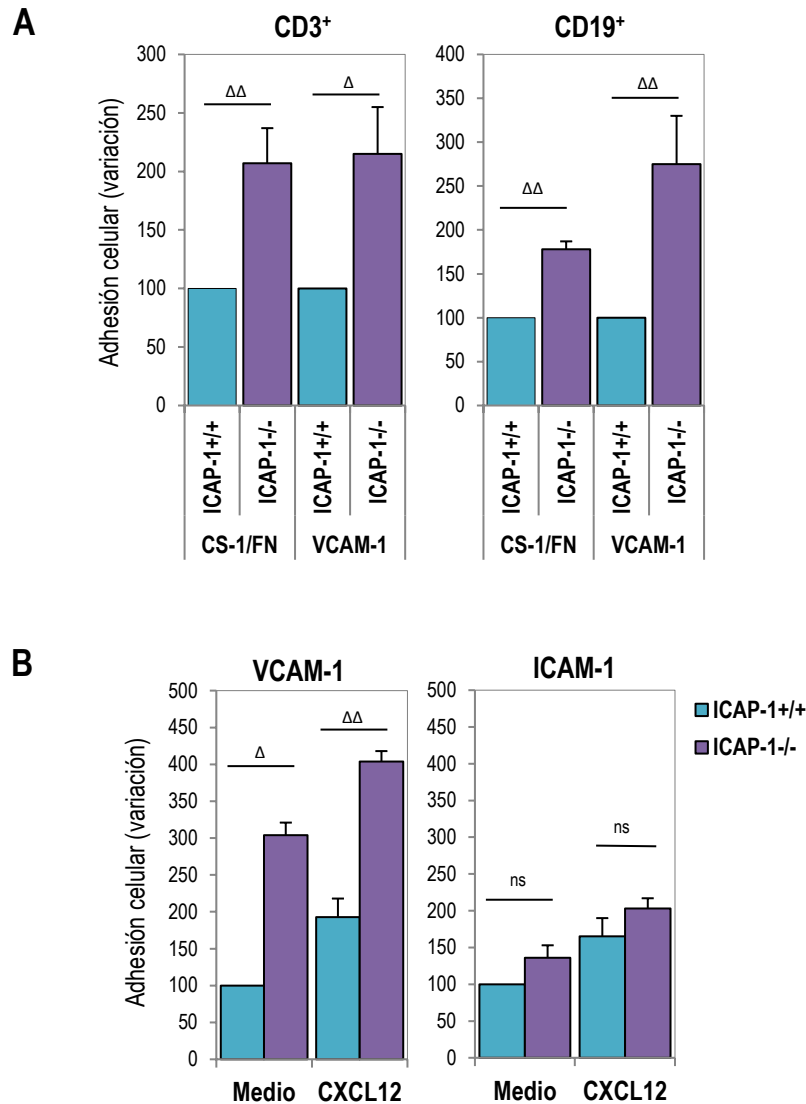


Figura 21. Adhesión de células de bazo de ratones ICAP-1^{+/+} y ICAP-1^{-/-} a ligandos de $\alpha 4\beta 1$ y de $\alpha L\beta 2$. **(A)** La adhesión de células T CD3⁺ y B CD19⁺ fue llevada a cabo durante 20 minutos a 37°C en condiciones estáticas (n=3). **(B)** La adhesión de esplenocitos totales a VCAM-1 e ICAM-1 co-inmovilizados en ausencia o presencia de CXCL12 se realizó en las mismas condiciones que en (A) (n=3-6). En ambos apartados, las barras de error representan la SD.

Estos resultados, junto con datos previos de nuestro grupo mostrando que los linfocitos ICAP-1^{-/-} poseen mayor adhesión a VCAM-1/CXCL12 en condiciones de flujo que los linfocitos WT (Tesis Doctoral, Soledad Isern de Val, 2016), resaltan el papel inhibitorio de ICAP-1 en la adhesión linfocitaria mediada por la integrina $\alpha 4\beta 1$.

Para determinar si ICAP-1 regula la activación de integrinas $\beta 1$ en linfocitos, llevamos a cabo experimentos de inmunofluorescencia con linfocitos ICAP-1^{+/+} y ICAP-1^{-/-} de bazo utilizando el anticuerpo monoclonal 9EG7, el cual reconoce un epítipo en la subunidad $\beta 1$ de células de ratón cuando ésta se encuentra en una conformación de alta afinidad (Lenter *et al.*, 1993). Para ello, adherimos esplenocitos a poli-L-lisina o a VCAM-1 y analizamos la unión de dicho anticuerpo, observando que la ausencia de

ICAP-1 en linfocitos estaba asociado a un aumento de la activación de la integrina $\beta 1$ (**Figura 22**). Estos resultados están en consonancia con la regulación negativa que ICAP-1 tiene sobre la activación de integrinas $\beta 1$ y que había sido observado previamente en osteoblastos deficientes en ICAP-1 (Bouvard *et al.*, 2007).

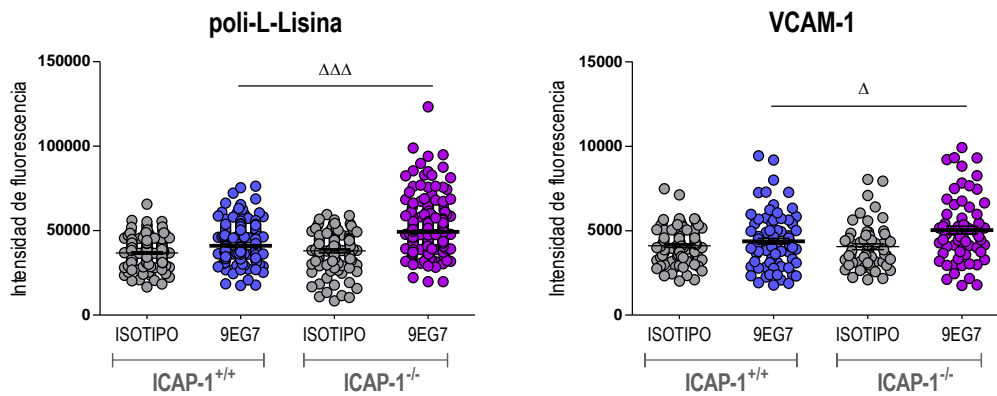


Figura 22. Análisis de la activación de integrinas $\beta 1$ en linfocitos ICAP-1^{+/+} y ICAP-1^{-/-}. El análisis de la unión del anticuerpo anti- $\beta 1$ 9EG7 a esplenocitos totales adheridos a poli-L-lisina o VCAM-1 fue realizado mediante microscopía de fluorescencia. Se muestra la intensidad de fluorescencia cuantificada para cada uno de los esplenocitos analizados.

Puesto que ICAP-1 regulaba la activación y la adhesión linfocitaria de las integrinas $\beta 1$, analizamos el efecto de su ausencia en la migración de esplenocitos a diferentes órganos linfoides. Para ello, marcamos diferencialmente esplenocitos ICAP-1^{+/+} y ICAP-1^{-/-} con marcadores vitales, y los inyectamos intravenosamente a una relación 1:1 en ratones ICAP-1^{+/+}. Resultados previos han mostrado que una gran parte de los linfocitos que entran en el bazo se liberan en la zona marginal (MZ), un nicho donde se expresan VCAM-1 e ICAM-1 (Pillai & Cariappa, 2009; Nagasawa, 2006; Lo *et al.*, 2003). Ambas proteínas son necesarias para la retención de células B en la MZ al interactuar con $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha L\beta 2$, respectivamente, aunque diferentes estudios revelaron que $\alpha 4\beta 1$ no desempeña un papel importante en la migración de linfocitos al bazo (Hartmann *et al.*, 2009; Lo *et al.*, 2003; Berlin-Rufenach *et al.*, 1999). El análisis de la migración competitiva hacia el bazo de esplenocitos marcados reveló solo un pequeño aumento en la migración de células ICAP-1^{-/-} comparado con células WT, mientras que el número de esplenocitos que migraron a ganglios linfáticos (NL) o que permanecieron en la sangre periférica (PB, *peripheral blood*) se redujo ligeramente (**Figura 23**). Estas pequeñas diferencias en migración reflejan probablemente el hecho de que $\alpha 4\beta 1$ parece no jugar un papel relevante en la migración linfocitaria a bazo.

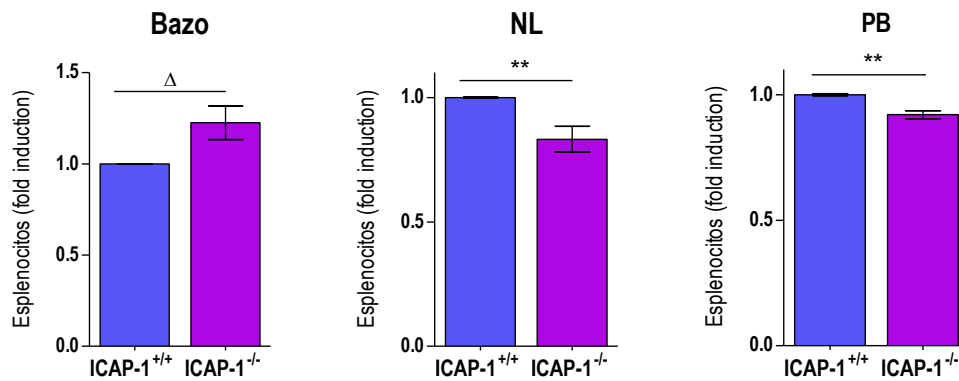


Figura 23. Análisis de la migración de esplenocitos ICAP-1^{+/+} y ICAP-1^{-/-}. Linfocitos de bazo de ratones ICAP-1^{+/+} y ICAP-1^{-/-} fueron marcados con CFSE y Far Red, y se inyectaron por vía intravenosa en ratones ICAP-1^{+/+} en una proporción de 1:1. Las células que migraron a bazo y NL, o permanecieron en sangre periférica (PB), fueron cuantificadas por citometría de flujo. Los datos se refieren a la migración de células WT, a las que se les asignó un valor de 1 (n=6).

Dado que las integrinas $\alpha 4$ facilitan la migración de linfocitos T a peritoneo inflamado por tioglicolato (TG), posiblemente mediante la interacción entre $\alpha 4\beta 1$ y VCAM-1 (Arroyo *et al.*, 2000), nos planteamos la posibilidad de que la falta de ICAP-1 pudiera alterar la capacidad migratoria de las células T hacia el peritoneo inflamado. Por ello, provocamos peritonitis en ratones ICAP-1^{+/+} y ICAP-1^{-/-} inyectando TG y, posteriormente, analizamos la capacidad de infiltración de las células T CD4⁺ y CD8⁺ en el peritoneo de estos animales. Los resultados mostraron que no existían diferencias entre el número total de células infiltradas en esta cavidad al comparar ratones ICAP-1^{+/+} y ICAP-1^{-/-} (datos no mostrados). Aunque detectamos pequeños cambios en el número de células CD4⁺ y CD8⁺ que habían migrado al peritoneo, estas variaciones no resultaron ser estadísticamente significativas (Figura 24).

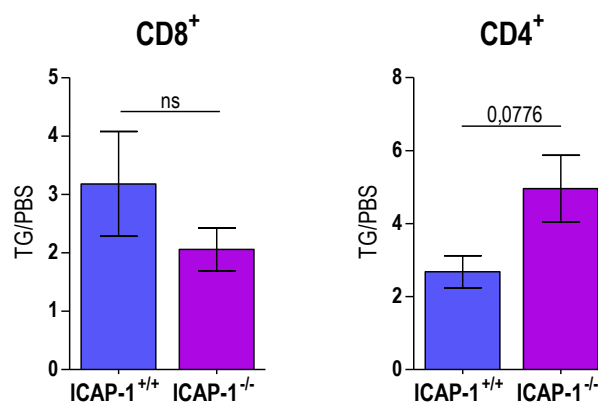


Figura 24. Infiltración de células T en modelos de peritonitis en ratones ICAP-1^{+/+} y ICAP-1^{-/-}. Tras 24 h de la administración del TG, se analizaron mediante citometría de flujo las poblaciones de células T (CD4⁺ y CD8⁺) que infiltraron el peritoneo. Se representa la inducción de la infiltración celular del peritoneo de los ratones que recibieron TG frente a los que recibieron PBS (n=6-9).

La ausencia de ICAP-1 afecta al desarrollo de las células T CD8⁺ de timo

Para caracterizar el sistema inmune en ratones deficientes en ICAP-1, iniciamos nuestro estudio con el timo, un órgano linfoide primario al que llegan células progenitoras del linaje T desde la médula ósea, y que acaban diferenciándose en linfocitos T maduros. Pudimos observar que el tamaño de los timos ICAP-1^{-/-} era menor que el de los ratones ICAP-1^{+/+} (Figura 25A), lo cual era especialmente evidente al comparar los timos de ratones de 3-5 semanas de edad, aunque también fue detectada en timos de ratones de 8-10 semanas (Figura 25A). Este menor tamaño se tradujo en una disminución del número de células totales en timos de ratones KO, en comparación con timos de ratones WT (Figura 25B).

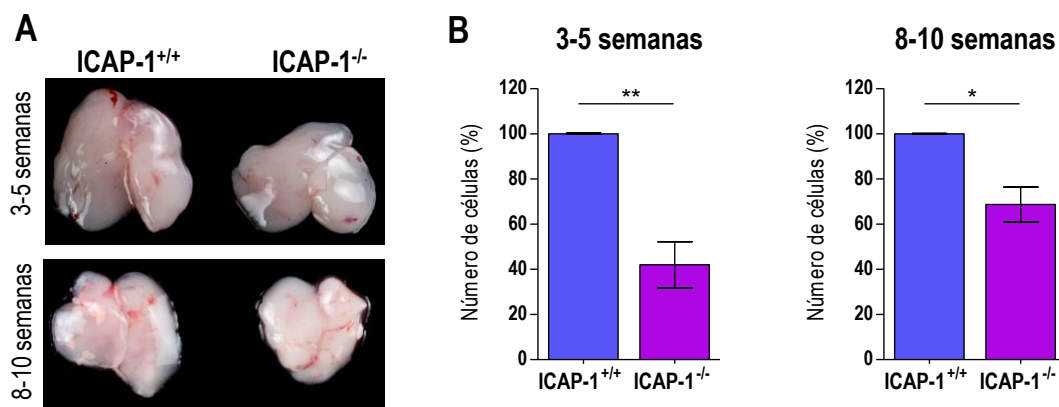


Figura 25. Tamaño y celularidad de timos de ratones ICAP-1^{+/+} y ICAP-1^{-/-}. (A) Fotografías de timos procedentes de ratones ICAP-1^{+/+} y ICAP-1^{-/-}. (B) Número de células totales de los timos de estos grupos de ratones. Los datos se muestran referenciados a los animales ICAP-1^{+/+}, a los que se les dio un valor de 100 (n=11-18).

Posteriormente, demostramos que ICAP-1 no se expresaba en células de timos de ratones ICAP-1^{-/-}, en ambos rangos de edades (Figura 26).

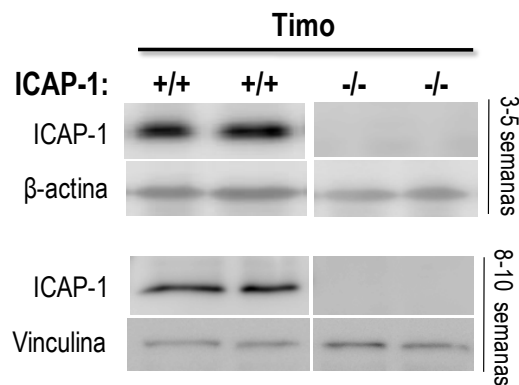
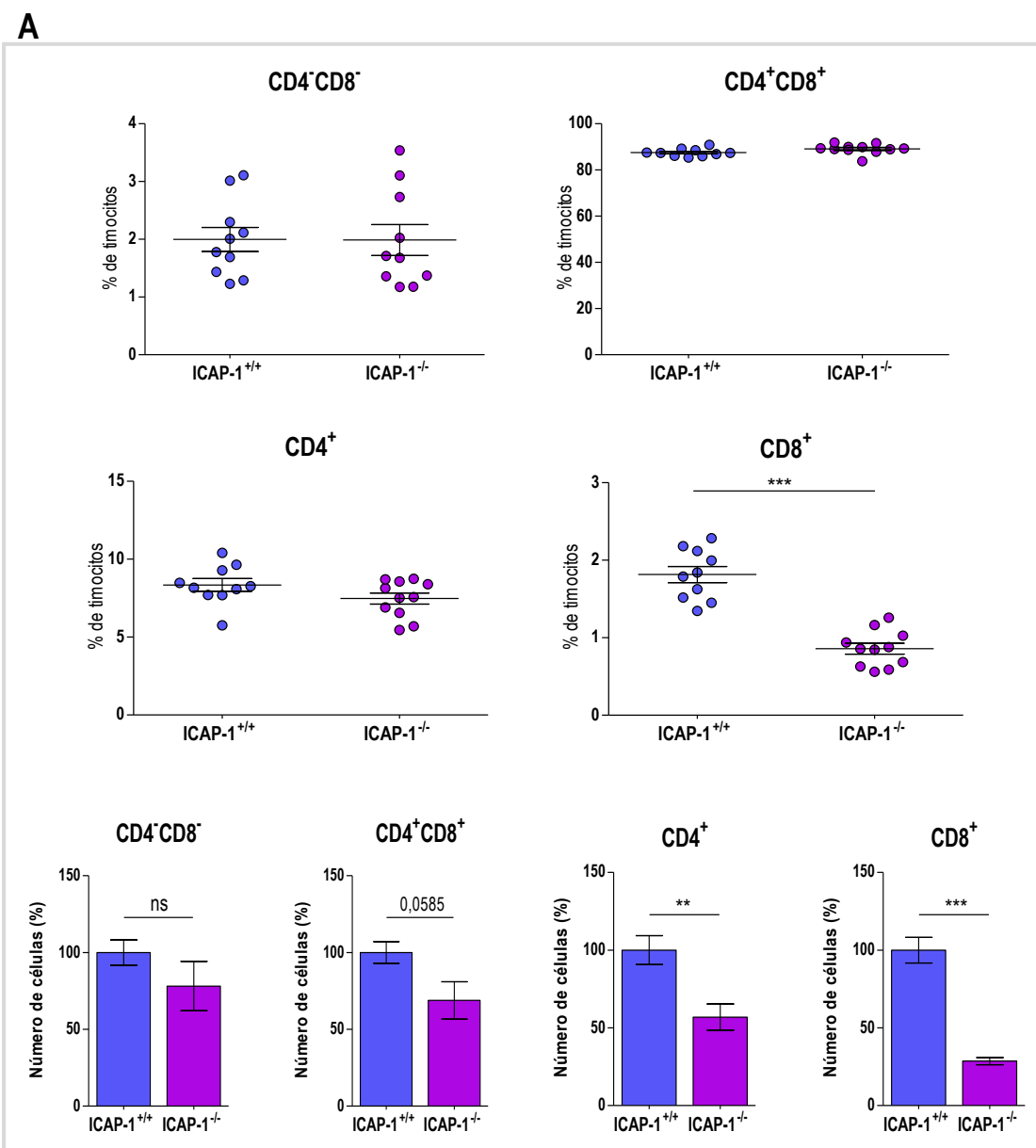


Figura 26. Expresión de ICAP-1 en timocitos. Análisis por western blotting de la expresión de ICAP-1 en timocitos de ratones ICAP-1^{+/+} y ICAP-1^{-/-}.

Notablemente, al comparar mediante citometría de flujo la distribución de poblaciones celulares tímicas entre ratones ICAP-1^{-/-} y ICAP-1^{+/+}, detectamos una disminución significativa de los porcentajes de células CD8⁺ SP (*single positive*) en los ratones ICAP-1^{-/-} (Figura 27). Por el contrario, no hallamos diferencias entre las poblaciones CD4⁻CD8⁻ DN (*double negative*), CD4⁺CD8⁺ DP (*double positive*) y CD4⁺ SP, lo que sugiere un defecto específico en la generación de células CD8⁺ SP. Consecuentemente, aunque la celularidad de las poblaciones DP y CD4⁺ y CD8⁺ SP estaba disminuida en los timos ICAP-1^{-/-}, lo que reflejaba la reducción de la celularidad total tímica, la disminución fue particularmente evidente en las células CD8⁺ SP. Estos resultados sugieren que la falta de ICAP-1 altera específicamente la selección y el desarrollo intra-tímico desde la población DP a la CD8⁺ SP.



B

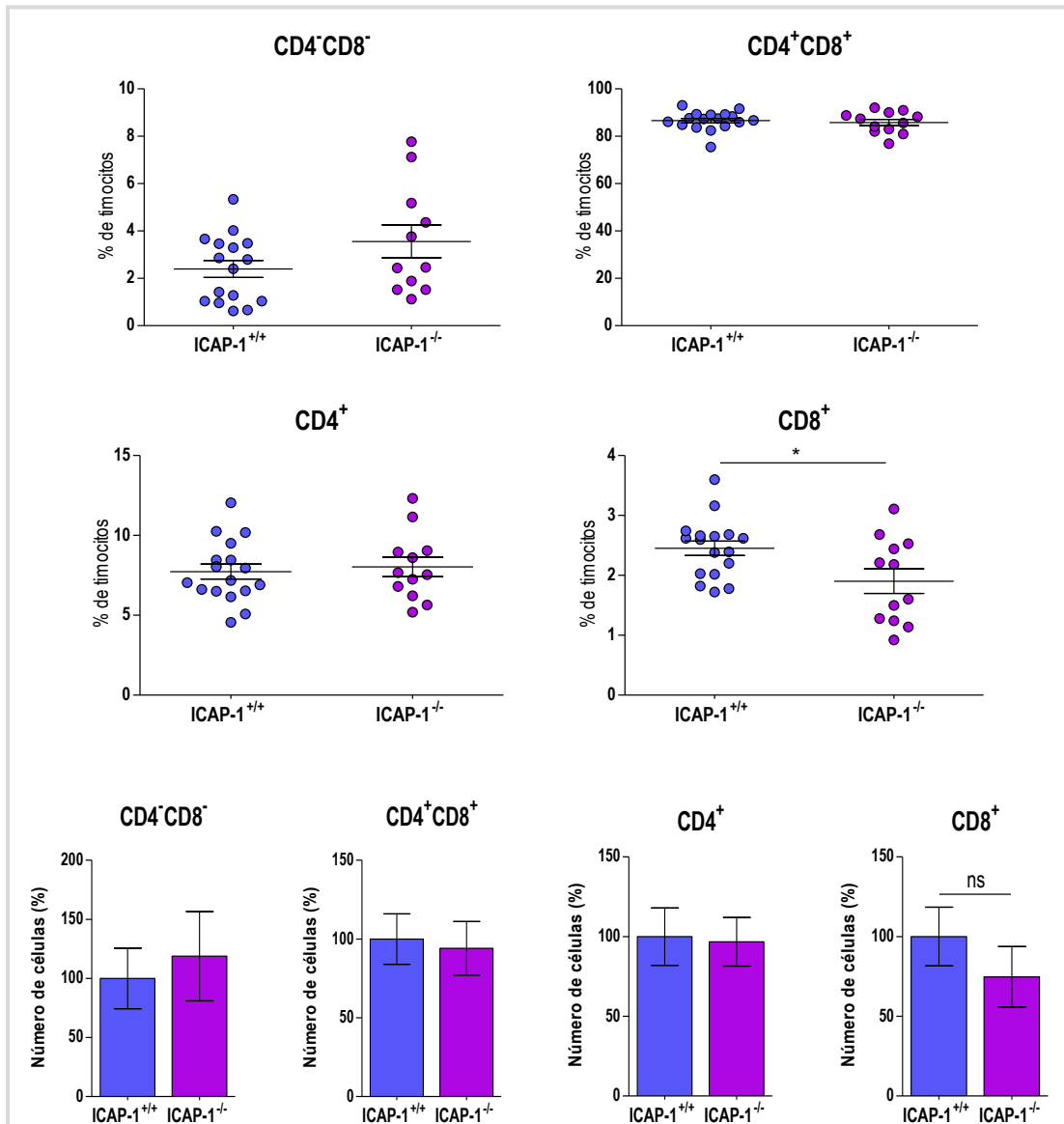


Figura 27. Caracterización de poblaciones celulares en los timos de ratones ICAP-1^{-/-} y ICAP-1^{+/+}. Se representan los porcentajes para cada una de las poblaciones analizadas por citometría de flujo, así como las medias del número de células referenciadas a los obtenidos para los ratones ICAP-1^{+/+}, a los que se les asignó un valor de 100 (n=5-10). Se muestran los datos obtenidos para timos de ratones de 3- 5 semanas (A) y de 8-10 semanas (B).

La expresión del CD69 es un rasgo característico durante el inicio del proceso de selección positiva de timocitos que tiene lugar en el estadio TCR $\alpha\beta$ ⁺ CD4⁺CD8⁺, y que se traduce en la generación de timocitos CD4⁺ y CD8⁺ SP (Hare *et al.*, 1999; Vanhecke *et al.*, 1997; Yamashita *et al.*, 1993). Para analizar la expresión de CD69 en ratones ICAP-1^{-/-}, iniciamos una colaboración con las Dras. María Luisa Toribio y Patricia Fuentes, pertenecientes al Centro De Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO, Madrid). De manera notable, observamos una clara reducción de los porcentajes de células CD69^{hi} en

la población $\text{TCR}\alpha\beta^+ \text{CD8}^+ \text{SP}$ en los ratones $\text{ICAP-1}^{-/-}$, en comparación con los ratones WT (**Figura 28**). Detectamos asimismo una reducción de la población $\text{TCR}\alpha\beta^+ \text{CD4}^+ \text{CD69}^{\text{hi}}$, si bien la diferencia fue mucho menor. Estos datos confirman que la falta de ICAP-1 afecta la selección positiva de las células $\text{CD8}^+ \text{SP}$, por tanto, indicando que ICAP-1 regula el desarrollo de las células T CD8^+ .

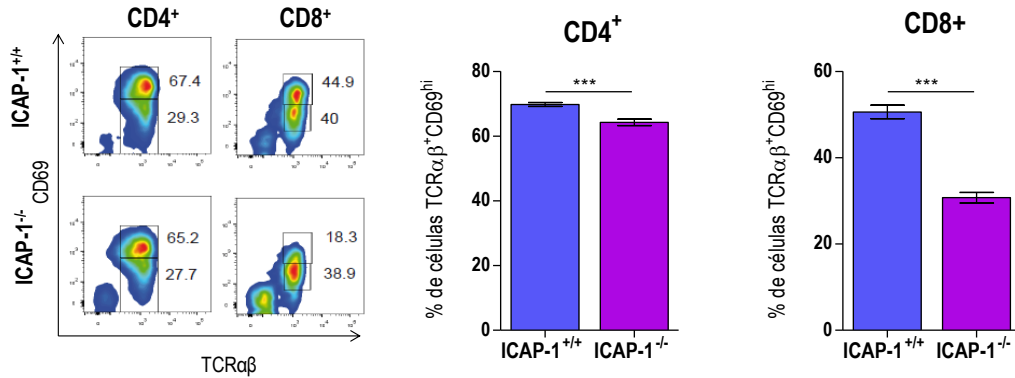


Figura 28. Expresión de CD69 y $\text{TCR}\alpha\beta$ en timocitos CD4^+ y CD8^+ de ratones $\text{ICAP-1}^{+/+}$ y $\text{ICAP-1}^{-/-}$. La expresión de CD69 y $\text{TCR}\alpha\beta$ fue analizada por citometría de flujo. Se representa tanto la distribución de las poblaciones celulares en forma de gráficas de densidades (izquierda), así como la cuantificación de la expresión de CD69^{hi} en células $\text{TCR}\alpha\beta^+ \text{CD4}^+$ y $\text{TCR}\alpha\beta^+ \text{CD8}^+$ de ratones de 3-5 semanas de edad (derecha, $n=4$).

El estudio de proliferación celular mediante análisis de la expresión por citometría de flujo de Ki67 reveló que no existían diferencias significativas de proliferación entre las diferentes poblaciones celulares del timo comparando ratones $\text{ICAP-1}^{-/-}$ y WT (**Figura 29**).

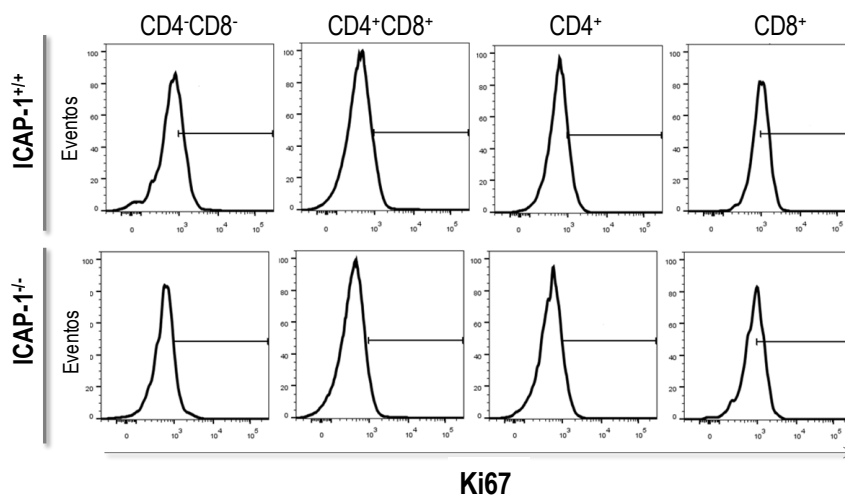


Figura 29. Análisis de la tasa de proliferación de diferentes poblaciones celulares tímicas de ratones $\text{ICAP-1}^{+/+}$ y $\text{ICAP-1}^{-/-}$. Las tasas de proliferación fueron analizadas mediante citometría de flujo utilizando un anticuerpo frente a Ki67. Se presentan histogramas de las diferentes poblaciones celulares del timo, para cada grupo de ratones. Se muestra un resultado representativo de 4 experimentos.

A continuación, examinamos el fenotipo adhesivo de células de timo de ratones deficientes en ICAP-1. De modo similar a lo que observamos en bazo, ensayos de *western blotting* revelaron que la falta de expresión de ICAP-1 en células de timo no afectaba a la expresión y la migración electroforética de talina, kindlin-3 y $\beta 1$ intracelular (**Figura 30**).

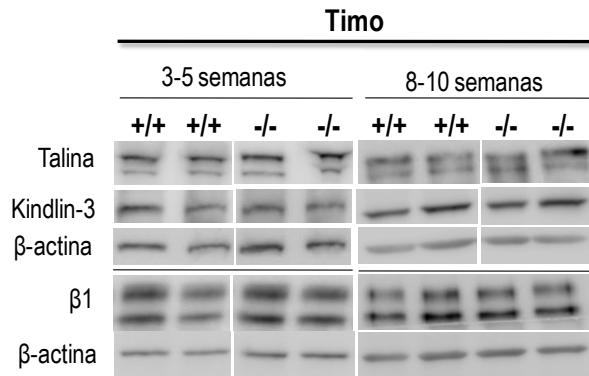


Figura 30. Expresión de talina, kindlin-3 y $\beta 1$ en timocitos de ratones ICAP-1^{+/+} y ICAP-1^{-/-}. La expresión fue analizada por *western blot* en muestras de timo de ratones de diferentes edades. Se utilizó β -actina como control de carga.

Experimentos de citometría de flujo revelaron niveles similares de expresión de $\beta 1$ en la membrana de diferentes subpoblaciones de timocitos de ratones ICAP-1^{-/-} y WT, aunque pudimos detectar una tendencia hacia aumentos moderados de expresión de $\beta 1$ en células DN y CD8⁺ SP de ratones de 3-5 semanas, pero no en ratones de 8-10 semanas (**Figura 31**). La adhesión mediada por $\alpha 4\beta 1$ contribuye a la localización de diferentes poblaciones de timocitos en los distintos compartimentos del timo (Salomon *et al.*, 1997). Sin embargo, utilizando diferentes modelos de ratón deficientes para integrinas $\alpha 4$ se ha concluido que la diferenciación de las células T en el timo no es dependiente de $\alpha 4\beta 1$ (Bungartz *et al.*, 2006; Gribi *et al.*, 2006; Arroyo *et al.*, 1996).

Posteriormente, realizamos ensayos de adhesión de timocitos totales (85-90% CD4⁺CD8⁺) a CS-1/FN, observando niveles de adhesión similares entre timocitos ICAP-1^{+/+} y ICAP-1^{-/-}, independientemente de si la adhesión se llevó a cabo a tiempos cortos (2-4 min) (**Figura 32**) tras una corta centrifugación, o a tiempos más largos (20-30 min) (no mostrado).

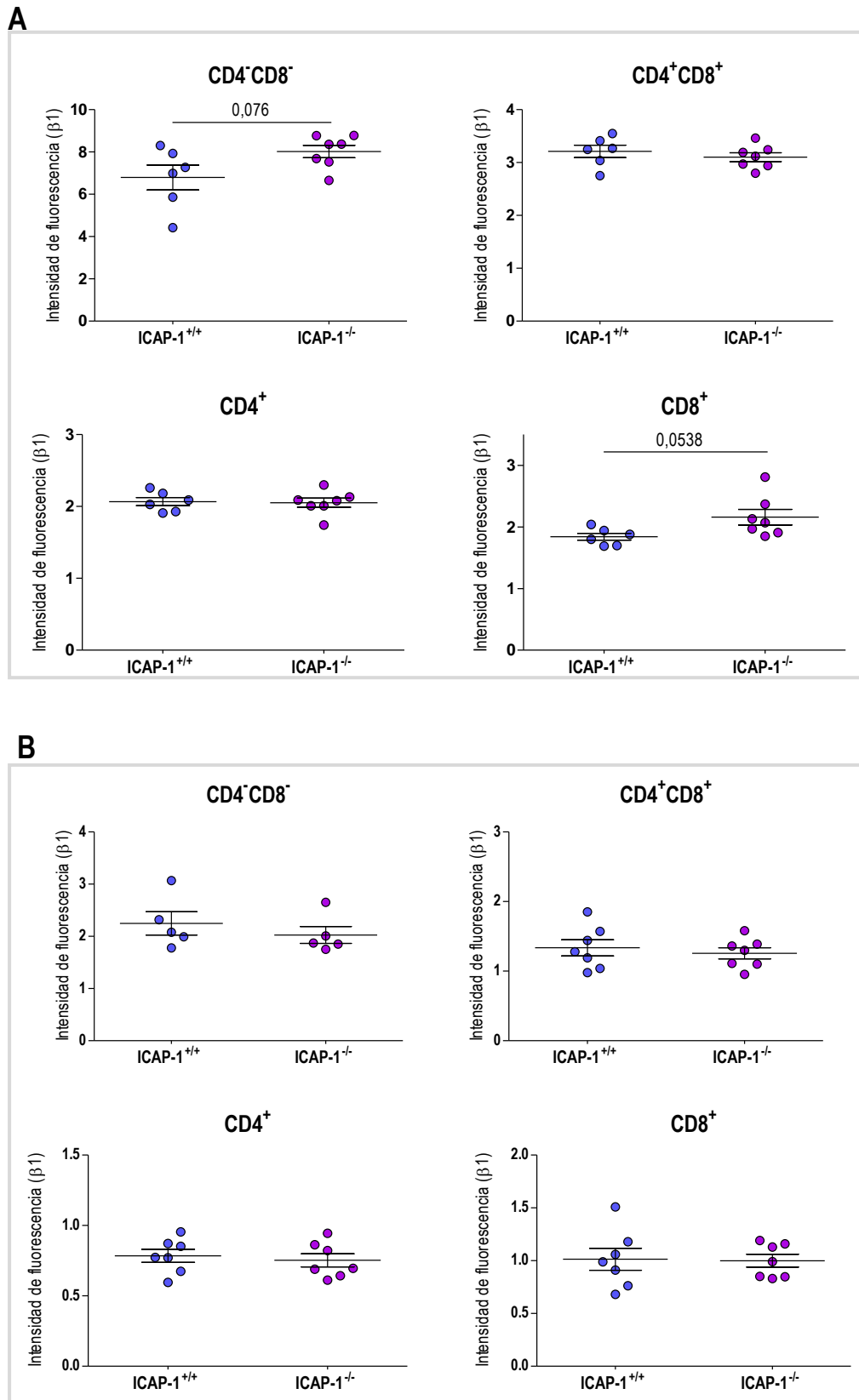


Figura 31. Expresión de $\beta 1$ en la membrana de timocitos. La expresión de $\beta 1$ en timocitos de ratones de 3-5 (A) y 8-10 semanas (B) fue analizada mediante citometría de flujo.

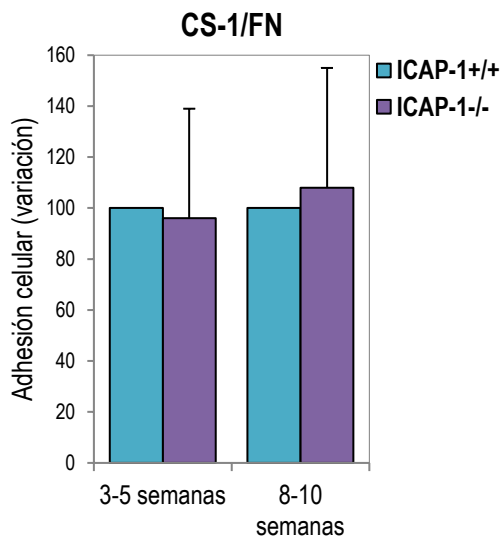


Figura 32. Ensayos de adhesión de timocitos a CS-1/FN. Los timocitos totales obtenidos de ratones ICAP-1^{+/+} y ICAP-1^{-/-} fueron analizados en ensayos de adhesión al fragmento recombinante CS-1/FN de la fibronectina (n=8). Las barras de error representan la SD.

El correcto tráfico y localización de los timocitos en las diferentes regiones del timo es asimismo dependiente de quimioquinas, las cuales contribuyen a que los timocitos en diferentes estadios de diferenciación reciban los estímulos correctos para optimizar el proceso de la timopoyesis (Lopez-Cotarelo *et al.*, 2017; Schulz *et al.*, 2016; Love & Bhandoola, 2011). Los receptores CCR7, CCR9 y CXCR4 se expresan de manera diferencial en distintas subpoblaciones tímicas, por lo que comparamos su expresión mediante citometría de flujo en timocitos de ratones ICAP-1^{-/-} y ICAP-1^{+/+}. CCR7 interacciona con las quimioquinas CCL19 y CCL21, expresadas en la médula, y regula la migración de timocitos desde el córtex hacia la médula tras realizarse la selección positiva (Kwan & Killeen, 2004; Ueno *et al.*, 2004). La expresión de CCR7 mostró una pequeña reducción en la población CD4⁺ SP de timos ICAP-1^{-/-}, mientras que no se detectaron variaciones en las demás poblaciones analizadas (Figura 33A, B). CCR9 interacciona con la quimioquina CCL25, y facilita el tráfico de células DN a la región subcapsular del timo (Uehara *et al.*, 2002; Carramolino *et al.*, 2001), mientras que la unión CXCR4/CXCL12 contribuye a la retención de la subpoblación DP en el córtex (Suzuki *et al.*, 1999; Berkowitz *et al.*, 1998). No se observaron alteraciones en la expresión de CCR9 comparando poblaciones celulares ICAP-1^{-/-} y ICAP-1^{+/+} (Figura 33A, D), y CXCR4 se detectó especialmente en las células DP, con niveles similares en células deficientes para ICAP-1 o WT (Figura 33A, C). Dado que sólo se detectaron cambios mínimos en la expresión de receptores de quimioquinas en las diferentes subpoblaciones de timocitos en ratones deficientes en ICAP-1, los resultados sugieren que la alteración en el desarrollo de las células CD8⁺ observada en dichos ratones no parece deberse a alteraciones en el tráfico de los timocitos entre diferentes regiones tímicas. Sin embargo, no podemos excluir que posibles variaciones en la expresión de CCL19/21 y/o CXCL12 en los ratones ICAP-1^{-/-} pudiera perturbar la migración de los timocitos e influenciar su desarrollo.

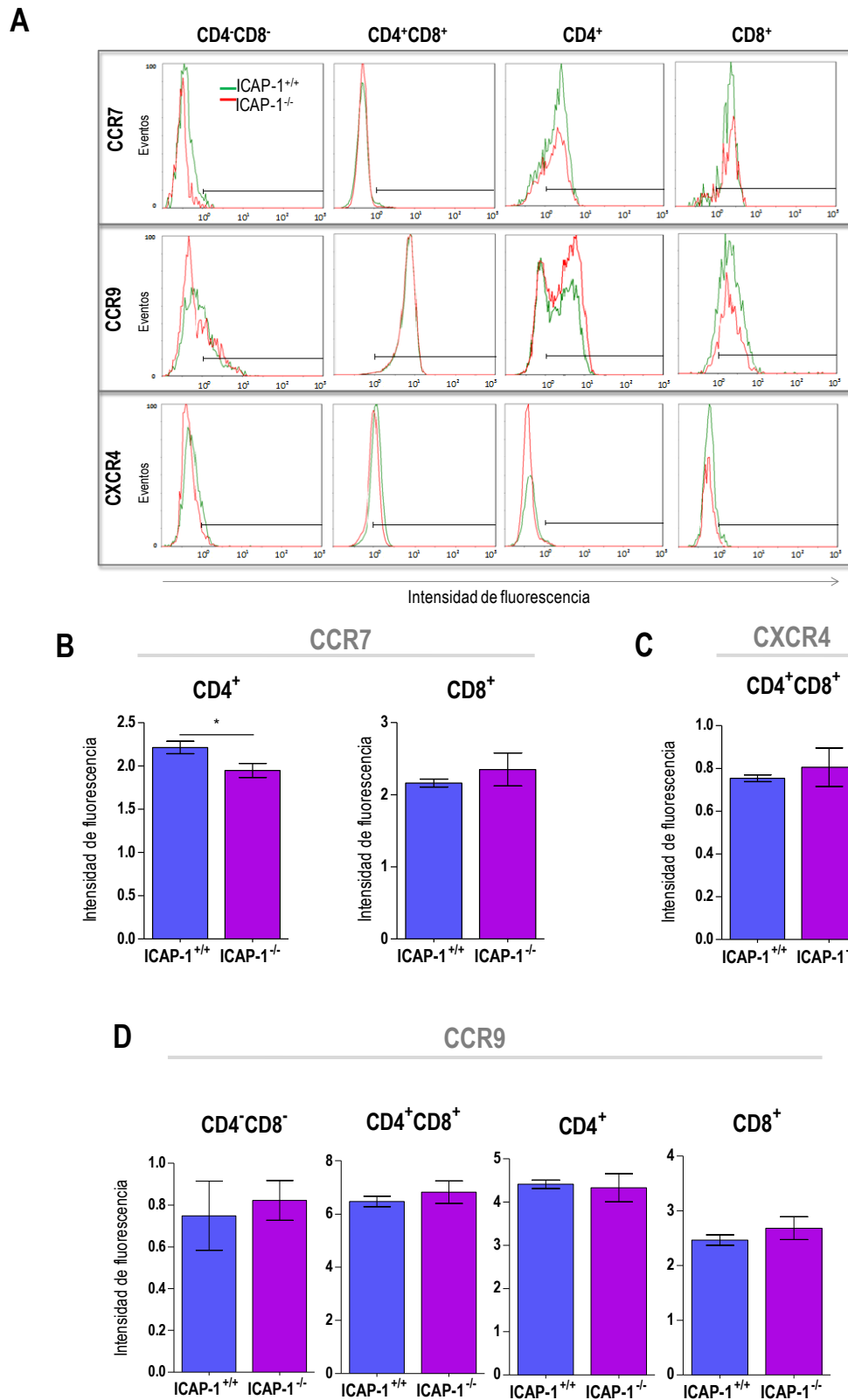


Figura 33. Análisis de la expresión de los receptores de quimioquinas CCR7, CCR9 y CXCR4 en diferentes poblaciones celulares del timo. **(A)** Análisis por citometría de flujo de perfiles de expresión representativos de receptores de quimioquinas en diferentes poblaciones de timocitos de ratones ICAP-1^{+/+} y ICAP-1^{-/-}. **(B-D)** Intensidad media de fluorescencia para CCR7, CXCR4 y CCR9 en las poblaciones celulares indicadas (n=4).

Además de unirse a $\beta 1$, lo que le proporciona una localización en la membrana plasmática celular, ICAP-1 contiene una secuencia de localización nuclear que facilita su exportación al núcleo (Draheim *et al.*, 2017; Fournier *et al.*, 2005). Notablemente, ICAP-1 mostró una distribución nuclear preferencial en la población total de timocitos, en comparación con los esplenocitos, los cuales mostraron pequeñas diferencias entre la distribución citoplasmática y nuclear (**Figura 34**). Estos resultados abrieron la posibilidad a valorar una implicación de ICAP-1 en el núcleo durante el desarrollo de células CD8⁺ SP.

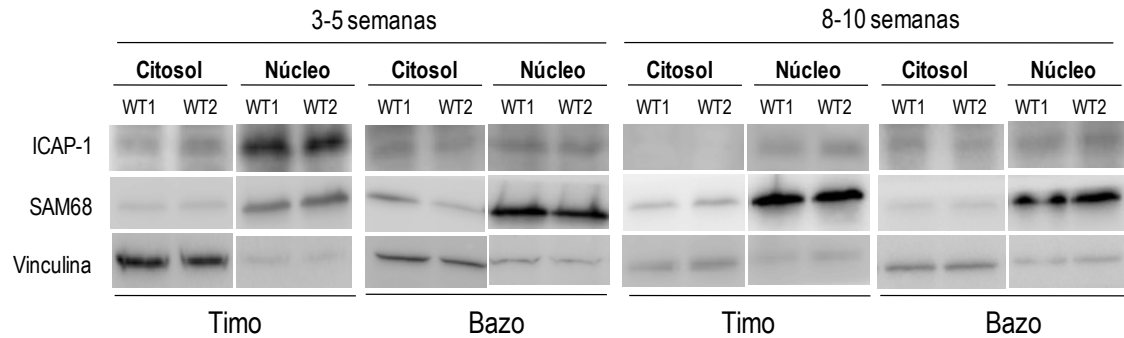


Figura 34. Distribución celular de ICAP-1. Expresión de ICAP-1 en las fracciones citosólica y nuclear. Utilizamos SAM68 como control de carga para la fracción nuclear; y vinculina, para la fracción citosólica.

De modo notable, en ensayos de RT-qPCR observamos que la expresión de *RUNX3*, un factor de transcripción requerido para la generación de células CD8⁺ (Park & Saint-Jeannet, 2010; Egawa *et al.*, 2007; Taniuchi *et al.*, 2002), se redujo significativamente en ratones deficientes en ICAP-1, mientras que la expresión de *THPOK*, *GATA3* y *SOCS1*, factores de transcripción que controlan la producción de células CD4⁺ (Luckey *et al.*, 2014; Singer *et al.*, 2008; He *et al.*, 2005; Chong *et al.*, 2003), fue comparable entre las células ICAP-1^{-/-} y las células control (**Figura 35**). Observamos asimismo una tendencia a la disminución de la expresión en las células ICAP-1^{-/-} de *IL-7R*, un regulador de Runx3 (Tani-ichi *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2003), pero dicha disminución no alcanzó significación estadística (**Figura 35**). Adicionalmente, no detectamos variaciones en la expresión de *ETS1* (**Figura 35**). La expresión de *c-MYC*, cuyo promotor demostró ser una diana de ICAP-1 en el núcleo (Fournier *et al.*, 2005), fue similar entre células control y deficientes en ICAP-1 (**Figura 36**).

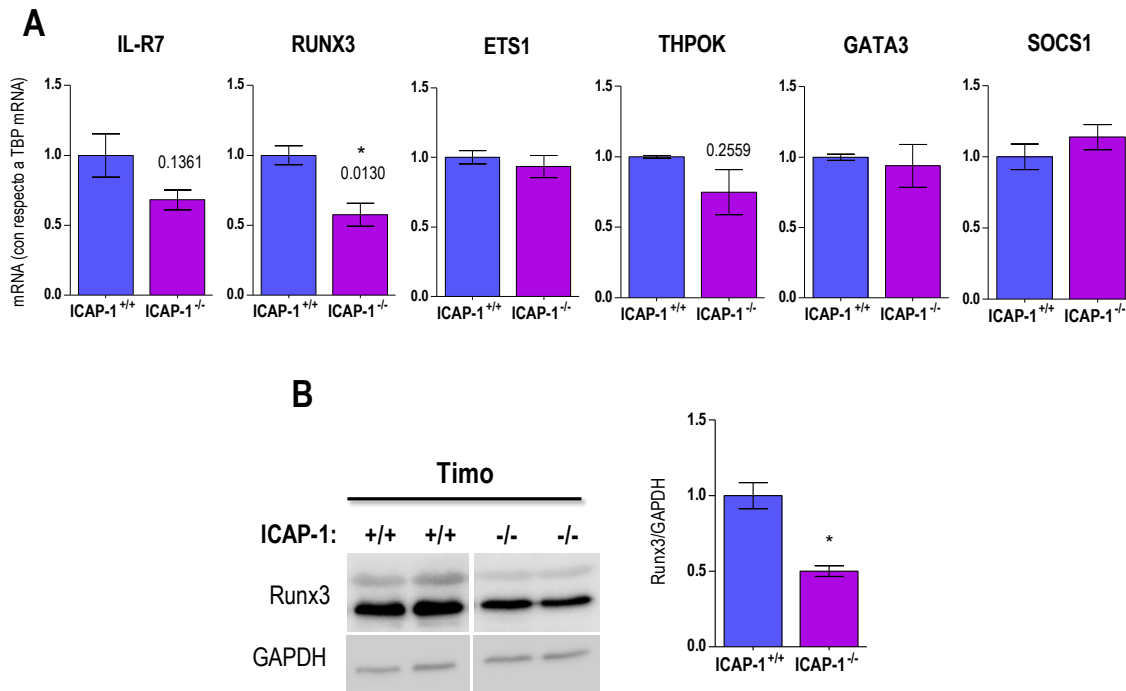


Figura 35. La expresión de Runx3 está reducida en el timo de ratones ICAP-1^{-/-}. (A) Análisis mediante RT-qPCR de la expresión de diferentes moléculas implicadas en el desarrollo de timocitos CD4⁺ y CD8⁺ SP. Se utilizó como referencia el mRNA para TBP, y los datos se muestran normalizados a la población WT, a la que se asignó un valor de 1 (n=3-4). (B) Análisis mediante *western blotting* de la expresión de Runx3 en timocitos totales (n=3). Se utilizó GAPDH como control de carga.

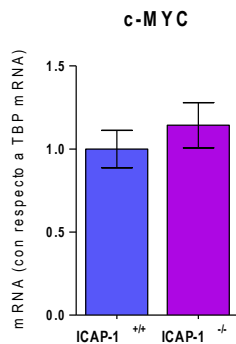


Figura 36. Análisis de la expresión de c-MYC en el timo de ratones ICAP-1^{-/-}. La expresión de c-MYC fue analizada mediante RT-qPCR. Se utilizó el mRNA de TBP como referencia (n=4).

Disminución de la población de células CD8⁺ en bazos de ratones ICAP-1^{-/-}

De manera similar a lo que observamos en timo, los bazos de los ratones ICAP-1^{-/-} de 3-5 semanas tenían un tamaño menor que el de los animales control (Figura 37A). A su vez, el número total de células de bazo y nódulos linfáticos resultó ser asimismo menor en dichos ratones ICAP-1^{-/-}, pero estas diferencias no se detectaron en estos órganos linfoides en ratones de 8-10 semanas (Figura 37B, C).

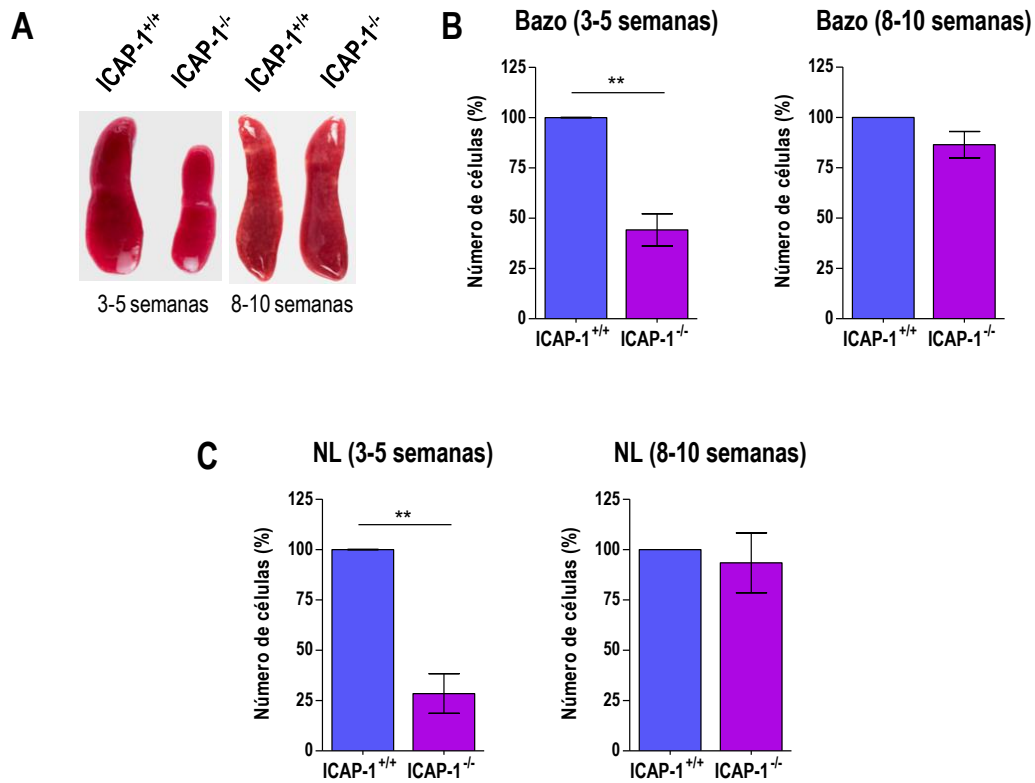


Figura 37. Tamaño y celularidad de bazos y NL de ratones ICAP-1^{+/+} y ICAP-1^{-/-}. **(A)** Fotografías representativas de bazos de ambos grupos de ratones en los dos rangos de edades. Celularidad total en bazo **(B)** y en NL **(C)** de ratones ICAP-1^{-/-} en relación a los WT, a los que se les asignó un valor de 100 (n=13-17).

Puesto que habíamos detectado una reducción en la proporción de células CD8⁺ SP en los timos de ratones ICAP-1^{-/-}, analizamos los niveles de esta población, tanto en bazo como en NLs. En ambos órganos linfoides detectamos una disminución de los porcentajes de células CD8⁺ en los ratones ICAP-1^{-/-} comparando con los ratones control, tanto en animales de 3-5 como de 8-10 semanas de edad **(Figura 38)**. En el caso de estos últimos, observamos que la disminución de la frecuencia de las células CD8⁺ se correlacionaba con un leve aumento de la población de células CD4⁺ **(Figura 38)**. No observamos diferencias significativas en la población de neutrófilos CD11b⁺Gr1⁺ presentes en bazos de ratones adultos ICAP-1^{-/-} y ICAP-1^{+/+} **(Figura 39)**.

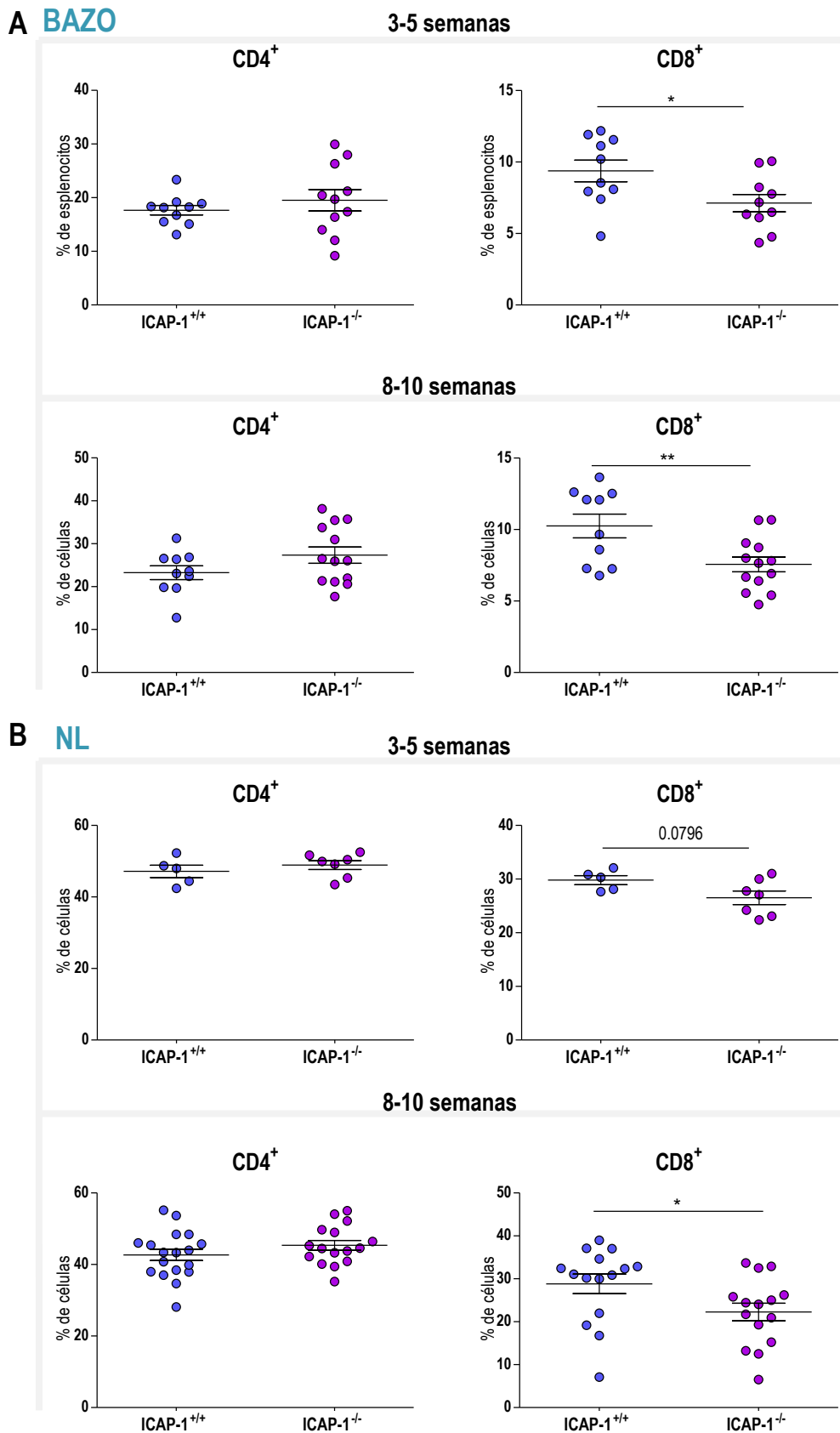


Figura 38. Disminución de los porcentajes de células CD8⁺ en bazo y NL de ratones ICAP-1^{-/-}. Análisis mediante citometría de flujo de la distribución de células CD4⁺ y CD8⁺ en bazo (A) y NL (B) en ratones ICAP-1^{+/+} y ICAP-1^{-/-}.

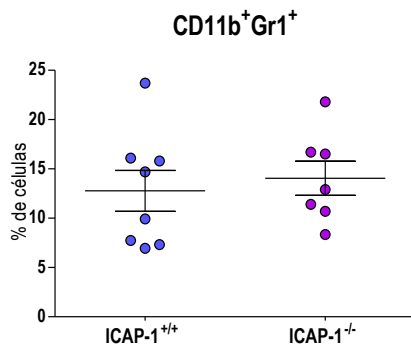


Figura 39. Análisis por citometría de flujo de la distribución de neutrófilos en bazo. Se muestran los porcentajes para las poblaciones de neutrófilos CD11b⁺Gr1⁺ en ratones ICAP-1^{+/+} y ICAP-1^{-/-} de 8-10 semanas.

El análisis de la distribución de poblaciones de células T en sangre periférica reveló que los ratones ICAP-1^{-/-} de 3-5 semanas de edad mostraban un pequeño pero significativo aumento en la frecuencia de células CD8⁺, lo cual no se observó en ratones de 8-10 semanas (**Figura 40**).

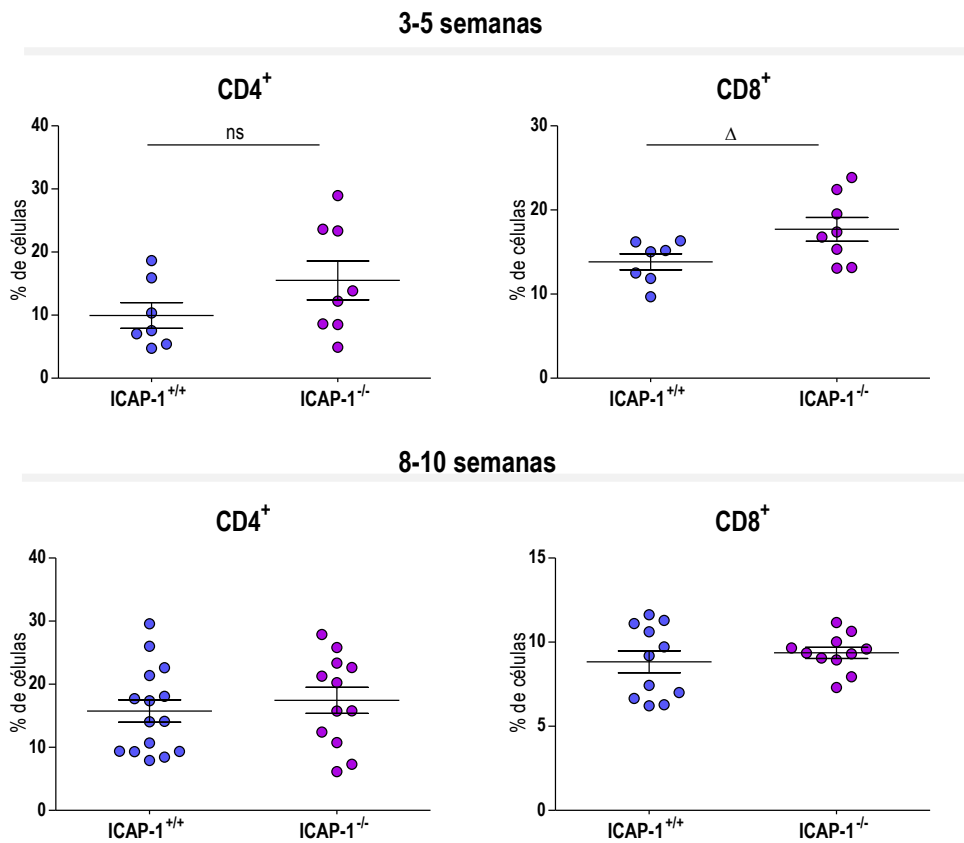


Figura 40. Distribución de células CD4⁺ y CD8⁺ en sangre periférica. Se muestran los porcentajes de células CD4⁺ y CD8⁺ en ratones ICAP-1^{+/+} y ICAP-1^{-/-} de distintas edades. El análisis fue realizado mediante citometría de flujo.

En línea con el incremento de expresión de la subunidad $\beta 1$ en poblaciones tímicas de ratones ICAP-1^{-/-}, detectamos asimismo un aumento de la expresión de $\beta 1$ en la membrana de células CD4⁺ y CD8⁺ en bazo de ratones ICAP-1^{-/-} de 3-5 semanas (**Figura 41**), sin encontrar diferencias en la expresión de la subunidad $\alpha 4$ (datos no mostrados).

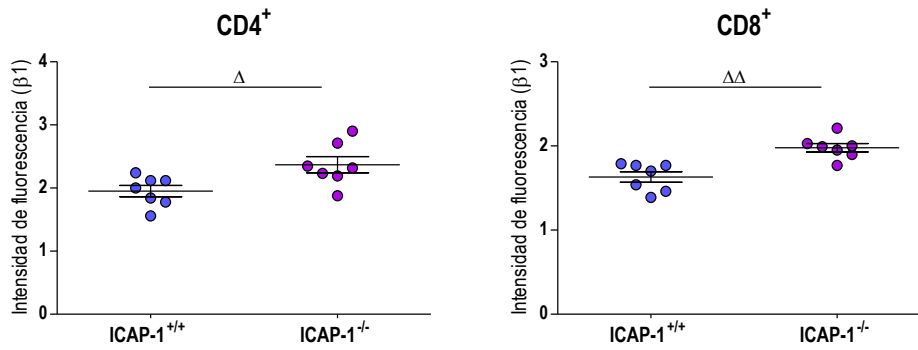


Figura 41. Expresión de $\beta 1$ en las poblaciones celulares CD4⁺ y CD8⁺ de bazo. Análisis mediante citometría de flujo de la expresión de $\beta 1$ en células T procedentes de bazo de ratones de 3-5 semanas de edad.

Distribución normal de poblaciones de células madre y progenitoras hematopoyéticas en médula ósea de ratones ICAP-1^{-/-}

ICAP-1 se expresa en células madre hematopoyéticas de MO (*Hematopoietic Stem Cells*, HSC) (Chen *et al.*, 2016) (Gene Expression Commons, GEO GSE77078, <http://gexc.stanford.edu>). Para determinar si la falta de ICAP-1 afectaba a la frecuencia de las poblaciones de HSC y progenitoras hematopoyéticas (*Hematopoietic Progenitor Cells*, HPCs) presentes en la MO, realizamos ensayos de citometría de flujo para clasificar y caracterizar los diferentes estadios de diferenciación (**Figura 42**).

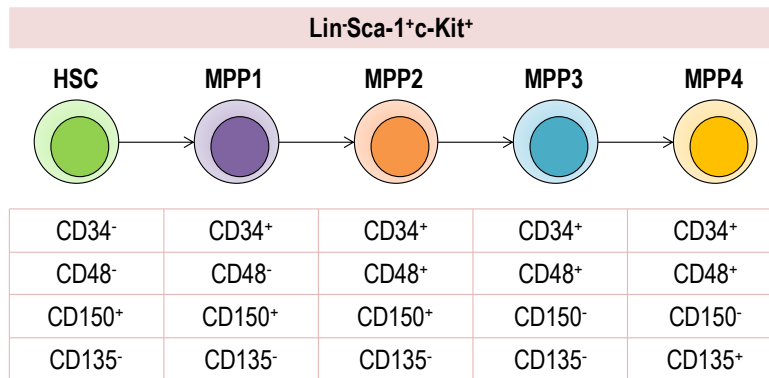


Figura 42. Esquema del programa de diferenciación de HSCs y HPCs. Se muestran los marcadores que determinan el estadio de diferenciación de las células HSPCs en MO, desde las más *stem* hasta los progenitores que derivarán en diferentes linajes hematopoyéticos.

Este estudio fue desarrollado durante el periodo de estancia predoctoral en el laboratorio del Dr. Reinhard Fässler, en el Departamento de Medicina Molecular del *Max Planck Institute of Biochemistry*, en Munich, Alemania. Los experimentos se realizaron con la ayuda y tutela del Dr. Peter Krenn. Comenzamos seleccionando la población celular HSC que no estaba determinada hacia los distintos linajes hematopoyéticos en la MO. Para ello, utilizamos una combinación de anticuerpos frente a marcadores celulares específicos de diferentes linajes hematopoyéticos: CD3, CD45R/B220, CD11b, TER-119 and Ly-G6/Gr-1, y seleccionamos aquellas células que no reaccionaban con estos anticuerpos, denominándolas “células negativas de linaje” (*Lineage⁻*, *Lin⁻*). Esta población comprendía tanto las células HSCs como las HPCs, por lo que caracterizamos ambos grupos celulares en ratones control y deficientes en ICAP-1. Los resultados revelaron que no existían diferencias significativas en la distribución de la población pluripotente de células LSK (*Lin⁻Sca-1⁺c-Kit⁺*) entre ambos grupos de ratones (Figura 43).

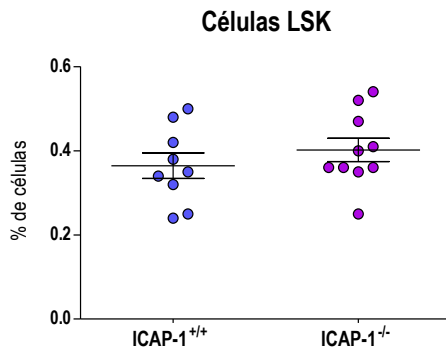


Figura 43. Caracterización de la población HSCs en MO de ratones ICAP-1^{-/-} y ICAP-1^{+/+}. Los progenitores hematopoyéticos de MO fueron retirados de los análisis utilizando una combinación de anticuerpos frente a antígenos de superficie específicos para los distintos linajes hematopoyéticos. Posteriormente, las células LSK fueron analizadas mediante citometría de flujo.

A continuación, analizamos la expresión de los marcadores CD150 y CD48, también conocidos como SLAMF1 y SLAMF2, respectivamente. Las células madre capaces de derivar hacia los diferentes linajes hematopoyéticos de la MO expresan CD150 pero no CD48 (Figura 42) (Kim *et al.*, 2006; Kiel *et al.*, 2005). De esta manera, seleccionamos la población celular CD48⁻CD150⁺ temprana en la diferenciación hematopoyética para diferenciarla de las células progenitoras. Los análisis mostraron que no había variaciones remarcables en esta población comparando muestras de ratones ICAP-1^{+/+} y ICAP-1^{-/-} (Figura 44). Asimismo, tampoco detectamos alteraciones en las poblaciones de células progenitoras analizando cada una de las etapas del proceso de diferenciación. Así, ni las poblaciones celulares en el estadio MPP1 (*Lin⁻Sca-1⁺c-Kit⁺CD34⁺CD48⁻CD150⁺*), ni en MPP2 (*Lin⁻Sca-1⁺c-Kit⁺CD34⁺CD48⁺CD150⁺*), o en MPP3/4 (*Lin⁻Sca-1⁺c-Kit⁺CD34⁺CD48⁺CD150⁻*), exhibieron diferencias notables entre ratones ICAP-1^{+/+} y ICAP-1^{-/-} (Figura 44). Todos estos resultados indican que la falta de ICAP-1 no causa un enriquecimiento ni una pérdida de población HSPCs en ninguna etapa a lo largo del programa de diferenciación.

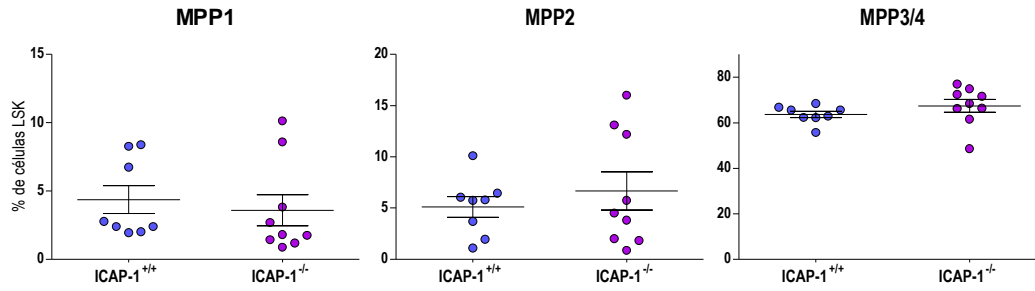


Figura 44. Análisis de las poblaciones de HPCs en MO de ratones deficientes en ICAP-1. Tras retirar del análisis los progenitores de MO más diferenciados mediante anticuerpos frente antígenos específicos de los distintos linajes hematopoyéticos, se analizó la población HSC/MMP1 (LSK-CD48⁺CD150⁺) de ratones ICAP-1^{+/+} y ICAP-1^{-/-}. Se muestra asimismo el análisis de las poblaciones MPP2 y MPP3/4.

La linfopoyesis B en médula ósea no se altera por la ausencia de ICAP-1

El análisis de la frecuencia de células B220⁺ en MO reveló valores similares entre ratones ICAP-1^{+/+} y ICAP-1^{-/-} (**Figura 45A**), y los niveles de expresión en la superficie de estas células de la subunidad β1 de la integrina fueron comparables entre ambos grupos de ratones (**Figura 45B**).

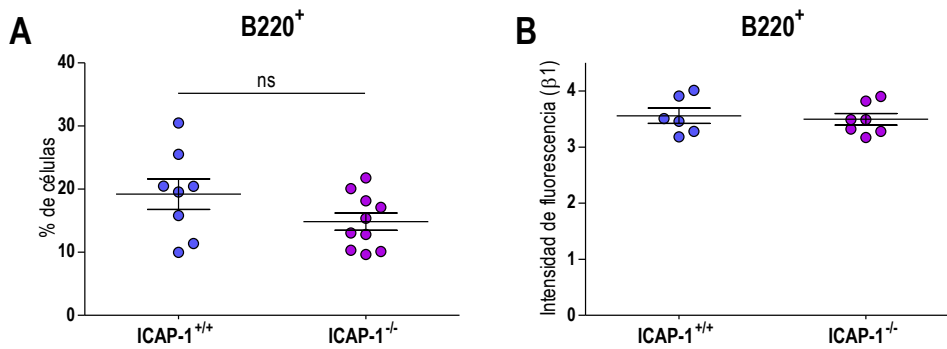


Figura 45. Caracterización de la población de células B220⁺ en médula ósea de ratones deficientes en ICAP-1. Análisis de la expresión de la subunidad β1 en células B220⁺. **(A)** Los porcentajes de células positivas para B220⁺ en MO de ratones de 8-10 semanas fueron determinados mediante citometría de flujo. **(B)** Se muestra la expresión de la subunidad β1 en células B220⁺ de MO.

Posteriormente analizamos si el desarrollo de las células B (**Figura 46**) se veía afectado en ratones ICAP-1^{-/-}. Dicho análisis se llevó a cabo en colaboración con la Dra. Yolanda Carrasco y Sofía R. Gardeta, del Centro Nacional de Biotecnología (CNB, Madrid).

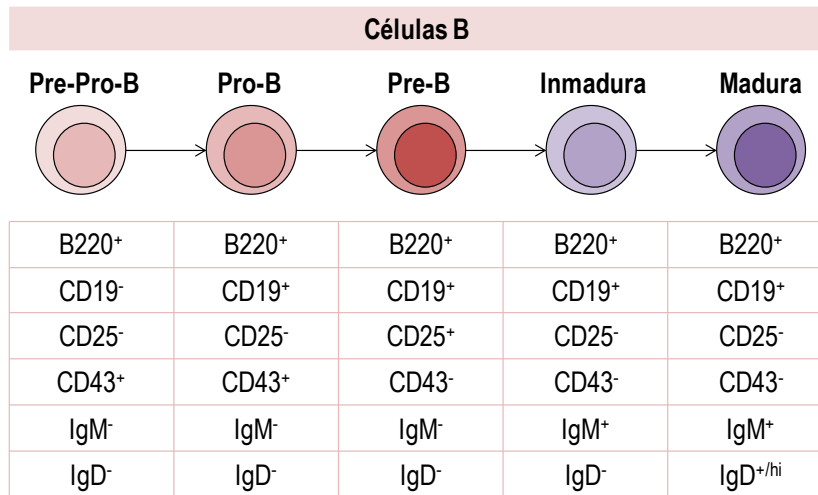


Figura 46. Esquema del programa de diferenciación y maduración de células B. Se muestran los marcadores que hemos utilizado para determinar el estadio de diferenciación de las células B en MO, desde las células más progenitoras hasta las células maduras.

En base a los niveles de expresión de B220/CD43 y B220/CD25, no se encontraron diferencias significativas en la distribución de las poblaciones pro-B y pre-B, ni tampoco en la frecuencia de células inmaduras y maduras recirculantes, de acuerdo a su expresión de IgM e IgD (**Figura 47**).

Asimismo, no hallamos diferencias destacables cuando comparamos los porcentajes de neutrófilos CD11b⁺Gr1⁺ o de células T CD8⁺ en la MO de ratones ICAP-1^{+/+} y ICAP-1^{-/-} (**Figura 48A**), mientras que detectamos una pequeña reducción en la frecuencia de células CD4⁺ (**Figura 48B**). Desconocemos, por el momento, la base de esta disminución.

En conjunto, estos resultados indican que la linfopoyesis B en médula ósea no está afectada por la falta de ICAP-1.

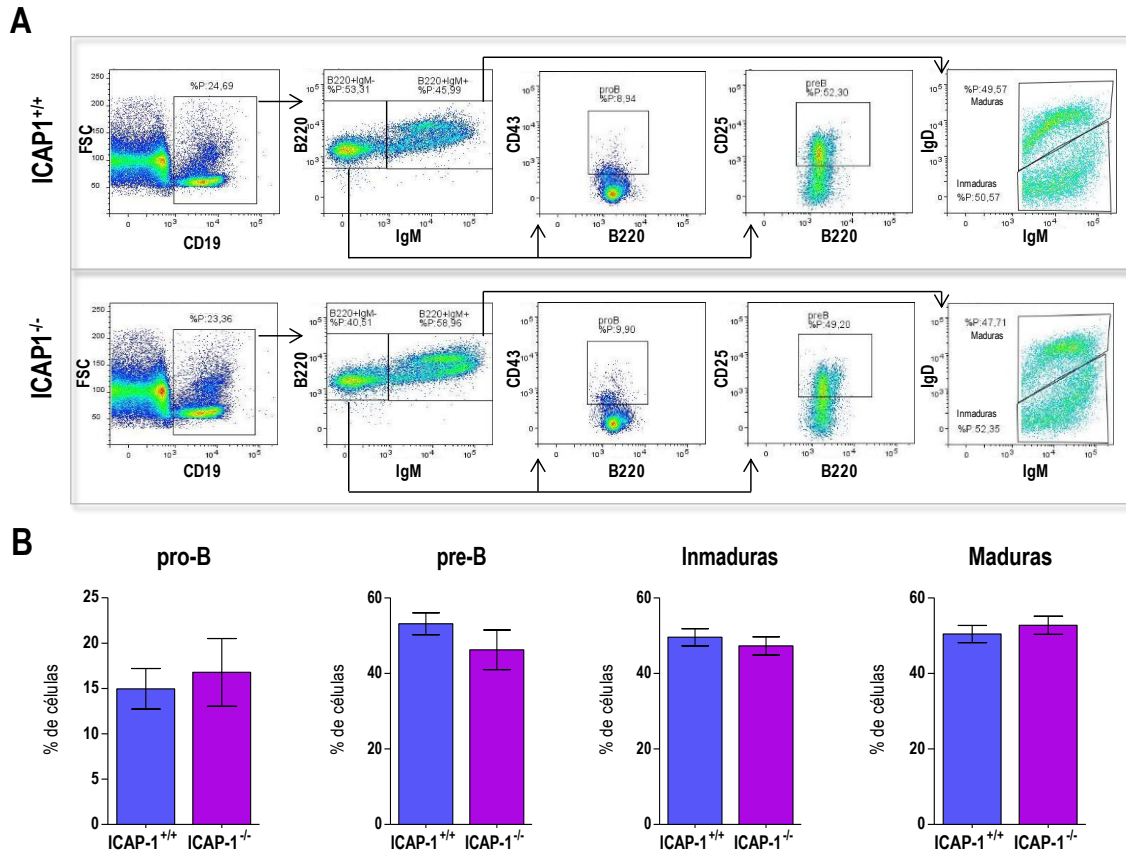


Figura 47. Diferenciación de células B en la médula ósea de ratones ICAP-1^{-/-}. Tras seleccionar la población CD19⁺B220⁺ de células de la MO por citometría de flujo, analizamos la expresión de los marcadores CD43 y CD25, e IgM e IgD. Se muestra un análisis representativo de cada grupo de ratones (A), así como la media de los porcentajes obtenidos para cada población (B) (n=4-5).

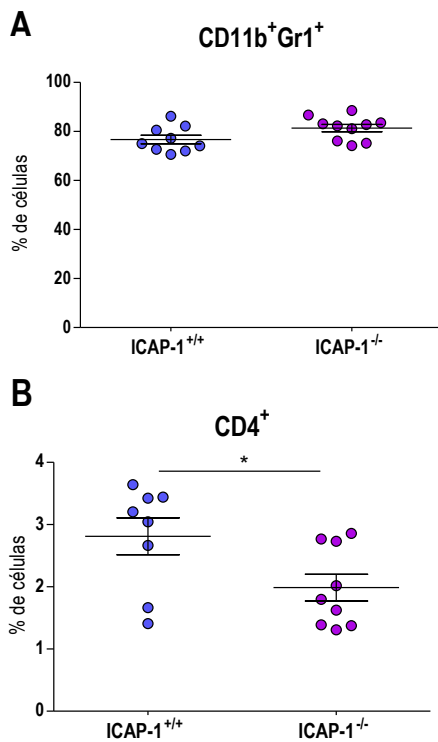


Figura 48. Análisis de la población granulocítica (CD11b⁺Gr1⁺) y de células T en la médula ósea de ratones ICAP-1^{-/-}. Se representan los porcentajes observados para la población de neutrófilos (A), y de células T CD4⁺ y CD8⁺ (B), tras análisis por citometría de flujo en muestras de MO de ratones de 8-10 semanas.

Los ratones ICAP-1^{-/-} muestran alteraciones en la frecuencia de células marginales y foliculares del bazo

Los porcentajes de células B220⁺ en bazo, NL y sangre periférica mostraron valores similares entre ratones ICAP-1^{-/-} y ICAP-1^{+/+} (Figura 49).

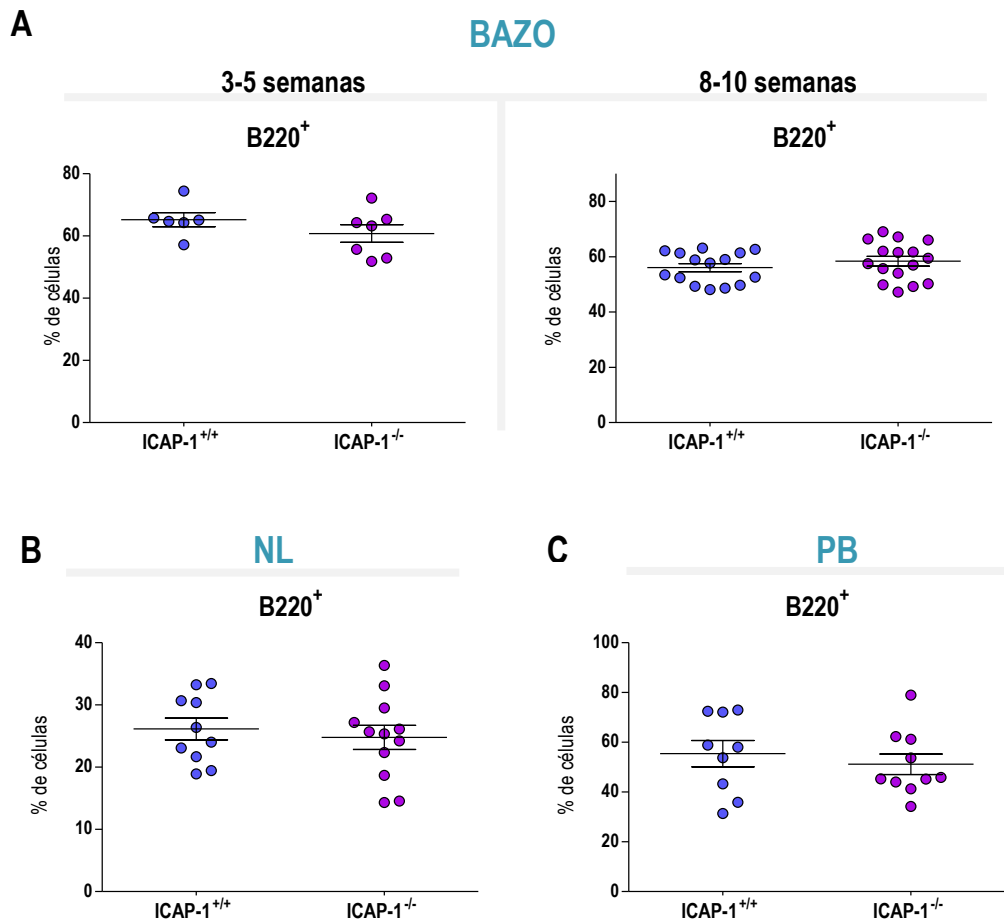


Figura 49. Análisis de la frecuencia de células B220⁺ en órganos linfoides y sangre periférica de ratones ICAP-1^{-/-}. Los porcentajes para la población de células B220⁺ presente en bazo (A), NL (B) y PB (C), fueron obtenidos mediante citometría de flujo.

Reflejando la reducción de la celularidad en los bazos de ratones ICAP-1^{-/-} de 3-5 semanas de edad, detectamos una disminución del número total de células B220⁺ en el bazo de estos animales, pero no en ratones de 8-10 semanas (Figura 50).

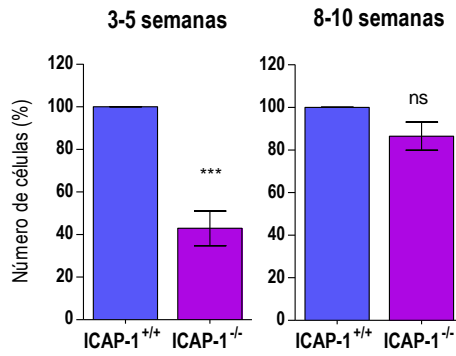


Figura 50. Porcentajes de células B220⁺ en los bazos de ratones deficientes de ICAP-1. Se muestra el porcentaje de células B220⁺ presentes en los bazos de ratones ICAP-1^{-/-} referenciados a ratones control, a los que se les asignó un valor de 100 (n=6-7 para 3-5 semanas, n=26-28 para 8-10 semanas).

El análisis de la expresión de $\beta 1$ en las células B220⁺ de bazo de ratones de 3-5 semanas reveló un moderado aumento en la intensidad de fluorescencia para células ICAP-1^{-/-} en comparación con las células control, mientras que no se observaron diferencias en la expresión de la subunidad $\alpha 4$ entre ambos grupos de ratones (Figura 51).

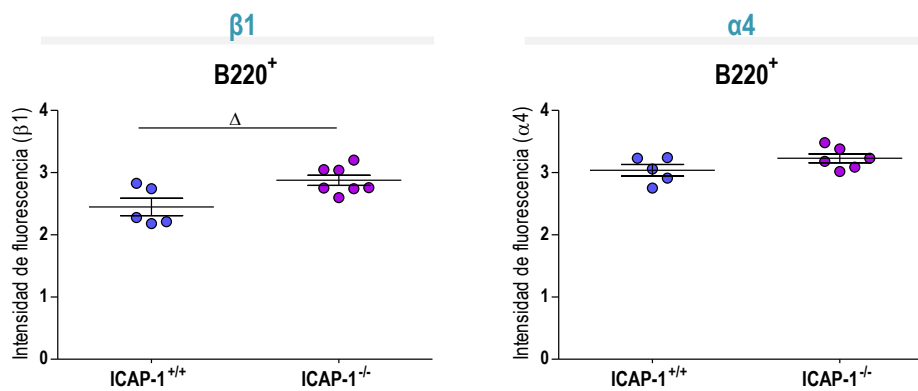


Figura 51. Análisis de la expresión en superficie de las subunidades $\beta 1$ y $\alpha 4$ en células B220⁺ de bazos de ratones ICAP-1^{+/+} y ICAP-1^{-/-}. Se representa la intensidad de fluorescencia para dichos marcadores detectada en células B220⁺ de bazos procedentes de ratones de 3-5 semanas de edad.

Las células B maduran secuencialmente en el bazo, transformándose en células B foliculares maduras (FO) o células B de la zona marginal (*Marginal Zone*, MZ) (Tedford *et al.*, 2017; Pillai & Cariappa, 2009). Estas últimas expresan cantidades elevadas de IgM en su superficie y bajos niveles de IgD, y no recirculan entre órganos linfoides y sangre, pero pueden desplazarse desde la zona marginal a los folículos del bazo (Arnon *et al.*, 2013; Pillai & Cariappa, 2009). Por contra, las células FO migran a los folículos y presentan un fenotipo recirculante, expresando niveles medios-altos de IgM, y altos niveles de IgD. El estudio de la expresión de IgM e IgD reveló que los porcentajes de células B CD19⁺ presentes en bazo que expresan IgM^{high}/IgD^{low}, un fenotipo de células MZ, es menor en ratones ICAP-1^{-/-} que en ratones control (Figura 52). Por el contrario,

la población $IgM^{med/low}/IgD^{hi}$, con fenotipo FO, aparecía aumentada en los ratones deficientes en ICAP-1 (**Figura 52**).

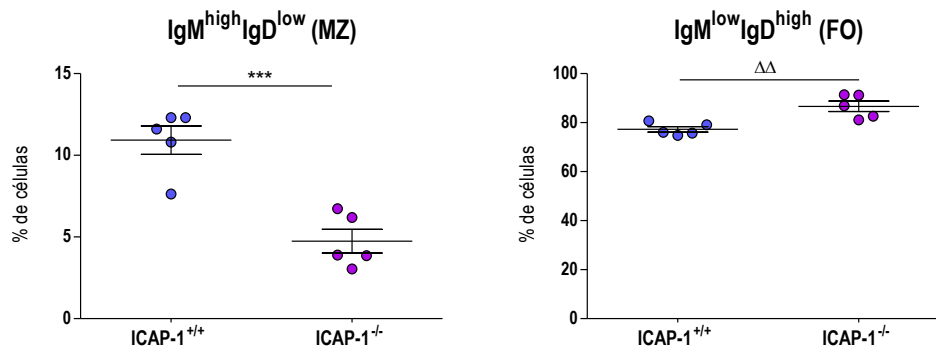


Figura 52. Análisis de la distribución de las poblaciones de células MZ y FO basado en la expresión de IgM e IgD. Los porcentajes representados para cada una de las poblaciones fueron determinados en ensayos de citometría de flujo, utilizando anticuerpos frente a IgM e IgD.

Posteriormente, evaluamos las poblaciones celulares MZ y FO basándonos en los niveles de expresión de CD21 y CD23. El análisis de estos marcadores en esplenocitos $CD19^+$ mostró una reducción del porcentaje de células MZ ($CD21^{high}CD23^-$), y un aumento de células FO ($CD21^+CD23^+$) en los bazo de ratones deficientes para ICAP-1 (**Figura 53**). Estos resultados, junto con los mostrados previamente en relación al aumento de adhesión de esplenocitos de ratones ICAP-1^{-/-}, abren la posibilidad de que el tráfico de células B en el bazo para una maduración controlada de las células B pudiera estar regulado por ICAP-1.

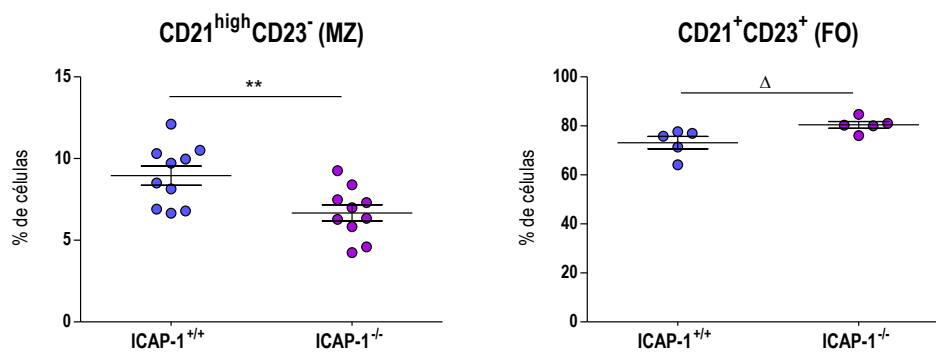


Figura 53. Análisis de la distribución de las poblaciones de células MZ y FO basado en la expresión de CD21 y CD23. Los porcentajes representados para cada una de las poblaciones fueron determinados en ensayos de citometría de flujo, utilizando anticuerpos frente a CD21 y CD23.

ICAP-1 regula negativamente la adhesión dependiente de $\alpha 4\beta 1$ de células de MM a la microvasculatura de la médula ósea

El tráfico de las células de MM a la MO y la progresión de esta enfermedad son eventos ligados a la actividad de la integrina $\alpha 4\beta 1$ (Martinez-Moreno *et al.*, 2016; Olson *et al.*, 2005; Mori *et al.*, 2004; Uchiyama *et al.*, 1993). $\alpha 4\beta 1$ desempeña un papel esencial en la adhesión *in vivo* de las células de MM a la microvasculatura de la MO, así como durante su posterior migración hacia diferentes nichos medulares (Martinez-Moreno *et al.*, 2016). Dicho estudio reveló que la talina y kindlin-3 actuaban cooperativamente activando $\alpha 4\beta 1$ en células de MM, ya que su unión a la subunidad $\beta 1$ estimulaba la adhesión de estas células a ligandos de $\alpha 4\beta 1$, así como a la microvasculatura de la MO en un modelo *in vivo*.

En colaboración con la Dra. Mónica Martínez-Moreno se realizó una parte del trabajo incluido en esta Tesis Doctoral, que comprende la caracterización del papel de ICAP-1 en la regulación de la adhesión dependiente de $\alpha 4\beta 1$ en células de MM. Analizamos, en primer lugar, la posible expresión de ICAP-1 en células de MO de pacientes diagnosticados con MM. Ensayos de RT-qPCR revelaron una expresión heterogénea del mRNA de *ICAP-1* en dichas células (Figura 54), y detectamos asimismo diferentes niveles de expresión de *ICAP-1* en las líneas celulares de mieloma NCI-H929, MM.1S y RPMI-8226 (Figura 54).

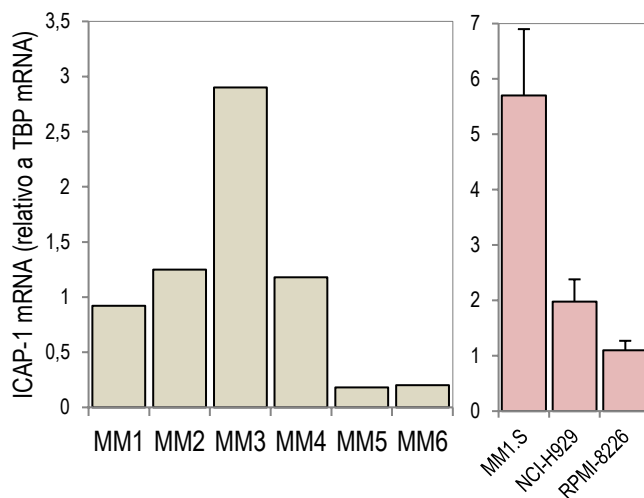


Figura 54. Análisis de la expresión de ICAP-1 en células de MM. Ensayos de RT-qPCR para determinar la expresión de *ICAP-1* en células primarias CD138⁺ de aspirados de MO de pacientes diagnosticados con MM (izquierda), y en las líneas celulares de MM indicadas (derecha). Los niveles de expresión fueron referidos a los obtenidos para el mRNA de *TBP*, y se representa la SD con las barras de error.

Ensayos de inmunoprecipitación utilizando anticuerpos anti- $\beta 1$ revelaron la coimmunoprecipitación de $\beta 1$ con ICAP-1 en células NCI-H929 (Figura 55), sugiriendo la presencia de una población de integrinas $\beta 1$ que se encuentran asociadas a ICAP-1 en dichas células.

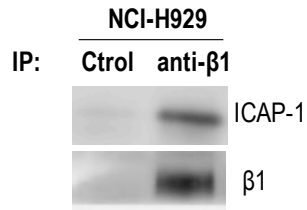


Figura 55. Análisis de la asociación de ICAP-1 con β 1.

Las células de MM NCI-H929 fueron sometidas a ensayos de inmunoprecipitación con anticuerpos anti- β 1, seguido de *western blotting* con anticuerpos frente a ICAP-1.

Para estudiar si ICAP-1 podría regular la adhesión de células de MM mediada por α 4 β 1, silenciamos ICAP-1 mediante nucleofección en las células NCI-H929 (**Figura 56A**). Los transfectantes mostraron niveles de expresión de α 4 β 1 y viabilidad celular similar a las células transfectadas con siRNA control (datos no mostrados). Los ensayos de adhesión a los ligandos de α 4 β 1, VCAM-1 y CS-1/FN tanto en presencia como en ausencia de CXCL12, revelaron que los transfectantes silenciados para ICAP-1 mostraban mayor adhesión a dichos ligandos que los transfectantes control, especialmente en presencia de la quimioquina (**Figura 56B, C**).

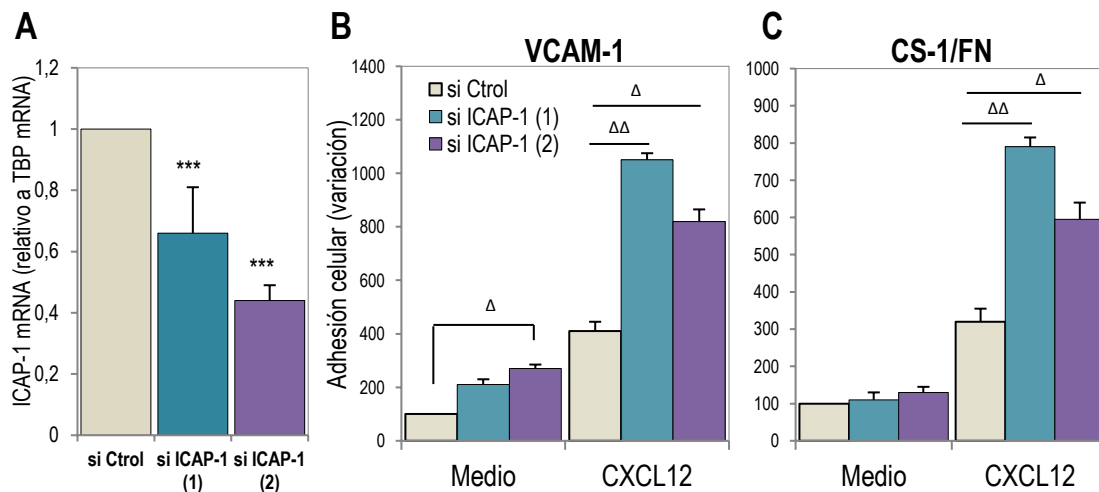


Figura 56. Análisis de la regulación por ICAP-1 de la adhesión de células de MM dependiente de α 4 β 1. (A) Las células fueron nucleofectadas con los siRNAs indicados y la expresión de *ICAP-1* en los transfectantes fue analizada por RT-qPCR. Se representa el nivel de expresión de mRNA para *ICAP-1*, referenciado al mRNA de *TBP* y la SD. Adhesión a VCAM-1 (n=4; B) y CS-1/FN (n=3; C) en ausencia o presencia de CXCL12, de transfectantes silenciados para ICAP-1. Las barras de error representan la SD.

Los transfectantes fueron asimismo testados en ensayos de adhesión sobre la línea celular de estroma de MO HS-27A, los cuales mostraron que las células silenciadas en ICAP-1 presentaban mayor capacidad de adhesión a las células HS-27A que las células control, tanto en ausencia como en presencia de CXCL12 (**Figura 57**).

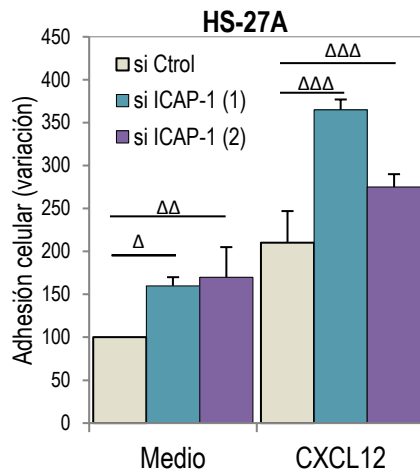


Figura 57. Análisis de la regulación por ICAP-1 de la adhesión de células de MM a células estromales HS-27A. Adhesión de transfectantes NCI-H929 silenciados para ICAP-1 a células HS-27A estimuladas con TNF α para inducir la expresión de VCAM-1, tanto en ausencia como en presencia de CXCL12 (n=4). Las barras de error representan la SD.

Adicionalmente, analizamos el estado de activación de integrinas $\beta 1$ en los transfectantes silenciados para ICAP-1 utilizando HUTS-21, un anticuerpo anti- $\beta 1$ que reconoce un epítipo de la subunidad $\beta 1$ cuando se encuentra en conformación activa. Los resultados mostraron que las células NCI-H929 deplecionadas para ICAP-1 exhibían un aumento significativo de la unión de HUTS-21 en comparación con las células control (Figura 58). En conjunto, estos resultados indicaban que ICAP-1 inhibe la activación de $\alpha 4\beta 1$ y la adhesión de células de MM mediada por esta integrina.

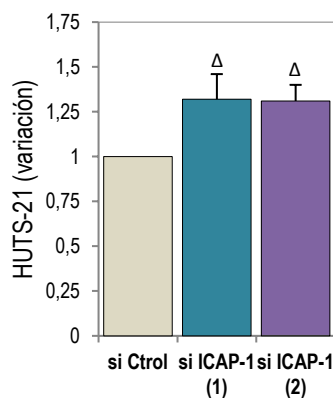


Figura 58. Activación de integrinas $\beta 1$ en células de MM silenciadas para ICAP-1. Las células NCI-H929 fueron transfectadas con siRNA control o para ICAP-1, y la unión del anticuerpo monoclonal anti- $\beta 1$ HUTS-21 a los transfectantes expuestos a CXCL12 fue analizada mediante ensayos de citometría de flujo (n=5).

Tras observar el papel esencial de $\alpha 4\beta 1$ en la adhesión de células de MM a la microvasculatura de la MO (Martinez-Moreno *et al.*, 2016), en colaboración con los Dres. Andrés Hidalgo y Magdalena Leiva, del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC, Madrid), llevamos a cabo un análisis mediante microscopía intravital (IVM) que nos permitió observar la capacidad adhesiva *in vivo* de los transfectantes de MM silenciados en ICAP-1. Las células NCI-H929 transfectadas con siRNA control o para ICAP-1 fueron marcadas con un colorante vital y posteriormente inyectadas en la calvaria de ratones NSG jóvenes. Los resultados revelaron que los

transfectantes deplecionados en ICAP-1 se adherían de manera estable a la microvasculatura de la MO en mayor medida que los transfectantes control, aunque no observamos diferencias en el *rolling* entre ambos transfectantes. La cuantificación de estos análisis nos permitió concluir que ICAP-1 inhibía la adhesión *in vivo* de células de MM mediada por $\alpha 4\beta 1$ (Figura 59).

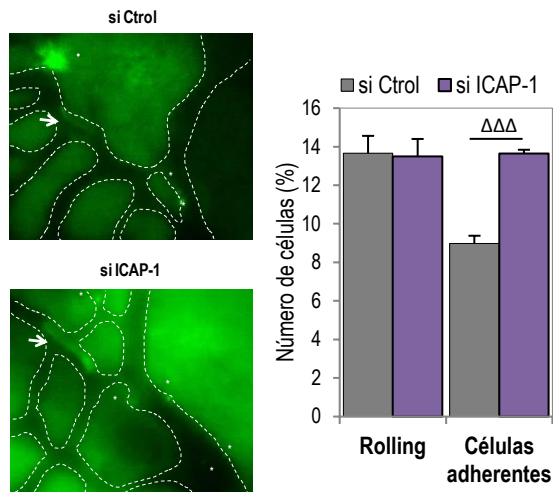


Figura 59. Microscopía intravital con células de MM silenciadas para ICAP-1. Las células NCI-H929 transfectadas con siRNA control o para ICAP-1 fueron marcadas con CFSE e inyectadas en ratones preparados para IVM. Se muestran imágenes representativas de vénulas irrigando la MO, así como la cuantificación de los datos obtenidos en forma de porcentajes de células que hicieron *rolling* o que se adhirieron establemente a la microvasculatura de la MO. Los resultados proceden del análisis de entre 16 y 20 vénulas de 4 ratones. Las barras muestran los valores de la media y el SEM.

OBJETIVO 2: CARACTERIZACIÓN DE RELACIONES FUNCIONALES ENTRE LA RESISTENCIA DE CÉLULAS DE MIELOMA MÚLTIPLE AL BORTEZOMIB Y LA EXPRESIÓN Y FUNCIÓN DE LA INTEGRINA $\alpha 4\beta 1$

Como ya se ha mencionado, la actividad de $\alpha 4\beta 1$ resulta esencial para el tráfico de células de MM hacia y dentro de la MO, contribuyendo al progreso de la enfermedad. En la MO, $\alpha 4\beta 1$ promueve la adhesión de las células de MM al estroma medular, un evento que dota a estas células de ventajas proliferativas y de supervivencia. Asimismo, $\alpha 4\beta 1$ juega un papel crucial en las respuestas *cell adhesion-mediated drug resistance* (CAM-DR) en células de MM (Noborio-Hatano *et al.*, 2009; Damiano *et al.*, 1999), entre ellas la resistencia que presentan estas células al bortezomib (BTZ) cuando están adheridas al estroma medular (Noborio-Hatano *et al.*, 2009). Por tanto, es importante aumentar nuestro conocimiento sobre la regulación de la expresión y función de dicha integrina en células de MM resistentes a dicho inhibidor. El segundo objetivo en esta Tesis Doctoral consistió en el estudio de las posibles relaciones que pudieran existir entre resistencia de células de MM a BTZ y la regulación de la expresión y función de $\alpha 4\beta 1$.

Caracterización de líneas de MM resistentes a BTZ

En colaboración con Nohemí Arellano Sánchez, generamos células de mieloma NCI-H929 resistentes a BTZ. Para ello, expusimos dos cultivos diferentes de esta línea celular a una concentración inicial de 5 nM, la cual se incrementó semanalmente hasta alcanzar 20 nM. A esta última concentración y en cultivo en medio completo (10% FBS), las células permanecieron 2 semanas en un estado quiescente, sin crecimiento aparente. Este período fue superado incrementando el suero hasta el 20% y añadiendo IL-6 a los cultivos en presencia de BTZ, y cuando las células volvieron a crecer con normalidad, se restableció el suero al 10% y se eliminó la IL-6 sin que se afectase la proliferación celular. De esta manera, obtuvimos dos poblaciones de células NCI-H929 resistentes a 20 nM de BTZ (NCI-H929-R20.1 y NCI-H929-R20.2), capaces de crecer en medio completo en presencia de 20 nM de BTZ, las cuales exhibieron tasas de crecimiento similares a las células parentales, en comparación con la notable inhibición de proliferación mostrada por estas últimas tratadas con BTZ (**Figura 60A, izquierda y centro**). Asimismo, generamos células NCI-H929 resistentes a 35 nM de BTZ (NCI-H929-R35) (**Figura 60A, derecha; 60B**), aunque observamos que su proliferación era algo más lenta que las células NCI-H929-R20, por lo que decidimos utilizar estas últimas en la caracterización posterior.

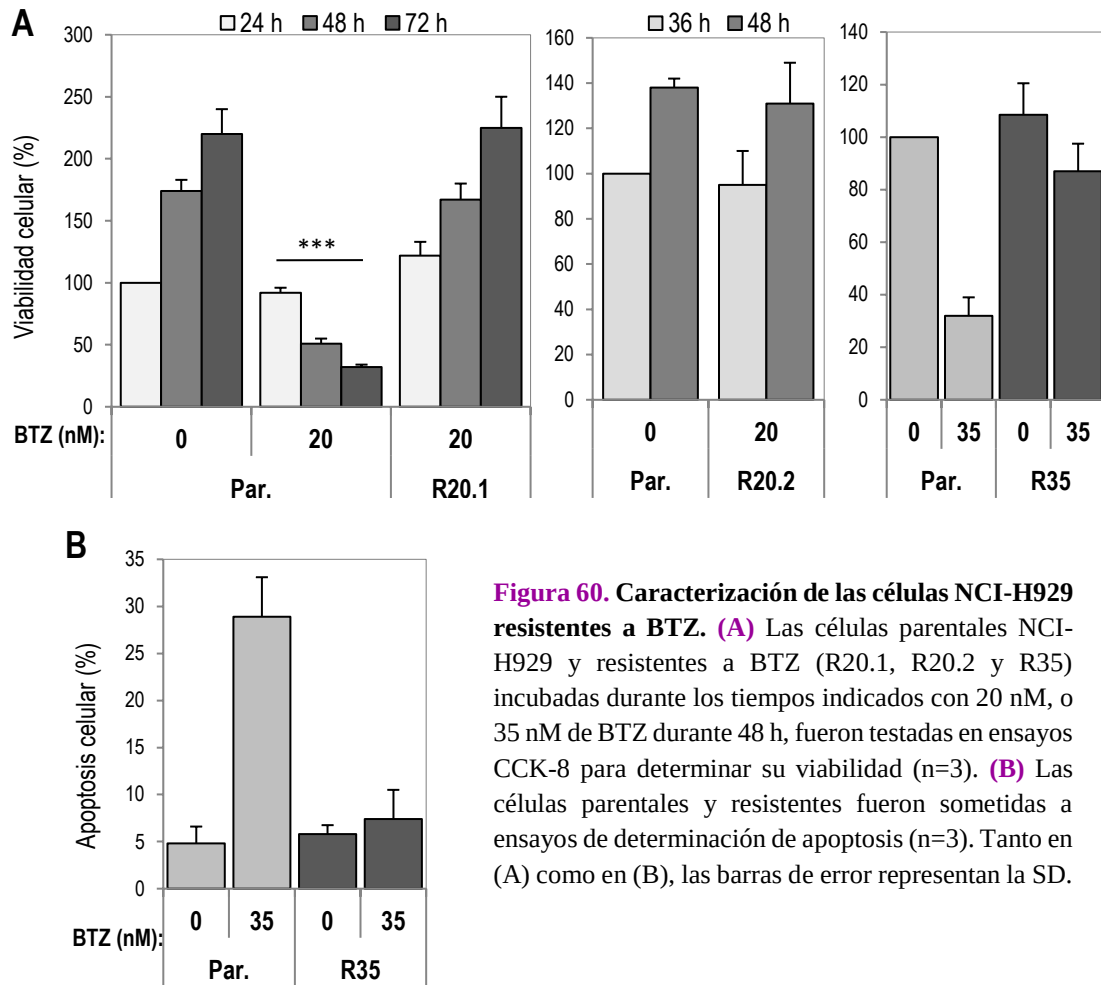


Figura 60. Caracterización de las células NCI-H929 resistentes a BTZ. (A) Las células parentales NCI-H929 y resistentes a BTZ (R20.1, R20.2 y R35) incubadas durante los tiempos indicados con 20 nM, o 35 nM de BTZ durante 48 h, fueron testadas en ensayos CCK-8 para determinar su viabilidad (n=3). (B) Las células parentales y resistentes fueron sometidas a ensayos de determinación de apoptosis (n=3). Tanto en (A) como en (B), las barras de error representan la SD.

Asimismo, analizamos la respuesta de las células NCI-H929-R20.1 a otro de los inhibidores de proteasoma aprobado por la FDA en 2012, el carfilzomib (CFZ). Mientras que las células parentales mostraron una fuerte disminución en su viabilidad tras un tratamiento de 48 h con 40 nM de CFZ, las células NCI-H929-R20.1 presentaron una notable resistencia a dicho inhibidor, sugiriendo que la resistencia adquirida al BTZ era extensible a otros inhibidores del proteasoma (Figura 61).

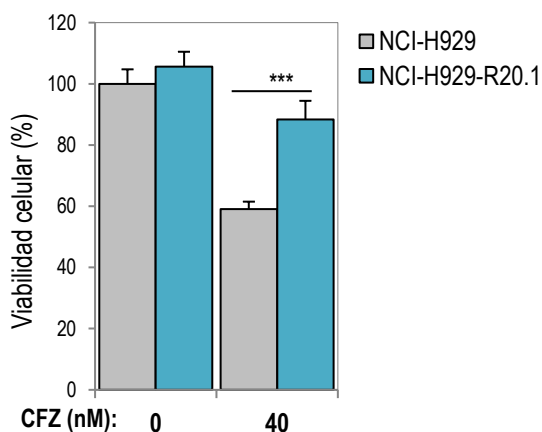


Figura 61. Las células NCI-H929-R20.1 muestran resistencia al CFZ. Las células fueron expuestas durante 48 h a 40 nM CFZ, realizándose a continuación un ensayo con CCK-8 para determinar su viabilidad. Se representan los datos con respecto a las células parentales sin tratamiento y la SD (n=3).

Actualmente estamos tratando de generar otra línea celular de MM resistente a BTZ, las células MM.1S, para ampliar los resultados del presente trabajo. Estas células se caracterizan por su elevada sensibilidad a cualquier tipo de inhibidor, por lo que las dosis iniciales administradas de BTZ han sido menores, y la obtención de una población resistente está llevando un tiempo considerablemente mayor que el que se requirió para la generación de las células NCI-H929 resistentes.

Por otro lado, contactamos con la Dra. Jacqueline Cloos (*Cancer Center Amsterdam*, Holanda), puesto que habían caracterizado la línea celular de mieloma RPMI-8226 resistente a 7 nM y 100 nM de BTZ: RPMI-8226-R7 y RPMI-8226-R100, respectivamente (Franke *et al.*, 2012). Observamos que mientras la proliferación de las células parentales se veía afectada por el tratamiento con BTZ, las células resistentes R7 y R100 mostraban supervivencia total a 7 y 100 nM del inhibidor (**Figura 62**).

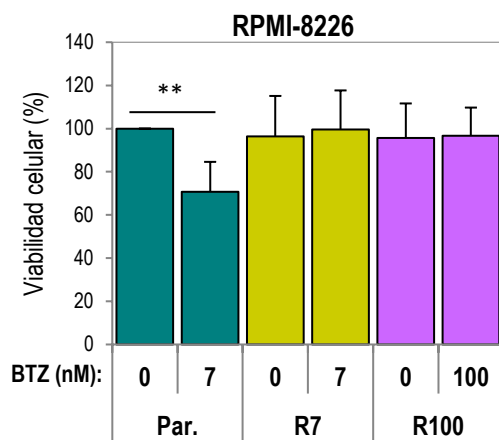


Figura 62. Caracterización de las células RPMI-8226, RPMI-8226-R7 y RPMI-8226-R100. Las células fueron tratadas durante 48 h con las concentraciones de BTZ indicadas, y su viabilidad determinada mediante el reactivo CCK-8. Los valores se han representado en referencia a las células parentales, a las que se asignó un valor de 100 (n=4). Las barras de error representan la SD.

Experimentos de citometría de flujo utilizando Anexina-V y yoduro de propidio para determinar el grado de apoptosis revelaron que la inhibición del crecimiento de las células NCI-H929 y RPMI-8226 parentales cuando eran tratadas con BTZ o CFZ se asociaba a un aumento en los niveles de apoptosis, mientras que las células resistentes mostraban niveles basales de apoptosis (**Figura 63**).

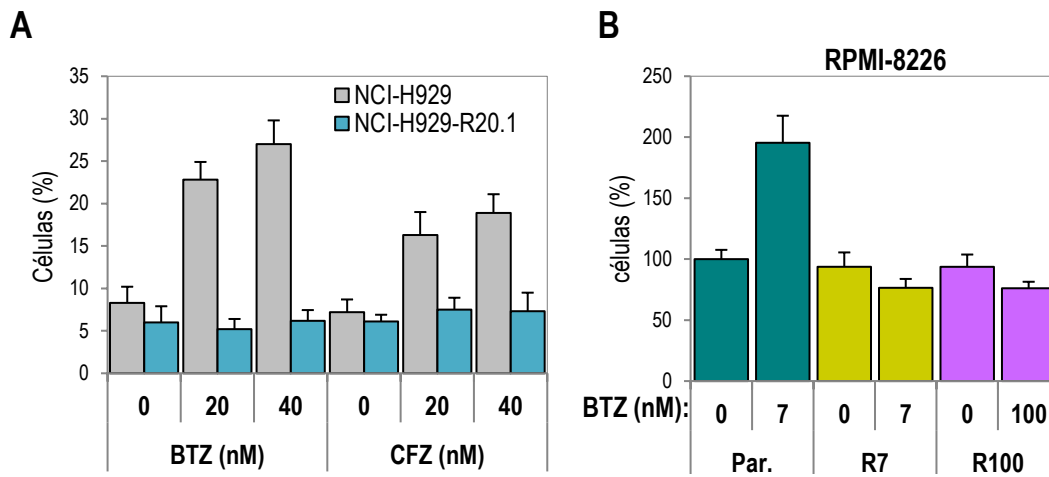


Figura 63. Apoptosis celular tras tratamientos con inhibidores del proteasoma. La apoptosis de células NCI-H929 (n=3; **A**) y RPMI-8226 (n=4; **B**) parentales y resistentes se determinó mediante ensayos de citometría de flujo utilizando yoduro de propidio y Anexina-V, tras su exposición durante 48h a las concentraciones de BTZ o CFZ indicadas. Se representan los porcentajes de células viables para cada una de las condiciones, referido a las células parentales sin tratamiento, y la SD.

El análisis de la resistencia de las células NCI-H929-R20.1 a otros agentes utilizados en la terapia frente al MM reveló que eran totalmente sensibles a la apilidina y a la doxorubicina (**Figura 64A**). Sin embargo, la viabilidad de estas células no resultó significativamente afectada tras el tratamiento con *melphalan* (MLP), si bien su viabilidad disminuyó tras ser tratadas con MLP en combinación con BTZ (**Figura 64B**).

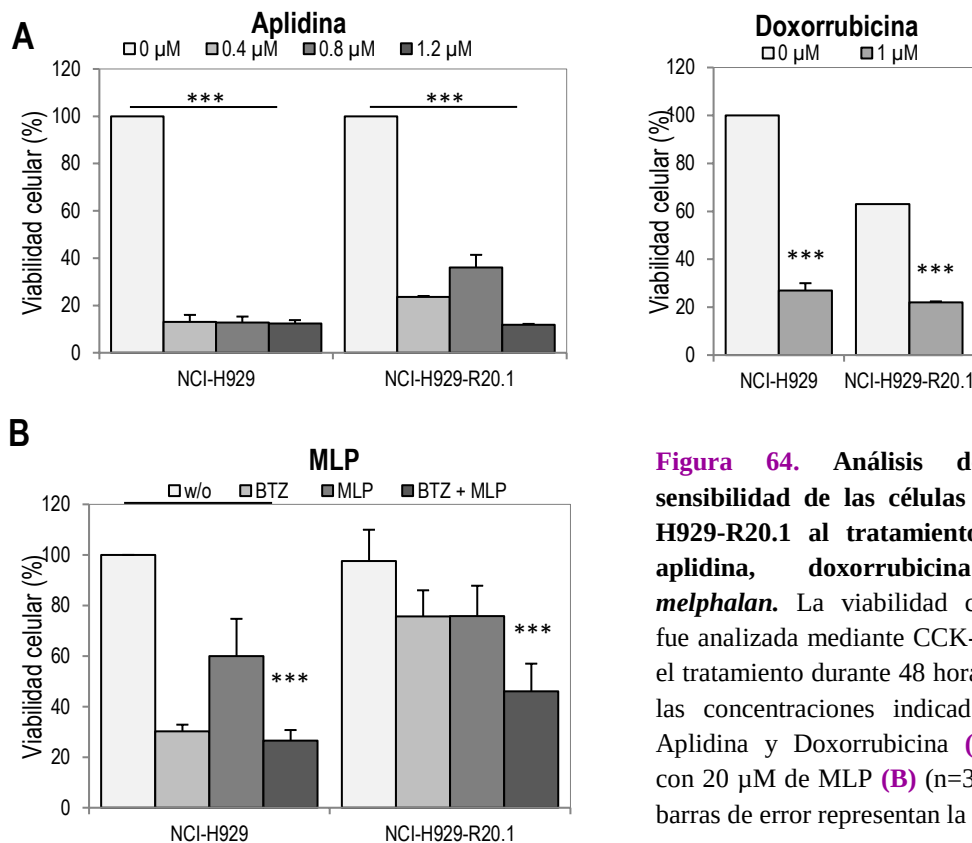


Figura 64. Análisis de la sensibilidad de las células NCI-H929-R20.1 al tratamiento con apilidina, doxorubicina o melphalan. La viabilidad celular fue analizada mediante CCK-8 tras el tratamiento durante 48 horas con las concentraciones indicadas de Apilidina y Doxorubicina (**A**), y con 20 µM de MLP (**B**) (n=3). Las barras de error representan la SD.

Para estudiar si la resistencia a BTZ de las células de MM implicaba la expulsión del inhibidor a través de bombas presentes en la membrana celular, testamos la expresión de la P-glicoproteína 1 (P-gP), un transportador de membrana dependiente de ATP (Verbrugge *et al.*, 2012; Lu & Hunter, 2010; Rumpold *et al.*, 2007). Para ello, y en colaboración con la empresa Pharmamar, realizamos experimentos de citometría de flujo para analizar la expresión de P-gP en las células NCI-H929-R20.1. Como control positivo de expresión de P-gP, utilizamos una línea de adenocarcinoma metastásico de colon denominada LoVo, que expresaba P-gP de manera inducible tras la administración de doxiciclina (**Figura 65**). Los resultados revelaron que ni las células parentales ni las resistentes a BTZ expresaban P-gP (**Figura 65**), sugiriendo que la resistencia a BTZ era mayoritariamente independiente de la actividad de transportadores de esta familia.

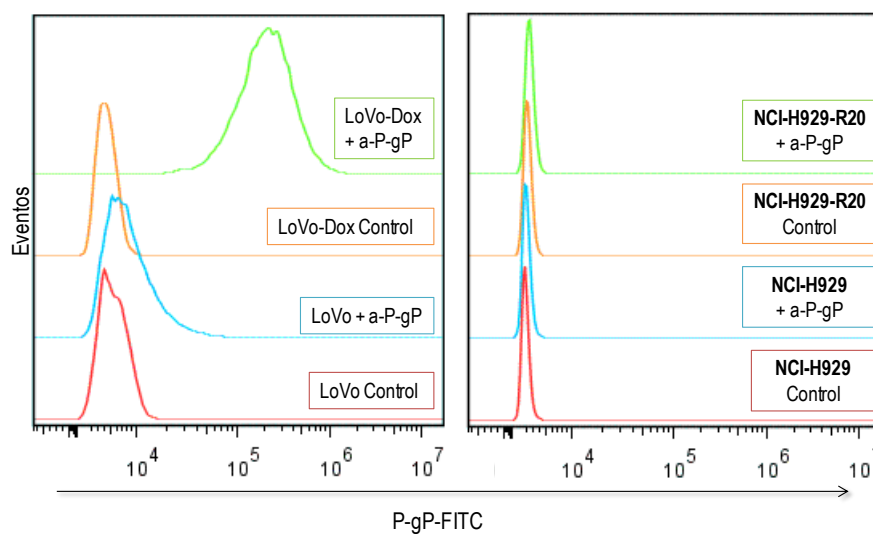


Figura 65. Análisis de la expresión de P-gP en células NCI-H929 y NCI-H929-R20.1. Las células fueron sometidas a ensayos de citometría de flujo para determinar la expresión de P-gP en membrana utilizando un anticuerpo frente a P-gP (a-P-gP). Se utilizaron células LoVo que expresaban P-gP de manera inducible tras la administración de doxiciclina.

Adicionalmente, utilizamos BTZ junto con verapamilo (VP), un compuesto que bloquea los canales de calcio (Amin, 2013), para confirmar que la resistencia de las células NCI-H929-R20.1 no se debía a la actividad de estos canales. Las células fueron tratadas durante 1 h con 50 μ M VP y, posteriormente, se las expuso durante 48 h a BTZ (20 nM para NCI-H929 parentales y R20.1; 7 nM y 100 nM para RPMI-8226 parentales, R7 y R100), y fueron sometidas a ensayos de viabilidad. Los resultados revelaron que cuando el BTZ era combinado con el VP había una mínima reducción (10%) de la viabilidad de las células NCI-H929-R20.1, en comparación con el tratamiento con BTZ solo (**Figura 66A**). Las células RPMI-8226, tanto las parentales como las resistentes a BTZ, mostraron más sensibilidad a VP que las células NCI-H929. Sin embargo, los análisis de viabilidad con la combinación BTZ+VP mostraron que una parte mayoritaria

de la resistencia a BTZ de las células RPMI-8226 era independiente de la acción de los canales de calcio (**Figura 66B**).

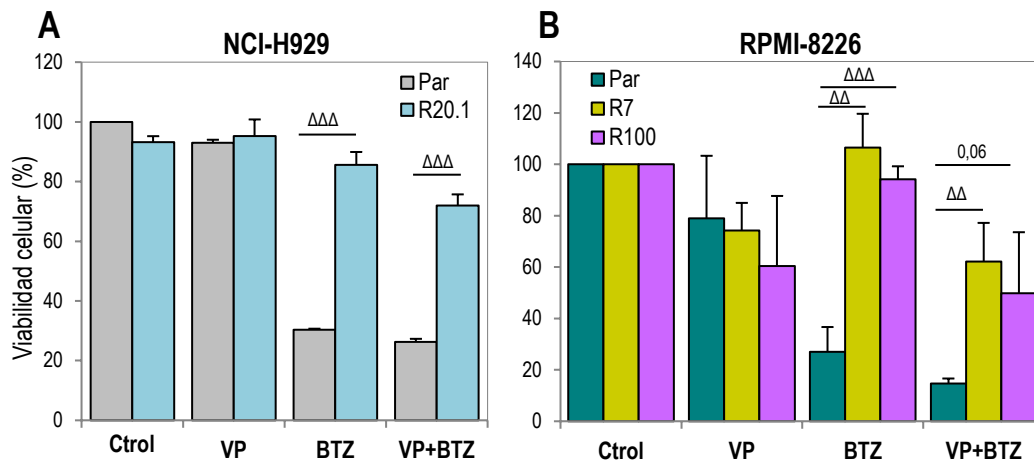


Figura 66. Análisis de la viabilidad de células resistentes a BTZ tras tratamiento con verapamilo. Las células NCI-H929 y NCI-H929-R20.1 (**A**), y las células RPMI-8226 y RPMI-8226-R7 y RPMI-8226-R100 (**B**), recibieron los tratamientos indicados y, posteriormente su viabilidad fue analizada utilizando el reactivo CCK-8 (n=3). Las barras de error representan la SD.

Dado que el BTZ inhibe al proteasoma, quisimos determinar los niveles celulares de proteínas ubiquitinadas (Ub) acumuladas tras el tratamiento con este agente. Correlacionando con la disminución de la viabilidad celular tras la exposición a BTZ (**ver figura 60**), el tratamiento de las células NCI-H929 parentales con BTZ causó un notable aumento de proteínas ubiquitinadas, indicando el bloqueo del proteasoma por el inhibidor (**Figura 67**). La exposición a BTZ de las células NCI-H929-R20.1 se tradujo asimismo en acumulación de ubiquitinación, pero a niveles inferiores a las de las células parentales (**Figura 67**), indicando la permisividad de un cierto nivel de proteínas ubiquitinadas en células resistentes a BTZ que no es suficiente para inducir su apoptosis.

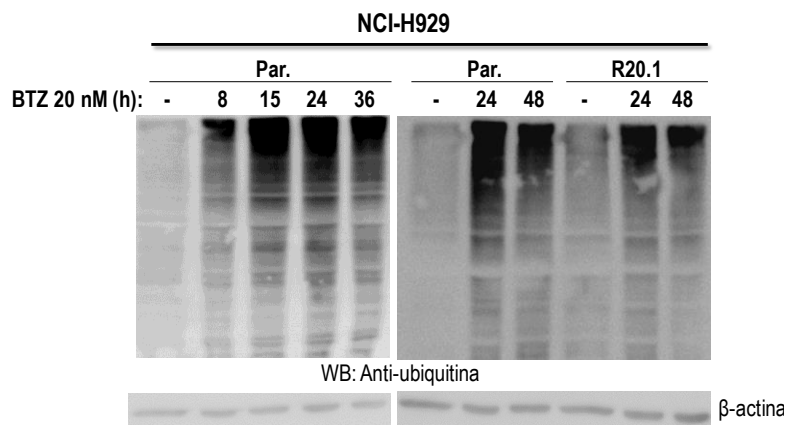


Figura 67. Análisis de ubiquitinación en las células de MM parentales y resistentes a BTZ. La ubiquitinación fue analizada mediante *western blotting* utilizando anticuerpos frente a ubiquitina, y se utilizó un anticuerpo frente a β-actina como control.

Uno de los mecanismos de resistencia a BTZ descrito hasta la fecha es la aparición de mutaciones en determinadas regiones del gen *PSMB5*, el cual codifica para la subunidad $\beta 5$ del proteasoma, y que impiden el reconocimiento específico del proteasoma por el BTZ. Esto nos llevó a analizar en las células NCI-H929 parentales y R20.1 una secuencia para la que se habían descrito varias mutaciones en dicho gen (Franke *et al.*, 2012; Ri *et al.*, 2010). Después de alinear las secuencias obtenidas utilizando la herramienta *BLAST* (NCBI), no observamos mutaciones en las células resistentes que pudieran potencialmente afectar a la interacción del BTZ con la subunidad $\beta 5$ (no mostrado).

Se ha sugerido previamente que la sobre-expresión de *PSMB5* podría constituir uno de los mecanismos de resistencia a BTZ que adquieren las células del MM (Balsas *et al.*, 2012). El análisis de los niveles de mRNA para *PSMB5* presente en las células NCI-H929-R20.1 mostró un aumento moderado pero significativo en comparación con las células parentales (Figura 68). No hemos estudiado en la presente Tesis si el aumento de expresión de *PSMB5* en dichas células resistentes pudiera contribuir a su resistencia frente al BTZ.

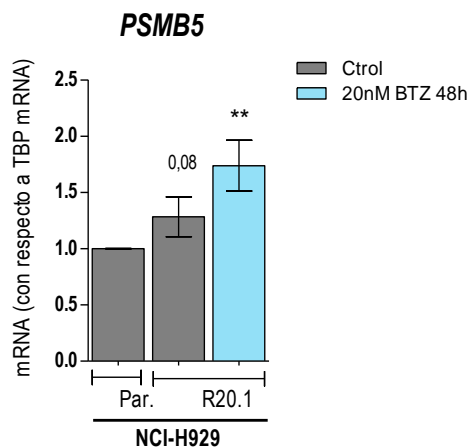


Figura 68. Análisis de la expresión de la subunidad $\beta 5$ del proteasoma en células NCI-H929 parentales y resistentes. Ensayos de RT-qPCR para analizar los niveles de expresión de *PSMB5* del proteasoma. Se utilizó *TBP* como referencia (n=4).

Al contrario que las células NCI-H929-R20.1, las células RPMI-8226 resistentes a BTZ no mostraron acumulación de proteínas ubiquitinadas cuando eran tratadas con BTZ durante 48 horas, mientras que se detectaron niveles importantes de ubiquitinización en células RPMI-8226 parentales tras exposición a BTZ (Figura 69). Estos resultados estarían en línea con datos previos que mostraban que estas células resistentes presentan mutaciones en la subunidad $\beta 5$ del proteasoma que causan una inhibición en la unión del BTZ al proteasoma, uno de los mecanismos probablemente implicados en su resistencia al inhibidor (Franke *et al.*, 2012).

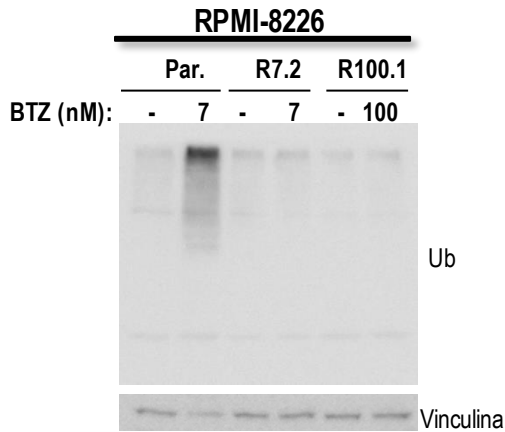


Figura 69. Análisis de la ubiquitinización en células RPMI-8226 parentales, RPMI-8226-R7 y RPMI-8226-R100 tras el tratamiento con BTZ. El nivel de proteínas ubiquitinadas tras tratamiento durante 24 h de las células con BTZ fue determinado mediante *western blotting* utilizando anticuerpos anti-ubiquitina, y anti-vinculina como control de carga.

A continuación, analizamos mediante *western blotting* el estado de activación de rutas de señalización intracelular que regulan procesos de proliferación y supervivencia celular. El estudio de la vía Ras-MAPK reveló una reducción moderada de la activación de Ras en las células NCI-H929-R20.1 y RPMI-8226-R7, en comparación a las células parentales (**Figura 70A**). Sin embargo, las células NCI-H929-R20.1 mostraron niveles de activación de Erk1/2 similares a las células parentales, mientras que las células RPMI-8226 resistentes a BTZ mostraron un moderado aumento de la fosforilación de Erk1/2 (**Figura 70B**). No observamos cambios significativos en los niveles de expresión de BRAF (no mostrado). Por otra parte detectamos una clara disminución de la fosforilación de Akt en las células NCI-H929-R20.1 (**Figura 70B**), lo que indica una reducción en la activación de la vía dependiente de PI3K en estas células. Dado que la proteína antiapoptótica Mcl-1 juega un papel importante en la progresión del MM (Gupta *et al.*, 2017), analizamos por *western blotting* su expresión en NCI-H929 y NCI-H929-R20.1, mostrando un moderado aumento de su expresión en las células resistentes (**Figura 70C**).

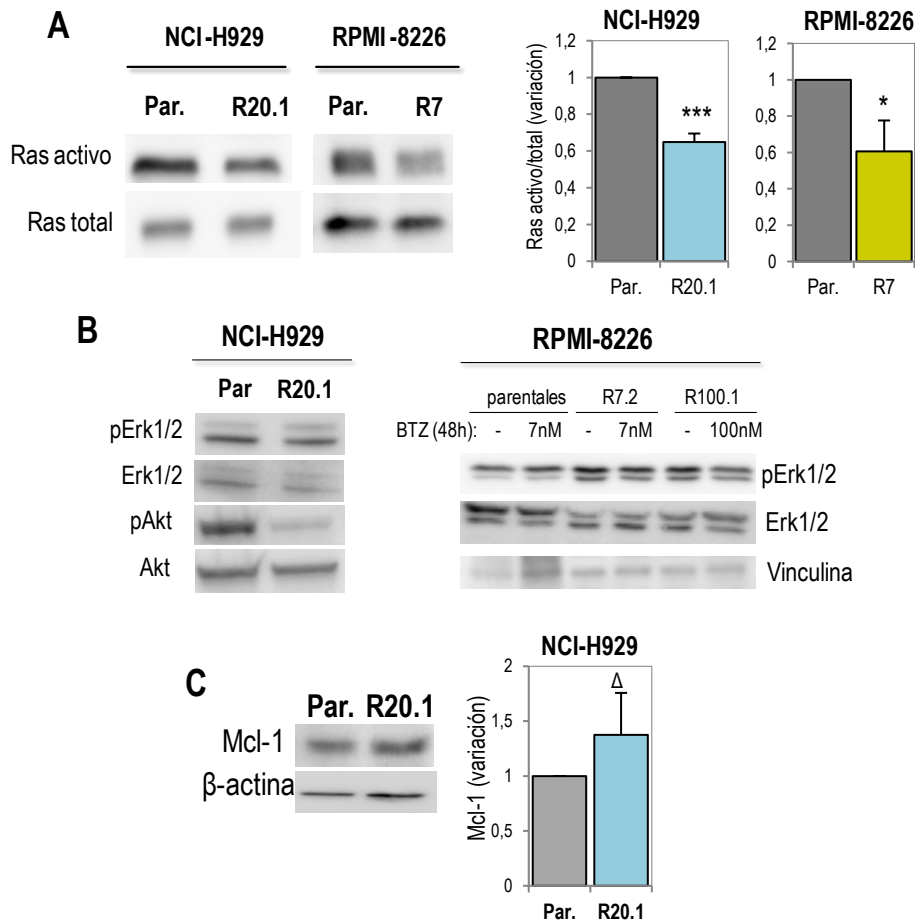


Figura 70. Caracterización de la activación de las vías Ras-MAPK y PI3K-Akt en células de MM resistentes a BTZ. **(A)** Ensayos GTPasa para analizar el nivel de activación de Ras (n=3). **(B)** Análisis mediante *western blotting* del estado de activación de Erk1/2 y Akt. **(C)** Análisis por *western blotting* de la expresión de Mcl-1 (n=5). Tanto en (A) como en (C), las barras de error representan la SD.

Se ha demostrado previamente que la resistencia a BTZ puede ser relacionada con un aumento de fosforilación de IGF1R (Kuhn *et al.*, 2012). Puesto que IGF-1 es considerado un importante factor de crecimiento para las células de MM (Ge & Rudikoff, 2000; Georgii-Hemming *et al.*, 1996), decidimos analizar los niveles de fosforilación de su receptor en nuestras células resistentes RPMI-8226. Los resultados mostraron un claro aumento de la fosforilación de IGF1R tanto en las células R7 como R100 (**Figura 71**), confirmando el aumento de fosforilación del receptor ya descrito y sugiriendo su posible implicación en la resistencia a BTZ de dichas células.



Figura 71. Expresión y activación de IGF1R en células RPMI-8226 resistentes a BTZ. Análisis mediante *western blotting* de la fosforilación de IGF1R y de su expresión total. Utilizamos un anticuerpos frente a GAPDH como control de carga. Se muestra un experimento representativo de los cuatro que se realizaron.

Las células de MM resistentes a BTZ muestran niveles superiores de expresión y función de $\alpha 4\beta 1$ que las células parentales

Ensayos de citometría de flujo utilizando células NCI-H929 parentales expuestas a BTZ y seleccionando las células vivas revelaron una considerable disminución de la expresión de moléculas de adhesión tales como $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ y CD44, mientras que la expresión de CXCR4 se redujo moderadamente (**Figura 72A**). La disminución de la expresión de $\alpha 4\beta 1$ observada en este trabajo concuerda con datos previos (Noborio-Hatano *et al.*, 2009). Las células NCI-H929-R20.1 mostraron una recuperación de la expresión de $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5$ y CD44, y de manera notable, los niveles de expresión de $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha 5$ fueron significativamente mayores en estas células resistentes que en las parentales (**Figura 72A, B**). Por el contrario, la expresión de CXCR4 en la membrana de las células NCI-H929-R20.1 no sufrió alteraciones significativas.

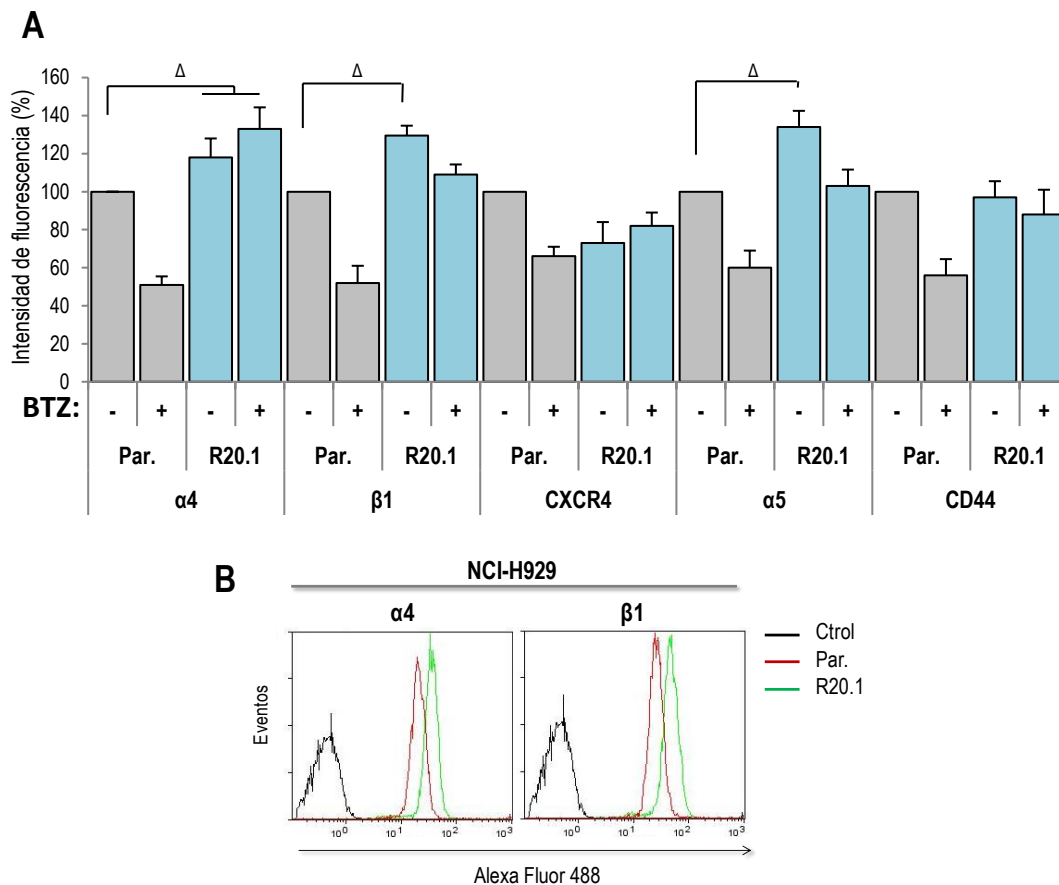


Figura 72. Análisis de la expresión de las subunidades $\alpha 4$, $\beta 1$ y $\alpha 5$, así como de CXCR4 y de CD44, en la membrana de células NCI-H929 resistentes a BTZ. (A) Las células incubadas en ausencia (-) o presencia (+) de BTZ (20 nM, 48 h), fueron sometidas a ensayos de citometría de flujo. Se representa la intensidad de fluorescencia media para los marcadores especificados (n=5). Los datos se han referido a las células parentales sin tratar, a las que se les asignó un valor de 100. Las barras de error representan la SD. **(B)** Histogramas representativos de la expresión en superficie de $\alpha 4$ y $\beta 1$ en las células parentales y resistentes.

Consistente con el aumento de expresión de $\alpha 4\beta 1$ en la membrana de las células NCI-H929-R20.1, ensayos de *western blotting* revelaron de nuevo una mayor expresión de $\alpha 4$ en estas células resistentes que en las parentales (**Figura 73A**), lo que se correlacionó asimismo con un incremento en los niveles de expresión del mRNA *ITGA4* (**Figura 73B**). De modo similar, detectamos un aumento en la expresión del mRNA *ITGB1* (**Figura 73B**). A pesar de que no habíamos observado cambios significativos en la expresión de *CXCR4* en la membrana de células resistentes, observamos un aumento significativo de los niveles de *CXCR4* en estas células en comparación con las parentales (**Figura 73B**).

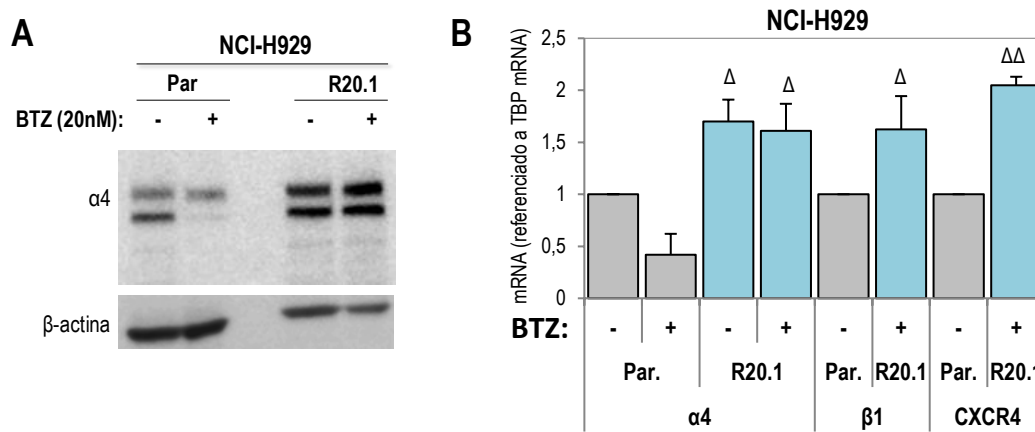


Figura 73. Análisis de la expresión proteica y de mRNA de $\alpha 4$, $\beta 1$ y CXCR4 en células NCI-H929 resistentes a BTZ. (A) Detección por *western blotting* de la expresión de $\alpha 4$ en las células indicadas. Se utilizó β -actina como control de carga. (B) Análisis por RT-qPCR de los niveles de mRNA para *ITGA4*, *ITGB1* y *CXCR4* (n=4). Las unidades arbitrarias y la estadística obtenidas para cada una de las condiciones fueron referidas a los datos de las células parentales sin tratamiento, y se representa la SD en forma de barras de error.

A continuación, estudiamos si el aumento de expresión de $\alpha 4\beta 1$ podía ser asimismo detectado en las células RPMI-8226 resistentes a BTZ. Los resultados de experimentos de citometría de flujo mostraron un claro aumento de la expresión de esta integrina, así como de CXCR4, en la membrana de células RPMI-8226-R7 y RPMI-8226-R100 relativo a su expresión en células parentales (**Figura 74A, B**). Por el contrario, las células resistentes mostraron una reducción de la expresión de $\alpha 5$.

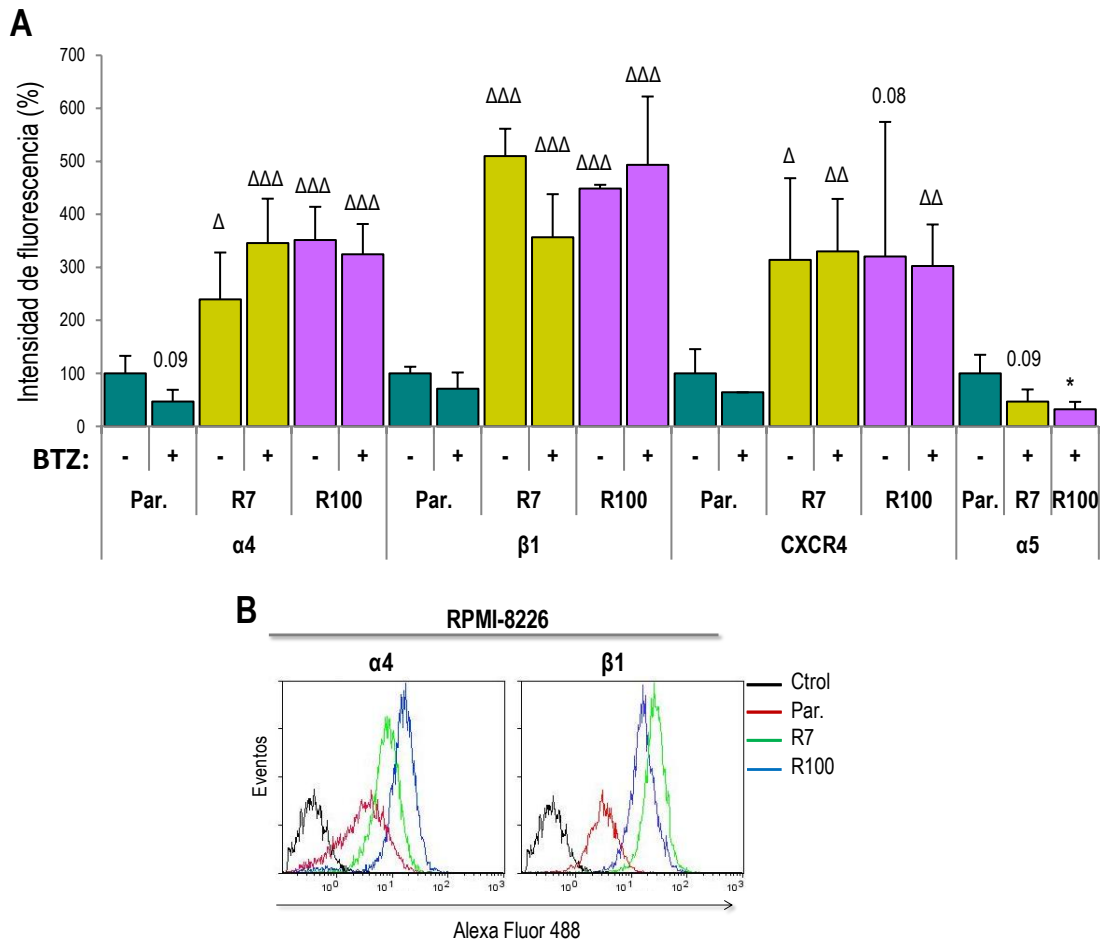


Figura 74. Análisis de la expresión de las subunidades α4, β1 y α5, así como de CXCR4, en la membrana de células RPMI-8226 resistentes a BTZ. (A) Las células incubadas en ausencia (-) o presencia (+) de BTZ (7 o 100 nM, 48 h), fueron sometidas a ensayos de citometría de flujo. Se representa la intensidad de fluorescencia media para los marcadores especificados (n=5). Los datos se han referido a las células parentales sin tratar, a las que se les asignó un valor de 100. Las barras de error representan la SD. **(B)** Histogramas representativos de la expresión en superficie de α4 y β1 en las células parentales y resistentes.

De modo similar a lo que ocurría en las células NCI-H929-R20.1, ensayos de *western blotting* revelaron un notable aumento de la expresión de α4 y β1 en las células RPMI-8226-R7 y RPMI-8226-R100 en comparación con las células parentales (Figura 75A). Asimismo, detectamos mayor expresión de *ITGA4* en las células resistentes a BTZ que en las parentales, aunque los niveles de expresión de *ITGB1* no variaron significativamente entre ambos tipos celulares (Figura 75B). Adicionalmente, observamos un incremento en la expresión de *CXCR4* en las células resistentes (Figura 75B).

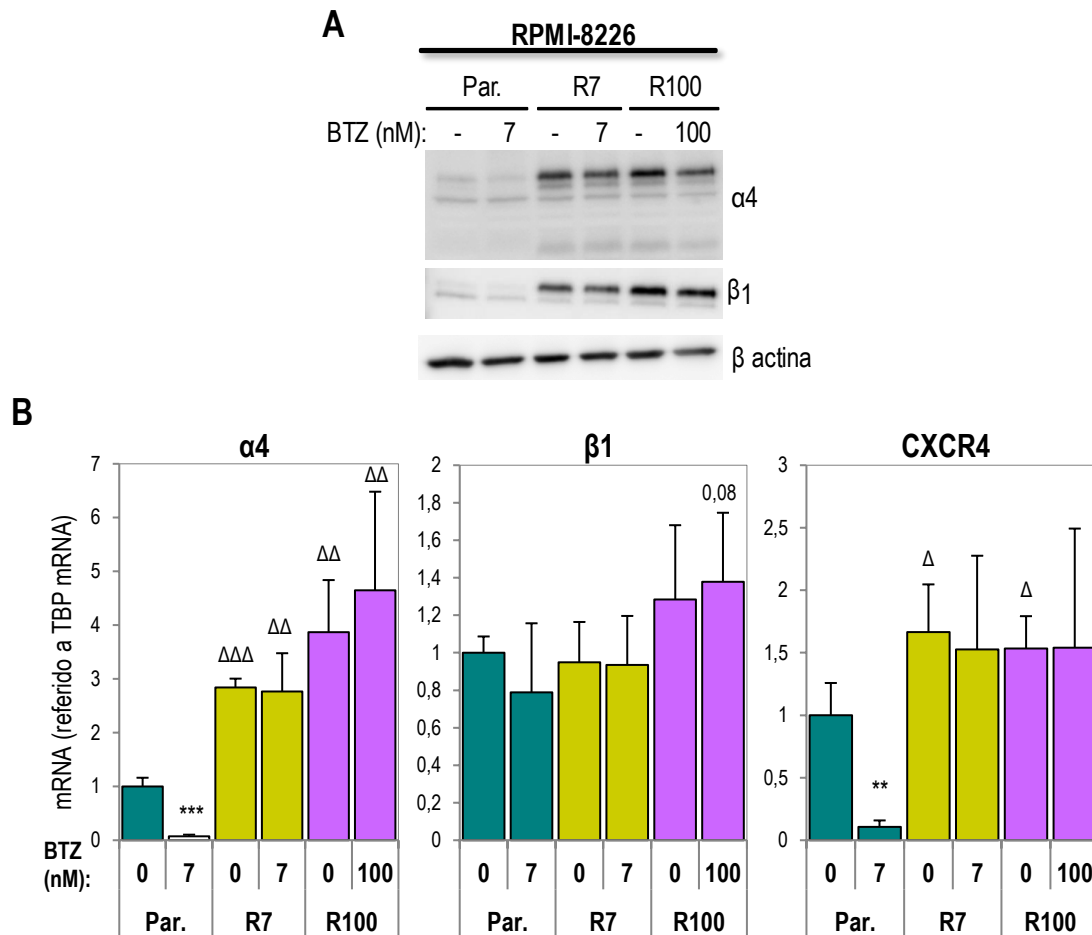


Figura 75. Análisis de la expresión proteica y de mRNA de $\alpha 4$, $\beta 1$ y CXCR4 en células RPMI-8226 parentales y resistentes a BTZ. **(A)** Las células fueron incubadas durante 48 h en ausencia (-) o presencia de las concentraciones indicadas de BTZ, y posteriormente la expresión de $\alpha 4$ y $\beta 1$ fue analizada mediante western blotting. **(B)** Análisis por RT-qPCR de los niveles de mRNA para *ITGA4*, *ITGB1* y *CXCR4* (n=4-6). Las unidades arbitrarias y la estadística obtenidas para cada una de las condiciones fueron referidas a los datos de las células parentales sin tratamiento, y se representa la SD.

Tras la observación de que las células de MM resistentes a BTZ mostraban un aumento de expresión de $\alpha 4\beta 1$, estudiamos si dicho aumento era dependiente o independiente de la presencia de BTZ en el medio de cultivo. Para ello, las células RPMI-8226 resistentes fueron mantenidas durante 3 semanas en ausencia de BTZ, y posteriormente analizamos su viabilidad y la expresión de $\alpha 4\beta 1$. Los resultados indicaron que estas células mantenían su resistencia a BTZ tras el período en ausencia del inhibidor (**Figura 76A**), y que la expresión de $\alpha 4\beta 1$ seguía siendo mayor que en las células parentales (**Figura 76B**). Estos datos revelan la estabilidad de la resistencia y del aumento de expresión de esta integrina independientemente de la presencia de BTZ, indicando que ambas respuestas no conllevan adicción celular al BTZ.

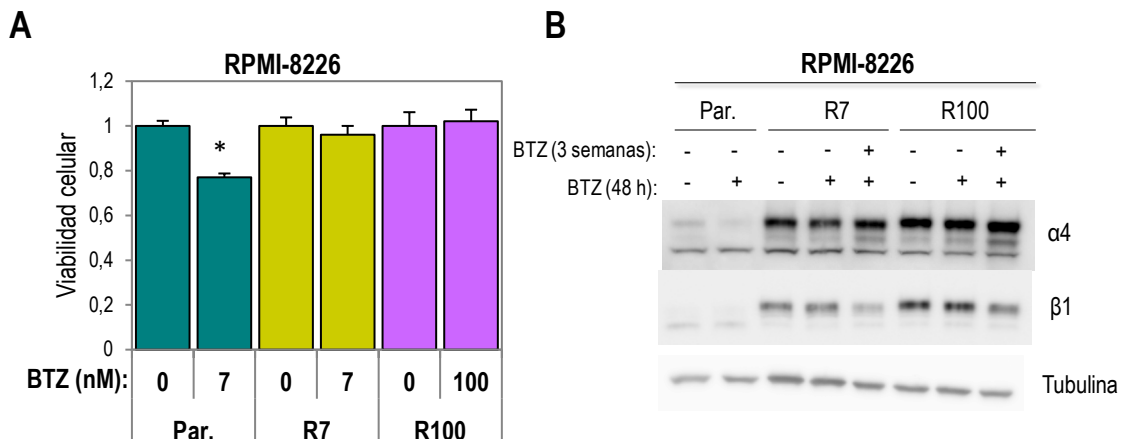


Figura 76. La resistencia a BTZ y el aumento de expresión de $\alpha 4\beta 1$ es independiente de la presencia del inhibidor. Las células fueron mantenidas durante 3 semanas sin BTZ en el medio de cultivo completo. Posteriormente, las células fueron tratadas con BTZ durante 48 h y se analizó su viabilidad (A) (n=2), y la expresión de $\alpha 4$ y de $\beta 1$ por *western blotting* (B).

Tomados en conjunto, nuestros datos sugerían que la regulación de la expresión de $\alpha 4$ podría ser, como mínimo, a nivel transcripcional, tanto en las células NCI-H929-R20.1 como en las células RPMI-8226-R7 y RPMI-8226-R100. Sin embargo, aunque la regulación de la expresión de $\beta 1$ en las células NCI-H929-R20.1 podría ser asimismo a nivel transcripcional, los resultados nos indicaban que su regulación tenía lugar post-transcripcionalmente en las células RPMI-8226 resistentes a BTZ. Para determinar si el aumento de expresión de $\beta 1$ a nivel proteico podría deberse a una estabilización de la proteína, tratamos las células RPMI-8226, RPMI-8226-R7 y RPMI-8226-R100 con cicloheximida (CHX), y analizamos la expresión de $\beta 1$ mediante *western blotting*. Los resultados mostraron que mientras que las células parentales presentaban una reducción de la expresión de $\beta 1$ al ser expuestas a CHX, dicha integrina se acumulaba en las células resistentes tratadas con CHX (Figura 77). Estos resultados sugieren que un aumento en la estabilidad de $\beta 1$ en las células RPMI-8226-R7 y RPMI-8226-R100 representa uno de los mecanismos responsables de su aumento de expresión.

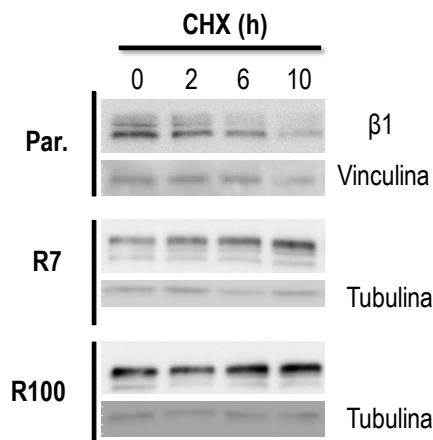


Figura 77. Expresión de $\beta 1$ tras tratamiento con cicloheximida de células RPMI-8226 parentales y resistentes a BTZ. Las células fueron incubadas durante los tiempos indicados con CHX (100 $\mu\text{g/ml}$), y a continuación, se analizó la expresión de $\beta 1$ por *western blotting*.

Posteriormente, estudiamos si el aumento de expresión de $\alpha 4\beta 1$ en las células de MM resistentes a BTZ se traducía en cambios en la adhesión celular mediada por esta integrina. Para ello, realizamos experimentos de adhesión a VCAM-1 y CS-1/FN, tanto en ausencia como en presencia de CXCL12. Los resultados indicaron que el aumento de expresión de $\alpha 4\beta 1$ estaba asociado a mayor adhesión de las células resistentes, que se hacía más evidente cuando se las estimulaba con la quimioquina (**Figura 78A, B**). Adicionalmente, pudimos detectar un aumento en la unión soluble de VCAM-1 a las células NCI-H929-R20.1 en comparación con las células parentales, tanto en condiciones basales como tras estimular con CXCL12 (**Figura 78C**).

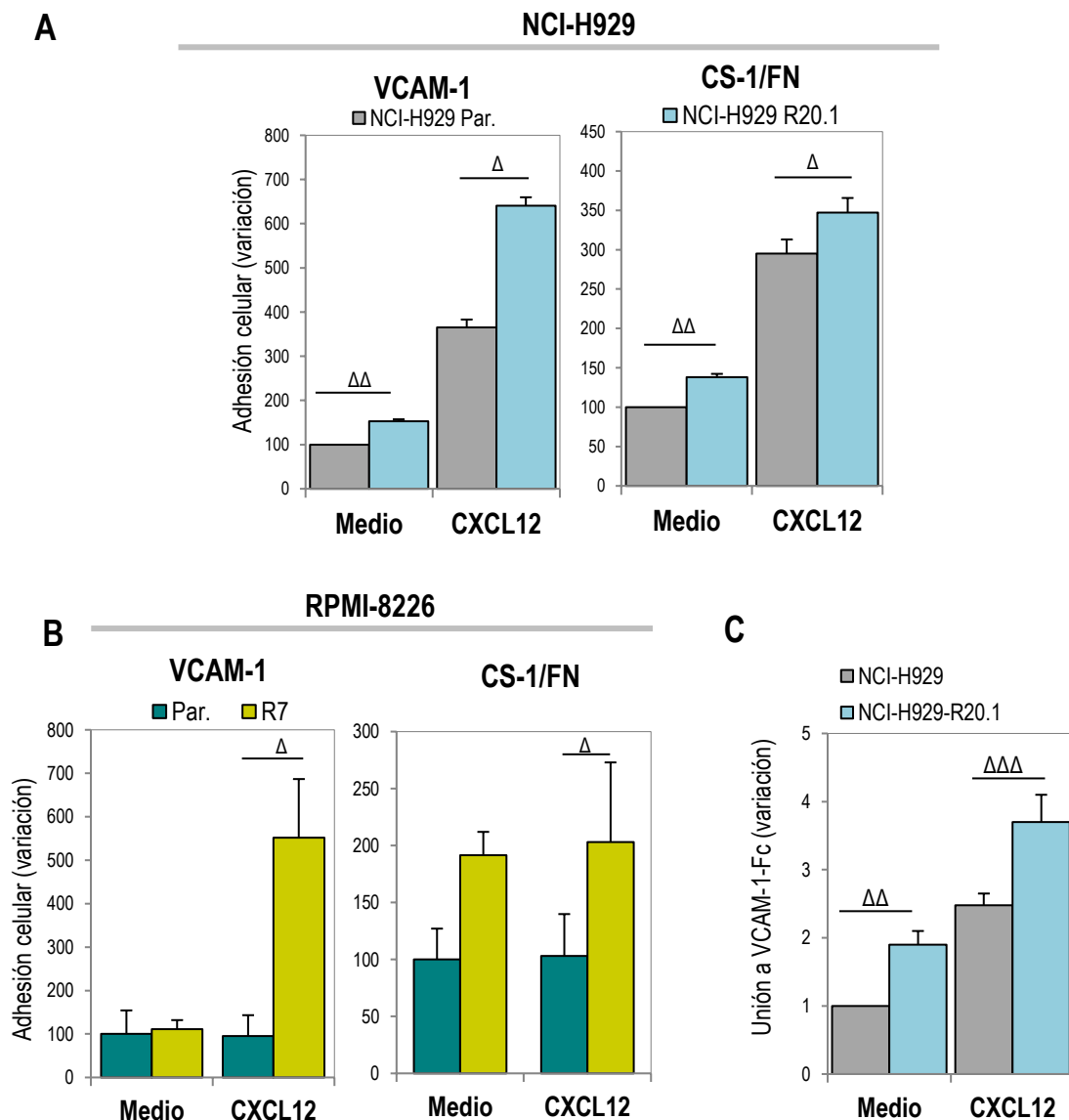


Figura 78. Adhesión dependiente de $\alpha 4\beta 1$ de células de MM resistentes a BTZ. Las células NCI-H929 y NCI-H929-R20.1 (**A**; n=3-4), y RPMI-8226 y RPMI-8226-R7 (**B**; n=3) fueron sometidas a ensayos de adhesión a VCAM-1 y CS-1/FN co-inmovilizados en ausencia (Medio) o presencia de CXCL12. Los datos se han referido a las células parentales, a las que se les asignó un valor de 100 y se representa la SD. (**C**) Las células fueron incubadas durante los tiempos indicados con o sin CXCL12, y a continuación la unión de VCAM-1-Fc fue determinada mediante citometría de flujo (n=3). Se representa la SD en las barras de error.

Estudio de la expresión de $\alpha 4\beta 1$ en resistencia a BTZ en otras neoplasias hematológicas

El bortezomib constituye uno de los agentes quimioterapéuticos utilizados en el tratamiento de otras neoplasias hematológicas, como son la leucemia linfoblástica aguda de células T (*acute lymphoblastic leukemia*, T-ALL), y el linfoma de células B no Hodgkin (*mantle cell lymphoma*, MCL) (Robak *et al.*, 2018b; Bertaina *et al.*, 2017; Robak *et al.*, 2015; Koyama *et al.*, 2014; Fisher *et al.*, 2006). La T-ALL es una neoplasia de células madre hematopoyéticas que se origina por aberraciones genéticas entre las que se incluyen mutaciones, translocaciones cromosómicas y aneuploidía de genes implicados en el desarrollo de órganos inmunitarios y en la regulación del ciclo celular (Iacobucci & Mullighan, 2017; Hunger & Mullighan, 2015; Inaba *et al.*, 2013). Se trata de uno de los cánceres infantiles más comunes, aunque también puede darse en adultos (Hunger & Mullighan, 2015). En cuanto al MCL, comprende el 6% de los casos de linfoma no Hodgkin, y aparece a causa de mutaciones genéticas en células somáticas que derivan en la proliferación exacerbada de linfocitos B tumorales en la zona del manto que rodea los folículos del centro germinal (Maddocks, 2018). En ambas neoplasias, una de las alteraciones más comunes es la desregulación de la vía NF- κ B, una de las razones de la administración de inhibidores del proteasoma en el tratamiento de estos tumores hematológicos. El BTZ es utilizado en ambas neoplasias con el fin de inhibir la actividad de esta ruta de señalización e inducir la apoptosis de las células tumorales, en combinación con otros fármacos como la dexametasona y la doxorubicina (Maddocks, 2018; Inaba *et al.*, 2013).

Para determinar si la resistencia adquirida a BTZ en estas neoplasias implicaba asimismo un aumento en la expresión de $\alpha 4\beta 1$, utilizamos la línea celular MOLT-4 como modelo para T-ALL, y la línea celular Z-138 como modelo de MCL. Generamos poblaciones de células MOLT-4 resistentes a 7 nM de BTZ (MOLT-4-R7), y Z-138 resistentes a 10 nM de BTZ (Z-138-R10) (Figura 79). Adicionalmente, analizamos la sensibilidad a BTZ de otra línea celular de MCL denominada Mino, comprobando que estas células presentaban una fuerte resistencia basal al inhibidor (no mostrado), por lo que no llevamos a cabo la generación de células resistentes de esta línea.

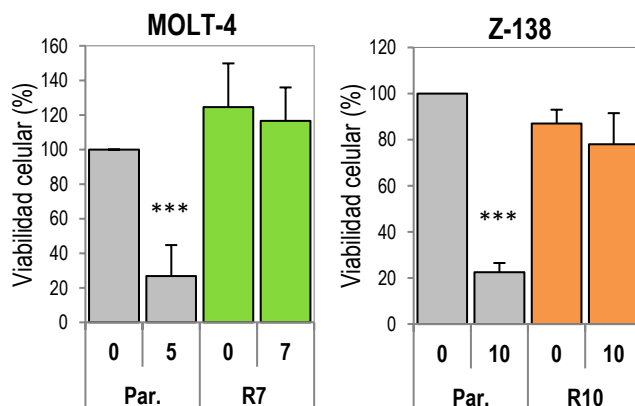


Figura 79. Generación de líneas celulares de T-ALL y MCL resistentes a BTZ. Las células fueron incubadas en ausencia o presencia de BTZ (48 h), y a continuación testadas en ensayos de viabilidad utilizando CCK8 (MOLT-4, n=6; Z-138, n=3). Los datos se han referenciado a las células parentales que no recibieron tratamiento (Ctrol), y se representa la SD con las barras de error.

A continuación, analizamos la expresión de $\alpha 4\beta 1$ y de CXCR4 en las células parentales y resistentes a BTZ. Los resultados de los ensayos de citometría de flujo revelaron que el tratamiento de las células MOLT-4 parentales con BTZ inducía una disminución de la expresión de $\alpha 4$, y que dicha disminución se mantenía y no era rescatada en las células resistentes (**Figura 80**). Curiosamente, la expresión de $\beta 1$ resultó moderadamente incrementada cuando las células MOLT-4, tanto parentales y resistentes eran incubadas con BTZ. Por otro lado, los niveles de CXCR4 disminuyeron en las células MOLT-4-R7 respecto de las parentales (**Figura 80**).

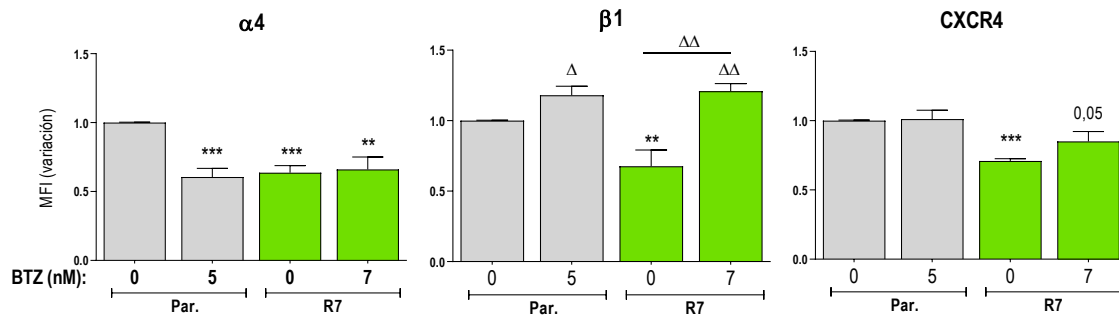


Figura 80. Análisis de la expresión de $\alpha 4$, $\beta 1$ y CXCR4 en la membrana de células MOLT-4 parentales y resistentes a BTZ. La expresión de los marcadores indicados fue analizada mediante citometría de flujo. Los resultados han sido referidos a las células control (n=4-5).

Cuando analizamos las células parentales Z-138 y sus resistentes, no pudimos detectar diferencias significativas en la expresión de $\alpha 4$ y $\beta 1$, independientemente de si habían sido incubadas en ausencia o presencia de BTZ (**Figura 81**). La expresión de CXCR4 disminuyó en las células Z-138 expuestas al inhibidor, y dicha expresión se recuperó en las células Z-138-R10, pero no aumentó en relación con las parentales (**Figura 81**).

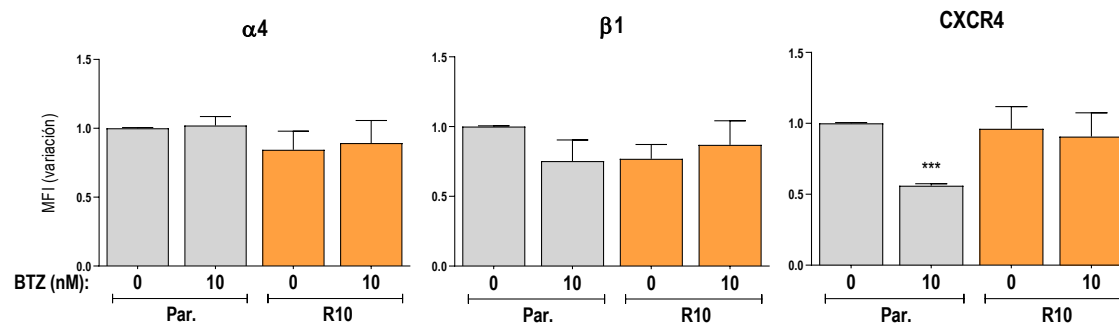


Figura 81. Análisis de la expresión de $\alpha 4$, $\beta 1$ y CXCR4 en la membrana células Z-138 parentales y resistentes a BTZ. La expresión de los marcadores indicados fue analizada mediante citometría de flujo. Los resultados han sido referidos a las células control (n=3).

Seguidamente, realizamos experimentos de adhesión a ligandos de $\alpha 4\beta 1$ con las células MOLT-R7 y Z-138-R10 y sus correspondientes controles parentales. Los resultados mostraron niveles similares de adhesión a VCAM-1 y CS-1/FN de las células parentales y resistentes a BTZ, independientemente de si los ensayos se habían realizado en ausencia o presencia de CXCL12 (**Figura 82**). Estos resultados sugieren que el aumento de expresión y función de $\alpha 4\beta 1$ en las células de MM resistentes a BTZ no constituye una respuesta generalizable a otros tipos de células neoplásicas hematológicas resistentes a BTZ.

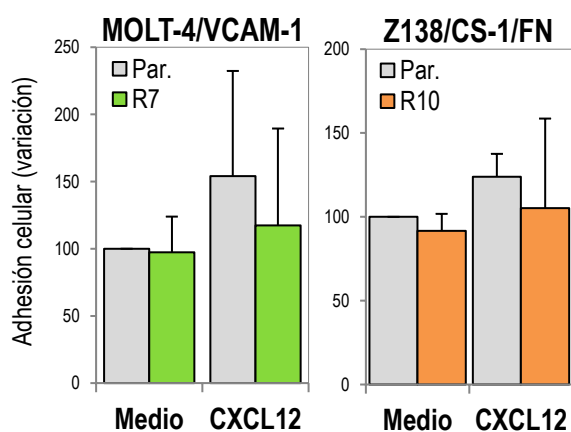


Figura 82. Adhesión de células MOLT-4 y Z-138 parentales y resistentes a BTZ a ligandos de $\alpha 4\beta 1$. Las células fueron sometidas a ensayos de adhesión a VCAM-1 o CS-1/FN co-inmovilizados en ausencia o presencia de CXCL12. Se representa la adhesión celular referida a la mostrada por las células parentales en ausencia de quimioquina, a la que se le asignó un valor de 100, junto con la SD (n=3).

Caracterización *in vivo* de las células de MM resistentes a bortezomib

Las células RPMI-8226 fueron inicialmente inmortalizadas desde la sangre periférica de un paciente con MM (Moore & Kitamura, 1968). Nuestros resultados preliminares indicaron que cuando se inoculan en la vena de la cola de ratones inmunodeprimidos NSG, son capaces de migrar, colonizar y desarrollar el mieloma en la MO (no mostrado). Como ya se ha comentado previamente en este trabajo, $\alpha 4\beta 1$ es esencial durante la adhesión y migración de células de MM a la MO, así como en la posterior adhesión de estas células al estroma medular. Por tanto, estudiamos si el aumento de expresión de $\alpha 4\beta 1$ en las células RPMI-8226 resistentes a BTZ se traducía en diferencias en su migración e infiltración en la MO, y posterior generación del MM. Para controlar la especificidad de los procesos adhesivos y migratorios de las células RPMI-8226-R7 y parentales hacia la MO, utilizamos anticuerpos anti- $\alpha 4$ (ALC 1.63) o control (P3). Previo a su inoculación en ratones NSG, incubamos las células con estos anticuerpos durante 20 min, y seguidamente las inyectamos vía intravenosa en presencia de los anticuerpos en la cola de grupos distintos de ratones. Cada 2-3 días, los distintos grupos de ratones recibieron intraperitonealmente el anticuerpo control o el anticuerpo anti- $\alpha 4$. Cuando los ratones mostraron signos de parálisis en las extremidades traseras que les impedía acceder al alimento y atentaba contra su bienestar, sacrificamos todos los ratones y obtuvimos la MO de sus fémures y tibias. A continuación, y utilizando el método que habíamos descrito previamente (Gutiérrez-González *et al.*, 2016), analizamos

la infiltración de las células parentales y RPMI-8226-R7 en la MO de los diferentes grupos de ratones. Para ello, analizamos mediante citometría de flujo las células positivas para HLA, un antígeno leucocitario humano que nos permitía diferenciar las células de origen humano frente a las de origen murino. De la misma manera, analizamos la expresión en superficie celular de la subunidad $\alpha 4$ en las células que habían infiltrado la MO de los ratones. Los resultados mostraron una mayor infiltración en la MO de las células RPMI-8226-R7 que las células parentales, y notablemente, esta infiltración se vió inhibida en los ratones que habían recibido el anticuerpo anti- $\alpha 4$ en comparación con los que habían sido tratados con el anticuerpo control (**Figura 83**). Asimismo, detectamos mayores niveles de expresión en superficie de $\alpha 4$ en las muestras procedentes de ratones inoculados con las células resistentes (**Figura 83**), mientras que en los ratones que recibieron medio RPMI 1640 no se detectó la expresión de esta molécula (no mostrado). Estos resultados indican que el aumento de expresión de $\alpha 4\beta 1$ en las células resistentes a BTZ se traduce en mayor migración y colonización de la MO, causando la progresión de la enfermedad.

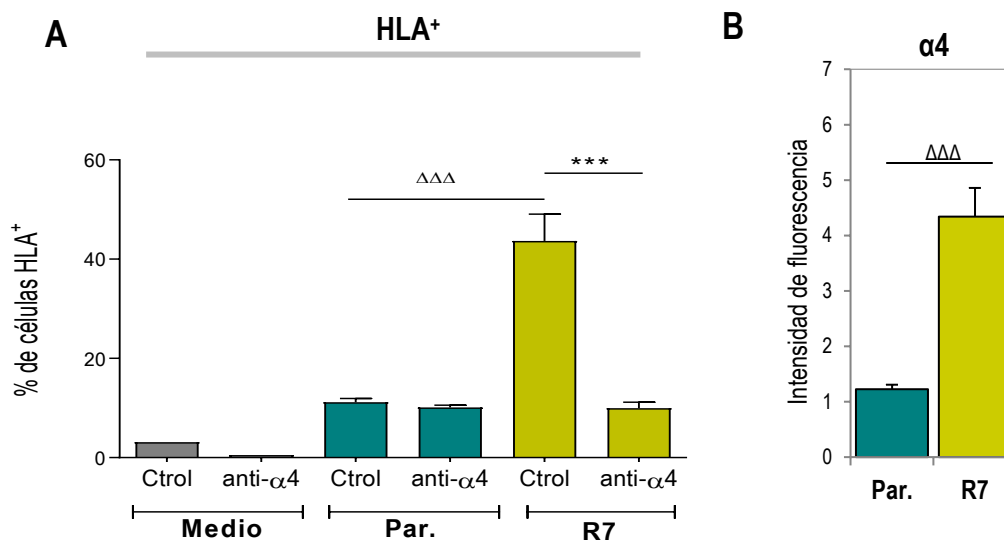


Figura 83. Caracterización de la infiltración de células RPMI-8226 parentales y R7 en la MO de ratones NSG. **(A)** Análisis por citometría de flujo del porcentaje de células humanas HLA⁺ en la MO de ratones que habían recibido anticuerpos control o anti- $\alpha 4$ (n=7-9). **(B)** Análisis mediante citometría de flujo de la expresión de $\alpha 4$ en las células aisladas de la MO de los diferentes grupos de ratones, Se representa la MFI (n=7-9).

Asimismo, realizamos ensayos de RT-qPCR para analizar la proporción de mRNA codificante para la *GAPDH* humana en la MO infiltrada, con respecto a la cantidad de mRNA presente para la *TBP* murina (**Figura 84**). De nuevo, pudimos confirmar la mayor infiltración en la MO de las células de MM resistentes, debido principalmente a su mayor expresión de la integrina $\alpha 4$.

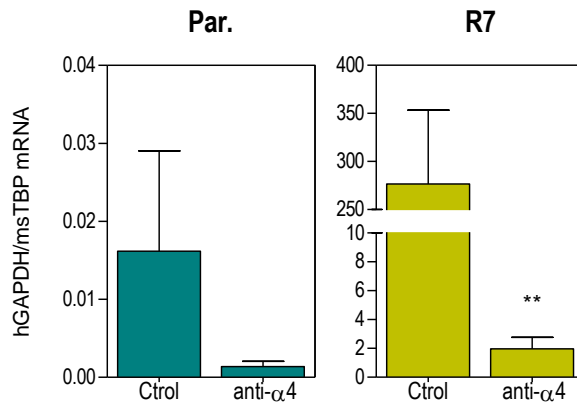


Figura 84. Cuantificación mediante RT-qPCR de la infiltración por células de MM de la MO de ratones NSG. Ensayo de RT-qPCR para determinar la proporción de mRNA para *GAPDH* humana frente a la *TBP* murina (n=7-8).

Las células NCI-H929 (Gazdar *et al.*, 1986) son capaces de generar plasmacitomas subcutáneos en ratones inmunodeprimidos, por lo que estudiamos la capacidad de las células NCI-H929 parentales y resistentes a BTZ de formar dichos tumores. Las células fueron inyectadas subcutáneamente ratones NSG, y tras 6 días comenzamos a notar visualmente el crecimiento de los tumores, por lo que iniciamos los distintos tratamientos. Un grupo de ratones recibió DMSO como tratamiento control, y el grupo restante fue inoculado con BTZ solubilizado en DMSO, a una concentración de 0.8 mg/kg. Durante los días posteriores se fue anotando el progreso de los volúmenes de los tumores de cada ratón, y los animales fueron sacrificados 19 días después de la inoculación celular, una vez los tumores alcanzaron un tamaño razonable. Los resultados indicaron que las células NCI-H929.R20.1 generaban tumores más rápidamente y mayores que las células parentales (Figura 85A). Significativamente, los ratones inyectados con células parentales y tratados con BTZ mostraban tumores de menor volumen que los que recibieron el tratamiento control (Figura 85A), mientras que los tumores generados a partir de células resistentes apenas veían afectado su volumen tras el tratamiento con BTZ, y progresaban de manera similar a los tumores de células parentales (Figura 85A). Una vez aislados los tumores, pudimos observar que las células NCI-H929-R20.1 generaban tumores de mayor peso que los de las células parentales (Figura 85B). Estos resultados confirman *in vivo* la resistencia a BTZ de las células NCI-H929-R20.1, y sugieren que estas células han desarrollado respuestas moleculares que contribuyen a tasas de proliferación *in vivo* mayores que las células parentales. Con muestras procedentes de tumores aislados llevamos a cabo ensayos de RT-qPCR y observamos que aquellos procedentes de células resistentes seguían manteniendo niveles mayores de *ITGA4* y de *ITGB1* que los generados a partir de células parentales (resultados no mostrados). Estos datos sugieren asimismo la posibilidad de que el aumento de expresión de α 4 β 1 en las células resistentes favorezca una mayor adhesión al microambiente tumoral que facilite una mayor proliferación, supervivencia y resistencia a BTZ.

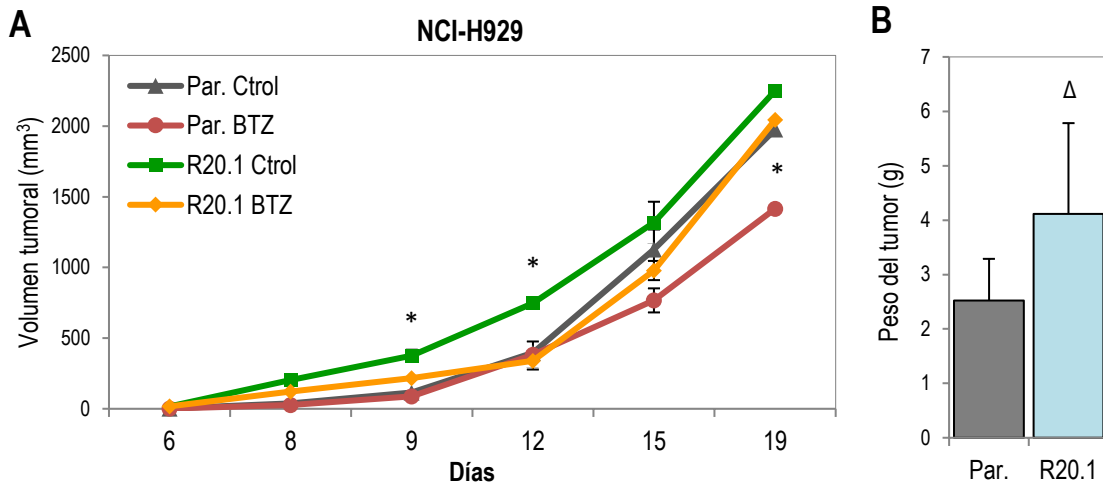


Figura 85. Caracterización del crecimiento tumoral en ratones inoculados con células NCI-H929 parentales y resistentes a BTZ. (A) Las células NCI-H929 y NCI-H929-R20.1 fueron inoculadas subcutáneamente en ratones NSG, y tras 6 días los animales fueron tratados con BTZ/DMSO o DMSO (Ctrol). Se representan los volúmenes tumorales, y las barras de error muestran el SEM (n=5-8). **(B)** Peso de los tumores obtenidos de ratones inyectados con células parentales o resistentes a los que se les administró el tratamiento control (n=6-9). Las barras de error representan la SD.

Identificación de mecanismos moleculares que regulan la expresión de $\alpha 4\beta 1$ en células de MM resistentes a BTZ

Para estudiar posibles mecanismos que pudieran estar regulando la expresión de $\alpha 4$ en las células de MM resistentes a BTZ, colaboramos con la Dra. Mónica Martínez-Moreno (CIB) en los análisis de la secuencia del promotor del gen *ITGA4*, utilizando el *software* diseñado por ALGGEN. El análisis reveló varios sitios de unión para factores de transcripción que podrían potencialmente regular la expresión de *ITGA4*. Dos de estos factores son NF- κ B (p65) y FOXO3a, los cuales fueron objeto de nuestros posteriores estudios. Otros factores de transcripción que detectamos en el análisis por su posible unión al promotor de *ITGA4* fueron XBP-1, STAT-1 y NFAT-1/2, los cuales no han sido estudiados en el presente trabajo.

Como ya se ha mencionado en la Introducción, en ausencia de estímulos, los dímeros de NF- κ B (p50 y p65) se encuentran en el citoplasma unidos al inhibidor I κ B α . En presencia de estímulo, el complejo IKK fosforila a I κ B α , liberando de este modo a NF- κ B para su translocación al núcleo, en donde se une a determinados promotores a través de su sitio de unión a DNA. Asimismo, la fosforilación por diferentes proteínas quinasas de residuos de serina en p65 tales como Ser276, Ser311, Ser468 y Ser536, aumentan la actividad transcripcional de p65 (Oeckinghaus *et al.*, 2011; Morotti *et al.*, 2007; Mattioli *et al.*, 2006). En relación a FOXO3a, decidimos estudiar su papel dado que se activa en condiciones de inhibición de la activación de la vía PI3K-Akt (Eijkelenboom & Burgering, 2013), y que su expresión se ve aumentada por BTZ en células tumorales (Yang *et al.*, 2016). Notablemente, el tratamiento de las células NCI-H929 parentales con BTZ indujo un aumento en fosfo-I κ B, el cual se mantuvo e incluso se incrementó en las

células NCI-H929-R20.1 (**Figura 86**). Asimismo, el BTZ causó un aumento en la fosforilación (Ser536) de la subunidad p65 en las células parentales, y los niveles de dicha fosforilación se mantuvieron moderadamente más altos en las células resistentes que en las parentales (**Figura 86**). Dado que el BTZ inhibe al proteasoma induciendo una notable acumulación de proteínas ubiquitinadas en las células NCI-H929 y en menor medida en las células NCI-H929-R20.1 (**ver figura 67**), estos resultados en conjunto sugieren una acumulación de fosfo-IκB en las células resistentes, lo que podría causar la disociación y activación del dímero NF-κB.

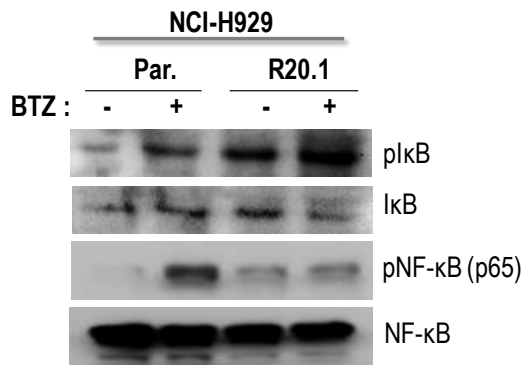


Figura 86. Análisis de la fosforilación de IκB y NF-κB (p65) en las células NCI-H929-R20.1. Las células fueron testadas mediante *western blotting* para analizar la fosforilación de IκB y NF-κB (p65).

Con el objetivo de estudiar el posible papel de NF-κB en el aumento de expresión de $\alpha 4\beta 1$ en las células NCI-H929-R20.1, silenciamos su subunidad p65 (NF-κB1) y posteriormente analizamos los niveles del mRNA de *ITGA4* (**Figura 87A**). Asimismo, estos experimentos se llevaron a cabo determinando el posible papel de FOXO3a en la expresión de *ITGA4* (**Figura 87B**). Los resultados revelaron que el silenciamiento de *NF-κB1* y, en menor medida, de *FOXO3a* reducía parcialmente los niveles de *ITGA4*, mientras que la depleción combinada de ambos mRNAs no se traducía en una mayor inhibición de la expresión de *ITGA4* (**Figura 87C**).

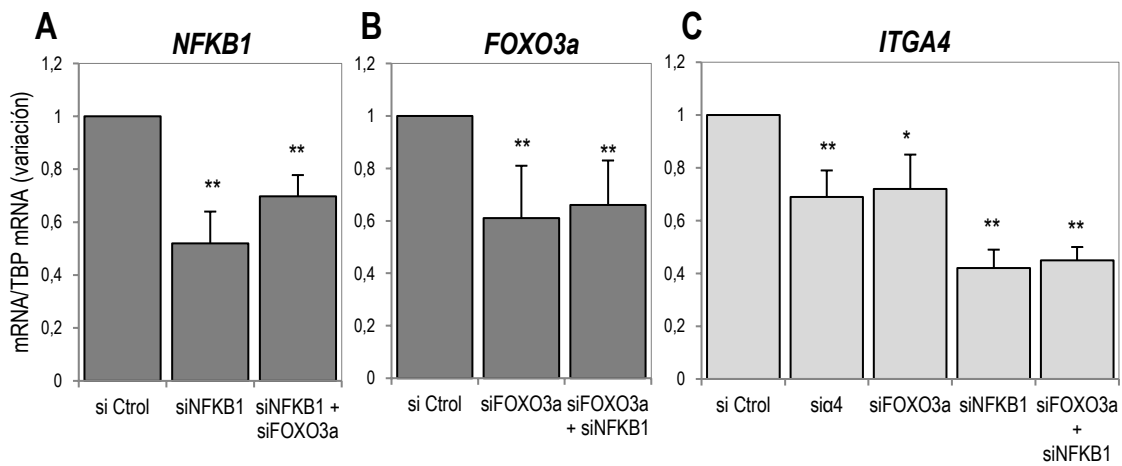


Figura 87. Expresión de *ITGA4* tras el silenciamiento de *NFKB1* y *FOXO3a*. Las células NCI-H929-R20.1 fueron nucleofectadas con los siRNAs especificados, y posteriormente se analizaron mediante RT-qPCR los niveles de *NFKB1* y *FOXO3a* (A, B), o de *ITGA4* (C). Se utilizó el mRNA de *TBP* como referencia y se representa la SD en forma de barras de error (n=2-3).

Cuando dichos transfectantes en las células NCI-H929-R20.1 se ensayaron en experimentos de adhesión a CS-1/FN, como era de esperar detectamos una disminución significativa en su capacidad adhesiva en aquellos silenciados para α 4, mientras que observamos una reducción en la adhesión de los transfectantes deplecionados en NF- κ B, FOXO3a, o silenciados para ambos factores de transcripción, aunque sin alcanzar significancia estadística (Figura 88). Estos resultados apuntan a una implicación parcial de NF- κ B y FOXO3a en el aumento de expresión y función de α 4 β 1 en las células de MM resistentes a BTZ.

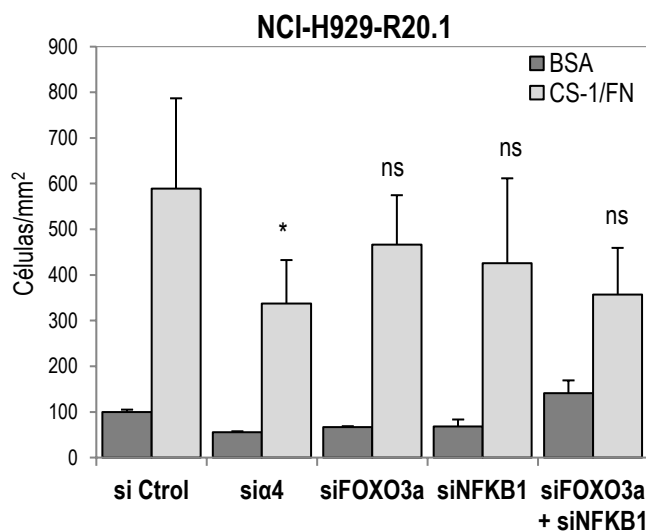


Figura 88. Adhesión dependiente de α 4 β 1 de los transfectantes de NCI-H929-R20.1 silenciados para α 4, NF- κ B o FOXO3a. Los transfectantes fueron sometidos a ensayos de adhesión a CS-1/FN. Se representa el número de células adheridas por mm² y la SD (n=3).

DISCUSIÓN

PAPEL DE ICAP-1 EN LA ADHESIÓN LINFOCITARIA Y EN EL DESARROLLO DEL SISTEMA INMUNITARIO

Estudios previos han propuesto a ICAP-1 como un inhibidor de la activación de las integrinas $\beta 1$, debido a su capacidad de unirse a secuencias del dominio citoplasmático de $\beta 1$ que interaccionan con moléculas activadoras de dichas integrinas, como talina y kindlin. En base a la posible competición entre ICAP-1 y talina y kindlin, la unión de ICAP-1 a dichas secuencias induciría una conformación de baja afinidad de la integrina por sus ligandos (Bouvard *et al.*, 2007; Zhang & Hemler, 1999; Chang *et al.*, 1997). Como $\alpha 4\beta 1$ es expresada principalmente en células del sistema inmunitario, decidimos caracterizar el posible papel de ICAP-1 en la adhesión de células inmunes y en desarrollo de este sistema. Para el desarrollo de este estudio se han utilizado ratones *knockout* para ICAP-1.

Observamos que los ratones ICAP-1^{-/-} crecían más lentamente que los ratones WT, como ya se había descrito previamente (Bouvard *et al.*, 2007), siendo más evidente la diferencia en ratones de entre 3-5 semanas de edad. Esto se tradujo en que los órganos linfoides procedentes de ratones KO tuvieran menor tamaño que los ratones ICAP-1^{+/+} y consecuentemente, obtuviéramos un menor recuento celular.

El análisis del fenotipo adhesivo de las células del timo reveló que no existían variaciones significativas en la expresión de talina y kindlin-3 entre ratones ICAP-1^{-/-} y ICAP-1^{+/+}. Asimismo, la expresión de $\alpha 4$ y $\beta 1$ en la superficie de las distintas poblaciones celulares tímicas fue comparable entre ambos tipos de ratones. Para la caracterización de la capacidad adhesiva de timocitos deficientes en ICAP-1, realizamos ensayos de adhesión a CS-1/FN, no observando diferencias en cuanto a su adhesión detectada, comparando con timocitos procedentes de ratones ICAP-1^{+/+}. Estos resultados indican que ICAP-1 no regula la adhesión mediada por $\alpha 4\beta 1$ a CS-1/FN de los timocitos. En el presente trabajo realizamos asimismo experimentos de adhesión de timocitos a VCAM-1, pero los niveles de adhesión fueron muy bajos, y no se pudo llegar a ninguna conclusión.

La caracterización de las distintas poblaciones de timocitos reveló una reducción de los porcentajes de células T CD8 SP, mientras que las otras poblaciones celulares (CD4 SP, DP y DN) no veían modificadas sus frecuencias. Estos resultados nos hicieron sospechar sobre una posible implicación de ICAP-1 en el desarrollo de células T CD8⁺ en el timo. El análisis de la expresión de CD69, un marcador de la selección positiva de timocitos reveló una reducción de la proporción de células TCR $\alpha\beta$ ⁺ CD8⁺ CD69^{hi} en los ratones ICAP-1^{-/-}, en comparación con los ratones WT. Estos resultados indican que ICAP-1 está implicado en la selección positiva de las células CD8 SP, regulando el desarrollo de las mismas.

Dado que habíamos observado que ICAP-1 no regulaba la adhesión a través de $\alpha 4\beta 1$ en los timocitos, la alteración en la selección positiva en los timocitos ICAP-1^{-/-} no parecía depender de cambios potenciales en el proceso de adhesión. No hemos estudiado en el presente trabajo si la ausencia de ICAP-1 en las poblaciones DN, CD4⁺ y CD8⁺ SP del timo afecta su adhesión dependiente de $\alpha 4\beta 1$, y por tanto no podemos excluir que

estas poblaciones en timocitos deficientes en ICAP-1 tuvieran alterada la mencionada adhesión.

En estudios previos se ha descrito una reducción en la proliferación de osteoclastos y fibroblastos ICAP-1^{-/-} (Liu *et al.*, 2013; Bouvard *et al.*, 2007). No hemos observado una correlación entre la falta de ICAP-1 y una disminución de la proliferación de los linfocitos T CD8 SP, lo que podría haber explicado la menor frecuencia de esta población celular. Estos datos nos sugieren que la regulación de la proliferación por parte de ICAP-1 es dependiente del tipo celular y del contexto tisular.

El correcto tráfico de los timocitos contribuye al óptimo desarrollo de los diferentes linajes de células T en el timo (Shah & Zuniga-Pflucker, 2014; Carpenter & Bosselut, 2010; Moser & Willimann, 2004). Otro de los procesos que podría verse afectado por la falta de ICAP-1 y que podría influir en el proceso de la selección positiva, es el tráfico y la localización de los timocitos, lo cual está regulado por quimioquinas y sus receptores. El eje conformado por la quimioquina CXCL12 y su receptor CXCR4 facilita la retención de la población de timocitos DP en el córtex (Halkias *et al.*, 2013), mientras que la interacción del receptor CCR7 con sus ligandos CCL19 y CCL21, promueve la migración de los timocitos desde el córtex a la médula (Hu *et al.*, 2015; Carpenter & Bosselut, 2010). No hemos detectado variaciones importantes en la expresión de CCR7 ni de CXCR4 en ninguna de las poblaciones celulares presentes en el timo de ratones ICAP-1^{-/-} en comparación a los timocitos ICAP-1^{+/+}. Estos datos sugieren que el defecto en la selección positiva en ratones ICAP-1^{-/-} no es consecuencia de una alteración de la migración de los timocitos y su posicionamiento en los diferentes compartimentos tímicos. Sin embargo, quedarían por analizar posibles alteraciones en la expresión de las quimioquinas específicas de estos receptores en los ratones ICAP-1^{-/-} que pudieran perturbar la migración de los timocitos, e influir en su desarrollo hacia células T CD8 SP.

La selección positiva de los timocitos DP tiene lugar en el córtex del timo y requiere de la interacción entre el receptor de células T (TCR) con péptidos propios presentados por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) expuestos por las células epiteliales tímicas. Estas interacciones regulan la expresión de factores de transcripción específicos que dirigen el desarrollo de las poblaciones de células T hacia los linajes CD4⁺ o CD8⁺ (Takaba & Takayanagi, 2017; Shah & Zuniga-Pflucker, 2014). Runx3 se expresa en la médula del timo, lugar en el que los timocitos realizan su diferenciación hacia los linajes CD4 y CD8 SP (Woolf *et al.*, 2003). Runx3 es un factor de transcripción requerido para el desarrollo de linfocitos CD8⁺ desde células DP, y su expresión está controlada por IL-7, la cual, en combinación con IL-15 determinan hacia el linaje T CD8 SP (**Figura 89**) (McCaughy *et al.*, 2012; Park & Saint-Jeannet, 2010; Singer *et al.*, 2008; Egawa *et al.*, 2007; Taniuchi *et al.*, 2002). Sin embargo, Socs1, supresor de señalización por citoquinas, emite una señalización que inhibe la inducción de Runx3 (Luckey *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2010). Socs1 se expresa de manera elevada una vez las células han superado la selección β y comienzan a expresar CD4 y CD8, provocando la pérdida de la expresión de IL-7R α , receptor de citoquinas (Park *et al.*, 2010; Carpenter & Bosselut, 2010). La señalización a través del TCR induce la represión de la expresión de Socs1 en los timocitos DP, los cuales reinician la expresión de *Il7r*

(Luckey *et al.*, 2014; Carpenter & Bosselut, 2010; Park *et al.*, 2010). Runx3 reprime la expresión de *Cd4*, así como de otros factores de transcripción que son esenciales para el desarrollo del linaje CD4 SP, como ThPOK. A su vez, ThPOK es capaz de suprimir la expresión de *Runx3*, imponiendo el desarrollo del linaje CD4⁺ e induciendo a Socs (Luckey *et al.*, 2014; He *et al.*, 2005).

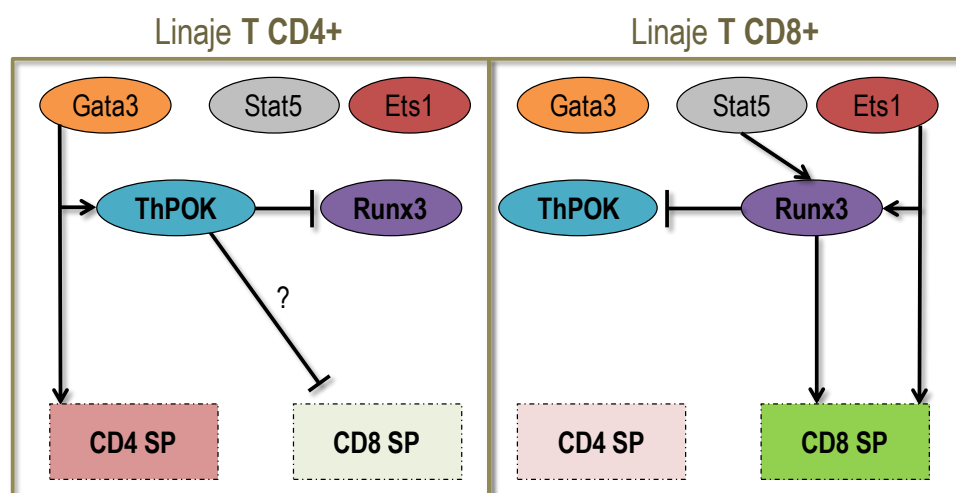


Figura 89. Factores de transcripción esenciales para la regulación del desarrollo de los linajes T CD4 y CD8 SP. Mientras que ThPOK determina la generación de células CD4 SP, Runx3 es necesario para dirigir el desarrollo de timocitos CD8 SP. Ambos factores de transcripción son capaces de reprimirse entre ellos, reflejo de la eficacia del programa.

Estudios anteriores demostraron que ICAP-1 y Krit1 poseen una secuencia de localización nuclear (NLS) (Fournier *et al.*, 2005). Su translocación al núcleo provoca que ICAP-1 no pueda unirse e inactivar a la subunidad $\beta 1$ (Calderwood *et al.*, 2013; Fournier *et al.*, 2005). En base a estos datos previos, nos planteamos la posibilidad de que ICAP-1 pudiera alterar la expresión de factores de transcripción implicados en el desarrollo de los distintos linajes T en el timo. Los ensayos de fraccionamiento celular nos han permitido determinar una distribución preferencial de ICAP-1 en la fracción nuclear de los timocitos totales, un resultado en línea con previas observaciones de su localización nuclear en fibroblastos y células epiteliales, con consecuencias funcionales en la actividad transcripcional de los promotores P1 y P2 de *c-Myc* (Fournier *et al.*, 2005). Notablemente, detectamos una disminución de los niveles de mRNA de *RUNX3*, así como una reducción de la proteína Runx3 en timocitos ICAP-1^{-/-}.

Nuestros resultados sugieren la posibilidad de una implicación de ICAP-1 nuclear en la regulación de la expresión de Runx3, lo cual representaría un potencial mecanismo implicado en la alteración de la selección positiva de los timocitos CD8⁺ en los ratones ICAP-1^{-/-} (Figura 90). Dado que tanto los timocitos control como los deficientes en ICAP-1 muestran niveles similares de adhesión mediados por $\alpha 4\beta 1$, surge la posibilidad

de que pudiera ser debido a la localización nuclear de ICAP-1, y por tanto de la imposibilidad de regular dicha integrina.

Durante la caracterización inicial de los ratones ICAP-1^{-/-} se observó que la ausencia de ICAP-1 correlacionaba con una reducción de la expresión de Runx2 (Bouvard *et al.*, 2007), marcador asociado a la diferenciación de osteoblastos. Tanto Runx2 como Runx3 pertenecen a la misma familia de factores de transcripción y, por tanto, los resultados sugieren que la expresión de ambos factores podría estar regulada por ICAP-1. Dado que ICAP-1 interacciona con Krit1, el cual posee asimismo una NLS y cuya unión a ICAP-1 facilita su translocación al núcleo (Fournier *et al.*, 2005), los resultados abren la posibilidad de que la regulación de la expresión de Runx3 por ICAP-1 pudiera estar relacionada con su interacción a Krit1.

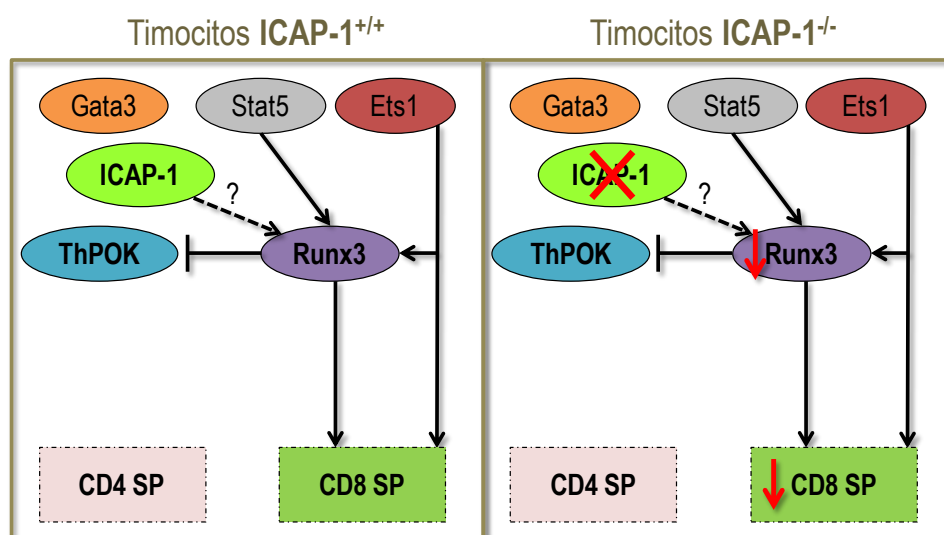


Figura 90. Modelo propuesto de la regulación ejercida por ICAP-1 sobre Runx3. En timocitos WT, ICAP-1 promovería la expresión de Runx3, lo que conllevaría la determinación hacia el linaje T CD8⁺. En timocitos de ratones ICAP-1^{-/-}, la carencia en ICAP-1 provoca una disminución de la expresión de Runx3, lo que podría ser la causa de la menor frecuencia de la población de células CD8 SP.

Con todos estos datos, creemos que es importante estudiar a fondo las respuestas celulares y moleculares que se ven afectadas por la pérdida de ICAP-1 y que alteran la selección positiva de las células CD4⁺CD8⁺ en los ratones ICAP-1^{-/-}. Asimismo, será interesante determinar posibles alteraciones en las células epiteliales del córtex tímico por la falta de ICAP-1 y que pudiera afectar al desarrollo de las células CD8⁺.

Contrariamente a lo observado con timocitos, las células T (CD3⁺) y B (CD19⁺) de bazo de ratones ICAP-1^{-/-} mostraron un aumento notable de la adhesión mediada por $\alpha 4\beta 1$, indicando que ICAP-1 actúa como regulador negativo del proceso de adhesión. Observamos un pequeño aumento en la expresión de $\beta 1$ en la membrana celular de esplenocitos T y B de ratones ICAP-1^{-/-} de 3-5 semanas de edad, aunque este cambio no era evidente en muestras de ratones de 8-10 semanas en comparación con muestras de

ratones ICAP-1^{+/+}. Las bases moleculares del mencionado aumento de expresión de $\beta 1$ son desconocidas por el momento. Sería interesante determinar si la falta de ICAP-1 favorece la estabilización de $\beta 1$ en la membrana plasmática de los esplenocitos debido a alteraciones en la maquinaria de reciclaje de $\beta 1$.

De modo diferente a lo observado con los timocitos, ICAP-1 mostró una distribución comparable entre núcleo y citoplasma en células del bazo, un hecho que pudiera contribuir a la regulación de la adhesión mediada por $\alpha 4\beta 1$ en estas células en comparación con las células del timo. Por tanto, la regulación por ICAP-1 de la adhesión dependiente de $\alpha 4\beta 1$ de esplenocitos, junto con la falta de regulación de este proceso en los timocitos, sugiere un papel de ICAP-1 diferente según la etapa en el programa de diferenciación y desarrollo linfocitario, además de ser órgano-dependiente. Otra posible base para la regulación diferencial por ICAP-1 de esta adhesión en estos diferentes tipos celulares podría venir de diferentes niveles de expresión o de distribución celular de Krit1 entre estas células.

El aumento de la adhesión a través de $\alpha 4\beta 1$ de esplenocitos T ICAP-1^{-/-} abre la posibilidad de que un número mayor de estas células pudieran ser retenidas en el bazo. Sin embargo, pudimos comprobar que éste no era el caso para las células T CD8⁺, ya que observamos una disminución en su frecuencia en el bazo, así como en los NLs de ratones ICAP-1^{-/-}. Esto probablemente refleje la reducción del número de células CD8 SP de los timos de estos ratones. Aún así, no podemos excluir completamente que esa reducción se deba a alteraciones intrínsecas al tráfico leucocitario hacia y entre los órganos linfoides secundarios, ya que detectamos un aumento del porcentaje células CD8⁺ presentes en la sangre periférica de ratones ICAP-1^{-/-} de 3-5 semanas de edad, asociado al descenso de células CD8⁺ en bazo y NLs.

Correlacionando con el aumento de la adhesión de células esplénicas B sobre ligandos de $\alpha 4\beta 1$, observamos una disminución de la frecuencia de células B MZ en ratones ICAP-1^{-/-}, mientras que las células FO aumentaron levemente, pero de manera significativa. La retención de las células B MZ en la zona marginal depende de las integrinas $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha L\beta 2$, mientras que estas integrinas no son requeridas para la migración de las células FO hacia los folículos (Lo *et al.*, 2003; Lu & Cyster, 2002). La frecuencia de células B con un fenotipo maduro (IgM^{med-low}IgD^{high}) presentes en MO resultó ser similar comparando ratones ICAP-1^{+/+} y ICAP-1^{-/-}, sugiriendo que el aumento en la frecuencia de células FO detectada en los bazos de ratones ICAP-1^{-/-} no conllevaba un incremento en su recirculación a MO. Asimismo, pudimos concluir que las células B maduras recirculan de manera normal desde el bazo hasta la MO en ausencia de ICAP-1.

Un aumento en la adhesión dependiente de $\alpha 4\beta 1$ de las células MZ implicaría, teóricamente, una mayor retención de estas células en la zona marginal del bazo, lo que causaría una reducción de su migración a los folículos, aunque no se observarían cambios en los números totales detectados de estas células al analizar la población total esplénica. No hemos estudiado hasta el momento si la reducción de la frecuencia de células MZ está asociada a la alteración de la localización y distribución de éstas en los diferentes compartimentos del bazo. El tráfico celular en este órgano es considerado como uno de los mecanismos que regulan la maduración de las células B MZ (Pillai & Cariappa, 2009). Estos mecanismos dependen de señales que determinan el destino de las células B MZ,

como pueden ser la señalización a través del BCR, la actividad de Notch2, las interacciones entre BAFF y BAFFR y la señalización a través de NF- κ B (Pillai & Cariappa, 2009; Saito *et al.*, 2003; Tanigaki *et al.*, 2002). Será importante desarrollar estudios que permitan comprender si alguno de estos procesos está alterado en bazos de animales deficientes en ICAP-1, como consecuencia del aumento en la adhesión mediada por α 4 β 1, o de manera independiente a la misma. También sería interesante estudiar si la generación de células B MZ desde sus células precursoras (IgM^{hi}IgD^{hi}CD21^{hi}CD1d^{hi}CD23⁺) tiene lugar en bazos carentes de ICAP-1.

Las HPSCs y la generación de células B no se vieron afectadas en los ratones ICAP-1^{-/-}. Asimismo, no se habían detectado cambios significativos en el recuento leucocitario sanguíneo en los análisis incluidos en la Tesis Doctoral de Soledad Isern de Val (2016), al comparar con muestras procedentes de ratones control. Estos resultados indican que, en condiciones estériles, la ausencia de ICAP-1 no afecta en gran medida a la generación de diferentes células del sistema inmunitario en ratones adultos. Finalmente, las pequeñas variaciones observadas al analizar la migración de linfocitos ICAP-1^{-/-} hacia bazo y NLs, o la infiltración de linfocitos T en el peritoneo inflamado tras la aplicación de TG, indican que ICAP-1 no regula de un modo importante estos procesos.

La observación de que la ausencia de ICAP-1 afecta al proceso de selección positiva en el timo, causando una disminución de la frecuencia de células T CD8⁺ SP, abre el camino a nuevas investigaciones que se centren en revelar los mecanismos por los que este proceso está afectado.

ICAP-1 REGULA NEGATIVAMENTE LA ADHESIÓN DEPENDIENTE DE α 4 β 1 DE CÉLULAS DE MM A LA MICROVASCULATURA DE LA MO

La integrina α 4 β 1 es esencial para los procesos de migración y adhesión de células de MM a la microvasculatura de la MO y en su posterior extravasación al interior medular (Martinez-Moreno *et al.*, 2016; Olson *et al.*, 2005; Mori *et al.*, 2004; Uchiyama *et al.*, 1993). Asimismo, α 4 β 1 juega un papel crítico en la adhesión de las células de MM al estroma medular, favoreciendo la proliferación y la supervivencia de las células tumorales, además de participar en procesos de resistencia a quimioterapia (CAM-DR). La quimioquina CXCL12 se expresa en la MO y se une a su receptor CXCR4 presentado por células de MM, lo que promueve la activación de α 4 β 1 y la posterior adhesión mediada por esta integrina, globalmente contribuyendo a la retención de las células de MM en la MO y a su supervivencia. Los activadores intracelulares de esta integrina se postulan como potentes dianas a tener en cuenta en el desarrollo de futuras terapias frente al MM (Martinez-Moreno *et al.*, 2016). Sin embargo, menos se conoce sobre la expresión y función de inhibidores de α 4 β 1 en MM, como es el caso de ICAP-1, por lo que decidimos caracterizar su papel en la adhesión de las células de MM. Observamos que ICAP-1 se expresa en células de MM de MO de pacientes con esta neoplasia, así como en líneas celulares de MM, y detectamos su interacción de ICAP-1 con β 1. El aumento de la activación de α 4 β 1 y el posterior incremento en la adhesión dependiente de esta integrina de células de MM silenciadas para ICAP-1 nos llevó a concluir que ICAP-1

regula negativamente la activación de $\alpha 4\beta 1$ en células de MM (Martinez-Moreno *et al.*, 2016) (Figura 91).

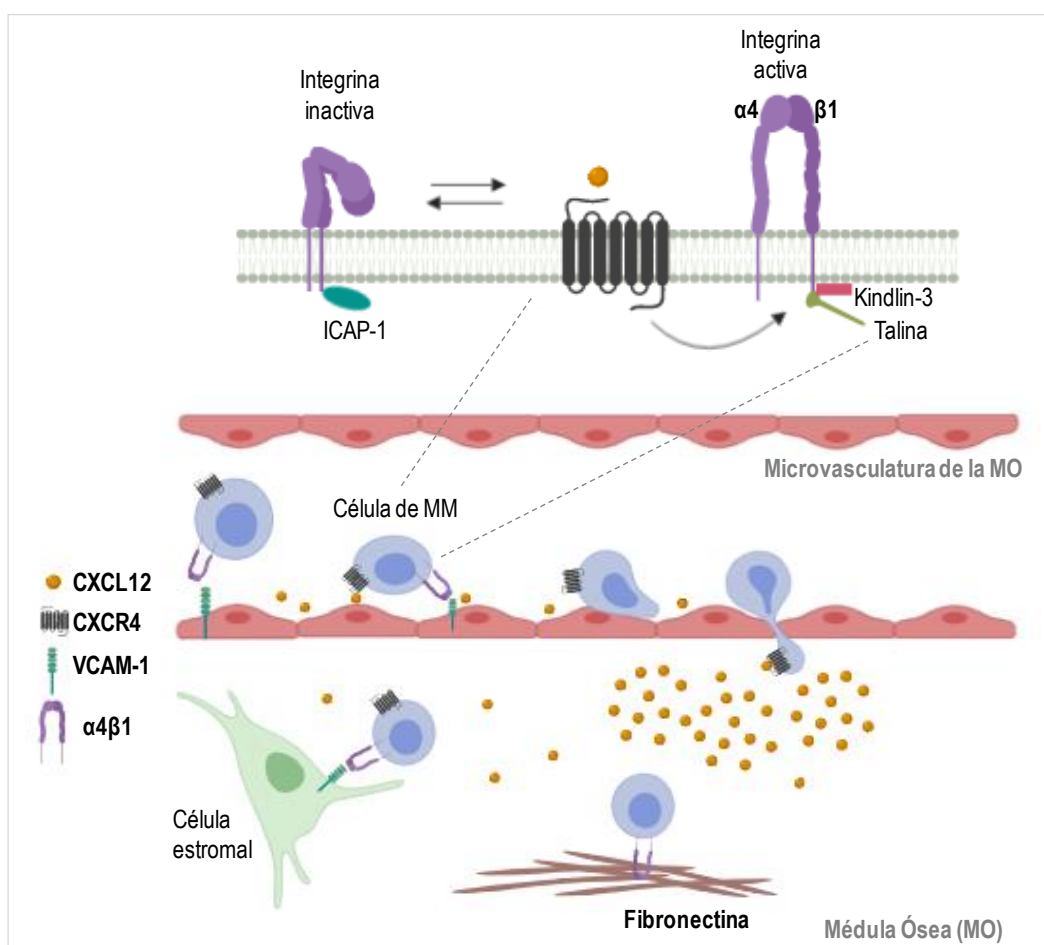


Figura 91. Modelo de la regulación de la adhesión de células de MM dependiente de $\alpha 4\beta 1$. La señalización *inside-out* estimulada tras la unión entre CXCL12 y CXCR4 promueve la adhesión estable dependiente de $\alpha 4\beta 1$ de las células de MM a la microvasculatura de la MO. Posteriormente, estas células se extravasan siguiendo el gradiente de la quimioquina y se asientan en el estroma medular, proceso también dependiente de $\alpha 4\beta 1$. La regulación positiva de la activación de $\alpha 4\beta 1$ es mediada por talina y kindlin-3, mientras que ICAP-1 regula negativamente dicha activación (Martinez-Moreno *et al.*, 2016).

CARACTERIZACIÓN DE RELACIONES FUNCIONALES ENTRE LA RESISTENCIA DE CÉLULAS DE MIELOMA MÚLTIPLE AL BORTEZOMIB Y LA EXPRESIÓN Y FUNCIÓN DE LA INTEGRINA $\alpha 4\beta 1$

El BTZ constituye uno de los inhibidores del proteasoma más frecuentemente utilizados en el tratamiento del MM. Uno de los problemas clínicos más importantes que surgen con el uso del BTZ y de otros inhibidores del proteasoma (IP) en el MM es la aparición de resistencia, ya sea innata o adquirida (Wallington-Beddoe *et al.*, 2018; Robak *et al.*, 2018a; Gandolfi *et al.*, 2017; Lub *et al.*, 2016). Esta resistencia puede ser debida,

entre otros mecanismos, a la incapacidad del BTZ de unirse al proteasoma a causa de mutaciones en la subunidad $\beta 5$, a la activación constitutiva de NF- κ B, a la implicación del microambiente tumoral en la resistencia, y en determinadas ocasiones, a la sobre-expresión de transportadores de membrana que expulsan los IP (Barrio *et al.*, 2019; Wallington-Beddoe *et al.*, 2018; Iida, 2016; Verbrugge *et al.*, 2012; Kuhn *et al.*, 2012; Kale & Moore, 2012; Franke *et al.*, 2012; Markovina *et al.*, 2008; Rumpold *et al.*, 2007). La caracterización de mecanismos celulares y moleculares, ya sean directos o indirectos, involucrados en la resistencia de células de MM a IP es un área científica muy activa que persigue mejorar los actuales protocolos terapéuticos para frenar la enfermedad. Dada la importancia de la integrina $\alpha 4\beta 1$ en la progresión del MM, nuestro estudio se ha focalizado en determinar posibles relaciones funcionales que puedan existir entre la resistencia de estas células al BTZ y la expresión y función de $\alpha 4\beta 1$.

Como ya se ha mencionado, $\alpha 4\beta 1$ juega un papel fundamental en la localización y retención de las células de MM en la MO a través de su interacción con componentes estromales del microambiente de la MO (Martinez-Moreno *et al.*, 2016; Anderson & Carrasco, 2011; Sanz-Rodriguez *et al.*, 2001; Uchiyama *et al.*, 1993). Asimismo, dicha interacción contribuye a la supervivencia de estas células, y les proporciona una mejor resistencia a los efectos pro-apoptóticos de diferentes agentes quimioterapéuticos tales como el BTZ (Noborio-Hatano *et al.*, 2009; Hideshima *et al.*, 2007; Damiano *et al.*, 1999). En ausencia del estroma, el BTZ causa una reducción en la expresión de $\alpha 4\beta 1$ en las células de MM (Noborio-Hatano *et al.*, 2009), lo cual ha sido confirmado en el presente trabajo. Notablemente, nuestros resultados muestran que la resistencia adquirida tanto a BTZ como a CFZ, en las líneas celulares de MM NCI-H929 y RPMI-8226, se traduce no sólo en una recuperación de la expresión de $\alpha 4\beta 1$, sino que las células resistentes presentan niveles superiores de expresión y función de esta integrina que las células parentales. Esto ya había sido observado con anterioridad en modelos celulares de MM resistentes a doxorubicina y *melfalan* (Damiano *et al.*, 1999). Por el contrario, dos líneas celulares resistentes a BTZ que representan modelos de T-ALL y linfoma del manto no presentaron alteraciones significativas en la expresión y función de $\alpha 4\beta 1$, lo que sugiere que el aumento de expresión de $\alpha 4\beta 1$ en células de MM resistentes a BTZ no parece ser extensible a otras neoplasias hematológicas.

El incremento de expresión de $\alpha 4$ en las líneas celulares de MM resistentes a BTZ se basa, como mínimo, en una regulación transcripcional, ya que ambas expresan niveles más elevados de mRNA para *ITGA4* que las células parentales. Sin embargo, no podemos excluir eventos post-transcripcionales que contribuyan asimismo al aumento de expresión proteica de $\alpha 4$. Mientras que la mayor expresión de la subunidad $\beta 1$ a nivel de proteína fue observada en ambas líneas celulares resistentes, el incremento de los niveles de mRNA para *ITGB1* fue sólo detectado en las células NCI-H929-R20 pero no en las células RPMI-8226-R7 o RPMI-8226-R100, sugiriendo distintos mecanismos implicados en el aumento de $\beta 1$. Notablemente, las células RPMI-8226 resistentes a BTZ mostraron que un aumento en la estabilidad de $\beta 1$ representa uno de los mecanismos implicados en el incremento de su expresión. Observamos asimismo que la expresión de la subunidad $\alpha 5$ de las integrinas $\beta 1$ resultó aumentada en la membrana de las células NCI-H929-R20. La base molecular de la mayor expresión de $\alpha 5$ en las células resistentes, así como las

consecuencias de este incremento de expresión en adhesión a fibronectina, el ligando de $\alpha 5\beta 1$, no han sido estudiadas en el presente trabajo.

El incremento en la expresión de $\alpha 4\beta 1$ en la membrana de las células de MM resistentes a BTZ correlacionó con un mayor nivel de adhesión de estas células a los ligandos de esta integrina que las células parentales. Asimismo, la mayor expresión de CXCR4 en las células RPMI-8226-R7 probablemente contribuyó, no sólo a su adhesión *in vitro* a VCAM-1 y CS-1/FN inmovilizados en presencia de CXCL12, sino también al incremento en su infiltración dependiente de $\alpha 4\beta 1$ y de CXCL12 en la MO de ratones NSG, en comparación con las células parentales. Adicionalmente, el aumento en la infiltración de las células RPMI-8226-R7 en la MO causó una notable progresión del MM. Por otro lado, el mayor volumen y peso de los tumores subcutáneos desarrollados por las células NCI-H929-R20 en presencia de BTZ, en comparación con los tumores parentales podría deberse, entre otros mecanismos, al aumento en la expresión de $\alpha 4\beta 1$ que facilitara la adhesión de las células resistentes al microambiente tumoral, resistiendo mejor la acción del BTZ.

Nuestros estudios *in silico* revelaron que el promotor de *ITGA4* presenta sitios de unión, entre otros, para NF- κ B1 y FOXO3a. Uno de los mecanismos implicados en la resistencia de las células de MM al BTZ es la activación de la vía NF- κ B (Park *et al.*, 2014; Markovina *et al.*, 2008). Notablemente, las células NCI-H929-R20 mostraron una sobre-activación de la vía NF- κ B, dado que presentaban un aumento de fosforilación de I κ B y de NF- κ B (p65), y el silenciamiento de NF- κ B1 se tradujo en una reducción de la expresión de *ITGA4* y en una moderada disminución de la adhesión mediada por $\alpha 4\beta 1$. Asimismo, FOXO3a mostró una implicación en el aumento de expresión de *ITGA4* y en la adhesión dependiente de dicha integrina. Estudios futuros tendrán que confirmar la implicación directa de NF- κ B y de FOXO3a sobre la regulación transcripcional de *ITGA4*, así como analizar el posible papel de otros factores de transcripción en el aumento de expresión de *ITGA4* en las células resistentes a BTZ.

En conjunto, todos estos datos sugieren el modelo expuesto en la **Figura 92**. El aumento de expresión de $\alpha 4\beta 1$ en las células de MM resistentes a BTZ les proporcionaría una ventaja selectiva de retención y supervivencia al inhibidor en la MO, lo que se traduciría en una recaída y en la recuperación de la progresión de la enfermedad.

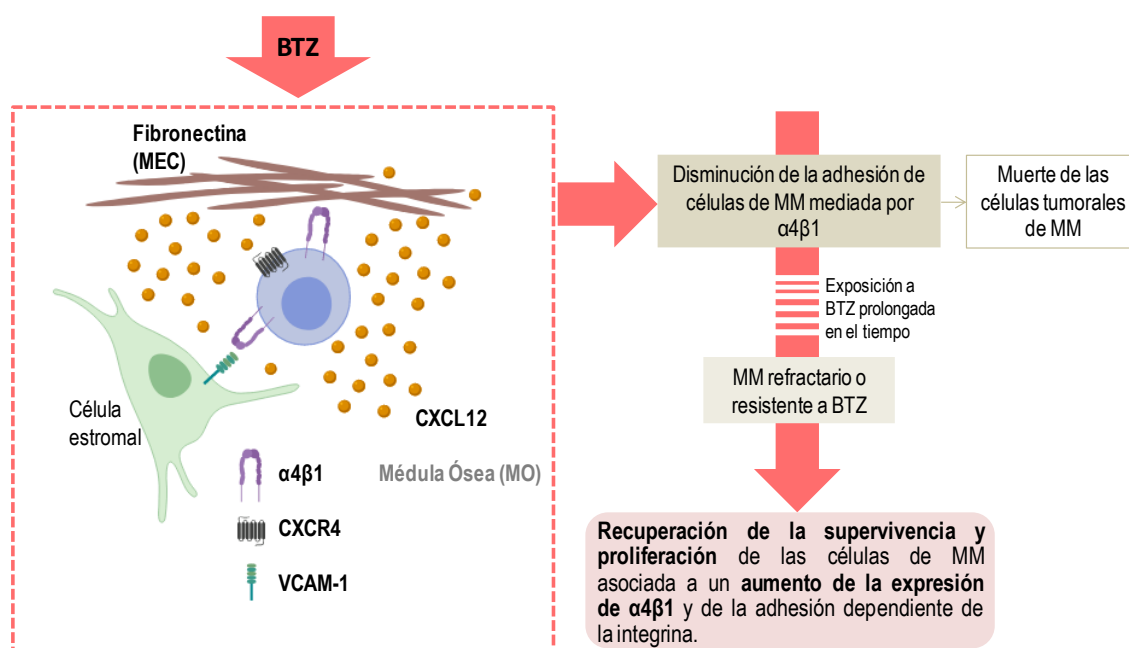


Figura 92. Modelo de la contribución de $\alpha 4\beta 1$ a la resistencia a BTZ de células de MM. El tratamiento de las células de MM con BTZ causa una disminución de la expresión de $\alpha 4\beta 1$, lo que conlleva una reducción de la adhesión de estas células al microambiente medular. Consecuentemente, esto afecta a las señales de supervivencia y proliferación que reciben estas células, inhibiéndose el crecimiento tumoral. La aparición de resistencia de las células de MM al BTZ se traduce en un aumento de la expresión de $\alpha 4\beta 1$ y de la adhesión mediada por esta integrina, recuperándose las señales que promueven la supervivencia y la proliferación celular.

El aumento de expresión y función de $\alpha 4\beta 1$ en las células de MM resistentes a BTZ contribuye globalmente a la resistencia, pero no sería en sí mismo el mecanismo responsable de esta resistencia. Desconocemos por el momento la base molecular de la resistencia de las células NCI-H929-R20 a BTZ. Uno de los posibles mecanismos podría estar relacionado con el aumento de activación de la vía NF- κ B. Sin embargo, el silenciamiento de NF- κ B (p65) no afectó significativamente la viabilidad de las células resistentes, sugiriendo que la activación de esta vía no sería un mecanismo importante en la resistencia a BTZ. Otro posible mecanismo responsable de la resistencia de estas células podría proceder de una reducción en la unión del BTZ a la subunidad $\beta 5$ del proteasoma (Barrio *et al.*, 2019; Iida, 2016; Franke *et al.*, 2012). Dado que el BTZ causa una notable acumulación de complejos ubiquitinados en las células NCI-H929-R20, esta observación indica que el inhibidor es capaz de unirse al proteasoma e inhibir su función, un resultado en línea con la ausencia de mutaciones en dicha subunidad del proteasoma que hemos observado en estas células. Otro dato relevante es la supervivencia de las células NCI-H929-R20 en presencia de BTZ a pesar de la acumulación de proteínas ubiquitinadas. Esta observación sugiere que estas células tienen probablemente la capacidad de superar la *unfolded protein response* inducida por el BTZ, evitando la muerte celular. Nuestros resultados estarían de acuerdo con datos previos obtenidos con células de MM adaptadas a crecer en presencia de BTZ (Soriano *et al.*, 2016). La posible implicación de transportadores de membrana que promovieran la expulsión del BTZ de las

células NCI-H929-R20, evitando de este modo su acción sobre el proteasoma, fue asimismo descartada como mecanismo implicado en la resistencia mediante la utilización de verapamilo, un agente bloqueante de canales de calcio. Tendremos que realizar experimentos adicionales que nos permitan identificar la maquinaria implicada en la resistencia de estas células.

En cuanto a la resistencia a BTZ de las células RPMI-8226-R7, estudios iniciales demostraron que dichas células poseen una mutación en la subunidad $\beta 5$ del proteasoma que inhibe la unión del BTZ (Franke *et al.*, 2012), lo cual probablemente sea la causa principal de la resistencia. Nuestro estudio ha confirmado que dichas células no acumulan proteínas ubiquitinadas tras el tratamiento con BTZ. Un mecanismo adicional, aunque minoritario, que pudiera contribuir a la resistencia en estas células es la actividad de transportadores de membrana que expulsara al inhibidor, dada nuestra observación de que el tratamiento con verapamilo y BTZ inducía una reducción parcial del grado de resistencia de las células RPMI-8226-R7. Otro posible mecanismo de la resistencia de estas células a BTZ podría estar basado en el aumento de expresión de IGF-1R relativo a las células parentales, lo cual se ha asociado previamente a resistencia a este inhibidor en células de MM (Kuhn *et al.*, 2012).

Los resultados de este trabajo mejorarán nuestro conocimiento de los mecanismos moleculares que contribuyen a las respuestas de resistencia de las células de MM a inhibidores del proteasoma, y pueden facilitar el diseño de nuevas terapias que impidan la recaída de los pacientes con MM.

CONCLUSIONES

1. Los ratones deficientes en ICAP-1 muestran una alteración de la selección positiva en timo que causa una reducción específica de timocitos CD8⁺, indicando que ICAP-1 está implicada en el desarrollo de células CD8⁺.
2. La reducción en los niveles de timocitos CD8⁺ en ratones ICAP-1^{-/-} correlaciona con una distribución preferencial nuclear de ICAP-1 en células de timo, y es independiente de variaciones en la adhesión de timocitos mediada por $\alpha 4\beta 1$.
3. La reducción en la expresión de Runx3 en ratones ICAP-1^{-/-} sugiere una implicación de ICAP-1 en la regulación de la expresión de Runx3, y abre la posibilidad de que dicha reducción pudiera contribuir a la disminución de timocitos CD8⁺.
4. Las células T y B de bazos de ratones ICAP-1^{-/-} presentan mayor activación de integrinas $\beta 1$ y adhesión a ligandos de $\alpha 4\beta 1$ que las células control, indicando que ICAP-1 regula negativamente la adhesión dependiente de $\alpha 4\beta 1$ en estas células.
5. La falta de ICAP-1 se traduce en una disminución de células B en la zona marginal del bazo, y en un aumento de células B foliculares. Los resultados abren la posibilidad de que la localización de células B en el bazo durante su maduración pudiera estar regulada por ICAP-1.
6. Las células de mieloma resistentes a bortezomib muestran un aumento de expresión de $\alpha 4\beta 1$ en comparación con las células parentales, lo que se traduce en mayor adhesión a ligandos de esta integrina.
7. El incremento de expresión y función de $\alpha 4\beta 1$ en las células de mieloma resistentes a bortezomib se traduce en un aumento en la infiltración en médula ósea y progresión de la enfermedad, así como en mayor crecimiento de plasmacitomas.
8. NF- κ B y FOXO3a están parcialmente implicados en el aumento de expresión de $\alpha 4\beta 1$ en células de mieloma resistentes a bortezomib.

BIBLIOGRAFÍA

A

- Abbas A. K., Lichtman A., Pillai S. (2014) *Cellular and Molecular Immunology*. 8 ed.
- Adams J. (2004). The development of proteasome inhibitors as anticancer drugs. *Cancer Cell*, 5 (5): 417-421.
- Adams J. (2001). Proteasome inhibition in cancer: development of PS-341. *Seminars in oncology*, 28 (6): 613-619.
- Adams J., Palombella V. J., Sausville E. A., Johnson J., Destree A., Lazarus D. D., Maas J., Pien C. S., Prakash S., Elliott P. J. (1999). Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer research*, 59 (11): 2615-2622.
- Alanko J., Mai A., Jacquemet G., Schauer K., Kaukonen R., Saari M., Goud B., Ivaska J. (2015). Integrin endosomal signalling suppresses anoikis. *Nature Cell Biology*, 17 (11): 1412-1421.
- Alon R. (2010). Chemokine arrest signals to leukocyte integrins trigger bi-directional-occupancy of individual heterodimers by extracellular and cytoplasmic ligands. *Cell adhesion & migration*, 4 (2): 211-214.
- Alon R., Dustin M. L. (2007). Force as a facilitator of integrin conformational changes during leukocyte arrest on blood vessels and antigen-presenting cells. *Immunity*, 26 (1): 17-27.
- Alon R., Feigelson S. W. (2012). Chemokine-triggered leukocyte arrest: force-regulated bi-directional integrin activation in quantal adhesive contacts. *Current opinion in cell biology*, 24 (5): 670-676.
- Alon R., Ley K. (2008). Cells on the run: shear-regulated integrin activation in leukocyte rolling and arrest on endothelial cells. *Current opinion in cell biology*, 20 (5): 525-532.
- Allen S. J., Crown S. E., Handel T. M. (2007). Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annual review of immunology*, 25: 787-820.
- Amara A., Lorthioir O., Valenzuela A., Magerus A., Thelen M., Montes M., Virelizier J. L., Delepiepierre M., Baleux F., Lortat-Jacob H., *et al.* (1999). Stromal cell-derived factor-1alpha associates with heparan sulfates through the first beta-strand of the chemokine. *The Journal of biological chemistry*, 274 (34): 23916-23925.
- Amin M. L. (2013). P-glycoprotein inhibition for optimal drug delivery. *Drug target insights*, 7: 27-34.
- Anderson K. C., Carrasco R. D. (2011). Pathogenesis of myeloma. *Annual review of pathology*, 6: 249-274.
- Annunziata C. M., Davis R. E., Demchenko Y., Bellamy W., Gabrea A., Zhan F., Lenz G., Hanamura I., Wright G., Xiao W., *et al.* (2007). Frequent engagement of the classical and alternative NF-kappaB pathways by diverse genetic abnormalities in multiple myeloma. *Cancer Cell*, 12 (2): 115-130.
- Anthis N. J., Wegener K. L., Ye F., Kim C., Goult B. T., Lowe E. D., Vakonakis I., Bate N., Critchley D. R., Ginsberg M. H., *et al.* (2009). The structure of an integrin/talin complex reveals the basis of inside-out signal transduction. *The EMBO journal*, 28 (22): 3623-3632.
- Ara T., Tokoyoda K., Sugiyama T., Egawa T., Kawabata K., Nagasawa T. (2003). Long-term hematopoietic stem cells require stromal cell-derived factor-1 for colonizing bone marrow during ontogeny. *Immunity*, 19 (2): 257-267.
- Arendt C. S., Hochstrasser M. (1997). Identification of the yeast 20S proteasome catalytic centers and subunit interactions required for active-site formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94 (14): 7156-7161.
- Arnon T. I., Horton R. M., Grigorova I. L., Cyster J. G. (2013). Visualization of splenic marginal zone B-cell shuttling and follicular B-cell egress. *Nature*, 493 (7434): 684-688.

- Arroyo A. G., Taverna D., Whittaker C. A., Strauch U. G., Bader B. L., Rayburn H., Crowley D., Parker C. M., Hynes R. O. (2000). In vivo roles of integrins during leukocyte development and traffic: insights from the analysis of mice chimeric for alpha 5, alpha v, and alpha 4 integrins. *Journal of immunology*, 165 (8): 4667-4675.
- Arroyo A. G., Yang J. T., Rayburn H., Hynes R. O. (1996). Differential requirements for alpha4 integrins during fetal and adult hematopoiesis. *Cell*, 85 (7): 997-1008.
- Atanackovic D., Radhakrishnan S. V., Bhardwaj N., Luetkens T. (2016). Chimeric Antigen Receptor (CAR) therapy for multiple myeloma. *British Journal of Haematology*, 172 (5): 685-698.

B

- Balkwill F. (2004). The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4. *Seminars in cancer biology*, 14 (3): 171-179.
- Balsas P., Galán-Malo P., Marzo I., Naval J. (2012). Bortezomib resistance in a myeloma cell line is associated to PSM β 5 overexpression and polyploidy. *Leukemia Research*, 36 (2): 212-218.
- Banno A., Goult B. T., Lee H., Bate N., Critchley D. R., Ginsberg M. H. (2012). Subcellular localization of talin is regulated by inter-domain interactions. *The Journal of biological chemistry*, 287 (17): 13799-13812.
- Baron J. L., Madri J. A., Ruddle N. H., Hashim G., Janeway C. A., Jr. (1993). Surface expression of alpha 4 integrin by CD4 T cells is required for their entry into brain parenchyma. *The Journal of experimental medicine*, 177 (1): 57-68.
- Barrio S., Stuhmer T., Da-Via M., Barrio-Garcia C., Lehnert N., Besse A., Cuenca I., Garitano-Trojaola A., Fink S., Leich E., et al. (2019). Spectrum and functional validation of PSMB5 mutations in multiple myeloma. *Leukemia*, 33 (2): 447-456.
- Barrow-McGee R., Kishi N., Joffre C. (2016). Beta 1-integrin-c-Met cooperation reveals an inside-in survival signalling on autophagy-related endomembranes. *Nature Communications*, 7.
- Bartolome R. A., Galvez B. G., Longo N., Baleux F., Van Muijen G. N., Sanchez-Mateos P., Arroyo A. G., Teixidó J. (2004). Stromal cell-derived factor-1alpha promotes melanoma cell invasion across basement membranes involving stimulation of membrane-type 1 matrix metalloproteinase and Rho GTPase activities. *Cancer research*, 64 (7): 2534-2543.
- Bataille R., Robillard N., Avet-Loiseau H., Harousseau J., Moreau P. (2005). CD221 (IGF-1R) is aberrantly expressed in multiple myeloma, in relation to disease severity. *Haematologica*, 90 (5): 706-707.
- Batista F. D., Arana E., Barral P., Carrasco Y. R., Depoil D., Eckl-Dorna J., Fleire S., Howe K., Vehlow A., Weber M., et al. (2007). The role of integrins and coreceptors in refining thresholds for B-cell responses. *Immunological reviews*, 218: 197-213.
- Bednarczyk J. L., McIntyre B. W. (1992). Expression and ligand-binding function of the integrin alpha 4 beta 1 (VLA-4) on neural-crest-derived tumor cell lines. *Clinical & experimental metastasis*, 10 (4): 281-290.
- Belperio J. A., Keane M. P., Arenberg D. A., Addison C. L., Ehlert J. E., Burdick M. D., Strieter R. M. (2000). CXC chemokines in angiogenesis. *Journal of leukocyte biology*, 68 (1): 1-8.
- Ben-Neriah Y., Karin M. (2011). Inflammation meets cancer, with NF-kappaB as the matchmaker. *Nature immunology*, 12 (8): 715-723.

- Berkowitz R. D., Beckerman K. P., Schall T. J., McCune J. M. (1998). CXCR4 and CCR5 expression delineates targets for HIV-1 disruption of T cell differentiation. *Journal of immunology*, 161 (7): 3702-3710.
- Berlin-Rufenach C., Otto F., Mathies M., Westermann J., Owen M. J., Hamann A., Hogg N. (1999). Lymphocyte migration in lymphocyte function-associated antigen (LFA)-1-deficient mice. *The Journal of experimental medicine*, 189 (9): 1467-1478.
- Bernhagen J., Krohn R., Lue H., Gregory J. L., Zernecke A., Koenen R. R., Dewor M., Georgiev I., Schober A., Leng L., *et al.* (2007). MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. *Nature medicine*, 13 (5): 587-596.
- Bertaina A., Vinti L., Strocchio L., Gaspari S., Caruso R., Algeri M., Coletti V., Gurnari C., Romano M., Cefalo M. G., *et al.* (2017). The combination of bortezomib with chemotherapy to treat relapsed/refractory acute lymphoblastic leukaemia of childhood. *British journal of haematology*, 176 (4): 629-636.
- Bialkowska K., Ma Y. Q., Bledzka K., Sossey-Alaoui K., Izem L., Zhang X., Malinin N., Qin J., Byzova T., Plow E. F. (2010). The integrin co-activator Kindlin-3 is expressed and functional in a non-hematopoietic cell, the endothelial cell. *The Journal of biological chemistry*, 285 (24): 18640-18649.
- Bianchi G., Kumar S., Ghobrial I. M., Roccaro A. M. (2012). Cell trafficking in Multiple Myeloma. *Open journal of hematology*, 3 (Suppl 1): 1-4.
- Bianchi G., Munshi N. C. (2015). Pathogenesis beyond the cancer clone(s) in multiple myeloma. *Blood*, 125 (20): 3049-3058.
- Bleul C. C., Farzan M., Choe H., Parolin C., Clark-Lewis I., Sodroski J., Springer T. A. (1996). The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature*, 382 (6594): 829-833.
- Borset M., Lien E., Espevik T., Helseth E., Waage A., Sundan A. (1996). Concomitant expression of hepatocyte growth factor/scatter factor and the receptor c-MET in human myeloma cell lines. *The Journal of biological chemistry*, 271 (40): 24655-24661.
- Bottcher R. T., Stremmel C., Meves A., Meyer H., Widmaier M., Tseng H. Y., Fassler R. (2012). Sorting nexin 17 prevents lysosomal degradation of beta1 integrins by binding to the beta1-integrin tail. *Nature Cell Biology*, 14 (6): 584-592.
- Bouvard D., Aszodi A., Kostka G., Block M. R., Albiges-Rizo C., Fassler R. (2007). Defective osteoblast function in ICAP-1-deficient mice. *Development*, 134 (14): 2615-2625.
- Bouvard D., Millon-Fremillon A., Dupe-Manet S., Block M. R., Albiges-Rizo C. (2006). Unraveling ICAP-1 function: toward a new direction? *European journal of cell biology*, 85 (3-4): 275-282.
- Bouvard D., Vignoud L., Dupe-Manet S., Abed N., Fournier H. N., Vincent-Monegat C., Retta S. F., Fassler R., Block M. R. (2003). Disruption of focal adhesions by integrin cytoplasmic domain-associated protein-1 alpha. *The Journal of biological chemistry*, 278 (8): 6567-6574.
- Bromberger T., Klapproth S., Rohwedder I., Zhu L., Mittmann L., Reichel C. A., Sperandio M., Qin J., Moser M. (2018). Direct Rap1/Talin1 interaction regulates platelet and neutrophil integrin activity in mice. *Blood*, 132 (26): 2754-2762.
- Bungartz G., Stiller S., Bauer M., Muller W., Schippers A., Wagner N., Fassler R., Brakebusch C. (2006). Adult murine hematopoiesis can proceed without beta1 and beta7 integrins. *Blood*, 108 (6): 1857-1864.
- Butcher E. C., Picker L. J. (1996). Lymphocyte homing and homeostasis. *Science*, 272 (5258): 60-66.

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

C

Cairo C. W., Mirchev R., Golan David E. (2006). Cytoskeletal regulation couples LFA-1 conformational changes to receptor lateral mobility and clustering. *Immunity*, 25 (2): 297-308.

Calderwood D. A., Campbell I. D., Critchley D. R. (2013). Talins and kindlins: partners in integrin-mediated adhesion. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 14 (8): 503-517.

Calderwood D. A., Fujioka Y., de Pereda J. M., Garcia-Alvarez B., Nakamoto T., Margolis B., McGlade C. J., Liddington R. C., Ginsberg M. H. (2003). Integrin beta cytoplasmic domain interactions with phosphotyrosine-binding domains: a structural prototype for diversity in integrin signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100 (5): 2272-2277.

Calderwood D. A., Ginsberg M. H. (2003). Talin forges the links between integrins and actin. *Nature Cell Biology*, 5 (8): 694-697.

Calderwood D. A., Yan B., de Pereda J. M., Alvarez B. G., Fujioka Y., Liddington R. C., Ginsberg M. H. (2002). The phosphotyrosine binding-like domain of talin activates integrins. *The Journal of biological chemistry*, 277 (24): 21749-58.

Calderwood D. A., Zent R., Grant R., Rees D. J., Hynes R. O., Ginsberg M. H. (1999). The Talin head domain binds to integrin beta subunit cytoplasmic tails and regulates integrin activation. *The Journal of biological chemistry*, 274 (40): 28071-28074.

Campbell J. J., Hedrick J., Zlotnik A., Siani M. A., Thompson D. A., Butcher E. C. (1998). Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science*, 279 (5349): 381-384.

Carman C. V., Springer T. A. (2003). Integrin avidity regulation: are changes in affinity and conformation underemphasized? *Current opinion in cell biology*, 15 (5): 547-556.

Carpenter A. C., Bosselut R. (2010). Decision checkpoints in the thymus. *Nature Immunology*, 11 (8): 666-673.

Carramolino L., Zaballos A., Kremer L., Villares R., Martin P., Ardavin C., Martinez A. C., Marquez G. (2001). Expression of CCR9 beta-chemokine receptor is modulated in thymocyte differentiation and is selectively maintained in CD8(+) T cells from secondary lymphoid organs. *Blood*, 97 (4): 850-857.

Carter R. A., O'Donnell K., Sachthep S., Cicuttini F., Boyd A. W., Wicks I. P. (2001). Characterization of a human synovial cell antigen: VCAM-1 and inflammatory arthritis. *Immunology and cell biology*, 79 (5): 419-428.

Castro A., Bono M. R., Simon V., Vargas L., Roseblatt M. (1997). Spleen-derived stromal cells. Adhesion molecules expression and lymphocyte adhesion to reticular cells. *European journal of cell biology*, 74 (4): 321-328.

Ciechanover A. (2015). The unravelling of the ubiquitin system. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 16 (5): 322-324.

Cohen S. J., Gurevich I., Feigelson S. W., Petrovich E., Moser M., Shakhar G., Fassler R., Alon R. (2013). The integrin coactivator Kindlin-3 is not required for lymphocyte diapedesis. *Blood*, 122 (15): 2609-2617.

Collins G. A., Goldberg A. L. (2017). The Logic of the 26S Proteasome. *Cell*, 169 (5): 792-806.

Cooper J., Giancotti F. G. (2019). Integrin signaling in cancer: mechanotransduction, stemness, epithelial plasticity, and therapeutic resistance. *Cancer Cell*, 35 (3): 347-367.

- Critchley D. R. (2009). Biochemical and structural properties of the integrin-associated cytoskeletal protein talin. *Annual review of biophysics*, 38: 235-254.
- Crump M. P., Gong J. H., Loetscher P., Rajarathnam K., Amara A., Arenzana-Seisdedos F., Virelizier J. L., Baggiolini M., Sykes B. D., Clark-Lewis I. (1997). Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1. *The EMBO journal*, 16 (23): 6996-7007.
- Cumano A., Godin I. (2007). Ontogeny of the hematopoietic system. *Annual review of immunology*, 25: 745-785.
- Cusack J. C., Jr., Liu R., Houston M., Abendroth K., Elliott P. J., Adams J., Baldwin A. S., Jr. (2001). Enhanced chemosensitivity to CPT-11 with proteasome inhibitor PS-341: implications for systemic nuclear factor-kappaB inhibition. *Cancer research*, 61 (9): 3535-3540.
- Czuchra A., Meyer H., Legate K. R., Brakebusch C., Fässler R. (2006). Genetic analysis of β 1 integrin "activation motifs" in mice. *The Journal of Cell Biology*, 174 (6): 889-899.
- Chang D. D., Hoang B. Q., Liu J., Springer T. A. (2002). Molecular basis for interaction between Icap1 alpha PTB domain and beta 1 integrin. *The Journal of biological chemistry*, 277 (10): 8140-5.
- Chang D. D., Wong C., Smith H., Liu J. (1997). ICAP-1, a novel beta1 integrin cytoplasmic domain-associated protein, binds to a conserved and functionally important NPXY sequence motif of beta1 integrin. *The Journal of cell biology*, 138 (5): 1149-1157.
- Chang Y.-C., Zhang H., Franco-Barraza J., Brennan M. L., Patel T., Cukierman E., Wu J. (2014). Structural and mechanistic insights into the recruitment of talin by RIAM in integrin signaling. *Structure*, 22 (12): 1810-1820.
- Chapman M. A., Lawrence M. S., Keats J. J., Cibulskis K., Sougnez C., Schinzel A. C., Harview C. L., Brunet J. P., Ahmann G. J., Adli M., et al. (2011). Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. *Nature*, 471 (7339): 467-472.
- Chari A., Mazumder A., Jagannath S. (2010). Proteasome inhibition and its therapeutic potential in multiple myeloma. *Biologics : targets & therapy*, 4: 273-287.
- Chauhan D., Tian Z., Zhou B., Kuhn D., Orłowski R., Raju N., Richardson P., Anderson K. C. (2011). In vitro and in vivo selective antitumor activity of a novel orally bioavailable proteasome inhibitor MLN9708 against multiple myeloma cells. *Clinical cancer research*, 17 (16): 5311-5321.
- Chauhan D., Uchiyama H., Akbarali Y., Urashima M., Yamamoto K., Libermann T. A., Anderson K. C. (1996). Multiple myeloma cell adhesion-induced interleukin-6 expression in bone marrow stromal cells involves activation of NF-kappa B. *Blood*, 87 (3): 1104-1112.
- Chen D., Frezza M., Schmitt S., Kanwar J., Dou Q. P. (2011). Bortezomib as the first proteasome inhibitor anticancer drug: current status and future perspectives. *Current cancer drug targets*, 11 (3): 239-253.
- Chen J. Y., Miyanishi M., Wang S. K., Yamazaki S., Sinha R., Kao K. S., Seita J., Sahoo D., Nakauchi H., Weissman I. L. (2016). Hoxb5 marks long-term haematopoietic stem cells and reveals a homogenous perivascular niche. *Nature*, 530 (7589): 223-227.
- Chong M. M., Cornish A. L., Darwiche R., Stanley E. G., Purton J. F., Godfrey D. I., Hilton D. J., Starr R., Alexander W. S., Kay T. W. (2003). Suppressor of cytokine signaling-1 is a critical regulator of interleukin-7-dependent CD8+ T cell differentiation. *Immunity*, 18 (4): 475-487.

D

- Damiano J. S., Cress A. E., Hazlehurst L. A., Shtil A. A., Dalton W. S. (1999). Cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR): role of integrins and resistance to apoptosis in human myeloma cell lines. *Blood*, 93 (5): 1658-1667.
- Davenport E. L., Moore H. E., Dunlop A. S., Sharp S. Y., Workman P., Morgan G. J., Davies F. E. (2007). Heat shock protein inhibition is associated with activation of the unfolded protein response pathway in myeloma plasma cells. *Blood*, 110 (7): 2641-2649.
- Davies F. E., Dring A. M., Li C., Rawstron A. C., Shamma M. A., O'Connor S. M., Fenton J. A. L., Hideshima T., Chauhan D., Tai I. T., *et al.* (2003). Insights into the multistep transformation of MGUS to myeloma using microarray expression analysis. *Blood*, 102 (13): 4504-4511.
- Degani S., Balzac F., Brancaccio M., Guazzone S., Retta S. F., Silengo L., Eva A., Tarone G. (2002). The integrin cytoplasmic domain-associated protein ICAP-1 binds and regulates Rho family GTPases during cell spreading. *The Journal of cell biology*, 156 (2): 377-387.
- Demchenko Y. N., Glebov O. K., Zingone A., Keats J. J., Bergsagel P. L., Kuehl W. M. (2010). Classical and/or alternative NF-kappaB pathway activation in multiple myeloma. *Blood*, 115 (17): 3541-3552.
- Di Marzo L., Desantis V., Solimando A. G., Ruggieri S., Annese T., Nico B., Fumarulo R., Vacca A., Frassanito M. A. (2016). Microenvironment drug resistance in multiple myeloma: emerging new players. *Oncotarget*, 7 (37): 60698-60711.
- Dimopoulos M. A., Garcia-Sanz R., Gavriatopoulou M., Morel P., Kyrtsolis M. C., Michalis E., Kartasis Z., Leleu X., Palladini G., Tedeschi A., *et al.* (2013). Primary therapy of Waldenstrom macroglobulinemia (WM) with weekly bortezomib, low-dose dexamethasone, and rituximab (BDR): long-term results of a phase 2 study of the European Myeloma Network (EMN). *Blood*, 122 (19): 3276-3282.
- Dong S., Ghobrial I. M. (2019). Autologous graft versus myeloma: it's not a myth. *The Journal of clinical investigation*, 129 (1): 48-50.
- Dong X., Mi L. Z., Zhu J., Wang W., Hu P., Luo B. H., Springer T. A. (2012). alpha(V)beta(3) integrin crystal structures and their functional implications. *Biochemistry*, 51 (44): 8814-8828.
- Draheim K. M., Huet-Calderwood C., Simon B., Calderwood D. A. (2017). Nuclear localization of Integrin Cytoplasmic Domain-associated Protein-1 (ICAP1) influences beta1 integrin activation and recruits Krev/Interaction Trapped-1 (KRIT1) to the nucleus. *Journal of Biological Chemistry*, 292 (5): 1884-1898.

E

- Egawa T., Tillman R. E., Naoe Y., Taniuchi I., Littman D. R. (2007). The role of the Runx transcription factors in thymocyte differentiation and in homeostasis of naive T cells. *The Journal of experimental medicine*, 204 (8): 1945-1957.
- Eijkelenboom A., Burgering B. M. (2013). FOXOs: signalling integrators for homeostasis maintenance. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 14 (2): 83-97.
- Epstein R. J. (2004). The CXCL12-CXCR4 chemotactic pathway as a target of adjuvant breast cancer therapies. *Nature reviews. Cancer*, 4 (11): 901-909.
- Fisher R. I., Bernstein S. H., Kahl B. S., Djulbegovic B., Robertson M. J., de Vos S., Epner E., Krishnan A., Leonard J. P., Lonial S., *et al.* (2006). Multicenter phase II study of bortezomib in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma. *Journal of clinical oncology*, 24 (30): 4867-4874.

F

- Fonseca R., Bergsagel P. L., Drach J., Shaughnessy J., Gutierrez N., Stewart A. K., Morgan G., Van Ness B., Chesi M., Minvielle S., *et al.* (2009). International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia*, 23 (12): 2210-2221.
- Fournier H. N., Dupe-Manet S., Bouvard D., Luton F., Degani S., Block M. R., Retta S. F., Albiges-Rizo C. (2005). Nuclear translocation of integrin cytoplasmic domain-associated protein 1 stimulates cellular proliferation. *Molecular biology of the cell*, 16 (4): 1859-1871.
- Franke N. E., Niewerth D., Assaraf Y. G., van Meerloo J., Vojtekova K., van Zantwijk C. H., Zweegman S., Chan E. T., Kirk C. J., Geerke D. P., *et al.* (2012). Impaired bortezomib binding to mutant beta5 subunit of the proteasome is the underlying basis for bortezomib resistance in leukemia cells. *Leukemia*, 26 (4): 757-768.
- Frankland-Searby S., Bhaumik S. R. (2012). The 26S proteasome complex: an attractive target for cancer therapy. *Biochimica et biophysica acta*, 1825 (1): 64-76.

G

- Gandolfi S., Laubach J. P., Hideshima T., Chauhan D., Anderson K. C., Richardson P. G. (2017). The proteasome and proteasome inhibitors in multiple myeloma. *Cancer Metastasis Rev*, 36 (4): 561-584.
- Garcia-Alvarez B., de Pereda J. M., Calderwood D. A., Ulmer T. S., Critchley D., Campbell I. D., Ginsberg M. H., Liddington R. C. (2003). Structural determinants of integrin recognition by talin. *Molecular cell*, 11 (1): 49-58.
- García-Bernal D., Pardo-Cabañas M., Dios-Esponera A., Samaniego R., Hernán-P de la Ossa D., Teixidó J. (2009). Chemokine-induced Zap70 kinase-mediated dissociation of the Vav1-talin complex activates alpha4beta1 integrin for T cell adhesion. *Immunity*, 31 (6): 953-964.
- Garcia-Bernal D., Redondo-Munoz J., Dios-Esponera A., Chevre R., Bailon E., Garayoa M., Arellano-Sanchez N., Gutierrez N. C., Hidalgo A., Garcia-Pardo A., *et al.* (2013). Sphingosine-1-phosphate activates chemokine-promoted myeloma cell adhesion and migration involving alpha4beta1 integrin function. *The Journal of pathology*, 229 (1): 36-48.
- Garcia-Bernal D., Wright N., Sotillo-Mallo E., Nombela-Arrieta C., Stein J. V., Bustelo X. R., Teixidó J. (2005). Vav1 and Rac control chemokine-promoted T lymphocyte adhesion mediated by the integrin alpha4beta1. *Molecular biology of the cell*, 16 (7): 3223-3235.
- Garcia-Pardo A., Ferreira O. C. (1990). Adhesion of human T-lymphoid cells to fibronectin is mediated by two different fibronectin domains. *Immunology*, 69 (1): 121-126.
- Garderet L., Iacobelli S., Moreau P., Dib M., Lafon I., Niederwieser D., Masszi T., Fontan J., Michallet M., Gratwohl A., *et al.* (2012). Superiority of the triple combination of bortezomib-thalidomide-dexamethasone over the dual combination of thalidomide-dexamethasone in patients with multiple myeloma progressing or relapsing after autologous transplantation: the MMVAR/IFM 2005-04 Randomized Phase III Trial from the Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Journal of clinical oncology*, 30 (20): 2475-2482.
- Gascoigne N. R., Palmer E. (2011). Signaling in thymic selection. *Current opinion in immunology*, 23 (2): 207-212.

- Gazdar A. F., Oie H. K., Kirsch I. R., Hollis G. F. (1986). Establishment and characterization of a human plasma cell myeloma culture having a rearranged cellular myc proto-oncogene. *Blood*, 67 (6): 1542-1549.
- Ge N. L., Rudikoff S. (2000). Insulin-like growth factor I is a dual effector of multiple myeloma cell growth. *Blood*, 96 (8): 2856-2861.
- Georgii-Hemming P., Wiklund H., Ljunggren O., Nilsson K. (1996). Insulin-like growth factor I is a growth and survival factor in human multiple myeloma cell lines. *Blood*, 88 (6): 2250-2258.
- Gerard C., Rollins B. J. (2001). Chemokines and disease. *Nature immunology*, 2 (2): 108-115.
- Ghobrial I. M. (2012). Myeloma as a model for the process of metastasis: implications for therapy. *Blood*, 120 (1): 20-30.
- Giancotti F. G., Ruoslahti E. (1999). Integrin signaling. *Science*, 285 (5430): 1028-1032.
- Gingras A. R., Bate N., Goult B. T., Hazelwood L., Canestrelli I., Grossmann J. G., Liu H., Putz N. S. M., Roberts G. C. K., Volkmann N., *et al.* (2008). The structure of the C-terminal actin-binding domain of talin. *The EMBO journal*, 27 (2): 458-469.
- Ginsberg M. H., Partridge A., Shattil S. J. (2005). Integrin regulation. *Current opinion in cell biology*, 17 (5): 509-516.
- Goksoy E., Ma Y. Q., Wang X., Kong X., Perera D., Plow E. F., Qin J. (2008). Structural basis for the autoinhibition of talin in regulating integrin activation. *Molecular cell*, 31 (1): 124-133.
- Grabovsky V., Feigelson S., Chen C., Bleijs D. A., Peled A., Cinamon G., Baleux F., Arenzana-Seisdedos F., Lapidot T., van Kooyk Y., *et al.* (2000). Subsecond induction of alpha4 integrin clustering by immobilized chemokines stimulates leukocyte tethering and rolling on endothelial vascular cell adhesion molecule 1 under flow conditions. *The Journal of experimental medicine*, 192 (4): 495-506.
- Graham G. J., Locati M., Mantovani A., Rot A., Thelen M. (2012). The biochemistry and biology of the atypical chemokine receptors. *Immunology letters*, 145 (1-2): 30-38.
- Gribi R., Hook L., Ure J., Medvinsky A. (2006). The differentiation program of embryonic definitive hematopoietic stem cells is largely alpha4 integrin independent. *Blood*, 108 (2): 501-509.
- Griffith J. W., Sokol C. L., Luster A. D. (2014). Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annual review of immunology*, 32: 659-702.
- Guan J. L., Hynes R. O. (1990). Lymphoid cells recognize an alternatively spliced segment of fibronectin via the integrin receptor alpha 4 beta 1. *Cell*, 60 (1): 53-61.
- Gupta S. K., Lysko P. G., Pillarisetti K., Ohlstein E., Stadel J. M. (1998). Chemokine receptors in human endothelial cells. Functional expression of CXCR4 and its transcriptional regulation by inflammatory cytokines. *The Journal of biological chemistry*, 273 (7): 4282-4287.
- Gupta V. A., Matulis S. M., Conage-Pough J. E., Nooka A. K., Kaufman J. L., Lonial S., Boise L. H. (2017). Bone marrow microenvironment-derived signals induce Mcl-1 dependence in multiple myeloma. *Blood*, 129 (14): 1969-1979.
- Gurtner G. C., Davis V., Li H., McCoy M. J., Sharpe A., Cybulsky M. I. (1995). Targeted disruption of the murine VCAM1 gene: essential role of VCAM-1 in chorioallantoic fusion and placentation. *Genes & development*, 9 (1): 1-14.
- Gutiérrez-González A., Martínez-Moreno M., Samaniego R., Arellano-Sánchez N., Salinas-Muñoz L., Relloso M., Valeri A., Martínez-López J., Corbí Á. L., Hidalgo A., *et al.* (2016). Evaluation of the potential therapeutic benefits of macrophage reprogramming in multiple myeloma. *Blood*, 128 (8): 2241-2252.

H

- Halkias J., Melichar H. J., Taylor K. T., Ross J. O., Yen B., Cooper S. B., Winoto A., Robey E. A. (2013). Opposing chemokine gradients control human thymocyte migration in situ. *The Journal of Clinical Investigation*, 123 (5): 2131-2142.
- Hamidi H., Ivaska J. (2018). Every step of the way: integrins in cancer progression and metastasis. *Nature Reviews. Cancer*, 18 (9): 533-548.
- Hardy R. R., Hayakawa K. (2001). B Cell Development Pathways. *Annual Review of Immunology*, 19 (1): 595-621.
- Hare K. J., Jenkinson E. J., Anderson G. (1999). CD69 expression discriminates MHC-dependent and -independent stages of thymocyte positive selection. *Journal of immunology*, 162 (7): 3978-3983.
- Hartmann T. N., Grabovsky V., Wang W., Desch P., Rubenzer G., Wollner S., Binsky I., Vallon-Eberhard A., Sapoznikov A., Burger M., et al. (2009). Circulating B-cell chronic lymphocytic leukemia cells display impaired migration to lymph nodes and bone marrow. *Cancer research*, 69 (7): 3121-3130.
- Hazlehurst L. A., Damiano J. S., Buyuksal I., Pledger W. J., Dalton W. S. (2000). Adhesion to fibronectin via beta1 integrins regulates p27kip1 levels and contributes to cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR). *Oncogene*, 19 (38): 4319-4327.
- He X., He X., Dave V. P., Zhang Y., Hua X., Nicolas E., Xu W., Roe B. A., Kappes D. J. (2005). The zinc finger transcription factor Th-POK regulates CD4 versus CD8 T-cell lineage commitment. *Nature*, 433 (7028): 826-833.
- Hershko A., Ciechanover A. (1998). The ubiquitin system. *Annual review of biochemistry*, 67: 425-479.
- Hetz C., Chevet E., Harding H. P. (2013). Targeting the unfolded protein response in disease. *Nature reviews. Drug discovery*, 12 (9): 703-719.
- Hidalgo A., Sanz-Rodriguez F., Rodriguez-Fernandez J. L., Albella B., Blaya C., Wright N., Cabanas C., Prosper F., Gutierrez-Ramos J. C., Teixidó J. (2001). Chemokine stromal cell-derived factor-1alpha modulates VLA-4 integrin-dependent adhesion to fibronectin and VCAM-1 on bone marrow hematopoietic progenitor cells. *Experimental hematology*, 29 (3): 345-355.
- Hideshima T., Ikeda H., Chauhan D., Okawa Y., Raje N., Podar K., Mitsiades C., Munshi N. C., Richardson P. G., Carrasco R. D., et al. (2009). Bortezomib induces canonical nuclear factor-kappaB activation in multiple myeloma cells. *Blood*, 114 (5): 1046-1052.
- Hideshima T., Mitsiades C., Tonon G., Richardson P. G., Anderson K. C. (2007). Understanding multiple myeloma pathogenesis in the bone marrow to identify new therapeutic targets. *Nature reviews. Cancer*, 7 (8): 585-598.
- Hideshima T., Richardson P., Anderson K. C. (2003). Novel therapeutic approaches for multiple myeloma. *Immunological Reviews*, 194 (1): 164-176.
- Hideshima T., Richardson P., Chauhan D., Palombella V. J., Elliott P. J., Adams J., Anderson K. C. (2001). The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer research*, 61 (7): 3071-3076.
- Hoggatt J., Kfoury Y., Scadden D. T. (2016). Hematopoietic Stem Cell Niche in Health and Disease. *Annual review of pathology*, 11: 555-581.
- Hoyos V., Borrello I. (2016). The immunotherapy era of myeloma: monoclonal antibodies, vaccines, and adoptive T-cell therapies. *Blood*, 128 (13): 1679-1687.
- Hu Z., Lancaster J. N., Sasiponganan C., Ehrlich L. (2015). CCR4 promotes medullary entry and thymocyte-dendritic cell interactions required for central tolerance. *The Journal of experimental medicine*, 212 (11): 1947-1965.

- Hunger S. P., Mullighan C. G. (2015). Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *New England Journal of Medicine*, 373 (16): 1541-1552.
- Hynes R. O. (2002). Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. *Cell*, 110 (6): 673-687.

I

- Iacobucci I., Mullighan C. G. (2017). Genetic basis of Acute Lymphoblastic Leukemia. *Journal of clinical oncology*, 35 (9): 975-983.
- Iida S. (2016). Mechanisms of action and resistance for multiple myeloma novel drug treatments. *International Journal of Hematology*, 104 (3): 271-272.
- Iiyama K., Hajra L., Iiyama M., Li H., DiChiara M., Medoff B. D., Cybulsky M. I. (1999). Patterns of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression in rabbit and mouse atherosclerotic lesions and at sites predisposed to lesion formation. *Circulation research*, 85 (2): 199-207.
- Imai Y., Park E. J., Peer D., Peixoto A., Cheng G., von Andrian U. H., Carman C. V., Shimaoka M. (2008). Genetic perturbation of the putative cytoplasmic membrane-proximal salt bridge aberrantly activates $\alpha 4$ integrins. *Blood*, 112 (13): 5007-5015.
- Inaba H., Greaves M., Mullighan C. G. (2013). Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*, 381 (9881): 1943-1955.
- Inobe T., Matouschek A. (2014). Paradigms of protein degradation by the proteasome. *Current opinion in structural biology*, 24: 156-164.
- Iwakoshi N. N., Lee A. H., Vallabhajosyula P., Otipoby K. L., Rajewsky K., Glimcher L. H. (2003). Plasma cell differentiation and the unfolded protein response intersect at the transcription factor XBP-1. *Nature immunology*, 4 (4): 321-329.
- Iwasaki A., Medzhitov R. (2015). Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nature immunology*, 16 (4): 343-353.

J

- Jacobsen K., Kravitz J., Kincade P. W., Osmond D. G. (1996). Adhesion receptors on bone marrow stromal cells: in vivo expression of vascular cell adhesion molecule-1 by reticular cells and sinusoidal endothelium in normal and gamma-irradiated mice. *Blood*, 87 (1): 73-82.
- Johnston B., Butcher E. C. (2002). Chemokines in rapid leukocyte adhesion triggering and migration. *Seminars in immunology*, 14 (2): 83-92.
- Julia Marinissen M., Gutkind J. S. (2001). G protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends in pharmacological sciences*, 22: 368-376.

K

- Kale A. J., Moore B. S. (2012). Molecular mechanisms of acquired proteasome inhibitor resistance. *Journal of medicinal chemistry*, 55 (23): 10317-10327.
- Kawabata K., Ujikawa M., Egawa T., Kawamoto H., Tachibana K., Iizasa H., Katsura Y., Kishimoto T., Nagasawa T. (1999). A cell-autonomous requirement for CXCR4 in long-term lymphoid and myeloid reconstitution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96 (10): 5663-5667.

- Kawano Y., Moschetta M., Manier S., Glavey S., Gorgun G. T., Roccaro A. M., Anderson K. C., Ghobrial I. M. (2015). Targeting the bone marrow microenvironment in multiple myeloma. *Immunological reviews*, 263 (1): 160-172.
- Keats J. J., Fonseca R., Chesi M., Schop R., Baker A., Chng W. J., Van Wier S., Tiedemann R., Shi C. X., Sebag M., *et al.* (2007). Promiscuous mutations activate the noncanonical NF-kappaB pathway in multiple myeloma. *Cancer Cell*, 12 (2): 131-144.
- Kiel M. J., Yilmaz O. H., Iwashita T., Yilmaz O. H., Terhorst C., Morrison S. J. (2005). SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell*, 121 (7): 1109-1121.
- Kim C., Ye F., Hu X., Ginsberg M. H. (2012). Talin activates integrins by altering the topology of the β transmembrane domain. *The Journal of Cell Biology*, 197 (5): 605-611.
- Kim I., He S., Yilmaz O. H., Kiel M. J., Morrison S. J. (2006). Enhanced purification of fetal liver hematopoietic stem cells using SLAM family receptors. *Blood*, 108 (2): 737-744.
- Kim J., Sherman N. E., Fox J. W., Ginsberg M. H. (2011). Phosphorylation sites in the cerebral cavernous malformations complex. *Journal of Cell Science*, 124 (23): 3929-3932.
- Kinashi T. (2007). Integrin regulation of lymphocyte trafficking: lessons from structural and signaling studies. *Advances in Immunology*, 93: 185-227.
- Kinashi T. (2005). Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes. *Nature reviews. Immunology*, 5 (7): 546-559.
- Kirby M. L., Hutson M. R. (2010). Factors controlling cardiac neural crest cell migration. *Cell adhesion & migration*, 4 (4): 609-621.
- Klapholz B., Brown N. H. (2017). Talin - the master of integrin adhesions. *Journal of cell science*, 130 (15): 2435-2446.
- Klapproth S., Sperandio M., Pinheiro E. M., Prunster M., Soehnlein O., Gertler F. B., Fassler R., Moser M. (2015). Loss of the Rap1 effector RIAM results in leukocyte adhesion deficiency due to impaired beta2 integrin function in mice. *Blood*, 126 (25): 2704-2712.
- Klemke M., Weschenfelder T., Konstandin M. H., Samstag Y. (2007). High affinity interaction of integrin alpha4beta1 (VLA-4) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) enhances migration of human melanoma cells across activated endothelial cell layers. *Journal of cellular physiology*, 212 (2): 368-374.
- Koni P. A., Joshi S. K., Temann U. A., Olson D., Burkly L., Flavell R. A. (2001). Conditional vascular cell adhesion molecule 1 deletion in mice: impaired lymphocyte migration to bone marrow. *The Journal of experimental medicine*, 193 (6): 741-754.
- Koopman G., Keehnen R. M., Lindhout E., Newman W., Shimizu Y., van Seventer G. A., de Groot C., Pals S. T. (1994). Adhesion through the LFA-1 (CD11a/CD18)-ICAM-1 (CD54) and the VLA-4 (CD49d)-VCAM-1 (CD106) pathways prevents apoptosis of germinal center B cells. *Journal of immunology* 152 (8): 3760-3767.
- Koopman G., Parmentier H. K., Schuurman H. J., Newman W., Meijer C. J., Pals S. T. (1991). Adhesion of human B cells to follicular dendritic cells involves both the lymphocyte function-associated antigen 1/intercellular adhesion molecule 1 and very late antigen 4/vascular cell adhesion molecule 1 pathways. *The Journal of experimental medicine*, 173 (6): 1297-1304.
- Koyama D., Kikuchi J., Hiraoka N., Wada T., Kurosawa H., Chiba S., Furukawa Y. (2014). Proteasome inhibitors exert cytotoxicity and increase chemosensitivity via transcriptional repression of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 28 (6): 1216-1226.

- Kubiczkova L., Pour L., Sedlarikova L., Hajek R., Sevcikova S. (2014). Proteasome inhibitors - molecular basis and current perspectives in multiple myeloma. *Journal of cellular and molecular medicine*, 18 (6): 947-961.
- Kuehl W. M., Bergsagel P. L. (2012). Molecular pathogenesis of multiple myeloma and its premalignant precursor. *The Journal of clinical investigation*, 122 (10): 3456-3463.
- Kufareva I., Salanga C. L., Handel T. M. (2015). Chemokine and chemokine receptor structure and interactions: implications for therapeutic strategies. *Immunology and cell biology*, 93 (4): 372-383.
- Kuhn D. J., Berkova Z., Jones R. J., Woessner R., Bjorklund C. C., Ma W., Davis R. E., Lin P., Wang H., Madden T. L., et al. (2012). Targeting the insulin-like growth factor-1 receptor to overcome bortezomib resistance in preclinical models of multiple myeloma. *Blood*, 120 (16): 3260-3270.
- Kuijpers T. W., van de Vijver E., Weterman M. A., de Boer M., Tool A. T., van den Berg T. K., Moser M., Jakobs M. E., Seeger K., Sanal O., et al. (2009). LAD-1/variant syndrome is caused by mutations in FERMT3. *Blood*, 113 (19): 4740-4746.
- Kumar S. K., Anderson K. C. (2016). Immune therapies in Multiple Myeloma. *Clinical Cancer Research*, 22 (22): 5453-5460.
- Kwan J., Killeen N. (2004). CCR7 directs the migration of thymocytes into the thymic medulla. *Journal of immunology*, 172 (7): 3999-4007.
- Kyle R. A., Rajkumar S. V. (2008). Multiple myeloma. *Blood*, 111 (6): 2962-2972.
- Ladi E., Yin X., Chtanova T., Robey E. A. (2006). Thymic microenvironments for T cell differentiation and selection. *Nature immunology*, 7 (4): 338-343.

L

- Lagarrigue F., Vikas Anekal P., Lee H.-S., Bachir A. I., Ablack J. N., Horwitz A. F., Ginsberg M. H. (2015). A RIAM/lamellipodin–talin–integrin complex forms the tip of sticky fingers that guide cell migration. *Nature Communications*, 6: 8492.
- Landowski T. H., Olashaw N. E., Agrawal D., Dalton W. S. (2003). Cell adhesion-mediated drug resistance (CAM-DR) is associated with activation of NF-kappa B (RelB/p50) in myeloma cells. *Oncogene*, 22 (16): 2417-2421.
- Laudanna C., Alon R. (2006). Right on the spot. Chemokine triggering of integrin-mediated arrest of rolling leukocytes. *Thrombosis and haemostasis*, 95 (1): 5-11.
- Laurenti E., Gottgens B. (2018). From haematopoietic stem cells to complex differentiation landscapes. *Nature*, 553 (7689): 418-426.
- LeBlanc R., Catley L. P., Hideshima T., Lentzsch S., Mitsiades C. S., Mitsiades N., Neubergh D., Goloubeva O., Pien C. S., Adams J., et al. (2002). Proteasome inhibitor PS-341 inhibits human myeloma cell growth in vivo and prolongs survival in a murine model. *Cancer research*, 62 (17): 4996-5000.
- Lee A. H., Iwakoshi N. N., Anderson K. C., Glimcher L. H. (2003). Proteasome inhibitors disrupt the unfolded protein response in myeloma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100 (17): 9946-9951.
- Lenter M., Uhlig H., Hamann A., Jenö P., Imhof B., Vestweber D. (1993). A monoclonal antibody against an activation epitope on mouse integrin chain beta 1 blocks adhesion of lymphocytes to the endothelial integrin alpha 6 beta 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90 (19): 9051-9055.
- Ley K., Laudanna C., Cybulsky M. I., Nourshargh S. (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature reviews. Immunology*, 7 (9): 678-689.

- Lichter D. I., Danaee H., Pickard M. D., Tayber O., Sintchak M., Shi H., Richardson P. G., Cavenagh J., Blade J., Facon T., *et al.* (2012). Sequence analysis of beta-subunit genes of the 20S proteasome in patients with relapsed multiple myeloma treated with bortezomib or dexamethasone. *Blood*, 120 (23): 4513-4516.
- Lim V. Y., Zehentmeier S., Fistonich C., Pereira J. P. (2017). A chemoattractant-guided walk through lymphopoiesis: from Hematopoietic Stem Cells to mature B lymphocytes. *Advances in immunology*, 134: 47-88.
- Liu S., Calderwood D. A., Ginsberg M. H. (2000). Integrin cytoplasmic domain-binding proteins. *Journal of cell science*, 113 (Pt 20): 3563-3571.
- Liu W., Draheim K. M., Zhang R., Calderwood D. A., Boggon T. J. (2013). Mechanism for KRIT1 release of ICAP1-mediated suppression of integrin activation. *Molecular cell*, 49 (4): 719-729.
- Lo C. G., Lu T. T., Cyster J. G. (2003). Integrin-dependence of lymphocyte entry into the splenic white pulp. *The Journal of experimental medicine*, 197 (3): 353-361.
- Lobb R. R., Hemler M. E. (1994). The pathophysiologic role of alpha 4 integrins in vivo. *The Journal of clinical investigation*, 94 (5): 1722-1728.
- Lokhorst H., Lamme T., de Smet M., Klein S., de Weger R., van Oers R., Bloem A. (1994). Primary tumor cells of myeloma patients induce interleukin-6 secretion in long-term bone marrow cultures. *Blood*, 84 (7): 2269-2277.
- Lopez-Cotarelo P., Gomez-Moreira C., Criado-Garcia O., Sanchez L., Rodriguez-Fernandez J. L. (2017). Beyond chemoattraction: multifunctionality of chemokine receptors in leukocytes. *Trends in immunology*, 38 (12): 927-941.
- Love P. E., Bhandoola A. (2011). Signal integration and crosstalk during thymocyte migration and emigration. *Nature Reviews Immunology*, 11: 469.
- Lu T. T., Cyster J. G. (2002). Integrin-mediated long-term B cell retention in the splenic marginal zone. *Science*, 297 (5580): 409-412.
- Lu Z., Hunter T. (2010). Ubiquitylation and proteasomal degradation of the p21(Cip1), p27(Kip1) and p57(Kip2) CDK inhibitors. *Cell Cycle*, 9 (12): 2342-2352.
- Lub S., Maes K., Menu E., De Bruyne E., Vanderkerken K., Van Valckenborgh E. (2016). Novel strategies to target the ubiquitin proteasome system in multiple myeloma. *Oncotarget*, 7 (6): 6521-6537.
- Luckey M. A., Kimura M., Waickman A., Feigenbaum L., Singer A., Park J.-H. (2014). The transcription factor ThPOK suppresses Runx3 and imposes CD4+ lineage fate by inducing the SOCS suppressors of cytokine signaling. *Nature immunology*, 15: 638-645.
- Luster A. D., Alon R., von Andrian U. H. (2005). Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nature immunology*, 6 (12): 1182-1190.

M

- Ma Q., Jones D., Borghesani P. R., Segal R. A., Nagasawa T., Kishimoto T., Bronson R. T., Springer T. A. (1998). Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95 (16): 9448-9453.
- Maddocks K. (2018). Update on mantle cell lymphoma. *Blood*, 132 (16): 1647-1656.
- Makarem R., Newham P., Askari J. A., Green L. J., Clements J., Edwards M., Humphries M. J., Mould A. P. (1994). Competitive binding of vascular cell adhesion molecule-1 and the HepII/IIIICS domain of fibronectin to the integrin alpha 4 beta 1. *The Journal of biological chemistry*, 269 (6): 4005-4011.
- Maksym R. B., Tarnowski M., Grymula K., Tarnowska J., Wysoczynski M., Liu R., Czerny B., Ratajczak J., Kucia M., Ratajczak M. Z. (2009). The role of stromal-derived

- factor-1--CXCR7 axis in development and cancer. *European journal of pharmacology*, 625: 31-40.
- Malinin N. L., Zhang L., Choi J., Ciocea A., Razorenova O., Ma Y. Q., Podrez E. A., Tosi M., Lennon D. P., Caplan A. I., *et al.* (2009). A point mutation in KINDLIN3 ablates activation of three integrin subfamilies in humans. *Nature medicine*, 15 (3): 313-318.
- Manevich-Mendelson E., Grabovsky V., Feigelson S. W., Cinamon G., Gore Y., Goverse G., Monkley S. J., Margalit R., Melamed D., Mebius R. E., *et al.* (2010). Talin1 is required for integrin-dependent B lymphocyte homing to lymph nodes and the bone marrow but not for follicular B-cell maturation in the spleen. *Blood*, 116 (26): 5907-5918.
- Markovina S., Callander N. S., O'Connor S. L., Kim J., Wernkli J. E., Raschko M., Leith C. P., Kahl B. S., Kim K., Miyamoto S. (2008). Bortezomib-resistant nuclear factor-kappaB activity in multiple myeloma cells. *Molecular cancer research*, 6 (8): 1356-1364.
- Martinez-Moreno M., Leiva M., Aguilera-Montilla N., Sevilla-Movilla S., Isern de Val S., Arellano-Sanchez N., Gutierrez N. C., Maldonado R., Martinez-Lopez J., Buno I., *et al.* (2016). In vivo adhesion of malignant B cells to bone marrow microvasculature is regulated by alpha4beta1 cytoplasmic-binding proteins. *Leukemia*, 30 (4): 861-872.
- Martinez-Munoz L., Villares R., Rodriguez-Fernandez J. L., Rodriguez-Frade J. M., Mellado M. (2018). Remodeling our concept of chemokine receptor function: From monomers to oligomers. 104 (2): 323-331.
- Matthews G. M., de Matos Simoes R., Dhimolea E., Sheffer M., Gandolfi S., Dashevsky O., Sorrell J. D., Mitsiades C. S. (2016). NF-kappaB dysregulation in multiple myeloma. *Seminars in cancer biology*, 39: 68-76.
- Mattioli I., Geng H., Sebald A., Hodel M., Bucher C., Kracht M., Schmitz M. L. (2006). Inducible phosphorylation of NF- κ B p65 at Serine 468 by T cell costimulation is mediated by IKK ϵ . *Journal of Biological Chemistry*, 281 (10): 6175-6183.
- Mazo I. B., Gutierrez-Ramos J. C., Frenette P. S., Hynes R. O., Wagner D. D., von Andrian U. H. (1998). Hematopoietic progenitor cell rolling in bone marrow microvessels: parallel contributions by endothelial selectins and vascular cell adhesion molecule 1. *The Journal of experimental medicine*, 188 (3): 465-474.
- McCaughy T. M., Etzensperger R., Alag A., Tai X., Kurtulus S., Park J. H., Grinberg A., Love P., Feigenbaum L., Erman B., *et al.* (2012). Conditional deletion of cytokine receptor chains reveals that IL-7 and IL-15 specify CD8 cytotoxic lineage fate in the thymus. *The Journal of experimental medicine*, 209 (12): 2263-2276.
- McEver R. P. (2002). Selectins: lectins that initiate cell adhesion under flow. *Current opinion in cell biology*, 14 (5): 581-586.
- Meads M. B., Hazlehurst L. A., Dalton W. S. (2008). The bone marrow microenvironment as a tumor sanctuary and contributor to drug resistance. *Clinical cancer research*, 14 (9): 2519-2526.
- Medzhitov R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 1 (2): 135-145.
- Melchers F. (2015). Checkpoints that control B cell development. *The Journal of clinical investigation*, 125 (6): 2203-2210.
- Mellado M., Rodriguez-Frade J. M., Vila-Coro A. J., Fernandez S., Martin de Ana A., Jones D. R., Toran J. L., Martinez A. C. (2001). Chemokine receptor homo- or heterodimerization activates distinct signaling pathways. *The EMBO journal*, 20 (10): 2497-2507.
- Mendez-Ferrer S., Michurina T. V., Ferraro F., Mazloom A. R., Macarthur B. D., Lira S. A., Scadden D. T., Ma'ayan A., Enikolopov G. N., Frenette P. S. (2010). Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*, 466 (7308): 829-834.

- Middleton J., Patterson A. M., Gardner L., Schmutz C., Ashton B. A. (2002). Leukocyte extravasation: chemokine transport and presentation by the endothelium. *Blood*, 100 (12): 3853-3860.
- Migkou M., Gavriatopoulou M., Terpos E., Dimopoulos M. A. (2018). Optimizing therapy in bortezomib-exposed patients with multiple myeloma. *Expert review of hematology*, 11 (6): 463-469.
- Millon-Fremillon A., Brunner M., Abed N., Collomb E., Ribba A.-S., Block M. R., Albiges-Rizo C., Bouvard D. (2013). CaMKII-mediated intramolecular opening of Integrin Cytoplasmic domain Associated Protein-1 (ICAP-1 α) negatively regulates β 1 integrins. *Journal of Biological Chemistry*.
- Mina R., D'Agostino M., Cerrato C., Gay F., Palumbo A. (2017). Plasma cell leukemia: update on biology and therapy. *Leukemia & lymphoma*, 58 (7): 1538-1547.
- Mitsiades C. S., Mitsiades N. S., Munshi N. C., Richardson P. G., Anderson K. C. (2006). The role of the bone microenvironment in the pathophysiology and therapeutic management of multiple myeloma: interplay of growth factors, their receptors and stromal interactions. *European journal of cancer*, 42 (11): 1564-1573.
- Mitsiades N., Mitsiades C. S., Richardson P. G., Poulaki V., Tai Y. T., Chauhan D., Fanourakis G., Gu X., Bailey C., Joseph M., et al. (2003). The proteasome inhibitor PS-341 potentiates sensitivity of multiple myeloma cells to conventional chemotherapeutic agents: therapeutic applications. *Blood*, 101 (6): 2377-2380.
- Miyake K., Medina K., Ishihara K., Kimoto M., Auerbach R., Kincade P. W. (1991). A VCAM-like adhesion molecule on murine bone marrow stromal cells mediates binding of lymphocyte precursors in culture. *The Journal of cell biology*, 114 (3): 557-565.
- Miyasaka M., Tanaka T. (2004). Lymphocyte trafficking across high endothelial venules: dogmas and enigmas. *Nature reviews. Immunology*, 4 (5): 360-370.
- Monkley S. J., Zhou X. H., Kinston S. J., Giblett S. M., Hemmings L., Priddle H., Brown J. E., Pritchard C. A., Critchley D. R., Fassler R. (2000). Disruption of the talin gene arrests mouse development at the gastrulation stage. *Developmental dynamics*, 219 (4): 560-574.
- Moore G. E., Kitamura H. (1968). Cell line derived from patient with myeloma. *New York state journal of medicine*, 68 (15): 2054-2060.
- Moreau P., Attal M., Facon T. (2015). Frontline therapy of multiple myeloma. *Blood*, 125 (20): 3076-3084.
- Moreau P., San Miguel J., Ludwig H., Schouten H., Mohty M., Dimopoulos M., Dreyling M. (2017). Multiple myeloma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology*, 28 (Suppl 4): iv52-iv61.
- Moreno-Layseca P., Icha J., Hamidi H., Ivaska J. (2019). Integrin trafficking in cells and tissues. *Nature Cell Biology*, 21 (2): 122-132.
- Moretti F. A., Moser M., Lyck R., Abadier M., Ruppert R., Engelhardt B., Fassler R. (2013). Kindlin-3 regulates integrin activation and adhesion reinforcement of effector T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110 (42): 17005-17010.
- Morgan G. J., Walker B. A., Davies F. E. (2012). The genetic architecture of multiple myeloma. *Nature reviews. Cancer*, 12 (5): 335-348.
- Mori Y., Shimizu N., Dallas M., Niewolna M., Story B., Williams P. J., Mundy G. R., Yoneda T. (2004). Anti- α 4 integrin antibody suppresses the development of multiple myeloma and associated osteoclastic osteolysis. *Blood*, 104 (7): 2149-2154.
- Morotti A., Parvis G., Cilloni D., Familiari U., Pautasso M., Bosa M., Messa F., Arruga F., Defilippi I., Catalano R., et al. (2007). CD7/CD56-positive acute myeloid leukemias

- are characterized by constitutive phosphorylation of the NF- κ B subunit p65 at Ser536. *Leukemia*, 21 (6): 1305-1306.
- Morrison V. L., MacPherson M., Savinko T., Lek H. S., Prescott A., Fagerholm S. C. (2013). The beta2 integrin-kindlin-3 interaction is essential for T-cell homing but dispensable for T-cell activation in vivo. *Blood*, 122 (8): 1428-1436.
- Mory A., Feigelson S. W., Yarali N., Kilic S. S., Bayhan G. I., Gershoni-Baruch R., Etzioni A., Alon R. (2008). Kindlin-3: a new gene involved in the pathogenesis of LAD-III. *Blood*, 112 (6): 2591-2591.
- Moser B., Willmann K. (2004). Chemokines: role in inflammation and immune surveillance. *Annals of the rheumatic diseases*, 63 (Suppl 2): ii84-ii89.
- Moser M., Legate K. R., Zent R., Fassler R. (2009). The tail of integrins, talin, and kindlins. *Science*, 324 (5929): 895-899.
- Moser M., Nieswandt B., Ussar S., Pozgajova M., Fassler R. (2008). Kindlin-3 is essential for integrin activation and platelet aggregation. *Nature medicine*, 14 (3): 325-330.
- Mould A. P., Askari J. A., Craig S. E., Garratt A. N., Clements J., Humphries M. J. (1994). Integrin alpha 4 beta 1-mediated melanoma cell adhesion and migration on vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and the alternatively spliced IIIc3 region of fibronectin. *Journal of Biological Chemistry*, 269 (44): 27224-27230.
- Moyano J., Carnemolla B., Domínguez-Jiménez C., García-Gila M., Albar J., Sánchez-Aparicio P., Leprini A., Querzè G., Zardi L., Garcia-Pardo A. (1997). Fibronectin Type IIIc5 Repeat Contains a Novel Cell Adhesion Sequence, KLDAPT, Which Binds Activated α 4 β 1 and α 4 β 7 Integrins. *The Journal of biological chemistry*, 272: 24832-24836.
- Muller A., Homey B., Soto H., Ge N., Catron D., Buchanan M. E., McClanahan T., Murphy E., Yuan W., Wagner S. N., et al. (2001). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*, 410 (6824): 50-56.
- Murata S., Yashiroda H., Tanaka K. (2009). Molecular mechanisms of proteasome assembly. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 10 (2): 104-115.
- Murdoch C., Finn A. (2000). Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood*, 95 (10): 3032-3043.
- Murphy K. (2012) *Janeway's Immunobiology*. 8 ed, Garland Science.
- Murray M. Y., Auger M. J., Bowles K. M. (2014). Overcoming bortezomib resistance in multiple myeloma. *Biochemical Society transactions*, 42 (4): 804-808.

N

- Nader G. P., Ezratty E. J., Gundersen G. G. (2016). FAK, talin and PIPK γ regulate endocytosed integrin activation to polarize focal adhesion assembly. *Nature Cell Biology*, 18 (5): 491-503.
- Nagasawa T. (2006). Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. *Nature reviews. Immunology*, 6 (2): 107-116.
- Nagasawa T., Hirota S., Tachibana K., Takakura N., Nishikawa S., Kitamura Y., Yoshida N., Kikutani H., Kishimoto T. (1996). Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature*, 382 (6592): 635-638.
- Nagasawa T., Omatsu Y., Sugiyama T. (2011). Control of hematopoietic stem cells by the bone marrow stromal niche: the role of reticular cells. *Trends in immunology*, 32 (7): 315-20.
- Neish A. S., Williams A. J., Palmer H. J., Whitley M. Z., Collins T. (1992). Functional analysis of the human vascular cell adhesion molecule 1 promoter. *The Journal of experimental medicine*, 176 (6): 1583-1593.

- Netelenbos T., van den Born J., Kessler F. L., Zweegman S., Merle P. A., van Oostveen J. W., Zwaginga J. J., Huijgens P. C., Drager A. M. (2003). Proteoglycans on bone marrow endothelial cells bind and present SDF-1 towards hematopoietic progenitor cells. *Leukemia*, 17 (1): 175-184.
- Neves S. R., Ram P. T., Iyengar R. (2002). G protein pathways. *Science*, 296 (5573): 1636-1639.
- Nieswandt B., Moser M., Pleines I., Varga-Szabo D., Monkley S., Critchley D., Fässler R. (2007). Loss of talin1 in platelets abrogates integrin activation, platelet aggregation, and thrombus formation in vitro and in vivo. *The Journal of Experimental Medicine*, 204 (13): 3113-3118.
- Noborio-Hatano K., Kikuchi J., Takatoku M., Shimizu R., Wada T., Ueda M., Nobuyoshi M., Oh I., Sato K., Suzuki T., *et al.* (2009). Bortezomib overcomes cell-adhesion-mediated drug resistance through downregulation of VLA-4 expression in multiple myeloma. *Oncogene*, 28 (2): 231-242.
- Nooka A. K., Kastiris E., Dimopoulos M. A., Lonial S. (2015). Treatment options for relapsed and refractory multiple myeloma. *Blood*, 125 (20): 3085-3099.
- Nourshargh S., Alon R. (2014). Leukocyte migration into inflamed tissues. *Immunity*, 41 (5): 694-707.

O

- O'Toole T. E., Ylanne J., Culley B. M. (1995). Regulation of integrin affinity states through an NPXY motif in the beta subunit cytoplasmic domain. *The Journal of biological chemistry*, 270 (15): 8553-8558.
- Obeng E. A., Carlson L. M., Gutman D. M., Harrington W. J., Jr., Lee K. P., Boise L. H. (2006). Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myeloma cells. *Blood*, 107 (12): 4907-4916.
- Oberlin E., Amara A., Bachelier F., Bessia C., Virelizier J. L., Arenzana-Seisdedos F., Schwartz O., Heard J. M., Clark-Lewis I., Legler D. F., *et al.* (1996). The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature*, 382 (6594): 833-835.
- Oeckinghaus A., Hayden M. S., Ghosh S. (2011). Crosstalk in NF-kappaB signaling pathways. *Nature immunology*, 12 (8): 695-708.
- Ohguchi H., Hideshima T., Anderson K. C. (2018). The biological significance of histone modifiers in multiple myeloma: clinical applications. *Blood Cancer Journal*, 8 (9): 83.
- Oldham W. M., Hamm H. E. (2008). Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9 (1): 60-71.
- Olson D. L., Burkly L. C., Leone D. R., Dolinski B. M., Lobb R. R. (2005). Anti- α 4 integrin monoclonal antibody inhibits multiple myeloma growth in a murine model. *Molecular Cancer Therapeutics*, 4 (1): 91-99.
- Orkin S. H., Zon L. I. (2008). Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*, 132 (4): 631-644.
- Orlowski R. Z., Lonial S. (2016). Integration of novel agents into the care of patients with Multiple Myeloma. *Clinical Cancer Research*, 22 (22): 5443-5452.
- Osborn L., Kunkel S., Nabel G. J. (1989). Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor kappa B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86 (7): 2336-2340.

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

P

P Tucker R. (2004). Neural crest cells: A model for invasive behavior. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 36 (2): 173-177.

Pahl H. L. (1999). Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*, 18 (49): 6853-6866.

Pankov R., Yamada K. M. (2002). Fibronectin at a glance. *Journal of cell science*, 115 (Pt 20): 3861-3863.

Park B. Y., Saint-Jeannet J. P. (2010). Expression analysis of Runx3 and other Runx family members during *Xenopus* development. *Gene expression patterns*, 10 (4-5): 159-166.

Park J.-H., Adoro S., Guinter T., Erman B., Alag A. S., Catalfamo M., Kimura M. Y., Cui Y., Lucas P. J., Gress R. E., *et al.* (2010). Signaling by intrathymic cytokines, not T cell antigen receptors, specifies CD8 lineage choice and promotes the differentiation of cytotoxic-lineage T cells. *Nature immunology*, 11 (3): 257-264.

Park J., Bae E.-K., Lee C., Choi J.-H., Jung W. J., Ahn K.-S., Yoon S.-S. (2014). Establishment and characterization of bortezomib-resistant U266 cell line: constitutive activation of NF- κ B-mediated cell signals and/or alterations of ubiquitylation-related genes reduce bortezomib-induced apoptosis. *BMB reports*, 47 (5): 274-279.

Pawig L., Klasen C., Weber C., Bernhagen J., Noels H. (2015). Diversity and interconnections in the CXCR4 chemokine receptor/ligand family: molecular perspectives. *Frontiers in immunology*, 6.

Pawlyn C., Morgan G. J. (2017). Evolutionary biology of high-risk multiple myeloma. *Nature reviews. Cancer*, 17 (9): 543-556.

Peled A., Kollet O., Ponomaryov T., Petit I., Franitza S., Grabovsky V., Slav M. M., Nagler A., Lider O., Alon R., *et al.* (2000). The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34(+) cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice. *Blood*, 95 (11): 3289-3296.

Pelletier N., Casamayor-Pallejà M., De Luca K., Mondière P., Saltel F., Jurdic P., Bella C., Genestier L., Defrance T. (2006). The Endoplasmic Reticulum is a key component of the plasma cell death pathway. *The Journal of Immunology*, 176 (3): 1340-1347.

Petit I., Szyper-Kravitz M., Nagler A., Lahav M., Peled A., Habler L., Ponomaryov T., Taichman R. S., Arenzana-Seisdedos F., Fujii N., *et al.* (2002). G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nature immunology*, 3 (7): 687-694.

Petrich B. G., Marchese P., Ruggeri Z. M., Spiess S., Weichert R. A. M., Ye F., Tiedt R., Skoda R. C., Monkley S. J., Critchley D. R., *et al.* (2007). Talin is required for integrin-mediated platelet function in hemostasis and thrombosis. *The Journal of Experimental Medicine*, 204 (13): 3103-3111.

Petrucci M. T., Giraldo P., Corradini P., Teixeira A., Dimopoulos M. A., Blau I. W., Drach J., Angermund R., Allietta N., Broer E., *et al.* (2013). A prospective, international phase 2 study of bortezomib retreatment in patients with relapsed multiple myeloma. *British journal of haematology*, 160 (5): 649-659.

Pichiorri F., Suh S. S., Ladetto M., Kuehl M., Palumbo T., Drandi D., Taccioli C., Zanesi N., Alder H., Hagan J. P., *et al.* (2008). MicroRNAs regulate critical genes associated

- with multiple myeloma pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105 (35): 12885-12890.
- Pierce K. L., Premont R. T., Lefkowitz R. J. (2002). Seven-transmembrane receptors. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 3 (9): 639-650.
- Pillai S., Cariappa A. (2009). The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. *Nature reviews. Immunology*, 9 (11): 767-777.
- Pleyer L., Egle A., Hartmann T. N., Greil R. (2009). Molecular and cellular mechanisms of CLL: novel therapeutic approaches. *Nature reviews. Clinical oncology*, 6 (7): 405-418.
- Podar K. (2012). Novel targets and derived small molecule inhibitors in multiple myeloma. *Current cancer drug targets*, 12 (7): 797-813.
- Polte T., Newman W., Gopal T. V. (1990). Full length vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1). *Nucleic Acids Research*, 18 (19).
- Priddle H., Hemmings L., Monkley S., Woods A., Patel B., Sutton D., Dunn G. A., Zicha D., Critchley D. R. (1998). Disruption of the talin gene compromises focal adhesion assembly in undifferentiated but not differentiated embryonic stem cells. *The Journal of cell biology*, 142 (4): 1121-1133.
- Prideaux S. M., Conway O'Brien E., Chevassut T. J. (2014). The genetic architecture of multiple myeloma. *Advances in hematology*, 2014.
- Proudfoot A. E. (2002). Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets. *Nature reviews. Immunology*, 2 (2): 106-115.

R

- Rajkumar S. V., Landgren O., Mateos M. V. (2015). Smoldering multiple myeloma. *Blood*, 125 (20): 3069-3075.
- Rajkumar S. V., Richardson P. G., Hideshima T., Anderson K. C. (2005). Proteasome inhibition as a novel therapeutic target in human cancer. *Journal of clinical oncology*, 23 (3): 630-639.
- Redondo-Munoz J., Escobar-Diaz E., Samaniego R., Terol M. J., Garcia-Marco J. A., Garcia-Pardo A. (2006). MMP-9 in B-cell chronic lymphocytic leukemia is up-regulated by alpha4beta1 integrin or CXCR4 engagement via distinct signaling pathways, localizes to podosomes, and is involved in cell invasion and migration. *Blood*, 108 (9): 3143-3151.
- Redondo-Muñoz J., García-Pardo A., Teixidó J. (2019). Molecular players in hematologic tumor cell trafficking. *Frontiers in immunology*, 10.
- Ri M., Iida S., Nakashima T., Miyazaki H., Mori F., Ito A., Inagaki A., Kusumoto S., Ishida T., Komatsu H., *et al.* (2010). Bortezomib-resistant myeloma cell lines: a role for mutated PSMB5 in preventing the accumulation of unfolded proteins and fatal ER stress. *Leukemia*, 24 (8): 1506-1512.
- Richardson P. G., Barlogie B., Berenson J., Singhal S., Jagannath S., Irwin D., Rajkumar S. V., Srkalovic G., Alsina M., Alexanian R., *et al.* (2003a). A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma. *The New England journal of medicine*, 348 (26): 2609-2617.
- Richardson P. G., Hideshima T., Anderson K. C. (2003b). Bortezomib (PS-341): a novel, first-in-class proteasome inhibitor for the treatment of multiple myeloma and other cancers. *Cancer Control*, 10 (5): 361-369.
- Richardson P. G., Xie W., Jagannath S., Jakubowiak A., Lonial S., Raje N. S., Alsina M., Ghobrial I. M., Schlossman R. L., Munshi N. C., *et al.* (2014). A phase 2 trial of lenalidomide, bortezomib, and dexamethasone in patients with relapsed and relapsed/refractory myeloma. *Blood*, 123 (10): 1461-1469.

- Robak P., Drozd I., Szemraj J., Robak T. (2018a). Drug resistance in multiple myeloma. *Cancer treatment reviews*, 70: 199-208.
- Robak T., Huang H., Jin J., Zhu J., Liu T., Samoiloova O., Pylypenko H., Verhoef G., Siritanaratkul N., Osmanov E., *et al.* (2015). Bortezomib-based therapy for newly diagnosed Mantle-Cell Lymphoma. *New England Journal of Medicine*, 372 (10): 944-953.
- Robak T., Jin J., Pylypenko H., Verhoef G., Siritanaratkul N., Drach J., Raderer M., Mayer J., Pereira J., Tumyan G., *et al.* (2018b). Frontline bortezomib, rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, and prednisone (VR-CAP) versus rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (R-CHOP) in transplantation-ineligible patients with newly diagnosed mantle cell lymphoma: final overall survival results of a randomised, open-label, phase 3 study. *The Lancet. Oncology*, 19 (11): 1449-1458.
- Robledo M. M., Bartolome R. A., Longo N., Rodriguez-Frade J. M., Mellado M., Longo I., van Muijen G. N., Sanchez-Mateos P., Teixidó J. (2001). Expression of functional chemokine receptors CXCR3 and CXCR4 on human melanoma cells. *The Journal of biological chemistry*, 276 (48): 45098-45105.
- Roccaro A. M., Sacco A., Thompson B., Leleu X., Azab A. K., Azab F., Runnels J., Jia X., Ngo H. T., Melhem M. R., *et al.* (2009). MicroRNAs 15a and 16 regulate tumor proliferation in multiple myeloma. *Blood*, 113 (26): 6669-6680.
- Rock K. L., Gramm C., Rothstein L., Clark K., Stein R., Dick L., Hwang D., Goldberg A. L. (1994). Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell*, 78 (5): 761-771.
- Rognoni E., Ruppert R., Fassler R. (2016). The kindlin family: functions, signaling properties and implications for human disease. *Journal of cell science*, 129 (1): 17-27.
- Rolink A. G., Andersson J., Melchers F. (2004). Molecular mechanisms guiding late stages of B-cell development. *Immunological reviews*, 197: 41-50.
- Rose D. M., Alon R., Ginsberg M. H. (2007). Integrin modulation and signaling in leukocyte adhesion and migration. *Immunological reviews*, 218: 126-134.
- Rose D. M., Han J., Ginsberg M. H. (2002). Alpha4 integrins and the immune response. *Immunological reviews*, 186: 118-124.
- Rosen S. D. (2004). Ligands for L-selectin: homing, inflammation, and beyond. *Annual review of immunology*, 22: 129-156.
- Rossi D., Zlotnik A. (2000). The biology of chemokines and their receptors. *Annual review of immunology*, 18: 217-242.
- Rumpold H., Salvador C., Wolf A. M., Tilg H., Gastl G., Wolf D. (2007). Knockdown of PgP resensitizes leukemic cells to proteasome inhibitors. *Biochemical and biophysical research communications*, 361 (2): 549-554.
- Ruppert R., Moser M., Sperandio M., Rognoni E., Orban M., Liu W. H., Schulz A. S., Oostendorp R. A., Massberg S., Fassler R. (2015). Kindlin-3-mediated integrin adhesion is dispensable for quiescent but essential for activated hematopoietic stem cells. *The Journal of experimental medicine*, 212 (9): 1415-1432.
- Ryan D. H., Nuccie B. L., Abboud C. N., Winslow J. M. (1991). Vascular cell adhesion molecule-1 and the integrin VLA-4 mediate adhesion of human B cell precursors to cultured bone marrow adherent cells. *The Journal of clinical investigation*, 88 (3): 995-1004.

S

- Saito T., Chiba S., Ichikawa M., Kunisato A., Asai T., Shimizu K., Yamaguchi T., Yamamoto G., Seo S., Kumano K., *et al.* (2003). Notch2 is preferentially expressed in mature B cells and indispensable for marginal zone B lineage development. *Immunity*, 18 (5): 675-685.
- Salomon D. R., Crisa L., Mojcik C. F., Ishii J. K., Klier G., Shevach E. M. (1997). Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed by cortical thymic epithelial cells and mediates thymocyte adhesion. Implications for the function of alpha4beta1 (VLA4) integrin in T-cell development. *Blood*, 89 (7): 2461-2471.
- Sallusto F., Lanzavecchia A., Mackay C. R. (1998). Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunology today*, 19 (12): 568-574.
- San Miguel J. F., Schlag R., Khuageva N. K., Dimopoulos M. A., Shpilberg O., Kropff M., Spicka I., Petrucci M. T., Palumbo A., Samoilova O. S., *et al.* (2008). Bortezomib plus melphalan and prednisone for initial treatment of multiple myeloma. *The New England journal of medicine*, 359 (9): 906-917.
- Sanchez-Aparicio P., Dominguez-Jimenez C., Garcia-Pardo A. (1994). Activation of the alpha 4 beta 1 integrin through the beta 1 subunit induces recognition of the RGDS sequence in fibronectin. *The Journal of cell biology*, 126 (1): 271-279.
- Sander E. E., van Delft S., ten Klooster J. P., Reid T., van der Kammen R. A., Michiels F., Collard J. G. (1998). Matrix-dependent Tiam1/Rac signaling in epithelial cells promotes either cell-cell adhesion or cell migration and is regulated by phosphatidylinositol 3-kinase. *The Journal of cell biology*, 143 (5): 1385-1398.
- Sanz-Rodriguez F., Hidalgo A., Teixidó J. (2001). Chemokine stromal cell-derived factor-1alpha modulates VLA-4 integrin-mediated multiple myeloma cell adhesion to CS-1/fibronectin and VCAM-1. *Blood*, 97 (2): 346-351.
- Sanz-Rodriguez F., Ruiz-Velasco N., Pascual-Salcedo D., Teixidó J. (1999). Characterization of VLA-4-dependent myeloma cell adhesion to fibronectin and VCAM-1. *British journal of haematology*, 107 (4): 825-834.
- Scott L. M., Priestley G. V., Papayannopoulou T. (2003). Deletion of alpha4 integrins from adult hematopoietic cells reveals roles in homeostasis, regeneration, and homing. *Molecular and cellular biology*, 23 (24): 9349-9360.
- Schmidt S., Nakchbandi I., Ruppert R., Kawelke N., Hess M. W., Pfaller K., Jurdic P., Fassler R., Moser M. (2011). Kindlin-3-mediated signaling from multiple integrin classes is required for osteoclast-mediated bone resorption. *The Journal of cell biology*, 192 (5): 883-897.
- Schulz O., Hammerschmidt S. I., Moschovakis G. L., Forster R. (2016). Chemokines and Chemokine Receptors in Lymphoid Tissue Dynamics. *Annual review of immunology*, 34: 203-242.
- Schumann K., Lammermann T., Bruckner M., Legler D. F., Polleux J., Spatz J. P., Schuler G., Forster R., Lutz M. B., Sorokin L., *et al.* (2010). Immobilized chemokine fields and soluble chemokine gradients cooperatively shape migration patterns of dendritic cells. *Immunity*, 32 (5): 703-713.
- Schurpf T., Springer T. A. (2011). Regulation of integrin affinity on cell surfaces. *The EMBO journal*, 30 (23): 4712-4727.
- Shah D. K., Zuniga-Pflucker J. C. (2014). An overview of the intrathymic intricacies of T cell development. *Journal of immunology*, 192 (9): 4017-4023.
- Shattil S. J., Kim C., Ginsberg M. H. (2010). The final steps of integrin activation: the end game. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 11 (4): 288-300.

- Shenoy S. K., Lefkowitz R. J. (2011). beta-Arrestin-mediated receptor trafficking and signal transduction. *Trends in pharmacological sciences*, 32 (9): 521-533.
- Shirozu M., Nakano T., Inazawa J., Tashiro K., Tada H., Shinohara T., Honjo T. (1995). Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene. *Genomics*, 28 (3): 495-500.
- Shulman Z., Shinder V., Klein E., Grabovsky V., Yeger O., Geron E., Montresor A., Bolomini-Vittori M., Feigelson S. W., Kirchhausen T., *et al.* (2009). Lymphocyte crawling and transendothelial migration require chemokine triggering of high-affinity LFA-1 integrin. *Immunity*, 30 (3): 384-396.
- Simmons P. J., Masinovsky B., Longenecker B. M., Berenson R., Torok-Storb B., Gallatin W. M. (1992). Vascular cell adhesion molecule-1 expressed by bone marrow stromal cells mediates the binding of hematopoietic progenitor cells. *Blood*, 80 (2): 388-395.
- Singer A., Adoro S., Park J.-H. (2008). Lineage fate and intense debate: myths, models and mechanisms of CD4- versus CD8-lineage choice. *Nature reviews. Immunology*, 8 (10): 788-801.
- Sironi M., Sciacca F. L., Matteucci C., Conni M., Vecchi A., Bernasconi S., Minty A., Caput D., Ferrara P., Colotta F. (1994). Regulation of endothelial and mesothelial cell function by interleukin-13: selective induction of vascular cell adhesion molecule-1 and amplification of interleukin-6 production. *Blood*, 84 (6): 1913-1921.
- Soriano G. P., Besse L., Li N., Kraus M., Besse A., Meeuwenoord N., Bader J., Everts B., den Dulk H., Overkleeft H. S., *et al.* (2016). Proteasome inhibitor-adapted myeloma cells are largely independent from proteasome activity and show complex proteomic changes, in particular in redox and energy metabolism. *Leukemia*, 30 (11): 2198-2207.
- Sosa-Costa A., Isern de Val S., Sevilla-Movilla S., Borgman K. J., Manzo C., Teixidó J., Garcia-Parajo M. F. (2016). Lateral mobility and nanoscale spatial arrangement of chemokine-activated alpha4beta1 integrins on T cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 291 (40): 21053-21062.
- Spencer A., Yoon S. S., Harrison S. J., Morris S. R., Smith D. A., Brigandi R. A., Gauvin J., Kumar R., Opalinska J. B., Chen C. (2014). The novel AKT inhibitor afuresertib shows favorable safety, pharmacokinetics, and clinical activity in multiple myeloma. *Blood*, 124 (14): 2190-2195.
- Springer T. A. (1994). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*, 76 (2): 301-314.
- Sugiyama T., Kohara H., Noda M., Nagasawa T. (2006). Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity*, 25 (6): 977-988.
- Sun Z., Costell M., Fässler R. (2019). Integrin activation by talin, kindlin and mechanical forces. *21* (1): 25-31.
- Sunwoo J. B., Chen Z., Dong G., Yeh N., Crowl Bancroft C., Sausville E., Adams J., Elliott P., Van Waes C. (2001). Novel proteasome inhibitor PS-341 inhibits activation of nuclear factor-kappa B, cell survival, tumor growth, and angiogenesis in squamous cell carcinoma. *Clinical cancer research*, 7 (5): 1419-1428.
- Suzuki G., Sawa H., Kobayashi Y., Nakata Y., Nakagawa K., Uzawa A., Sakiyama H., Kakinuma S., Iwabuchi K., Nagashima K. (1999). Pertussis toxin-sensitive signal controls the trafficking of thymocytes across the corticomedullary junction in the thymus. *Journal of immunology*, 162 (10): 5981-5985.
- Svensson L., Howarth K., McDowall A., Patzak I., Evans R., Ussar S., Moser M., Metin A., Fried M., Tomlinson I., *et al.* (2009). Leukocyte adhesion deficiency-III is caused by mutations in KINDLIN3 affecting integrin activation. *Nature medicine*, 15 (3): 306-312.

Swerlick R. A., Lee K. H., Li L. J., Sepp N. T., Caughman S. W., Lawley T. J. (1992). Regulation of vascular cell adhesion molecule 1 on human dermal microvascular endothelial cells. *Journal of immunology*, 149 (2): 698-705.

T

Tachibana K., Hirota S., Iizasa H., Yoshida H., Kawabata K., Kataoka Y., Kitamura Y., Matsushima K., Yoshida N., Nishikawa S., *et al.* (1998). The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature*, 393 (6685): 591-594.

Tadokoro S., Shattil S. J., Eto K., Tai V., Liddington R. C., de Pereda J. M., Ginsberg M. H., Calderwood D. A. (2003). Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation. *Science*, 302 (5642): 103-106.

Takaba H., Takayanagi H. (2017). The mechanisms of T Cell selection in the thymus. *Trends in immunology*, 38 (11): 805-816.

Takagi J., Petre B. M., Walz T., Springer T. A. (2002). Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling. *Cell*, 110 (5): 599-511.

Takala H., Nurminen E., Nurmi S. M., Aatonen M., Strandin T., Takatalo M., Kiema T., Gahmberg C. G., Ylanne J., Fagerholm S. C. (2008). Beta2 integrin phosphorylation on Thr758 acts as a molecular switch to regulate 14-3-3 and filamin binding. *Blood*, 112 (5): 1853-1862.

Tanaka K. (2009). The proteasome: overview of structure and functions. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences*, 85 (1): 12-36.

Tani-ichi S., Shimba A., Wagatsuma K., Miyachi H., Kitano S., Imai K., Hara T., Ikuta K. (2013). Interleukin-7 receptor controls development and maturation of late stages of thymocyte subpopulations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110 (2): 612-617.

Tanigaki K., Han H., Yamamoto N., Tashiro K., Ikegawa M., Kuroda K., Suzuki A., Nakano T., Honjo T. (2002). Notch-RBP-J signaling is involved in cell fate determination of marginal zone B cells. *Nature immunology*, 3 (5): 443-450.

Taniuchi I., Osato M., Egawa T., Sunshine M. J., Bae S. C., Komori T., Ito Y., Littman D. R. (2002). Differential requirements for Runx proteins in CD4 repression and epigenetic silencing during T lymphocyte development. *Cell*, 111 (5): 621-633.

Tedford K., Steiner M., Koshutin S., Richter K., Tech L., Eggers Y., Jansing I., Schilling K., Hauser A. E., Korthals M., *et al.* (2017). The opposing forces of shear flow and sphingosine-1-phosphate control marginal zone B cell shuttling. *Nature Communications*, 8 (1).

Teixidó J., Martínez-Moreno M., Díaz-Martínez M., Sevilla-Movilla S. (2018). The good and bad faces of the CXCR4 chemokine receptor. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 95: 121-131.

Teixidó J., Parker C. M., Kassner P. D., Hemler M. E. (1992). Functional and structural analysis of VLA-4 integrin alpha 4 subunit cleavage. *The Journal of biological chemistry*, 267 (3): 1786-1791.

Ticchioni M., Charvet C., Noraz N., Lamy L., Steinberg M., Bernard A., Deckert M. (2002). Signaling through ZAP-70 is required for CXCL12-mediated T-cell transendothelial migration. *Blood*, 99 (9): 3111-3118.

Tripodo C., Sangaletti S., Piccaluga P. P., Prakash S., Franco G., Borrello I., Orazi A., Colombo M. P., Pileri S. A. (2011). The bone marrow stroma in hematological neoplasms--a guilty bystander. *Nature reviews. Clinical oncology*, 8 (8): 456-466.

U

- Uchiyama H., Barut B. A., Mohrbacher A. F., Chauhan D., Anderson K. C. (1993). Adhesion of human myeloma-derived cell lines to bone marrow stromal cells stimulates interleukin-6 secretion. *Blood*, 82 (12): 3712-3720.
- Ueda Y., Yang K., Foster S. J., Kondo M., Kelsoe G. (2004). Inflammation controls B lymphopoiesis by regulating chemokine CXCL12 expression. *The Journal of experimental medicine*, 199 (1): 47-58.
- Uehara S., Song K., Farber J. M., Love P. E. (2002). Characterization of CCR9 expression and CCL25/thymus-expressed chemokine responsiveness during T cell development: CD3(high)CD69+ thymocytes and gammadeltaTCR+ thymocytes preferentially respond to CCL25. *Journal of immunology*, 168 (1): 134-142.
- Ueno T., Saito F., Gray D. H., Kuse S., Hieshima K., Nakano H., Kakiuchi T., Lipp M., Boyd R. L., Takahama Y. (2004). CCR7 signals are essential for cortex-medulla migration of developing thymocytes. *The Journal of experimental medicine*, 200 (4): 493-505.
- Ugarte-Berzal E., Bailon E., Amigo-Jimenez I., Vituri C. L., del Cerro M. H., Terol M. J., Albar J. P., Rivas G., Garcia-Marco J. A., Garcia-Pardo A. (2012). A 17-residue sequence from the matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) hemopexin domain binds alpha4beta1 integrin and inhibits MMP-9-induced functions in chronic lymphocytic leukemia B cells. *The Journal of biological chemistry*, 287 (33): 27601-27613.

V

- Vale A. M., Kearney J. F., Nobrega A., Schroeder H. W. 2015. Chapter 7 - Development and Function of B Cell Subsets. in: *Molecular Biology of B Cells (Second Edition)*, (Eds.) F.W. Alt, T. Honjo, A. Radbruch, M. Reth, Academic Press. London, pp. 99-119.
- van Nieuwenhuijzen N., Spaan I., Raymakers R., Peperzak V. (2018). From MGUS to Multiple Myeloma, a paradigm for clonal evolution of premalignant cells. *Cancer Res*, 78 (10): 2449-2456.
- Vanderkerken K., Asosingh K., Braet F., Van Riet I., Van Camp B. (1999). Insulin-Like Growth Factor-1 acts as a chemoattractant factor for 5T2 Multiple Myeloma cells. *Blood*, 93 (1): 235-241.
- Vanhecke D., Verhasselt B., De Smedt M., Leclercq G., Plum J., Vandekerckhove B. (1997). Human thymocytes become lineage committed at an early postselection CD69+ stage, before the onset of functional maturation. *Journal of immunology* 159 (12): 5973-5983.
- Verbrugge S. E., Assaraf Y. G., Dijkmans B. A., Scheffer G. L., Al M., den Uyl D., Oerlemans R., Chan E. T., Kirk C. J., Peters G. J., et al. (2012). Inactivating PSMB5 mutations and P-glycoprotein (multidrug resistance-associated protein/ATP-binding cassette B1) mediate resistance to proteasome inhibitors: ex vivo efficacy of (immuno)proteasome inhibitors in mononuclear blood cells from patients with rheumatoid arthritis. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 341 (1): 174-182.
- Vestweber D. (2015). How leukocytes cross the vascular endothelium. *Nature reviews. Immunology*, 15 (11): 692-704.
- Vicente-Manzanares M., Rey M., Jones D. R., Sancho D., Mellado M., Rodriguez-Frade J. M., del Pozo M. A., Yanez-Mo M., de Ana A. M., Martinez A. C., et al. (1999). Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in stromal cell-derived factor-1 alpha-

induced lymphocyte polarization and chemotaxis. *Journal of immunology*, 163 (7): 4001-4012.

von Andrian U. H., Mackay C. R. (2000). T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *The New England journal of medicine*, 343 (14): 1020-1034.

von Boehmer H. (2014). The thymus in immunity and in malignancy. *Cancer immunology research*, 2 (7): 592-597.

W

Waldschmidt J. M., Simon A., Wider D., Müller S. J., Follo M., Ihorst G., Decker S., Lorenz J., Chatterjee M., Azab A. K., *et al.* (2017). CXCL12 and CXCR7 are relevant targets to reverse cell adhesion-mediated drug resistance in multiple myeloma. *British Journal of Haematology*, 179 (1): 36-49.

Wallington-Beddoe C. T., Sobieraj-Teague M., Kuss B. J., Pitson S. M. (2018). Resistance to proteasome inhibitors and other targeted therapies in myeloma. *British Journal of Haematology*, 182 (1): 11-28.

Wayner E. A., Garcia-Pardo A., Humphries M. J., McDonald J. A., Carter W. G. (1989). Identification and characterization of the T lymphocyte adhesion receptor for an alternative cell attachment domain (CS-1) in plasma fibronectin. *The Journal of Cell Biology*, 109 (3): 1321-1330.

Wegener K. L., Partridge A. W., Han J., Pickford A. R., Liddington R. C., Ginsberg M. H., Campbell I. D. (2007). Structural basis of integrin activation by talin. *Cell*, 128 (1): 171-182.

Wei Q., Frenette P. S. (2018). Niches for Hematopoietic Stem Cells and their progeny. *Immunity*, 48 (4): 632-648.

Weill J. C., Weller S., Reynaud C. A. (2009). Human marginal zone B cells. *Annual review of immunology*, 27: 267-285.

Wernimont S. A., Wiemer A. J., Bennin D. A., Monkley S. J., Ludwig T., Critchley D. R., Huttenlocher A. (2011). Contact-dependent T cell activation and T cell stopping require talin1. *Journal of immunology*, 187 (12): 6256-6267.

Wilson A., Trumpp A. (2006). Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nature reviews. Immunology*, 6 (2): 93-106.

Wilson B. J., Allen J. L., Caswell P. T. (2018). Vesicle trafficking pathways that direct cell migration in 3D matrices and in vivo. *Traffic*, 19 (12): 899-909.

Woolf E., Xiao C., Fainaru O., Lotem J., Rosen D., Negreanu V., Bernstein Y., Goldenberg D., Brenner O., Berke G., *et al.* (2003). Runx3 and Runx1 are required for CD8 T cell development during thymopoiesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100 (13): 7731-7736.

Wright J. J. (2010). Combination therapy of bortezomib with novel targeted agents: an emerging treatment strategy. *Clinical cancer research*, 16 (16): 4094-4104.

Wright N., de Lera T. L., Garcia-Moruja C., Lillo R., Garcia-Sanchez F., Caruz A., Teixidó J. (2003). Transforming growth factor-beta1 down-regulates expression of chemokine stromal cell-derived factor-1: functional consequences in cell migration and adhesion. *Blood*, 102 (6): 1978-1984.

Y

Yamashita I., Nagata T., Tada T., Nakayama T. (1993). CD69 cell surface expression identifies developing thymocytes which audition for T cell antigen receptor-mediated positive selection. *International immunology*, 5 (9): 1139-1150.

- Yanamandra N., Colaco N. M., Parquet N. A., Buzzeo R. W., Boulware D., Wright G., Perez L. E., Dalton W. S., Beaupre D. M. (2006). Tipifarnib and bortezomib are synergistic and overcome cell adhesion-mediated drug resistance in multiple myeloma and acute myeloid leukemia. *Clinical cancer research*, 12 (2): 591-599.
- Yang J., Zhu L., Zhang H., Hirbawi J., Fukuda K., Dwivedi P., Liu J., Byzova T., Plow E. F., Wu J., *et al.* (2014). Conformational activation of talin by RIAM triggers integrin-mediated cell adhesion. *Nature Communications*, 5: 5880.
- Yang J. T., Rayburn H., Hynes R. O. (1995). Cell adhesion events mediated by alpha 4 integrins are essential in placental and cardiac development. *Development*, 121 (2): 549-560.
- Yang Z., Liu S., Zhu M., Zhang H., Wang J., Xu Q., Lin K., Zhou X., Tao M., Li C., *et al.* (2016). PS341 inhibits hepatocellular and colorectal cancer cells through the FOXO3/CTNNB1 signaling pathway. *Scientific reports*, 6.
- Ye F., Kim C., Ginsberg M. H. (2011). Molecular mechanism of inside-out integrin regulation. *Journal of thrombosis and haemostasis*, 9 (Suppl 1): 20-25.
- Yu L., Cecil J., Peng S. B., Schrementi J., Kovacevic S., Paul D., Su E. W., Wang J. (2006). Identification and expression of novel isoforms of human stromal cell-derived factor 1. *Gene*, 374: 174-179.
- Yu Q., Erman B., Bhandoola A., Sharrow S. O., Singer A. (2003). In vitro evidence that cytokine receptor signals are required for differentiation of double positive thymocytes into functionally mature CD8+ T cells. *The Journal of experimental medicine*, 197 (4): 475-487.

Z

- Zarbock A., Ley K., McEver R. P., Hidalgo A. (2011). Leukocyte ligands for endothelial selectins: specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow. *Blood*, 118 (26): 6743-6751.
- Zhang K., Chen J. (2012). The regulation of integrin function by divalent cations. *Cell adhesion & migration*, 6 (1): 20-29.
- Zhang X. A., Hemler M. E. (1999). Interaction of the integrin beta1 cytoplasmic domain with ICAP-1 protein. *The Journal of biological chemistry*, 274 (1): 11-19.
- Zheng Y., Cai Z., Wang S., Zhang X., Qian J., Hong S., Li H., Wang M., Yang J., Yi Q. (2009). Macrophages are an abundant component of myeloma microenvironment and protect myeloma cells from chemotherapy drug-induced apoptosis. *Blood*, 114 (17): 3625-3628.
- Zhu L., Yang J., Bromberger T., Holly A., Lu F., Liu H., Sun K., Klapproth S., Hirbawi J., Byzova T. V., *et al.* (2017). Structure of Rap1b bound to talin reveals a pathway for triggering integrin activation. *Nature Communications*, 8 (1).
- Zlotnik A., Yoshie O. (2012). The chemokine superfamily revisited. *Immunity*, 36 (5): 705-716.
- Zlotnik A., Yoshie O. (2000). Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*, 12 (2): 121-127.
- Zou Y. R., Kottmann A. H., Kuroda M., Taniuchi I., Littman D. R. (1998). Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature*, 393 (6685): 595-599.

ANEXOS

Publicaciones de la autora relacionadas con el trabajo de la Tesis Doctoral:~ **ANEXO I:**

Sevilla-Movilla S., Arellano-Sánchez N., Isern de Val S., Krenn P. W., Fuentes P., Gardeta S. R., Barrio-Alonso C., Crainiciuc G., Hidalgo A., Fässler R., Carrasco Y., Toribio M. L., Teixidó J. ICAP-1 loss affects thymic positive selection causing reduced CD8⁺ cell levels and decreases marginal zone B cells. En preparación.

~ **ANEXO II:**

Martinez-Moreno M., Leiva M., Aguilera-Montilla N., Sevilla-Movilla S., Isern de Val S., Arellano-Sanchez N., Gutierrez N. C., Maldonado R., Martinez-Lopez J., Buno I., *et al.* (2016). In vivo adhesion of malignant B cells to bone marrow microvasculature is regulated by alpha4beta1 cytoplasmic-binding proteins. *Leukemia*, 30 (4): 861-872.

Publicaciones en las que ha colaborado la autora:~ **ANEXO III:**

Teixido J., Martinez-Moreno M., Diaz-Martinez M., Sevilla-Movilla S. (2018). The good and bad faces of the CXCR4 chemokine receptor. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 95: 121-131.

~ **ANEXO VI:**

Sosa-Costa A., Isern de Val S., Sevilla-Movilla S., Borgman K. J., Manzo C., Teixidó J., Garcia-Parajo M. F. (2016). Lateral mobility and nanoscale spatial arrangement of chemokine-activated $\alpha 4 \beta 1$ integrins on T cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 291 (40): 21053-21062.

~ **ANEXO V:**

Dios-Esponera A., Isern de Val S., Sevilla-Movilla S., García-Verdugo R., García-Bernal D., Arellano-Sánchez N., Cabañas C., Teixidó J. (2015) Positive and negative regulation by SLP-76/ADAP and Pyk2 of chemokine-stimulated T-lymphocyte adhesion mediated by integrin $\alpha 4 \beta 1$. *Molecular Biology of the Cell*, 26 (18): 3215-3228.

ANEXO I

ICAP-1 loss affects thymic positive selection causing reduced CD8⁺ cell levels and decreases marginal zone B cells

Short title: ICAP-1 in immune cell adhesion and development

Silvia Sevilla-Movilla¹, Nohemi Arellano-Sánchez¹, Soledad Isern de Val¹, Peter W. Krenn², Patricia Fuentes³, Sofía R. Gardeta⁴, Celia Barrio-Alonso¹, Georgiana Crainiciuc⁵, Andrés Hidalgo⁵, Reinhard Fässler², Yolanda R. Carrasco⁴, Maria L. Toribio³ and Joaquin Teixidó¹

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

²Department of Molecular Medicine, Max Planck Institute of Biochemistry, Martinsried, Germany;

³Department of Cell Biology and Immunology, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Consejo de Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Universidad Autónoma de Madrid (UAM), 28049 Madrid, Spain;

⁴Department on Immunology and Oncology, Centro Nacional de Biotecnología (CNB)-CSIC, Madrid, Spain;

⁵Area of Developmental and Cell Biology, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III (CNIC), Madrid, Spain; and Institute for Cardiovascular Prevention, Ludwig-Maximilians University, Munich, Germany.

Corresponding author: Joaquin Teixidó. Centro de Investigaciones Biológicas, Department of Molecular Biomedicine. Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain. Phone 34-91-8373112; Fax 34-91-5360432; e-mail: joaquin@ Cib.csic.es

Text word count: 3891

Abstract word count: 243

Figures: 6

Tables: 1

Reference count: 65

Scientific Category: Immunobiology and Immunotherapy

ICAP-1 competes with talin and kindlin for binding to the integrin $\beta 1$ subunit, thus potentially inhibiting cell adhesion. The $\alpha 4\beta 1$ integrin is expressed on immune cells and plays important roles in leukocyte trafficking. Here we used ICAP-1-null mice to study the possible ICAP-1 involvement during immune cell adhesion, trafficking and development. The results revealed that ICAP-1 loss affects the thymic positive selection causing a specific reduction of CD8⁺ cell percentages, indicating that ICAP-1 regulates CD8⁺ cell development. Decreased CD8⁺ cell frequencies were also detected in spleen and lymph nodes from ICAP-1-null mice, likely reflecting the reduced thymic CD8⁺ cell numbers. We found that ICAP-1 is preferentially expressed in the nucleus of thymocytes, and we observed in ICAP-1-null thymocytes a direct correlation between lack of ICAP-1 and reduced levels of Runx3, a transcription factor required for CD8⁺ cell generation, suggesting a potential ICAP1 involvement in the regulation of Runx3 expression. Thymocyte adhesion involving $\alpha 4\beta 1$ was comparable between ICAP-1-deficient and control cells. Instead, ICAP-1-null spleen T and B cells displayed an upregulation of adhesion mediated by $\alpha 4\beta 1$, indicating that ICAP-1 negatively controls their attachment. Furthermore, ICAP-1 absence led to a decrease in marginal zone B cell frequencies and to increased follicular B cell percentages. Finally, the hematopoietic stem and progenitor cell compartments, as well as B lymphopoiesis, were not affected by ICAP-1 loss. Together, these data unravel a functional involvement of ICAP-1 in the generation and/or maintenance of CD8⁺ thymocytes and marginal zone B cells.

INTRODUCTION

Integrins are heterodimers of α and β subunits that mediate cell-cell and cell-extracellular matrix (ECM) interactions.^{1,2} Ligand binding to integrins triggers intracellular signaling that can regulate cell growth and survival.^{1,3} Integrins adopt different conformations which determine the state of activation linked to their ability to high-affinity ligand binding (integrin activation).⁴⁻⁸ Integrin activation is a dynamic process that can be achieved by ligand binding or by interaction of the β subunit cytoplasmic domains with specific proteins that promote extension of the integrin extracellular region from a bent inactive conformation.^{4,5} Thus, the cytoplasmic face of the integrin β subunits harbors several binding motifs for proteins which regulate integrin activation, including talin, kindlin, ICAP-1 and filamin.^{4,5,8,9} The binding of talin to membrane-proximal NPXY and kindlin to membrane-distal NPXY motifs in the β subunit cytoplasmic domain triggers the extension of the extracellular heterodimer region together with separation of the transmembrane and cytoplasmic domains of α and β subunits, leading to high-affinity integrin conformations.

The ICAP-1 large isoform, also known as ICAP-1 α or ITGB1BP1, is ubiquitously expressed and contains a C-terminal phosphotyrosine-binding domain that interacts with a valine residue located at position -5 from the NPXY 1 motif.¹⁰⁻¹³ ICAP-1 can compete with talin and kindlin for binding to β subunit cytoplasmic regions, and hence is capable of suppressing integrin activation.^{14,15} ICAP-1 also contains an N-terminal nuclear localization signal (KKRH) enabling its nuclear translocation, with functional consequences for integrin activation.^{16,17} ICAP-1 can interact with β 1, but not β 2, β 3 or β 5 cytoplasmic regions.^{10,11} Another ICAP-1 binding partner is KRIT1 (Krev interaction trapped-1; also known as CCM1), a protein containing three NPX(Y/F) motifs of which the first one mediates interaction with ICAP-1.^{18,19} Of note, ICAP-1/KRIT1 binding blocks ICAP-1 interaction with β 1, resulting in upregulated integrin activation.^{17,19,20}

Characterization of ICAP-1-null mice revealed a defective osteoblastic function, and showed that ICAP-1-deficient osteoblasts adopt fibronectin receptors in an active conformation leading to increased cell adhesion to fibronectin.²¹ Furthermore, we recently reported that ICAP-1-silenced multiple myeloma cells display upregulated adhesion to the α 4 β 1 integrin ligands VCAM-1 and the CS-1 region of fibronectin (CS-1/FN).²²

Immune cells and bone marrow (BM) hematopoietic progenitor cells (HPCs) express several β 1-class integrins, especially α 4 β 1. This integrin mediates cell trafficking to sites of inflammation and can contribute to migration to lymphoid tissues.²³ Given that ICAP-1 can compete with talin and kindlin proteins for modulation of β 1 integrin activation, we hypothesized that ICAP-1 might regulate the immune cell trafficking and function. In the present work we directly tested this hypothesis in ICAP-1-knockout mice.

MATERIALS AND METHODS

Mice. ICAP^{+/-} mice were intercrossed to generate ICAP^{-/-} mice that were genotyped by PCR as described.²¹ Confirmation of ICAP-1 deletion was further assessed by immunoblotting with anti-ICAP-1 antibodies (a gift of Drs. Daniel Bouvard; and Corinne Albiges-Rizo, Institute for Advanced Biosciences, La Tronche, France). Spleens, lymph nodes, thymus and BM were obtained from 3-5- or 8-10-week old mice. BM samples were obtained from femur and tibia by washing the bone with PBS. Tissues were disrupted on a 40 µm nylon filter (Life Sciences, Falcon, New York, USA) to obtain single cell suspensions. When needed, erythrocytes were lysed on ice with lysis buffer (NH₄Cl 170 mM, KHCO₃ 12 mM, EDTA 50 mM). Peripheral blood (PB) harvested into PBS-EDTA was obtained either from the heart or the retro orbital sinuses. CD3⁺ T cell populations from spleens were enriched by density gradient and negative selection following manufacturer's indications (EasySep, Stem Cell Technologies, Canada) (purity>85-90%). CD19⁺ B cells were isolated (purity >90%) by cell depletion using mouse pan-T Dynabeads (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) of mononuclear splenocytes (Lympholyte gradient purification, Cedarlane Laboratories, Burlington, Canada). Mice were kept under specific pathogen-free conditions at the animal facility of the Centro de Investigaciones Biológicas, and all mouse experiments were approved by the Consejo Superior de Investigaciones Científicas Ethics Committee (Madrid, Spain).

Cell adhesion assays. Static and flow chamber adhesion assays to α4β1 ligands were carried out as described,²⁴ and detailed in supplemental Methods.

Flow cytometry. When required, cells were pre-incubated for 10 min on ice with Fc receptor-blocking antibody (BD Biosciences) in FACS buffer (PBS with 1% FBS and sodium azide). Then, cells were stained for 30 min on ice with the corresponding purified or fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies, followed by incubation with secondary antibodies or streptavidin-conjugated fluorochromes. Purified or conjugated Rat IgG2b, κ and Armenian Hamster IgG were used as isotype controls. The antibodies used for flow cytometry are listed in Table S1 (*SI Appendix*). Samples were analyzed either with a Coulter Epics XL, a FC500 (Beckman Coulter) or a Becton Dickinson LSRII flow cytometers. We used CXP and FlowLogic software for analysis of flow cytometry data.

Statistical analyses. Analyses were performed with GraphPad Prism 5. Outliers according to the Grubbs' test were excluded. Two groups of normally distributed data were compared using the paired and unpaired *t* test. Results were considered significantly different when *p*<0.05. Non-significant differences were marked as ns. Error bars show ±SD.

Data Sharing Statement. For original data, please contact: joaquin@cib.csic.es

RESULTS

Adhesion properties of ICAP-1-null lymphocytes. ICAP-1^{-/-} splenocytes displayed talin and kindlin-3 electrophoretic patterns and expression levels similar to control splenocytes (Fig. 1A, left and right). The mean fluorescence intensity (MFI) values of surface $\beta 1$ integrin were comparable on CD4⁺ and CD8⁺ T cells from spleens of ICAP-1^{-/-} and ICAP-1^{+/+} mice (Fig. 1B). A small and non-significant increase of $\beta 1$ expression on ICAP-1-null spleen B220⁺ B cells was observed (Fig. 1B), but it was not linked to changes in $\alpha 4$ integrin subunit levels (*SI Appendix*, Fig. S1A). A minimal enhancement in $\alpha 4$ MFI values on ICAP-1^{-/-} CD8⁺ splenocytes was detected (*SI Appendix*, Fig. S1A), but it was not associated with increased $\beta 1$ expression (Fig. 1B). These data indicate that $\alpha 4\beta 1$ expression was comparable on ICAP-1^{-/-} and ICAP-1^{+/+} B and T splenocytes. Of note, total splenocytes as well as spleen-derived CD3⁺ T cells and CD19⁺ B cells from ICAP-1-deficient mice displayed stronger $\alpha 4\beta 1$ -mediated adhesion to VCAM-1 and to CS-1/FN than control cells (Fig. 1C). In support of lack of ICAP-1 binding to and regulation of $\beta 2$ integrins,^{10,11} there were no significant changes in cell adhesion to ICAM-1 (Fig. 1C). Results from adhesion assays performed under shear stress measuring cells that adhered to VCAM-1 co-immobilized with CXCL12 showed higher numbers of stably arrested ICAP-1^{-/-} cells than control cells (Fig. 1D), confirming a key role for ICAP-1 in negatively regulating $\alpha 4\beta 1$ -dependent cell attachment.

Next, we determined the activation state of $\beta 1$ integrin by using the 9EG7 mAb, which binds to an activation-induced epitope in $\beta 1$ integrins.²⁵ In agreement with data obtained with ICAP-1-null osteoblasts and fibroblasts,²¹ 9EG7 showed stronger binding to ICAP-1^{-/-} splenocytes than to control counterparts (Fig. 1E), indicating that ICAP-1 also negatively controls $\beta 1$ integrin affinity of splenocytes. Along the adhesion process, cells undergo adhesion strengthening followed by spreading. Both ICAP-1^{-/-} and ICAP-1^{+/+} cells exhibited similar spreading ability on VCAM-1/CXCL12 (*SI Appendix*, Fig. S1B), suggesting that ICAP-1 is not involved in post-ligand binding events such as cell spreading mediated by $\alpha 4\beta 1$.

Analysis of the competitive migration to spleen of differentially-labelled control and ICAP-1-null splenocytes revealed only a small increase in homing of ICAP-1^{-/-} relative to ICAP-1^{+/+} cells (Fig. 1F, left), whereas the number of splenocytes migrating to lymph nodes (LNs) or remaining in peripheral blood (PB) was slightly reduced (Fig. 1F, middle and right). These minor homing differences likely reflect previous observations revealing that $\alpha 4\beta 1$ does not play major roles in lymphocyte homing to spleen.^{26,27} As $\alpha 4$ integrins contribute to T lymphocyte migration to thioglycolate (TG)-inflamed peritoneum likely involving $\alpha 4\beta 1$ -VCAM-1 interactions,²⁸ we investigated whether lack of ICAP-1 could alter T cell trafficking in the TG-induced peritonitis inflammation model. Although the total cell numbers in the peritoneal lavage of PBS (control) and TG-treated ICAP-1^{+/+} and ICAP-1^{-/-} mice were similar (not shown), CD4⁺ and CD8⁺ T cell content in the lavage of TG-exposed mice differed moderately between the genotypes. The variations, however, did not reach statistical significance (Fig. 1G).

ICAP-1 deficiency alters CD8⁺ T cell development. ICAP-1 was expressed in the thymus of ICAP-1^{+/+} mice and was absent in ICAP-1-null littermates (*SI Appendix*, Fig. S2A). Confirming earlier results,²¹ ICAP-1^{-/-} mice were smaller than control animals, which was more evident at 3-5 weeks of age (*SI Appendix*, Fig. S2B). ICAP-1^{-/-} thymi were smaller than those from control animals, especially in younger mice, and consistently, total thymus cellularity was significantly reduced (Fig. 2A). Interestingly, percentages of CD8⁺ single positive (SP) thymocytes were lower in ICAP-1^{-/-} than in control thymi, whereas frequencies of CD4⁻CD8⁻ double negative (DN), CD4⁺CD8⁺ double positive (DP) and CD4⁺ SP cells were not significantly altered (Fig. 2B), suggesting a specific defect in CD8⁺ SP cell generation. Accordingly, although the total numbers of DP and CD4⁺ and CD8⁺ SP cells were reduced in ICAP-1^{-/-} thymi (*SI Appendix*, Fig. S2C), reflecting the decreased total thymus cellularity, the reduction was particularly marked in CD8⁺ SP cells. These data strongly suggest that lack of ICAP-1 expression specifically alters the selection and intrathymic development from the DP to the CD8⁺ cell subset.

The expression of CD69 is a hallmark at the beginning of the positive selection process that takes place at the TCR $\alpha\beta$ ⁺ DP stage and results in the generation of CD4⁺ and CD8⁺ SP thymocytes.²⁹⁻³¹ A remarkable reduction of CD69^{hi} cell percentage was detected in TCR $\alpha\beta$ ⁺CD8⁺ SP cells from ICAP-1^{-/-} mice relative to control counterparts (Fig. 2C). A minor decrease in CD69^{hi} cells was also seen in TCR $\alpha\beta$ ⁺CD4⁺ SP cells from ICAP-1-null mice. These results confirm that loss of ICAP-1 affects the positive selection of CD8⁺ SP thymocytes, thus indicating that ICAP-1 regulates CD8⁺ T cell development. Determination of proliferation rates of thymocyte subsets revealed that proliferation was not affected by the lack of ICAP-1 (Fig. 2B).

Lack of ICAP-1 expression in thymic cells did not affect their talin, kindlin-3 and β 1 integrin electrophoretic pattern (*SI Appendix*, Fig. S2D). Minor increases in β 1 membrane expression on ICAP-1^{-/-} DN and CD8⁺ SP thymocytes from 3-5 week-old, but not on 8-10 week-old animals were detected (Fig. 2E; *SI Appendix*, Fig. S2E). Adhesion mediated by α 4 β 1 contributes to thymocyte positioning at different thymic compartments,³² although several α 4-deficient mouse models revealed that α 4 integrins are not required for T cell differentiation in the thymus.³³⁻³⁵ Both ICAP-1^{+/+} and ICAP-1^{-/-} total thymocytes (85-90% DP cells) displayed similar adhesion levels to CS-1/FN, regardless of whether adhesion times were short (2-4 min; Fig. 2F) or longer (20-30 min, not shown).

Interaction of chemokines with their receptors is essential for thymocyte trafficking and for exposing thymocytes to distinct developmental stimuli.^{36,37} CCR7, CXCR4 and CCR9 are main chemokine receptors differentially expressed on thymocytes, and therefore we determined their expression on thymocyte subpopulations. CCR7 mediates cortex to medulla migration after positive selection via interaction with CCL19 and CCL21, which are expressed in the medulla.^{38,39} Minor reductions in CCR7 expression were detected on CD4⁺ SP cells from ICAP-1^{-/-} mice, whereas its expression was not altered in other thymocyte subsets (Fig. 2G; *SI Appendix*, Fig. S2F). CCR9 facilitates DN cell movement to the subcapsular zone,^{40,41} whereas

CXCR4 contributes to DP thymocyte retention in the cortex.^{42,43} CCR9 levels were mostly unchanged on the thymocyte subpopulations, and CXCR4 expression was detected on DP cells, with similar levels on ICAP-1^{-/-} and ICAP-1^{+/+} cells (Fig. 2G; *SI Appendix*, Fig. S2F). The minimal variations in chemokine receptor expression on the different thymocyte subpopulations between control and ICAP-1-null mice suggest that the reduced CD8⁺ cell development in ICAP-1^{-/-} mice is not grossly contributed by changes in thymocyte trafficking. Yet, we cannot rule out whether potential alterations in CCL19/21 and/or CXCL12 expression in ICAP-1^{-/-} mice could perturb the migration of thymocytes and influence their development.

In addition to bind β 1 and to localize to the cell membrane, ICAP-1 bears a nuclear localization signal which mediates its export to the nucleus.^{16,17} Remarkably, ICAP-1 displayed a preferential nuclear distribution in thymocytes compared to splenocytes, which showed small differences between cytoplasmic and nuclear ICAP-1 distribution (Fig. 3A). These data raised the possibility of a potential involvement of nuclear ICAP-1 in CD8⁺ SP development. Interestingly, expression of *RUNX3*, a transcription factor required for CD8⁺ cell generation,⁴⁴⁻⁴⁶ was significantly reduced in ICAP-1-null thymus, whereas expression of *THPOK*, *GATA3* and *SOCS1*, transcription factors controlling CD4⁺ cell production,⁴⁷⁻⁵⁰ was mostly comparable between ICAP-1^{-/-} and control cells (Fig. 3B; *SI Appendix*, Fig. S2G). There was a small decrease in the expression in ICAP-1^{-/-} cells of *IL-7R*, an upstream regulator of Runx3,^{45,51,52} but it did not reach statistical significance, and no altered *ETS1* expression was observed (Fig. 3B). Expression of *c-MYC*, whose promoter is a target of nuclear ICAP-1,¹⁶ was similar between control and ICAP-1-deficient cells (*SI Appendix*, Fig. S2G). Of note, the reduced *RUNX3* expression in ICAP-1-null thymus was associated with decreased Runx3 protein levels (Fig. 3C), therefore raising the possibility that Runx3 reduction might underlie the altered CD8⁺ cell development seen in ICAP-1^{-/-} mice.

Decrease in spleen CD8⁺ cell frequency in ICAP-1-null mice. Similar to thymus, 3-5 week-old ICAP-1^{-/-} spleens were smaller than control animals (Fig. 4A, top). Accordingly, ICAP-1-deficient spleens as well as LNs, displayed a decrease in total cellularity relative to ICAP-1^{+/+} mice (Fig. 4A, bottom). No major differences in their spleen sizes were observed at 8-10 weeks, and their total cell numbers were comparable. Analogous to ICAP-1^{-/-} thymus, CD8⁺ cell percentages were significantly diminished in spleens and LNs from ICAP-1-null compared with control mice (Fig. 4B). Correlating with reduced CD8⁺ cell frequency, an increase in CD4⁺ cell percentages in 8-10 week-old spleens was detected. Analysis of PB showed higher CD8⁺ cell frequencies in 3-5 week-old ICAP-1^{-/-} mice than to control littermates, but not in older animals (Fig. 4C).

Similar to the increased β 1 expression seen in some thymocyte populations in 3-5 week-old ICAP-1-null mice (see Fig. 3B), we also detected small enhancements in β 1 levels in spleen CD4⁺ and CD8⁺ cells from young mice (Fig. 4D), but no alterations in α 4 integrin expression (not shown).

Normal hematopoietic stem and progenitor cell populations, and unaltered B lymphopoiesis in the bone marrow of ICAP-1-null mice. *ICAP-1* is expressed in BM

hematopoietic stem cells (HSC) (Gene Expression Commons, <http://gecx.stanford.edu>, and GEO GSE77078).⁵³ To study if ICAP-1 loss affected the HSC and hematopoietic progenitor cell (HPC) populations in BM, committed cells were first removed from subsequent FACS analyses by using a combination of antibodies against hematopoietic lineage-specific cell surface antigens (CD3, CD45R/B220, CD11b, TER-119 and Ly-G6/Gr-1). After selecting the lineage negative population (Lin⁻) harboring HSCs and HPCs, expression of HSCs markers was analyzed. There were no remarkable differences in total LSK (Lin⁻ Sca-1⁺ c-Kit⁺) cell populations between ICAP-1^{+/+} and ICAP-1^{-/-} mice (Fig. 5A). HSCs are characterized by the expression of CD150 and lack of CD48.^{54,55} Analysis of selected CD48⁻CD150⁺ BM cell populations (MPP1: Lin⁻ Sca-1⁺ c-Kit⁺ CD34⁺ CD48⁻ CD150⁺) revealed no significant differences between ICAP-1^{+/+} and ICAP-1^{-/-} mice (Fig. 5B, left panel), indicating that lack of ICAP-1 expression does not affect the MPP1 compartment. In addition, neither MPP2 (Lin⁻ Sca-1⁺ c-Kit⁺ CD34⁺ CD48⁺ CD150⁺) or MPP3/4 (Lin⁻ Sca-1⁺ c-Kit⁺ CD34⁺ CD48⁺ CD150⁻) cell populations displayed significant differences between both mice groups (Fig. 5B, middle and right panels). Together, these results reveal that there is no enrichment or depletion of HSPCs at any stage downstream in the differentiation program.

The frequency of B220⁺ BM cells was similar in control and ICAP-1^{-/-} mice (Fig. 5C), and their β 1 surface levels were comparable (*SI Appendix*, Fig. S3A). Furthermore, based on B220/CD43 and B220/CD25 expression, we found no remarkable differences in the proB and preB cell distribution, and in immature and recirculating mature B cells, according to IgM and IgD expression levels (Fig. 5D; *SI Appendix*, Fig. S3B).

Altered frequencies of mature marginal zone and follicular B cells in spleen of ICAP-1-deficient mice. B220⁺ cell percentages in spleen, LNs and PB from ICAP-1^{-/-} mice were similar to those from control animals (Fig. 6A). Reflecting the reduced total cell numbers in spleens from 3-5 week-old ICAP-1-null mice (see Fig. 4A, bottom), decreased B220⁺ cell numbers were detected in these mice, but not in older ones (*SI Appendix*, Fig. S4A). B220⁺ splenocytes from 3-5 week-old ICAP-1^{-/-} mice displayed a small increase in β 1 surface levels (Fig. 6B), similar to CD4⁺ and CD8⁺ splenocytes (see Fig. 4D), while β 4 expression was comparable with ICAP-1^{+/+} cells (*SI Appendix*, Fig. S4B).

B cells in the spleen undergo transitional stages into mature follicular (FO) or MZ B cells.⁵⁶ The latter express high levels of surface IgM and low amounts of IgD and do not recirculate between lymphoid organs and blood, but shuttle between the MZ and the follicles.^{56,57} Instead, FO B cells traffic to the follicles and display a recirculating phenotype, predominantly expressing medium/low IgM levels and high IgD amounts. The percentage of CD19⁺ spleen B cells displaying a IgM^{high}/IgD^{low} MZ-like phenotype significantly decreased in ICAP-1-null mice relative to control littermates, whereas higher IgM^{med/low}/IgD^{hi} FO cell frequencies in the ICAP-1^{-/-} (85-90%) than in ICAP-1^{+/+} (75-80%) mice were observed (Fig. 6C). We further evaluated the MZ and FO cell populations based on the expression of CD21 and CD23. The analysis of these markers in CD19⁺ spleen B cells revealed reduced CD21^{high}CD23⁻ percentage of MZ cells and enhanced CD21⁺CD23⁺ FO cells in the ICAP-1^{-/-} mice (Fig. 6D). The altered frequencies

of ICAP-1-null MZ and FO B cells, linked to the up-regulated adhesion of ICAP-1-deficient spleen B cells (see Fig. 1C), raise the possibility that B cell positioning within the spleen for controlled B cell maturation might be regulated by ICAP-1.

Unaltered neutrophil distribution in spleen and bone marrow of ICAP-1-deficient mice, and normal leukocyte counts in peripheral blood. The percentage of neutrophils in the spleen and BM from ICAP-1^{-/-} mice was comparable to control counterparts (*SI Appendix*, Fig. S5). To determine if absence of ICAP-1 influenced the PB counts of young adult (9-12 week-old) mice, we analyzed a wide range of cellular blood components. Data revealed no major alterations in ICAP-1-null PB cellular counts and haemoglobin levels compared to control animals (*SI Appendix*, Table S1).

DISCUSSION

ICAP-1 can regulate cell adhesion by binding to the cytoplasmic domain of $\beta 1$ integrin subunits.¹³ As $\alpha 4\beta 1$ is a main $\beta 1$ integrin expressed by immune cells, here we have characterized their development in mice lacking ICAP-1. The results revealed that ICAP-1 absence affects positive selection of $CD8^+$ thymocytes, as indicated by a specific reduction of $CD8^+$ cell numbers, therefore unveiling an ICAP-1 involvement in $CD8^+$ cell development in the thymus. Adhesion assays to $\alpha 4\beta 1$ ligands using unselected thymocytes (mostly DP) showed similar attachment levels between ICAP-1^{-/-} and control thymocytes, suggesting that the altered positive selection is independent of potential adhesion changes. We have not determined if ICAP-1 absence in DN, $CD4^+$ and $CD8^+$ SP thymocyte subsets affects their $\alpha 4\beta 1$ -dependent attachment, and therefore, we cannot exclude that ICAP-1-null thymocyte subsets distinct from DP cells might have altered attachment. Previous studies revealed that ICAP-1^{-/-} osteoblasts have decreased proliferation.²¹ We found that the reduced $CD8^+$ SP thymocyte frequency was not associated with diminished proliferation, suggesting that ICAP-1-regulated proliferation might be cell type-context dependent.

Positive selection involves the interaction of TCRs on DP thymocytes with self-peptides presented by MHC molecules on thymic epithelial cells.^{58,59} These interactions regulate the expression of transcription factors that ultimately direct cell fates towards the $CD4^+$ or $CD8^+$ lineages. The transcription factor Runx3 is required for $CD8^+$ cell development from DP cells, and its expression is controlled by IL-7 which in combination with IL-15 specifies the $CD8^+$ lineage.^{44-46,48,60} We show that ICAP-1 is preferentially expressed in the nucleus of thymocytes, a finding in line with previous observations of ICAP-1 nuclear localization in fibroblasts and epithelial cells, with functional consequences on the transcriptional activity of c-Myc promoters.¹⁶ Remarkably, we obtained a direct correlation between lack of ICAP-1 and reduced Runx3 mRNA and protein levels in ICAP-1-null thymocytes. These data raise the possibility of a potential involvement of nuclear ICAP1 in the regulation of Runx3 expression, which could be behind the altered positive selection of $CD8^+$ thymocytes in ICAP-1^{-/-} mice. Of note, decreased expression of the bone marker *RUNX2* was also observed in ICAP-1-null mice.²¹ Whether the unaltered $\alpha 4\beta 1$ -mediated adhesion of ICAP-1-deficient thymocytes is based on the preferential ICAP-1 nuclear localization, is a possibility that deserves further studies.

Unlike thymocytes, ICAP-1^{-/-} spleen T and B cells displayed an increase in $\beta 1$ integrin affinity and upregulated adhesion mediated by $\alpha 4\beta 1$, indicating that ICAP-1 negatively controls their attachment. We observed minor increases of $\beta 1$ expression on the membrane of spleen T and B cells from 3-5 week-old, but not from 8-10 week-old mice. The basis for the augmented $\beta 1$ expression is not known at present. ICAP-1 displayed a comparable distribution between cytoplasm and nucleus in spleen cells, a fact that might contribute to the regulation of $\alpha 4\beta 1$ -mediated adhesion of these cells compared to thymic cells. Another possible clue for the distinct regulation of adhesion by ICAP-1 in these different cell types might come from potentially different expression levels and cellular distribution of the ICAP-1-binding partner Krit1 between these cells.

The increased $\alpha 4\beta 1$ -mediated adhesion of ICAP-1^{-/-} spleen T cells could open the possibility that higher number of T cells might be retained in the spleen T-cell zone. However, this was not the case for CD8⁺ cells, as their diminished frequencies in the spleens as well as in the LNs of ICAP-1^{-/-} mice most likely reflect the reduced CD8⁺ cell numbers from their thymi. Nonetheless, we cannot exclude intrinsic alterations in trafficking to and within these lymphoid organs, as we detected increased PB CD8⁺ cell percentages in ICAP-1^{-/-} mice linked to the reduced CD8⁺ cell numbers in spleen and LNs.

Associated with spleen B cell upregulated attachment to $\alpha 4\beta 1$ ligands, a remarkable decrease in MZ B cell frequencies was found in ICAP-1-null mice, whereas FO B cells displayed a moderate increase. Retention of MZ B cells in the marginal zone depends on $\alpha 4\beta 1$ and $\alpha L\beta 2$, whereas these integrins are not required for FO B cell lodging in the follicles.⁶¹ The frequency of mature (IgM^{med-low}IgD^{high}) B cells in the BM was similar between ICAP-1^{-/-} and control mice, indicating that enhanced FO B cell percentages in ICAP-1-deficient spleens do not lead to their increased recirculation to BM. An enhanced $\alpha 4\beta 1$ -dependent MZ B cell adhesion could theoretically augment their retention in the marginal zone, causing a reduction in their shuttling to the follicles, although total cell numbers should not change. We have not tested if reduced MZ B cell frequency is associated with perturbed distribution of these cells in the different spleen compartments. Regulated cell trafficking in the spleen is one of the several mechanisms controlling MZ B cell maturation.⁵⁶ These mechanisms are dictated by commitment signals to a MZ B cell fate, such as those depending on the strength of BCR signaling, Notch2 activity, BAFF-BAFFR interactions and the NF- κ B pathway.^{56,62-65} Whether any of such processes is perturbed in ICAP-1^{-/-} spleens dependently or independently of the altered $\alpha 4\beta 1$ -mediated B cell adhesion, or if inhibition in MZ B cell generation from their precursors (IgM^{hi}IgD^{hi}CD21^{hi}CD1d^{hi}CD23⁺) takes place, warrants further studies.

The HSC and HPC compartments as well as B lymphopoiesis were not affected by ICAP-1 loss, and adult ICAP-1-null mice (>9 weeks) displayed no remarkable changes in leukocyte numbers in their PB. These results indicate that under controlled sterile conditions, the absence of ICAP-1 does not grossly impair the generation of the different immune cell types in adult mice. In addition, the modest alterations in migration to spleen and LNs, and to TG-inflamed peritoneum shown by ICAP-1^{-/-} lymphocytes indicate that ICAP-1 does not importantly contribute to these homing events. Our results open the way for future research focusing on the mechanisms of the developmental processes regulated by ICAP-1.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Drs. Corinne Albiges-Rizo, Daniel Bouvard and Patricio Aller for providing useful reagents for this work. Dr. Pedro Lastres is acknowledged for help in flow cytometry, Guillermo Padilla Alonso for bioinformatics analyses, and Francisco Casado-Robledillo and Olivia Barcón-Minchán for assistance in the Animal Facility. This work was supported by grants SAF2014-53059-R and SAF2017-85146-R from the Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (MCIU) to J.T, SAF2016-75442-R from MCIU to M.L.T, BFU2013-48828-P from MCIU to Y.R.C., ERC Synergy Grant (2018) to R.F., and RTI2018-095497-B-I00 from MCIU to A.H.

AUTHORSHIP

Contribution: S.S-M, S.I.V, P.W.K, P.F., A.H., R.F., Y.R.C., M.L.T and J.T. designed and performed experiments. N.A-S, S.R.G., C.B-A and G.K performed experiments. S.S-M, S.I.V, P.W.K, P.F., A.H., Y.R.C., M.L.T and J.T. analyzed the results. S.S-M, S.I.V, P.W.K, P.F. Y.R.C., M.L.T and J.T. made the figures. A.H., R.F., Y.R.C., M.L.T and J.T. designed the research and wrote the paper.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Joaquin Teixidó. Centro de Investigaciones Biológicas, Department of Molecular Biomedicine. Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain. Phone 34-91-8373112; Fax 34-91-5360432; e-mail: joaquin@cib.csic.es

REFERENCES

1. Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*. 2002;110(6):673-687.
2. Hamidi H, Ivaska J. Every step of the way: integrins in cancer progression and metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2018.
3. Schwartz MA, Ginsberg MH. Networks and crosstalk: integrin signalling spreads. *Nat Cell Biol*. 2002;4(4):E65-68.
4. Kim C, Ye F, Ginsberg MH. Regulation of integrin activation. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2011;27:321-345.
5. Calderwood DA, Campbell ID, Critchley DR. Talins and kindlins: partners in integrin-mediated adhesion. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013;14(8):503-517.
6. Moser M, Legate KR, Zent R, Fassler R. The tail of integrins, talin, and kindlins. *Science*. 2009;324(5929):895-899.
7. Carman CV, Springer TA. Integrin avidity regulation: are changes in affinity and conformation underemphasized? *Curr Opin Cell Biol*. 2003;15(5):547-556.
8. Sun Z, Costell M, Fassler R. Integrin activation by talin, kindlin and mechanical forces. *Nat Cell Biol*. 2019;21(1):25-31.
9. Bouvard D, Pouwels J, De Franceschi N, Ivaska J. Integrin inactivators: balancing cellular functions in vitro and in vivo. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013;14(7):430-442.
10. Chang DD, Wong C, Smith H, Liu J. ICAP-1, a novel beta1 integrin cytoplasmic domain-associated protein, binds to a conserved and functionally important NPXY sequence motif of beta1 integrin. *J Cell Biol*. 1997;138(5):1149-1157.
11. Zhang XA, Hemler ME. Interaction of the integrin beta1 cytoplasmic domain with ICAP-1 protein. *J Biol Chem*. 1999;274(1):11-19.
12. Chang DD, Hoang BQ, Liu J, Springer TA. Molecular basis for interaction between Icap1 alpha PTB domain and beta 1 integrin. *J Biol Chem*. 2002;277(10):8140-8145.
13. Bouvard D, Millon-Fremillon A, Dupe-Manet S, Block MR, Albiges-Rizo C. Unraveling ICAP-1 function: toward a new direction? *Eur J Cell Biol*. 2006;85(3-4):275-282.
14. Bouvard D, Vignoud L, Dupe-Manet S, et al. Disruption of focal adhesions by integrin cytoplasmic domain-associated protein-1 alpha. *J Biol Chem*. 2003;278(8):6567-6574.
15. Brunner M, Millon-Fremillon A, Chevalier G, et al. Osteoblast mineralization requires beta1 integrin/ICAP-1-dependent fibronectin deposition. *J Cell Biol*. 2011;194(2):307-322.
16. Fournier HN, Dupe-Manet S, Bouvard D, et al. Nuclear translocation of integrin cytoplasmic domain-associated protein 1 stimulates cellular proliferation. *Mol Biol Cell*. 2005;16(4):1859-1871.
17. Draheim KM, Huet-Calderwood C, Simon B, Calderwood DA. Nuclear Localization of Integrin Cytoplasmic Domain-associated Protein-1 (ICAP1) Influences beta1 Integrin Activation and Recruits Krev/Interaction Trapped-1 (KRIT1) to the Nucleus. *J Biol Chem*. 2017;292(5):1884-1898.

18. Zhang J, Clatterbuck RE, Rigamonti D, Chang DD, Dietz HC. Interaction between krit1 and icap1alpha infers perturbation of integrin beta1-mediated angiogenesis in the pathogenesis of cerebral cavernous malformation. *Hum Mol Genet.* 2001;10(25):2953-2960.
19. Liu W, Draheim KM, Zhang R, Calderwood DA, Boggon TJ. Mechanism for KRIT1 release of ICAP1-mediated suppression of integrin activation. *Mol Cell.* 2013;49(4):719-729.
20. Faurobert E, Rome C, Lisowska J, et al. CCM1-ICAP-1 complex controls beta1 integrin-dependent endothelial contractility and fibronectin remodeling. *J Cell Biol.* 2013;202(3):545-561.
21. Bouvard D, Aszodi A, Kostka G, Block MR, Albiges-Rizo C, Fassler R. Defective osteoblast function in ICAP-1-deficient mice. *Development.* 2007;134(14):2615-2625.
22. Martinez-Moreno M, Leiva M, Aguilera-Montilla N, et al. In vivo adhesion of malignant B cells to bone marrow microvasculature is regulated by alpha4beta1 cytoplasmic-binding proteins. *Leukemia.* 2016;30(4):861-872.
23. Rose DM, Han J, Ginsberg MH. Alpha4 integrins and the immune response. *Immunol Rev.* 2002;186:118-124.
24. Garcia-Bernal D, Wright N, Sotillo-Mallo E, et al. Vav1 and Rac Control Chemokine-promoted T Lymphocyte Adhesion Mediated by the Integrin {alpha}4{beta}1. *Mol Biol Cell.* 2005;16(7):3223-3235.
25. Lenter M, Uhlig H, Hamann A, Jeno P, Imhof B, Vestweber D. A monoclonal antibody against an activation epitope on mouse integrin chain beta 1 blocks adhesion of lymphocytes to the endothelial integrin alpha 6 beta 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(19):9051-9055.
26. Berlin-Rufenach C, Otto F, Mathies M, et al. Lymphocyte migration in lymphocyte function-associated antigen (LFA)-1-deficient mice. *J Exp Med.* 1999;189(9):1467-1478.
27. Lo CG, Lu TT, Cyster JG. Integrin-dependence of lymphocyte entry into the splenic white pulp. *J Exp Med.* 2003;197(3):353-361.
28. Arroyo AG, Taverna D, Whittaker CA, et al. In vivo roles of integrins during leukocyte development and traffic: insights from the analysis of mice chimeric for alpha 5, alpha v, and alpha 4 integrins. *J Immunol.* 2000;165(8):4667-4675.
29. Yamashita I, Nagata T, Tada T, Nakayama T. CD69 cell surface expression identifies developing thymocytes which audition for T cell antigen receptor-mediated positive selection. *Int Immunol.* 1993;5(9):1139-1150.
30. Vanhecke D, Verhasselt B, De Smedt M, Leclercq G, Plum J, Vandekerckhove B. Human thymocytes become lineage committed at an early postselection CD69+ stage, before the onset of functional maturation. *J Immunol.* 1997;159(12):5973-5983.
31. Hare KJ, Jenkinson EJ, Anderson G. CD69 expression discriminates MHC-dependent and -independent stages of thymocyte positive selection. *J Immunol.* 1999;162(7):3978-3983.
32. Salomon DR, Crisa L, Mojciak CF, Ishii JK, Klier G, Shevach EM. Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed by cortical thymic epithelial cells and mediates

thymocyte adhesion. Implications for the function of alpha4beta1 (VLA4) integrin in T-cell development. *Blood*. 1997;89(7):2461-2471.

33. Arroyo AG, Yang JT, Rayburn H, Hynes RO. Differential requirements for alpha4 integrins during fetal and adult hematopoiesis. *Cell*. 1996;85(7):997-1008.

34. Bungartz G, Stiller S, Bauer M, et al. Adult murine hematopoiesis can proceed without beta1 and beta7 integrins. *Blood*. 2006;108(6):1857-1864.

35. Gribi R, Hook L, Ure J, Medvinsky A. The differentiation program of embryonic definitive hematopoietic stem cells is largely alpha4 integrin independent. *Blood*. 2006;108(2):501-509.

36. Schulz O, Hammerschmidt SI, Moschovakis GL, Forster R. Chemokines and Chemokine Receptors in Lymphoid Tissue Dynamics. *Annu Rev Immunol*. 2016;34:203-242.

37. Love PE, Bhandoola A. Signal integration and crosstalk during thymocyte migration and emigration. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(7):469-477.

38. Kwan J, Killeen N. CCR7 directs the migration of thymocytes into the thymic medulla. *J Immunol*. 2004;172(7):3999-4007.

39. Ueno T, Saito F, Gray DH, et al. CCR7 signals are essential for cortex-medulla migration of developing thymocytes. *J Exp Med*. 2004;200(4):493-505.

40. Carramolino L, Zaballos A, Kremer L, et al. Expression of CCR9 beta-chemokine receptor is modulated in thymocyte differentiation and is selectively maintained in CD8(+) T cells from secondary lymphoid organs. *Blood*. 2001;97(4):850-857.

41. Uehara S, Song K, Farber JM, Love PE. Characterization of CCR9 expression and CCL25/thymus-expressed chemokine responsiveness during T cell development: CD3(high)CD69+ thymocytes and gamma delta TCR+ thymocytes preferentially respond to CCL25. *J Immunol*. 2002;168(1):134-142.

42. Berkowitz RD, Beckerman KP, Schall TJ, McCune JM. CXCR4 and CCR5 expression delineates targets for HIV-1 disruption of T cell differentiation. *J Immunol*. 1998;161(7):3702-3710.

43. Suzuki G, Sawa H, Kobayashi Y, et al. Pertussis toxin-sensitive signal controls the trafficking of thymocytes across the corticomedullary junction in the thymus. *J Immunol*. 1999;162(10):5981-5985.

44. Taniuchi I, Osato M, Egawa T, et al. Differential requirements for Runx proteins in CD4 repression and epigenetic silencing during T lymphocyte development. *Cell*. 2002;111(5):621-633.

45. Park JH, Adoro S, Guintier T, et al. Signaling by intrathymic cytokines, not T cell antigen receptors, specifies CD8 lineage choice and promotes the differentiation of cytotoxic-lineage T cells. *Nat Immunol*. 2010;11(3):257-264.

46. Egawa T, Tillman RE, Naoe Y, Taniuchi I, Littman DR. The role of the Runx transcription factors in thymocyte differentiation and in homeostasis of naive T cells. *J Exp Med*. 2007;204(8):1945-1957.

47. He X, Dave VP, Zhang Y, et al. The zinc finger transcription factor Th-POK regulates CD4 versus CD8 T-cell lineage commitment. *Nature*. 2005;433(7028):826-833.

48. Singer A, Adoro S, Park JH. Lineage fate and intense debate: myths, models and mechanisms of CD4- versus CD8-lineage choice. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(10):788-801.
49. Chong MM, Cornish AL, Darwiche R, et al. Suppressor of cytokine signaling-1 is a critical regulator of interleukin-7-dependent CD8+ T cell differentiation. *Immunity.* 2003;18(4):475-487.
50. Luckey MA, Kimura MY, Waickman AT, Feigenbaum L, Singer A, Park JH. The transcription factor ThPOK suppresses Runx3 and imposes CD4(+) lineage fate by inducing the SOCS suppressors of cytokine signaling. *Nat Immunol.* 2014;15(7):638-645.
51. Yu Q, Erman B, Bhandoola A, Sharrow SO, Singer A. In vitro evidence that cytokine receptor signals are required for differentiation of double positive thymocytes into functionally mature CD8+ T cells. *J Exp Med.* 2003;197(4):475-487.
52. Tani-ichi S, Shimba A, Wagatsuma K, et al. Interleukin-7 receptor controls development and maturation of late stages of thymocyte subpopulations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(2):612-617.
53. Chen JY, Miyanishi M, Wang SK, et al. Hoxb5 marks long-term haematopoietic stem cells and reveals a homogenous perivascular niche. *Nature.* 2016;530(7589):223-227.
54. Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, Terhorst C, Morrison SJ. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell.* 2005;121(7):1109-1121.
55. Kim I, He S, Yilmaz OH, Kiel MJ, Morrison SJ. Enhanced purification of fetal liver hematopoietic stem cells using SLAM family receptors. *Blood.* 2006;108(2):737-744.
56. Pillai S, Cariappa A. The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(11):767-777.
57. Arnon TI, Horton RM, Grigороva IL, Cyster JG. Visualization of splenic marginal zone B-cell shuttling and follicular B-cell egress. *Nature.* 2013;493(7434):684-688.
58. Shah DK, Zuniga-Pflucker JC. An overview of the intrathymic intricacies of T cell development. *J Immunol.* 2014;192(9):4017-4023.
59. Takaba H, Takayanagi H. The Mechanisms of T Cell Selection in the Thymus. *Trends Immunol.* 2017;38(11):805-816.
60. McCaughy TM, Etzensperger R, Alag A, et al. Conditional deletion of cytokine receptor chains reveals that IL-7 and IL-15 specify CD8 cytotoxic lineage fate in the thymus. *J Exp Med.* 2012;209(12):2263-2276.
61. Lu TT, Cyster JG. Integrin-mediated long-term B cell retention in the splenic marginal zone. *Science.* 2002;297(5580):409-412.
62. Saito T, Chiba S, Ichikawa M, et al. Notch2 is preferentially expressed in mature B cells and indispensable for marginal zone B lineage development. *Immunity.* 2003;18(5):675-685.
63. Tanigaki K, Han H, Yamamoto N, et al. Notch-RBP-J signaling is involved in cell fate determination of marginal zone B cells. *Nat Immunol.* 2002;3(5):443-450.

64. Kaisho T, Takeda K, Tsujimura T, et al. IkappaB kinase alpha is essential for mature B cell development and function. *J Exp Med.* 2001;193(4):417-426.
65. Cariappa A, Liou HC, Horwitz BH, Pillai S. Nuclear factor kappa B is required for the development of marginal zone B lymphocytes. *J Exp Med.* 2000;192(8):1175-1182.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. ICAP-1-null splenocytes display increased $\alpha 4\beta 1$ -mediated attachment.

(A) Spleen cells from control (+/+), heterozygous (+/-) or knock-out (-/-) ICAP-1 mice were analyzed by immunoblotting for expression of the indicated proteins. Endothelial bEnd.3 cells were used as positive control for ICAP-1 expression. Control loading is shown by blotting with anti- β -actin antibodies. (B) $\beta 1$ integrin expression on the indicated spleen cell populations was tested by flow cytometry. (C) Total splenocytes (left), or CD3⁺- or CD19⁺-selected T or B cells, respectively (middle and right), from ICAP-1^{+/+} or ICAP-1^{-/-} mice were subjected to adhesion assays to VCAM-1, ICAM-1 or CS-1/FN, in the absence or presence of co-immobilized CXCL12 (n=3-6; $\Delta\Delta p < 0.01$, $\Delta p < 0.05$). (D) Splenocytes were perfused in flow chambers coated with VCAM-1 co-immobilized with CXCL12, and analyzed for rolling and stable cell arrest. Data is presented as mean \pm SD of adhered cells (n=3; $\Delta\Delta p < 0.01$). (E) Splenocytes were attached onto PLL or VCAM-1, incubated with isotype control or 9EG7 anti- $\beta 1$ mAb and subjected to fluorescence microscopy ($\Delta\Delta\Delta p < 0.001$, $\Delta p < 0.05$). (F) CFSE- and Far Red-stained splenocytes from ICAP-1^{+/+} and ICAP-1^{-/-} mice were injected into control recipients at 1:1 ratio, and cells that migrated into spleen and LNs, or remained in peripheral blood (PB), were analyzed by flow cytometry. Data is referred to migrating control cells, which were given a value of 1. Migration was significantly upregulated ($\Delta p < 0.05$) or inhibited ($** p < 0.01$) (n=6). (G) Mice were administered with 3% thioglycolate (TG) and CD4⁺ and CD8⁺ cell numbers in the peritoneal lavage were determined by flow cytometry. Data represent fold induction between TG- and PBS (control)-induced cell infiltration in the peritoneal cavity (n=6-9).

Figure 2. Altered CD8⁺ T cell development in ICAP-1-deficient mice.

(A, top) Pictures depict thymi from 3-5- or 8-10-week old control and ICAP-1-null mice. (Bottom) Shown is the total cellularity of thymi at the indicated ages relative to control animals, which were given a value of 100 (n=11-18; $** p < 0.01$, $* p < 0.05$). (B) Distribution of the indicated cell populations as assessed by flow cytometry ($*** p < 0.001$, $* p < 0.05$). (C, left) The expression of CD69 and TCR $\alpha\beta^+$ on 3-5 week-old CD4⁺ and CD8⁺ SP thymocytes was assessed by flow cytometry. (Right) Shown is the quantification of CD69^{hi} expression in TCR $\alpha\beta^+$ CD4⁺ SP and TCR $\alpha\beta^+$ CD8⁺ SP thymocytes from ICAP-1^{+/+} and ICAP-1^{-/-} mice ($*** p < 0.001$). (D) Proliferation rates were assessed by FACS using anti-Ki67 antibodies. Shown is a representative result out of four experiments. (E) Total $\beta 1$ integrin expression on the indicated thymocyte populations was tested by flow cytometry. (F) Total thymocytes were subjected to adhesion assays to CS-1/FN (n= 8). (G) Flow cytometry showing expression of the indicated chemokine receptors on different thymocyte subpopulations from control and ICAP-1-null mice.

Figure 3. Differential cellular distribution of ICAP-1 in thymus and spleen, and decreased Runx3 expression in ICAP-1^{-/-} thymus.

(A) Thymus and spleen cells from wild type mice were subjected to cell fractionation assays to enrich for cytoplasmic and nuclear fractions. SAM68 and vinculin were used as nuclear and cytoplasmic markers.

(B, C) Thymic cells were tested by qPCR for expression of the indicated transcription factors (B), or by immunoblotting to assess Runx3 expression (C) (* $p < 0.05$) (n=3-4).

Figure 4. CD8⁺ cell percentages are reduced in spleen and lymph nodes from ICAP-1-null mice. (A, top) Gross appearance of spleens from control and ICAP-1^{-/-} mice. (Bottom) Total cellularity of spleens and LNs from ICAP-1^{-/-} mice relative to wild type animals, which were given a value of 100 (n=13-17; ** $p < 0.01$). (B-C) Distribution of CD4⁺ and CD8⁺ cells in spleens and LNs (B), and in peripheral blood (C) from ICAP-1^{+/+} and ICAP-1^{-/-} mice. Percentages were significantly reduced, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, or increased, $\Delta p < 0.05$. (D) $\beta 1$ integrin expression on the indicated spleen cell populations was tested by flow cytometry ($\Delta\Delta\Delta p < 0.001$, $\Delta p < 0.05$).

Figure 5. Analysis of bone marrow cell populations in ICAP-1-null mice. Committed BM progenitors were removed for the analysis using a combination of antibodies against hematopoietic lineage-specific cell surface antigens, and the selected LSK (A) and HSC/MMP1 (LSK-CD48⁻ CD150⁺) (B, left panel) cell populations from ICAP-1^{+/+} and ICAP-1^{-/-} mice were analyzed by flow cytometry. The middle and right panels in (B) display the distribution of MPP2 and MPP3/4 cellular populations. (C) Percentage of bone marrow B220⁺ cells was assessed by flow cytometry. (D) CD19⁺B220⁺ bone marrow cells were gated and subsequently analyzed by flow cytometry for the expression of CD43 and CD25, and IgM and IgD. A representative result out of four independent analyses is shown.

Figure 6. Altered distribution of marginal zone and follicular B cells in spleens of ICAP-1-null mice. (A) The B220⁺ cell percentages in spleens, LNs and PB from ICAP-1^{+/+} and ICAP-1^{-/-} mice were assessed by flow cytometry. (B) Surface levels of $\beta 1$ integrin on spleen B220⁺ cells were analyzed by flow cytometry ($\Delta p < 0.05$). (C, D) The distribution of marginal zone (MZ) and follicular (FO) CD19⁺ spleen B cells was determined by flow cytometry with anti-IgM or anti-IgD antibodies (C), or with anti-CD21 and anti-CD23 antibodies (D). Percentages were significantly reduced, *** $p < 0.001$ and ** $p < 0.01$, or increased, $\Delta p < 0.05$.

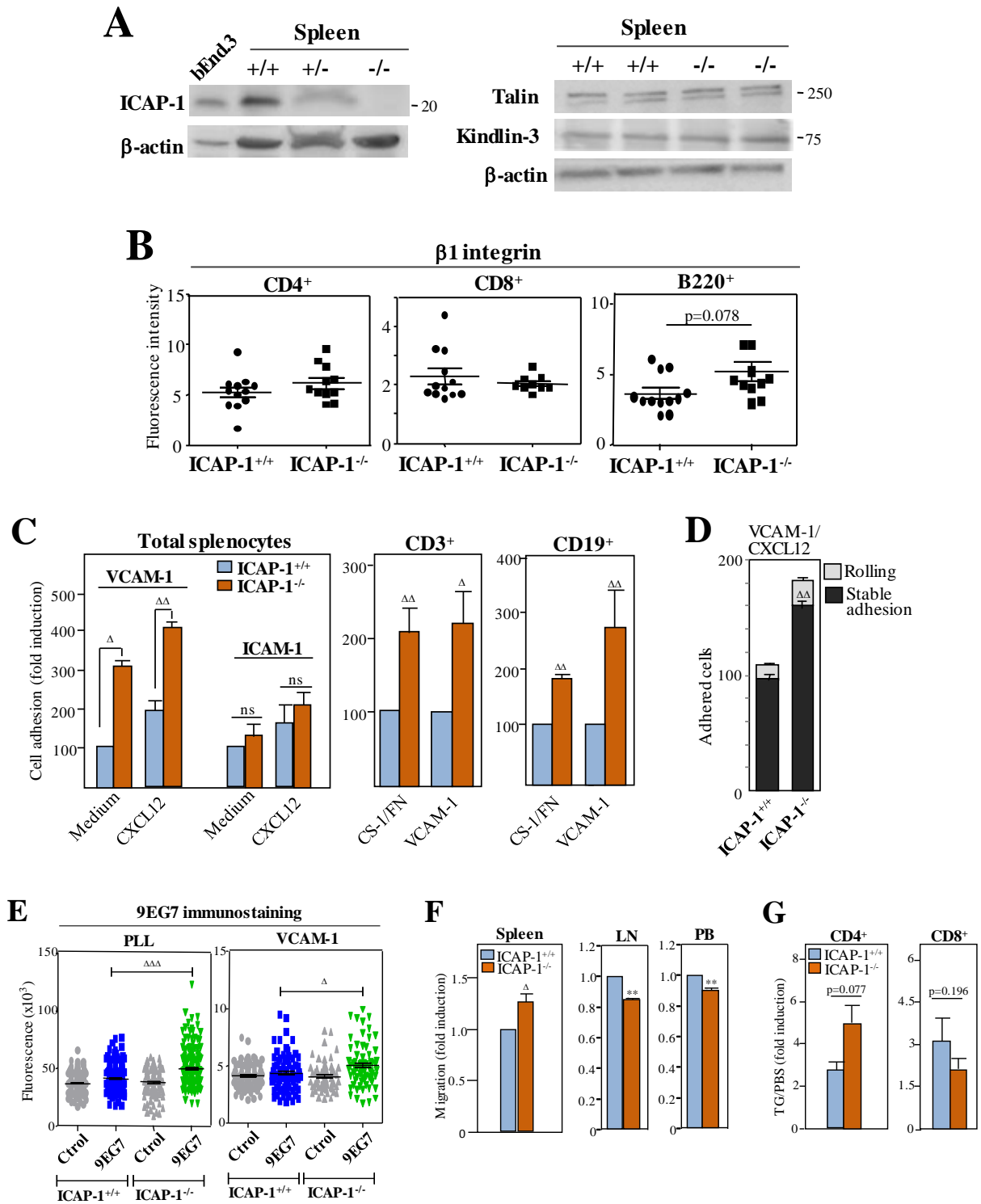


Fig. 1

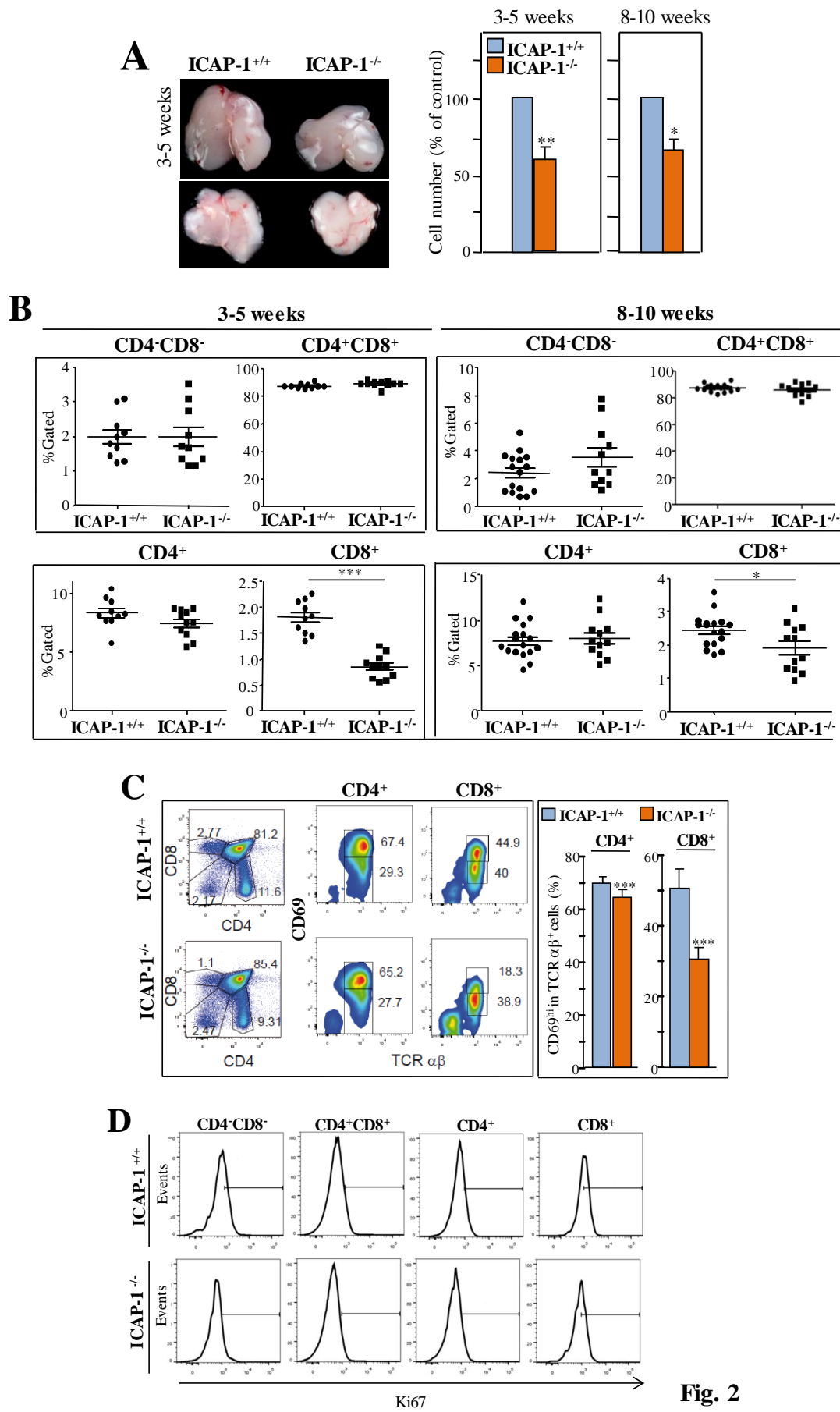


Fig. 2

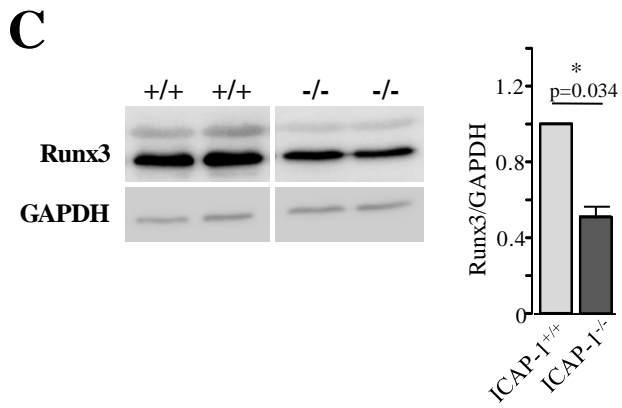
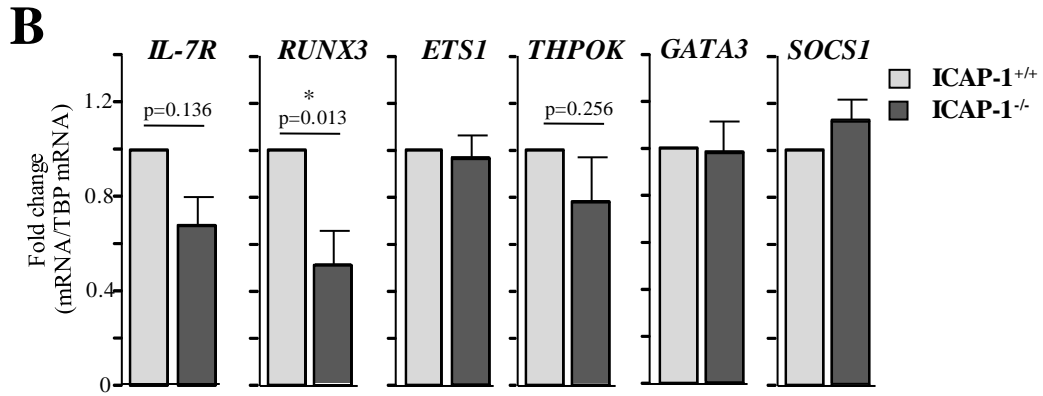
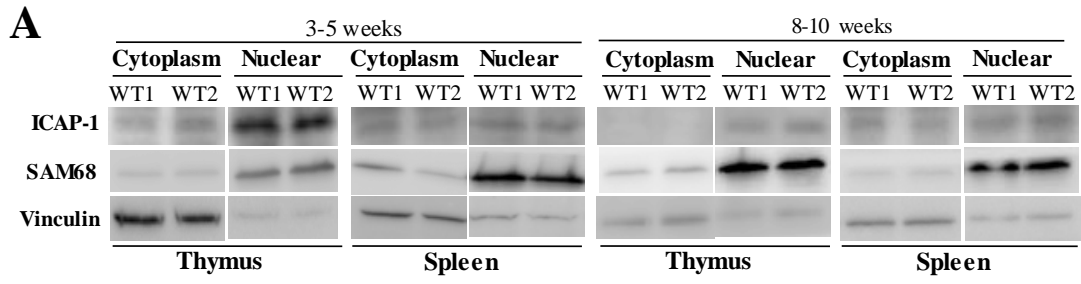
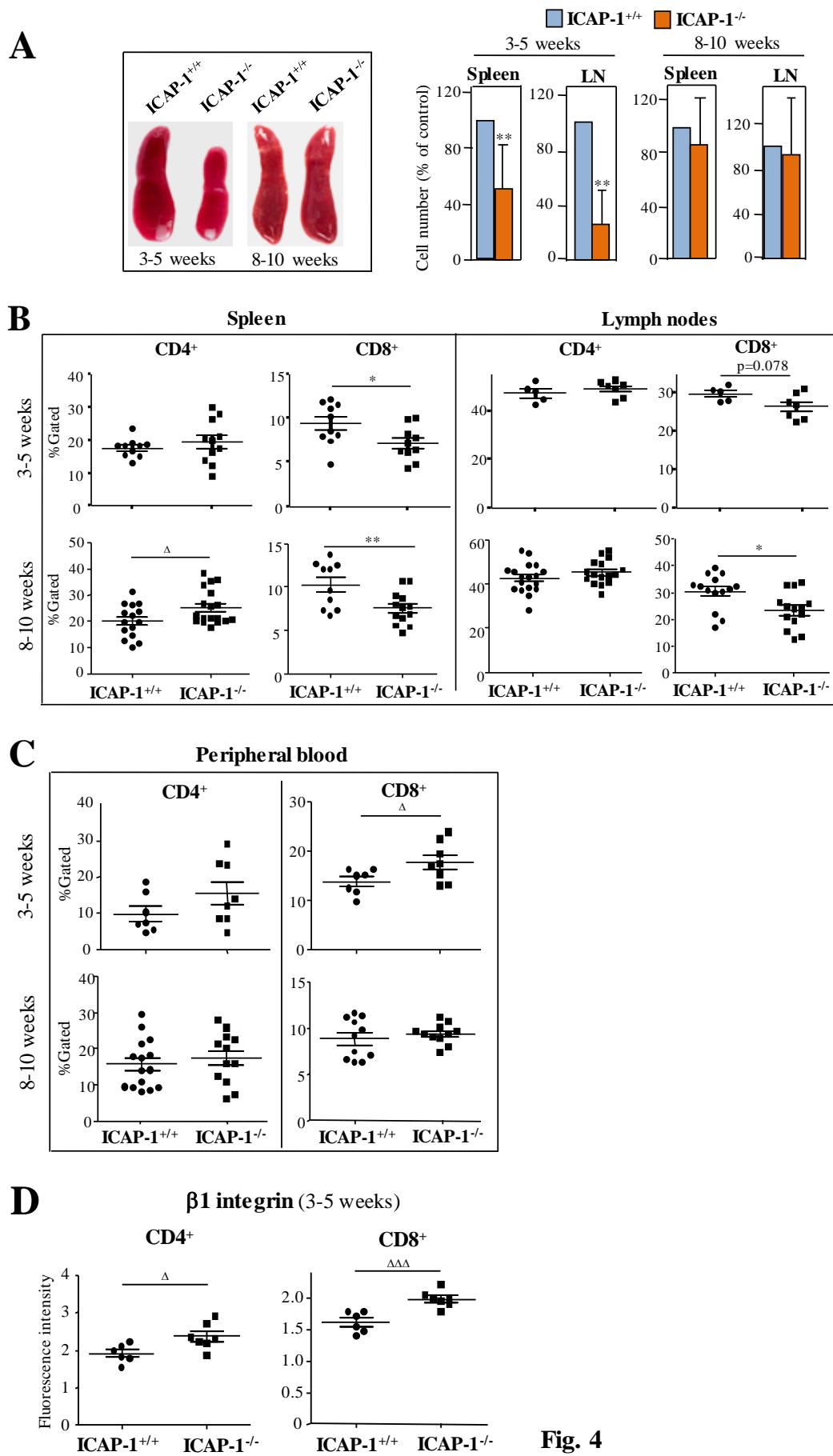


Fig. 3



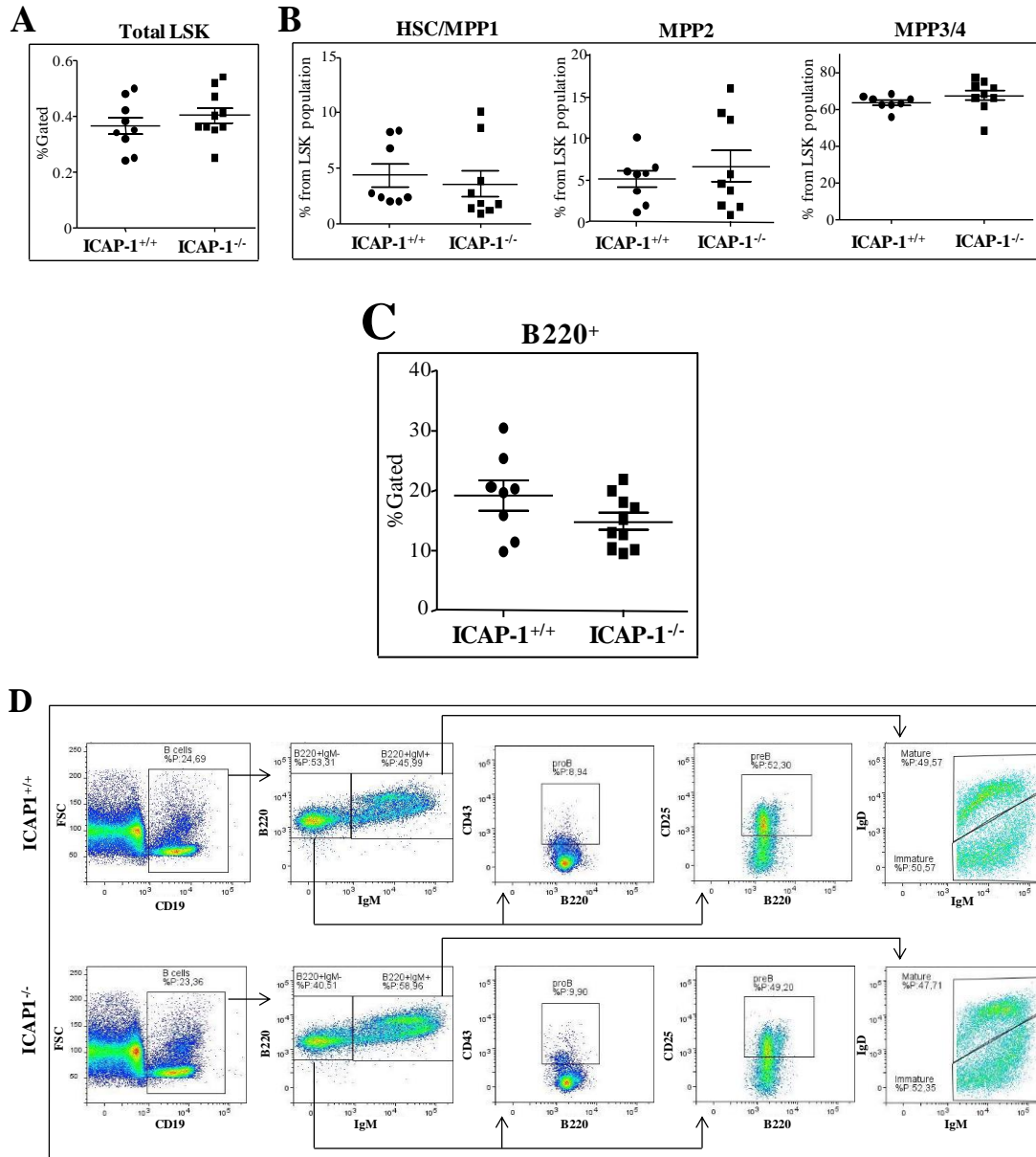
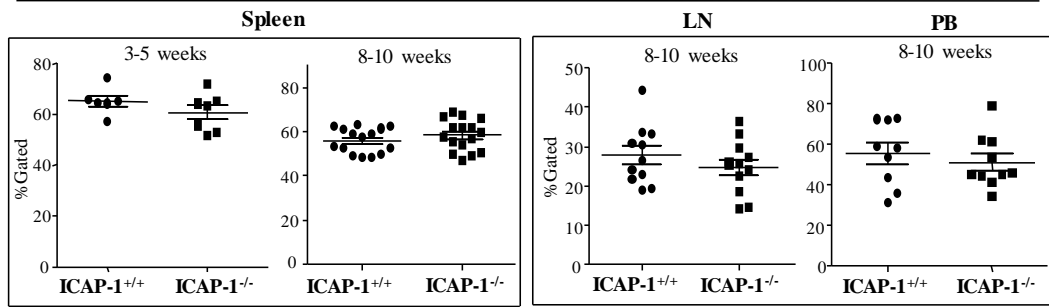
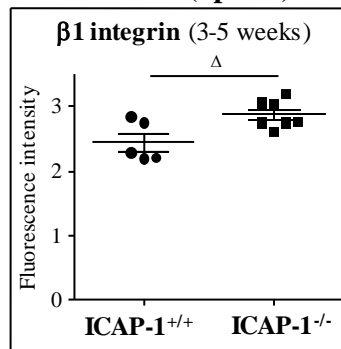
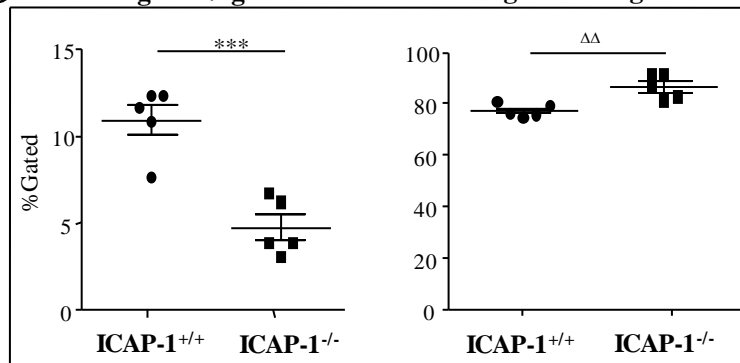
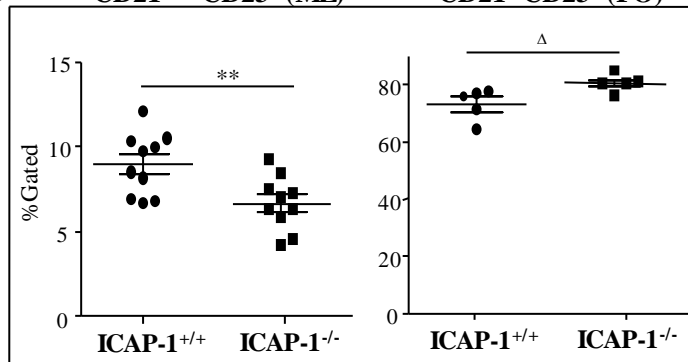


Fig. 5

A**B220⁺****B****B220⁺ (Spleen)****C****IgM^{high}/IgD^{low}****IgM^{med-low}/IgD^{high}****D****CD21^{high} CD23⁻ (MZ)****CD21⁺ CD23⁺ (FO)****Fig. 6**

ANEXO II

ORIGINAL ARTICLE

In vivo adhesion of malignant B cells to bone marrow microvasculature is regulated by $\alpha 4\beta 1$ cytoplasmic-binding proteins

M Martínez-Moreno^{1,9}, M Leiva^{2,9}, N Aguilera-Montilla¹, S Sevilla-Movilla¹, S Isern de Val¹, N Arellano-Sánchez¹, NC Gutiérrez³, R Maldonado⁴, J Martínez-López⁴, I Buño⁵, JA García-Marco⁶, P Sánchez-Mateos⁷, A Hidalgo^{2,8}, A García-Pardo¹ and J Teixidó¹

Multiple myeloma (MM) and chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells must attach to the bone marrow (BM) microvasculature before lodging in the BM microenvironment. Using intravital microscopy (IVM) of the BM calvariae we demonstrate that the $\alpha 4\beta 1$ integrin is required for MM and CLL cell firm arrest onto the BM microvasculature, while endothelial P-selectin and E-selectin mediate cell rolling. Talin, kindlin-3 and ICAP-1 are $\beta 1$ -integrin-binding partners that regulate $\beta 1$ -mediated cell adhesion. We show that talin and kindlin-3 cooperatively stimulate high affinity and strength of $\alpha 4\beta 1$ -dependent MM and CLL cell attachment, whereas ICAP-1 negatively regulates this adhesion. A functional connection between talin/kindlin-3 and Rac1 was found to be required for MM cell attachment mediated by $\alpha 4\beta 1$. Importantly, IVM analyses with talin- and kindlin-3-silenced MM cells indicate that these proteins are needed for cell arrest on the BM microvasculature. Instead, MM cell arrest is repressed by ICAP-1. Moreover, MM cells silenced for talin and kindlin-3, and cultured on $\alpha 4\beta 1$ ligands showed higher susceptibility to bortezomib-mediated cell apoptosis. Our results highlight the requirement of $\alpha 4\beta 1$ and selectins for the *in vivo* attachment of MM and CLL cells to the BM microvasculature, and indicate that talin, kindlin-3 and ICAP-1 differentially control physiological adhesion by regulating $\alpha 4\beta 1$ activity.

Leukemia advance online publication, 8 January 2016; doi:10.1038/leu.2015.332

INTRODUCTION

Multiple myeloma (MM) and chronic lymphocytic leukemia (CLL) are B-cell neoplasms characterized by malignant cell trafficking to the bone marrow (BM).^{1–3} Myeloma cells accumulate in the BM, leading to bone destruction, anemia, serum monoclonal gammopathy and immune suppression,⁴ and their attachment to components of the BM microenvironment induces cell adhesion-mediated drug resistance (CAM-DR).^{5,6} Widespread involvement of the BM and the presence of circulating MM cells in more than 70% of patients at diagnosis indicate that there is a continuous recirculation of MM cells in the peripheral blood and re-entrance to multiple areas in the BM niches.^{7,8} Homing of MM cells from the circulation into the BM milieu must begin with stepwise interactions with the BM microvasculature, involving rolling and firm attachment processes. The initial rolling step may potentially be mediated by selectins, and it was earlier shown that P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) contributes to the overall MM cell homing to the BM.⁹ *In vitro* data suggest that $\alpha 4\beta 1$ and $\alpha L\beta 2$ integrins are relevant candidates to mediate the attachment of circulating MM cells to the BM microvasculature,^{10–14} but the *in vivo* contribution of these integrins has not yet been fully elucidated.

The $\alpha 4\beta 1$ integrin also has key roles in CLL cell *in vitro* migration and *in vivo* homing to BM and lymph nodes (LNs).^{15–20} $\alpha 4\beta 1$

expression is associated with the presence of lymphadenopathy in CLL patients,²¹ and it was recently shown to be the strongest predictor of overall survival in CLL.²² $\alpha L\beta 2$ displays aberrant chemokine-induced activation in CLL cells,^{23–25} and it also contributes to CLL cell *in vitro* migration.²¹ The role of $\alpha L\beta 2$ in CLL *in vivo* adhesion is less clear. As in MM, CLL cell interaction with the BM microenvironment provides survival signals and induces drug resistance, thus contributing to disease progression.^{26,27}

The $\alpha 4\beta 1$ activity is tightly regulated by inside-out signaling induced upon chemokine-receptor interactions.²⁸ In MM cells, the small GTPase Rac1 and its upstream activator DOCK2, as well as RhoA positively regulate this signaling in response to the chemokine CXCL12, leading to stimulation of $\alpha 4\beta 1$ -mediated cell adhesion.^{29,30} A key step in integrin activation in leukocytes is the binding of talin and the hematopoietic-specific kindlin-3 to the cytoplasmic domain of the integrin $\beta 1$ subunit.^{31–33} The talin N-terminal FERM (protein 4.1, ezrin, radixin and moesin) region binds to the membrane-proximal NPXY/F motif of β -subunit cytoplasmic tails. This causes the spatial separation of the α - and β -subunits and the extension of the integrin extracellular domain, leading to the generation of high-affinity integrins and upregulation of cell adhesion.^{31,33} Kindlin proteins also have a FERM

¹Department of Cellular and Molecular Medicine, Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Madrid, Spain; ²Area of Cell and Developmental Biology, Fundación Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Madrid, Spain; ³Department of Hematology, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, Spain; ⁴Section of Hematology, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain; ⁵Section of Hematology, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Madrid, Spain; ⁶Hematology Unit, Hospital Universitario Puerta de Hierro, Madrid, Spain; ⁷Section of Immuno-Oncology, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Complutense University School of Medicine, Madrid, Spain and ⁸Institute for Cardiovascular Prevention, Ludwig-Maximilians-University, Munich, Germany. Correspondence: Dr J Teixidó, Department of Cellular and Molecular Medicine, Centro de Investigaciones Biológicas, Ramiro de Maeztu 9, Madrid 28040, Spain. E-mail: joaquin@cib.csic.es

⁹These authors contributed equally to this work.

Received 11 June 2015; revised 23 October 2015; accepted 24 November 2015; accepted article preview online 10 December 2015

domain that binds to a distinct NXXY/F site in the membrane-distal region of the β -cytoplasmic domain.^{32,33} Recent data showed that talin and kindlin-3 have distinct but cooperative roles during integrin inside-out activation in leukocytes.³⁴ Importantly, talin depletion leads to reduced chemokine-stimulated leukocyte adhesiveness to α 4 β 1 and α L β 2 ligands.^{34–38} On the other hand, kindlin-3 regulates chemokine-stimulated leukocyte adhesion involving α L β 2, and to a lesser extent in attachment mediated by α 4 β 1.^{34,39,40} Therefore, these observations revealed that talin and kindlin-3 are major inside-out signaling molecules for integrin activation in response to chemokines.

Integrin activation can be counteracted by molecules potentially competing with talin and kindlin for interaction with β 1, such as ICAP-1.^{41–44} The ICAP-1 phosphotyrosine-binding domain interacts with a valine residue located at position -5 from the NPXY β 1 motif.^{41,42} Remarkably, ICAP-1-deficient cells display fibronectin receptors in active conformations and increased cell adhesion to fibronectin.⁴⁵ Together, these data raised the possibility that talin, kindlin-3 and ICAP-1 may represent important molecules for the regulation of integrin-dependent attachment of malignant B cells to the BM microvasculature and to components of the BM microenvironment that potentially contribute to the trafficking and localization of these cells.

In the present study we have used intravital microscopy to directly examine the potential involvement of selectins and α 4 β 1 and α L β 2 integrins during the early stages of *in vivo* recruitment of MM and CLL cells to the BM. Moreover, using *in vivo* and *in vitro* assays, we have further analyzed if α 4 β 1-dependent MM and CLL cell adhesion is regulated by talin, kindlin-3 and/or ICAP-1.

MATERIALS AND METHODS

Patients, cell purification and cell lines

Samples from MM and CLL patients were obtained after informed consent and followed the guidelines from the Ethics committees of the University Hospital of Salamanca, and hospitals 12 de Octubre, Gregorio Marañón and Puerta de Hierro (Madrid). The whole study was approved by the Consejo Superior de Investigaciones Científicas Bioethics Review Board. CD138⁺ primary myeloma cells were purified from the mononuclear fraction of BM samples from patients with active MM using CD138 microbeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). CLL cells were purified from the peripheral blood by Ficoll-Hypaque (Nycomed, Oslo, Norway) centrifugation and, if < 93% CD19 expression, negative selection with anti-CD3-conjugated Dynabeads (Invitrogen Dynal AS, Oslo, Norway) was employed. The human myeloma cell lines NCI-H929, MM1.S and RPMI 8226, and BM stromal cells HS-27A (ATCC, Manassas, VA, USA), were cultured in RPMI 1640 medium with 10% fetal bovine serum (FBS) (Biowest, Nuaillé, France). The MEC-1, MEC-2 and EHEB cell lines established from the peripheral blood of two patients with CLL⁴⁶ were purchased from DSMZ (Braunschweig, Germany) and maintained in IMDM medium (Lonza, Verviers, Belgium) with 10% FBS. The Epstein-Barr virus (EBV)-transformed CO43 and BRO168 cell lines, established from normal B lymphocytes, have been previously reported.¹⁶ Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were purchased from Lonza.

RNA interference, transfections and RT-qPCR

siRNAs were purchased from Sigma-Aldrich (Gillingham, UK) and sequences are listed in Supplementary Table 1. Vectors coding for GFP and GFP-fused Rac V12 were provided by Dr Francisco Sánchez-Madrid (Hospital de la Princesa, Madrid, Spain). siRNAs and vectors were nucleofected (Amaxa, Cologne, Germany) using solution V and programs T-01, O-23 and T-13 for NCI-H929, MM1.S and MEC-1 cells, respectively, and transfectants assayed 20 h (NCI-H929) or 20–72 h (MEC-1) post transfection. For RT-qPCR, RNA was extracted using TRI-Reagent (Sigma-Aldrich), and reverse transcribed using M-MLV RT (Promega, Madison, WI, USA). Oligonucleotide sequences are provided in Supplementary Table 2, and RT-qPCR was performed using iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Assays were performed in triplicate, and results normalized according to the expression levels of TBP (TATA-binding

protein) RNA and expressed by using the LightCycler 480 II software (Roche, Mannheim, Germany).

Cell adhesion, migration and apoptosis assays

For static adhesion assays to α 4 β 1 ligands we followed the described method.⁴⁷ Briefly, fluorescently labeled cells were plated in triplicate on wells coated with CXCL12 or CCL21 together with FN-H89, a fibronectin fragment that contains the α 4 β 1-binding region called CS-1, or with recombinant soluble VCAM-1, and plates were incubated for 2 min at 37 °C upon a short spin. MM cells were also treated with soluble chemokine (1 min) and added to TNF- α -incubated HS-27A cells for 2 min at 37 °C. Adhesions were quantified with a fluorescence analyzer (Varioskan Flash Multimode Reader, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Adhesion data is presented relative to control untreated cells, which have been given an arbitrary value of 100. For flow chamber adhesion assays, we followed the described protocol.⁴⁸ Briefly, cells were infused at a flow rate of 1 dyne/cm² into flow chambers containing coimmobilized VCAM-1 (800 ng/ml) and CXCL12 (650 ng/ml). Rolling cells that subsequently firmly attached were expressed as stable arrest, whereas tethering cells that did not arrest at any moment were expressed as rolling cells. To evaluate shear resistance, cells were allowed to attach, and then were subjected to sequential increases of the flow rates. The number of cells remaining bound was determined as the percentage of total adhered cells after the adhesion step. Cell migration across TNF- α -treated HUVEC was done as described,⁴⁹ and migrated cells counted by flow cytometry. Cell viability was determined on a Coulter Epics XL flow cytometer (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA), using Annexin V-FITC (Immunostep, Salamanca, Spain) and propidium iodide (Sigma-Aldrich). Bortezomib (Selleckchem, Houston, TX, USA) was used at 40 nM.

Intravital microscopy

Five-week-old NSG mice prepared for intravital imaging of the calvarial bone,^{29,50} were injected with fluorescently labeled cells through a catheter placed in the left carotid artery, and images were acquired using a Leika DM6000 epifluorescence microscope. In the experiments in which we blocked integrins, 5×10^6 CFSE-labeled MM1.S, NCI-H929, RPMI 8226, MEC-1 and EHEB cells were incubated for 30 min with 5 μ g of purified anti-human α 4, α L or anti-human PC3 antibodies. Saturation with antibodies was confirmed by flow cytometry (not shown). To determine endothelial selectin-mediated rolling and adhesion, mice received intravenously (i.v.) 50 μ g of blocking antibodies against E-selectin and/or anti P-selectin 20 min before image acquisition. For CXCR4 inhibition, cells were incubated with 5 μ M of AMD3100 for 3 h, and subsequently washed and immediately i.v. injected into mice prepared for intravital imaging. For the experiments involving siRNA transfectants, 5×10^6 CFSE-labeled cells were injected i.v. at the time of imaging. Collecting venules (Cv) and sinusoids (S) have been anatomically defined previously, and are functionally associated with early engraftment in mouse models.^{50,51} The number of rolling and adherent cells, as well as hemodynamic parameters was analyzed by blind off-line video analysis. For each vessel we measured the maximum blood velocity (V_{max}) from the fastest free-flowing cells, as well as the vessel diameter (D_v), mean velocity (V_{mean}) and wall shear rate (WSR), by applying the following formulae: $(V_{mean} - V_{max}) / (2 - \epsilon^2)$, where $\epsilon = D_c / D_v$, and the cell diameter (D_c) for NCI-H929 is 8 μ m, $WSR = 8 (V_{mean} / D_v)$ and $V_{crit} = V_{mean} \times \epsilon(2 - \epsilon)$. Any cell travelling below V_{crit} was considered to be rolling on the vessel wall. Cells that remained stationary for 3 s or more were considered arrested. The fraction of cells that rolled or arrested according to these criteria were scored from the movies. An example movie with MM1.S cells showing cells in free flowing, rolling or arrested is displayed in Supplementary Movie 1. Animal procedures followed the guidelines of the Ethical Committee at CNIC.

Statistical analyses

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

RESULTS

The α 4 β 1 integrin is required for *in vivo* MM and CLL cell attachment to the BM microvasculature

We used intravital imaging (IVM) of the calvarial bone of NSG mice to determine the *in vivo* role of α 4 β 1 and α L β 2 integrins in the

initial adhesive steps of circulating MM and CLL cells to the BM endothelium. Preliminary analyses indicated that $\alpha 4\beta 1$ is expressed in MM1.S, NCI-H929 and RPMI 8226 myeloma cells, as well as in primary CLL cells and in the CLL cell lines MEC-1 and EHEB (not shown). In addition, we found that cell adhesion to recombinant VCAM-1 is blocked by the anti- $\alpha 4$ ALC 1/63 mAb (Supplementary Figures 1A and B). NCI-H929 and MEC-1, but not MM1.S cells express $\alpha \beta 2$ (not shown), and cell attachment to ICAM-1 was inhibited by the anti- αL R7-1 mAb (Supplementary Figures 1A and B).

IVM analyses showed that pre-incubation with anti- $\alpha 4$ mAb led to a dramatic inhibition of the firm arrest of fluorescently labeled MM1.S, NCI-H929, RPMI 8226, MEC-1 and EHEB cells, as well as of primary CLL cells, to the microvasculature of the calvarial BM, as compared with attachment of cells incubated with control mAb (Figures 1a–c; Supplementary Movies 1–6). Cell rolling was reduced by anti- $\alpha 4$ mAb in MM cells, whereas decreased rolling was especially detected on EHEB and primary CLL cells, and to a lower extent in MEC-1 cells (Figures 1a–c). We were unable to

perform IVM analyses with primary BM MM cells, as drawing solid and statistically significant conclusions from these analyses require at least 4×10^6 cells/condition/mouse, well above the cell number available from MM-BM sources. Opposite to the anti- $\alpha 4$ mAb, blockade of αL did not inhibit the rolling or firm arrest of MM or CLL cells to the BM microvasculature (Figures 1a–c). The CXCR4 inhibitor AMD3100 impaired MM cell attachment to the BM endothelium to an extent similar to that obtained by inhibition of $\alpha 4$ integrins (Supplementary Figure 2). These results indicate that $\alpha 4\beta 1$ is a main integrin mediating *in vivo* attachment of circulating MM and CLL cells to the BM microvasculature, an early and limiting step in their homing to the BM.

Role of selectins on the *in vivo* MM and CLL cell attachment to BM endothelium

Using a flow cytometry-based assay to measure binding of soluble P- or E-selectin chimeras (P- or E-selectin/hlgM), which identifies the presence of functional selectin ligands (Supplementary Figure 3),

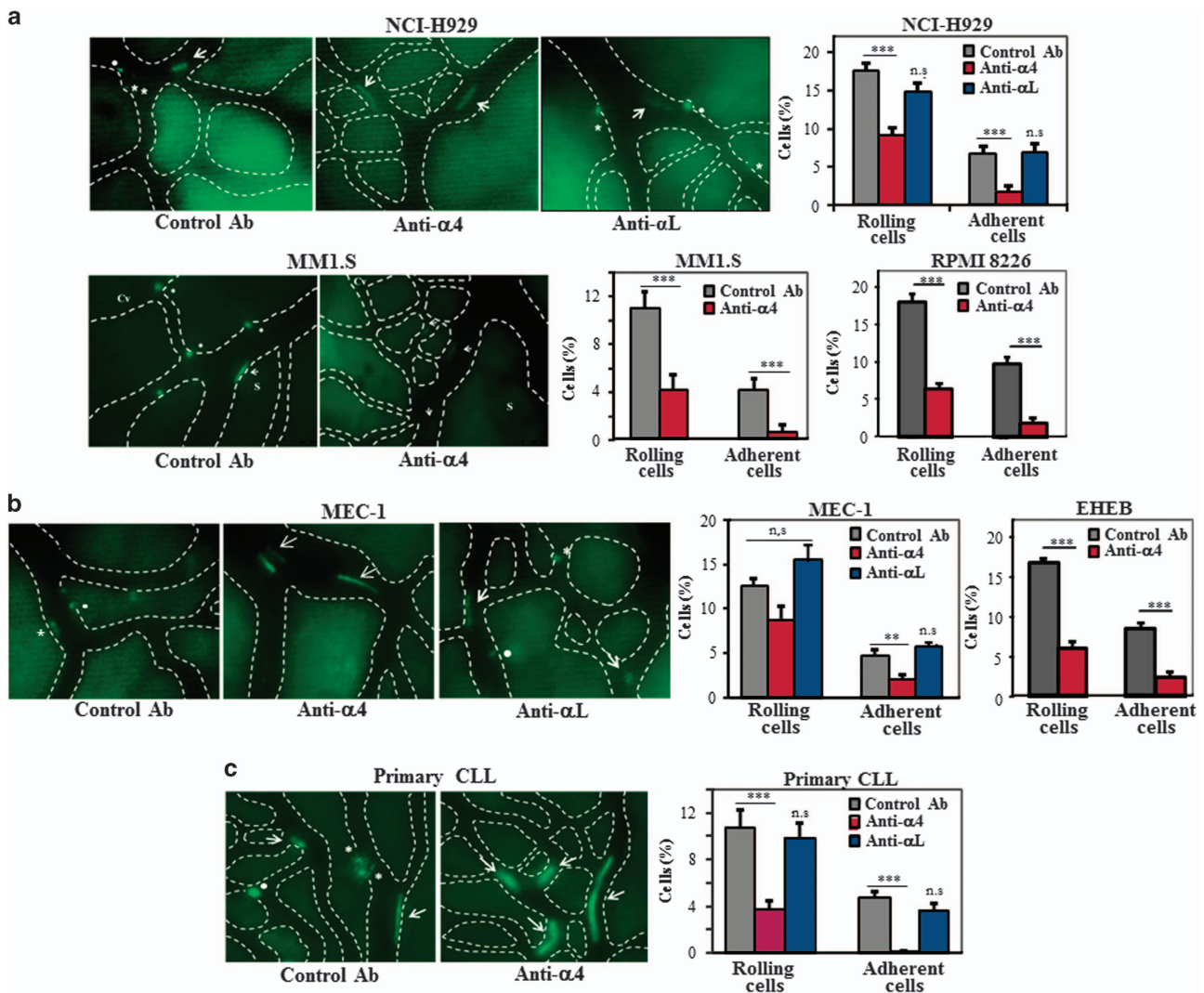


Figure 1. The $\alpha 4\beta 1$ integrin is required for *in vivo* MM and CLL cell attachment to the BM microvasculature. MM cells (NCI-H929, MM1.S and RPMI 8226) (**a**), and CLL cells (MEC-1, EHEB and primary cells) (**b**, **c**) were fluorescently labeled and pre-incubated with control, anti- $\alpha 4$ ALC 1/63 or anti- αL R7-1 mAb, and subsequently injected into NSG mice prepared for intravital imaging of the calvarial bone marrow. Micrographs are representative images of the collecting venules (Cv) and sinusoids (S) that irrigate the BM from each experimental group. Free flowing (arrowhead), rolling (·) or arrested cells (*) can be visualized against the auto-fluorescent bone and dark vessels. Bar graphs show the percentage of passing cells that rolled (defined as those moving below the V_{crit} as described in the Methods section), or arrested for 3 s or longer. Bars represent mean \pm s.e.m. values obtained from the analysis of 16–20 venules from four mice. *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$ (one-tailed *t* test); NS, non-significant.

we found that MM1.S cells express only ligands for P-selectin, whereas NCI-H929 and MEC-1 cells express ligands for both P- and E-selectin (Figure 2a). We addressed the potential selectin involvement in *in vivo* MM and CLL cell tethering onto the BM microvasculature by exposing mice to anti-P- or anti-E-selectin blocking antibodies before performing IVM analyses. The data revealed that both antibodies significantly inhibited the rolling and subsequent firm arrest of MM and CLL cells to the BM endothelium (Figures 2b and c), thus indicating that P- and E-selectin ligands also contribute to the interaction of these cells with the BM microvasculature. Of note, whereas anti-selectin antibodies inhibited to similar levels both rolling and firm arrest of MM and CLL cells, anti- $\alpha 4$ mAb impaired their stable adhesion to a higher extent than rolling, indicating that selectins participate in firm arrest of MM and CLL cells by mediating rolling, while $\alpha 4\beta 1$ function is important for both their rolling and firm arrest.

Talin and kindlin-3 positively regulate $\alpha 4\beta 1$ -dependent MM cell attachment to the BM microvasculature and to BM stromal cells. Having identified a central role for $\alpha 4\beta 1$ in the early adhesive steps of MM and CLL cell migration to the BM, we next examined if its activity can be regulated by $\beta 1$ -binding proteins in these cells. The integrin $\beta 1$ subunit cytoplasmic domain contains

docking sites for talin and kindlin-3.³¹ RT-qPCR experiments revealed heterogeneous levels of talin and kindlin-3 mRNAs amongst different primary MM BM samples (Figure 3a). In addition, talin and kindlin-3 were detected in the MM1.S, NCI-H929 and RPMI 8226 cell lines (Figure 3b, left; Supplementary Figure 4A). Co-immunoprecipitation experiments indicated that $\beta 1$ associates with talin and kindlin-3 in NCI-H929 cells, and that the chemokine CXCL12 gradually increases this association (Figure 3b, right). Moreover, talin- $\beta 1$ assembly was also detected in MM1.S and RPMI 8226 cells (Supplementary Figure 4B).

To analyze the role of talin and kindlin-3 in $\alpha 4\beta 1$ -mediated MM cell attachment to the BM microvasculature, we silenced them by RNA interference in NCI-H929 cells (Figure 3c, left and middle panels; Supplementary Figure 4C), and first tested the knockdown transfectants in static adhesion assays to VCAM-1. Control flow cytometry experiments indicated that $\alpha 4$, $\beta 1$ or CXCR4 expression was not significantly altered by talin or kindlin-3 knocking down (not shown), and that cell viability was similar among the different transfectants (Supplementary Figure 5A). Depletion of either talin or kindlin-3, or their combined silencing caused a significant reduction in cell attachment to VCAM-1, compared with control transfectants (Figure 3c, right). CXCL12 upregulated the attachment of control siRNA transfectants to co-immobilized VCAM-1, whereas the adhesion of single talin or kindlin-3 knockdown

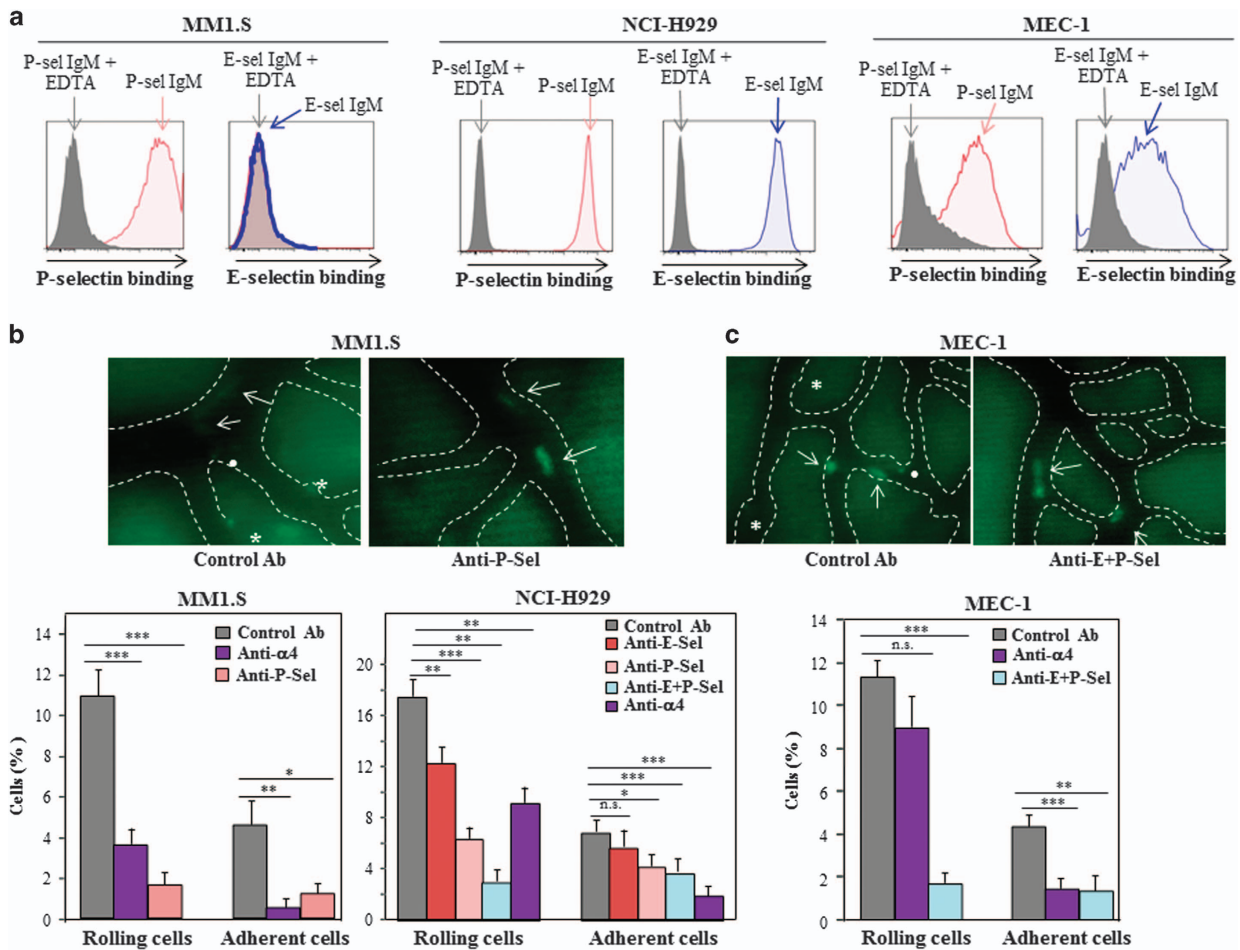


Figure 2. Role of P-selectin and E-selectin on the *in vivo* MM and CLL cell attachment to BM endothelium. (a) Cells were incubated with fluorescently labeled P- or E-selectin/hlgM chimera in the absence or presence of EDTA, and samples subjected to flow cytometry. Selectin ligands were detected with Cy5-labeled anti-human IgM. (b, c) Cells were analyzed by IVM using NSG mice that had been pre-treated with control antibodies, or with antibodies to E- /and or P-selectin. Micrographs are representative images of collecting venules and sinusoids irrigating the BM. Bar graphs show the percentage of rolling or arrested cells. Bars represent mean \pm s.e.m. values obtained from the analysis of 16–20 venules from four mice. *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$; NS, non-significant.

transfectants was approximately half of control transfectant adhesion. Furthermore, depletion of both proteins completely abolished the CXCL12-stimulated attachment.

To identify mechanisms that are associated with the defective adhesion of MM cells silenced for talin and kindlin-3, we first analyzed if their α 4 β 1 affinity was altered. For this purpose, we performed flow cytometry with the β 1 activation-reporter mAb HUTS-21, which detects α 4 β 1 high-affinity conformations.⁵² Control siRNA transfectants displayed moderate but significantly induced HUTS-21 mAb binding in response to CXCL12, whereas binding was inhibited when both talin and kindlin-3 were silenced (Figure 3d). Next, we performed adhesion assays under flow conditions measuring the cells that rapidly (< 20 s) and stably adhere under a shear stress of 1 dyne/cm² to VCAM-1 co-immobilized with CXCL12. Of note, talin- and kindlin-3-knockdown MM transfectants displayed a significant decrease in stable cell arrest compared with control siRNA transfectants (Figure 3e, left). To analyze the α 4 β 1-dependent adhesion strength of these MM transfectants, we subjected cells that had been attached to VCAM-1/CXCL12 at 1 dyne/cm², to detachment at sequential increases of shear stress. Transfectants knock down for both proteins were found to develop lower resistance to detachment at high shear stress than control siRNA transfectants (Figure 3e, right).

To further investigate mechanisms linked to the deficient adhesion of talin- and kindlin-3-knockdown cells, we analyzed the transfectants for a potentially altered function of the GTPase Rac1, as we and others have shown that Rac1 was required for CXCL12-stimulated, α 4 β 1-dependent myeloma cell adhesion.^{29,30} To address this question, we transfected GFP-fused constitutively active forms of Rac (GFP-Rac V12) together with siRNA for both talin and kindlin-3, and then tested the transfectants in adhesion assays to VCAM-1 co-immobilized with CXCL12. We found that GFP-Rac V12 expression reversed the inhibitory effects of talin/kindlin-3 siRNA on the stimulation of cell adhesion to VCAM-1/CXCL12 (Figure 3f; Supplementary Figure 6).

Importantly, combined talin and kindlin-3 depletion significantly impaired the *in vivo* MM cell rolling and firm arrest on the BM microvasculature, as evidenced in IVM analyses (Figure 3g). Together, these results indicate that both talin and kindlin-3 are needed for optimal α 4 β 1-dependent attachment of circulating MM cells to the BM microvasculature, and reveal that these two proteins cooperate to enhance the affinity and the strength of α 4 β 1-dependent adhesion. Furthermore, the data identify key functional connections between Rac1 and talin/kindlin-3 during chemokine-stimulated MM cell adhesion involving α 4 β 1.

We next analyzed the potential involvement of talin and kindlin-3 in MM cell transendothelial migration (TEM) using TNF- α -treated HUVEC. Anti- α 4 mAb inhibited by 60% the CXCL12-upregulated migration of NCI-H929 cells across HUVEC (Figure 4a, left). Similarly, single talin or double talin-kindlin-3 knockdown transfectants displayed 50–60% impairment in their TEM, whereas silencing kindlin-3 alone reduced migration to a lower degree (25%) (Figure 4a, right). These data indicate that talin and to a lower extent kindlin-3 are needed for MM cell TEM involving α 4 β 1.

Once MM cells cross the BM microvasculature, they establish contacts with extracellular matrix proteins, including fibronectin, as well as with stromal cells of the BM microenvironment. Depletion of either talin or kindlin-3 caused a significant reduction in basal and CXCL12-stimulated MM cell attachment to the CS-1/fibronectin fragment FN-H89, whereas cells silenced for both proteins showed a full blockade of chemokine-activated adhesion (Figure 4b). Moreover, under conditions where the adhesion of NCI-H929 cells to HS-27A BM stromal cells was reduced by 50% by anti- α 4 mAb (Figure 4c, left), CXCL12-upregulated attachment was significantly inhibited by single talin or kindlin-3 knocking down, and inhibition was further increased upon silencing both proteins (Figure 4c, right). These results indicate that α 4 β 1-dependent

adhesion of MM cells to the BM microenvironment is positively regulated by talin and kindlin-3.

As α 4 β 1-dependent MM cell adhesion has been linked to cell adhesion-mediated drug resistance,^{5,6} we searched for potential connections between the inhibition of cell adhesion to α 4 β 1 ligands observed with talin/kindlin-3-silenced MM transfectants and MM cell apoptosis mediated by the proteasome inhibitor bortezomib (BTZ). Apoptosis levels increased from 30 to 45% in NCI-H929 cells knock down for both talin and kindlin-3 when they were exposed to BTZ in FN-H89-coated dishes, as compared with control siRNA transfectants incubated under the same conditions (Figure 4d). These data indicate that inhibition of positive regulators of α 4 β 1-dependent MM cell adhesion such as talin and kindlin-3 render myeloma cells more susceptible to BTZ-mediated cell apoptosis.

ICAP-1 negatively regulates α 4 β 1-dependent MM cell attachment to the BM microvasculature

ICAP-1 binds to the β 1 integrin cytoplasmic domain, in possible competition with kindlin-3.⁴⁴ Real-time PCR experiments revealed heterogeneous levels of ICAP-1 mRNA in primary MM BM cells, as well as in the NCI-H929, MM1.S and RPMI 8226 cell lines (Figure 5a, left). Using several commercially available anti-ICAP-1 antibodies we were unable to detect ICAP-1 protein by immunoblotting using NCI-H929 cell lysates (not shown). However, anti- β 1 mAb co-immunoprecipitated a 23–25 kDa protein from these cells which was specifically detected by anti-ICAP-1 antibodies (Figure 5a, right). Cell exposure to CXCL12 did not significantly alter the amount of ICAP-1 co-precipitated with β 1 (not shown). These results suggest that a large portion of ICAP-1 is bound to β 1 integrins in NCI-H929 myeloma cells.

Next, we knocked down ICAP-1 in MM cells (Figure 5b, left), and tested transfectants in adhesion assays to purified α 4 β 1 ligands or to HS-27A BM stromal cells. Of note, ICAP-1-depleted cells displayed a significant increase in adhesion to VCAM-1, FN-H89 and HS-27A cells compared with control siRNA transfectants (Figure 5b, middle and right; and Figure 5c). No alterations in α 4 β 1 expression (not shown) or in survival (Supplementary Figure 5A) were detected in ICAP-1-knockdown MM cells. Moreover, ICAP-1-depleted cells exhibited a significant increase in HUTS-21 binding compared with control transfectants (Figure 5d), revealing that α 4 β 1 switched to high-affinity conformations upon reducing ICAP-1 expression. Importantly, ICAP-1 knocking down in MM cells led to upregulated cell firm arrest onto BM microvasculature compared to control transfectants, as assessed in IVM analyses (Figure 5e; and Supplementary Video 7). We did not observe any obvious change in cell rolling in ICAP-1-silenced cells. These data indicate that ICAP-1 represses the α 4 β 1-dependent adhesion of MM cells.

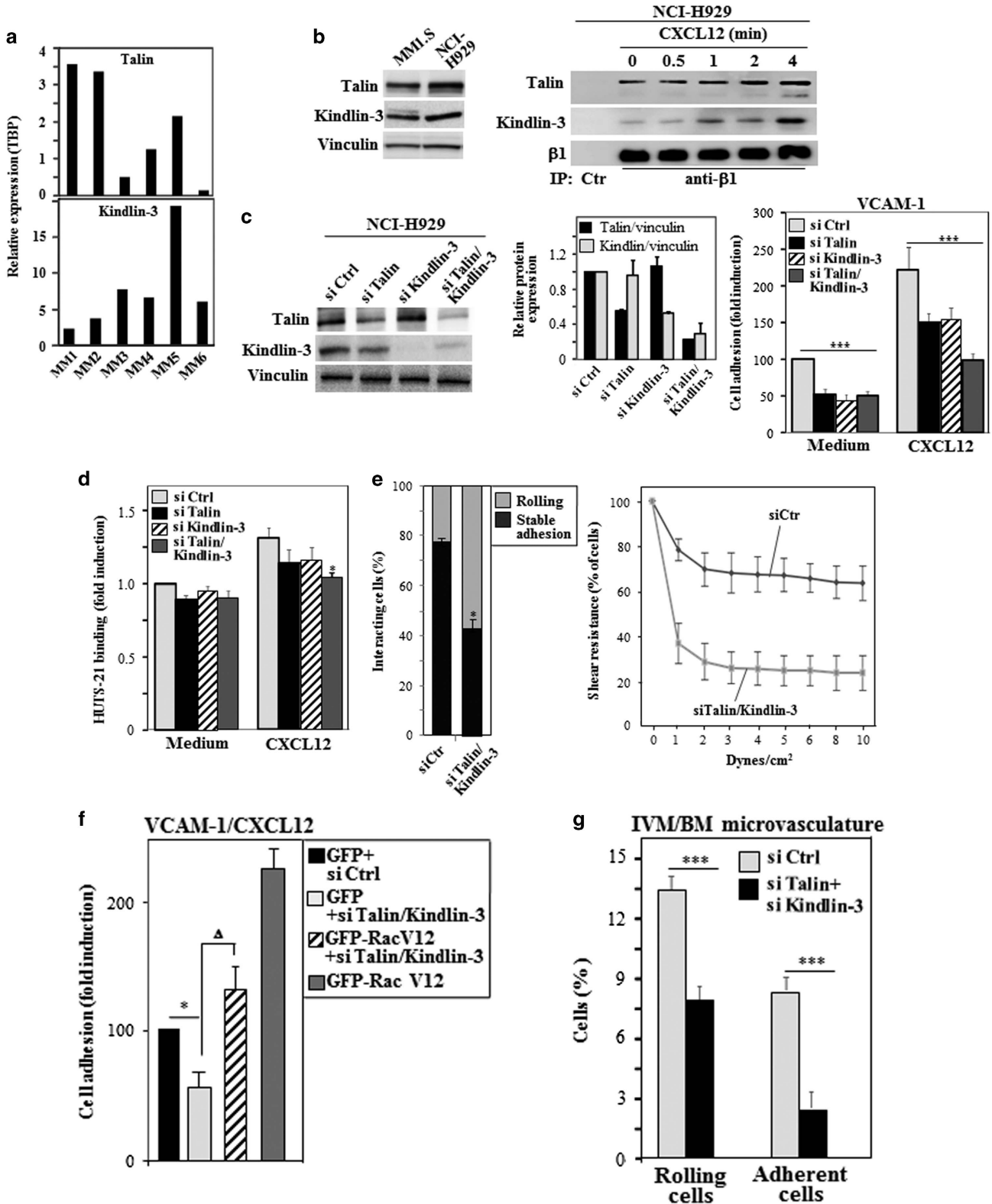
Role of talin, kindlin-3 and ICAP-1 in α 4 β 1-dependent CLL cell adhesion and transendothelial migration

Real-time PCR experiments showed heterogeneous levels of talin, kindlin-3 and ICAP-1 mRNAs amongst different primary CLL samples, as well as in the MEC-1, MEC-2 and EHEB CLL cell lines, and EBV-transformed CO43 and BRO168 cells established from normal B lymphocytes (Figure 6a; Supplementary Figure 4D). In addition, talin and kindlin-3 proteins were observed in all these CLL cells (Figure 6b, left). Co-immunoprecipitation experiments indicated that association of the β 1 subunit with talin and kindlin-3 was enhanced upon incubation for 1.5 min of MEC-1 cells with the chemokine CCL21 (Figure 6b, right). Importantly, combined silencing of talin and kindlin-3 led to a significant reduction in MEC-1 cell adhesion to VCAM-1, both under basal conditions and in the presence of CCL21 (Figure 6c, left and middle; Supplementary Figures 4E and 5B). Furthermore, talin and kindlin-3 depletion partially impaired MEC-1 cell migration across HUVEC using CCL21 as stimulus (Figure 6c, right). In contrast, ICAP-1-

knockdown MEC-1 cells displayed significantly increased adhesion to VCAM-1 (Figure 6d; Supplementary Figure 5B). Altogether these data indicate that CLL cell adhesion and transendothelial migration involving $\alpha 4\beta 1$ are differentially regulated by talin, kindlin-3 and ICAP-1.

DISCUSSION

Trafficking of MM and CLL cells to the BM and disease progression are connected by integrin $\alpha 4\beta 1$ activity.^{17,18,20,53-55} Previous *in vitro* data led to the proposal that $\alpha 4\beta 1$ could participate in the initial adhesive steps of MM and CLL cell migration



into the BM.^{13–15} Using intravital microscopy of the BM calvariae of NSG mice, we demonstrate that $\alpha 4\beta 1$, but not $\alpha L\beta 2$, is a major integrin mediating firm arrest of circulating MM and CLL cells to

the BM microvasculature. In addition, we found that $\alpha 4\beta 1$ also contributes to the preceding MM cell rolling step. Furthermore, our data reveal that selectin ligands (most likely PSGL-1⁹) on MM

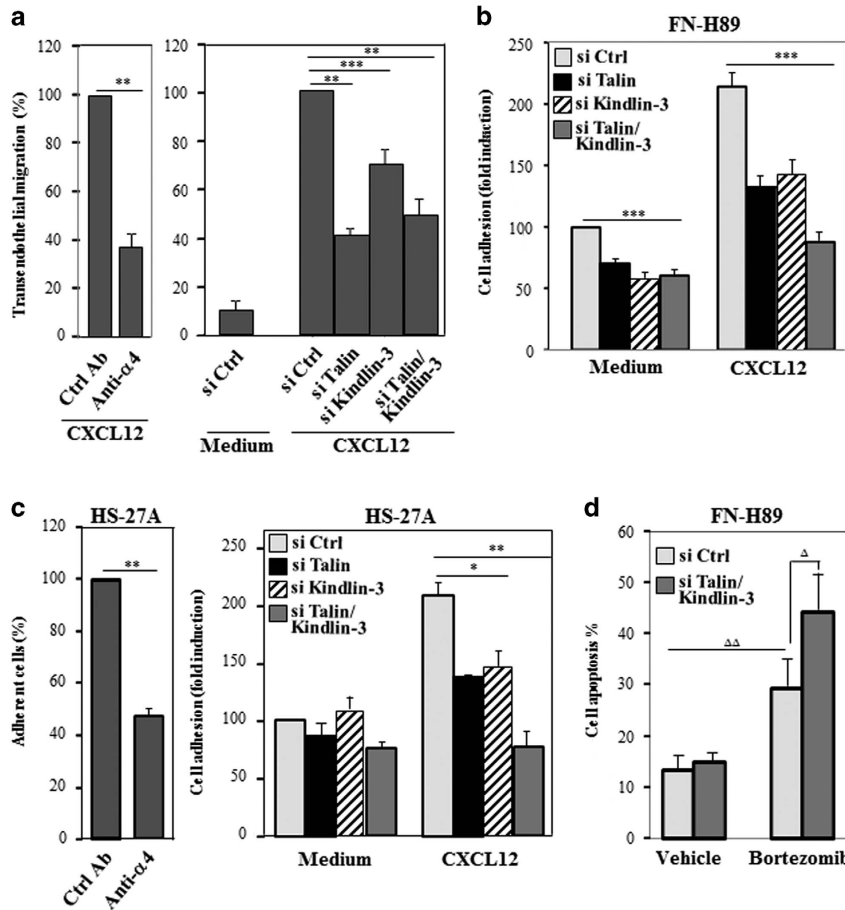


Figure 4. Role of talin and kindlin-3 in $\alpha 4\beta 1$ -dependent MM cell transendothelial migration and in adhesion to fibronectin and BM stroma. **(a)** NCI-H929 cells pre-incubated with control or anti- $\alpha 4$ mAb (left), or the indicated NCI-H929 siRNA transfectants (right), were subjected to transendothelial migration towards CXCL12 across TNF- α -incubated HUVEC. Migration was significantly inhibited, $***P < 0.001$ or $**P < 0.01$ ($n = 6$). **(b)** Control, talin and kindlin-3 siRNA transfectants were analyzed in adhesion assays to FN-H89 co-immobilized with or without CXCL12. **(c)** NCI-H929 cells pre-incubated with control or anti- $\alpha 4$ mAb (left), or the indicated NCI-H929 siRNA transfectants (right), were subjected to adhesion to HS-27A BM stromal cells. Adhesions were significantly inhibited, $***P < 0.001$, $**P < 0.01$ or $*P < 0.05$ ($n = 4$). **(d)** Cell apoptosis was measured in control and talin/kindlin-3 siRNA NCI-H929 transfectants incubated for 36 h in FN-H89-coated dishes in the absence or presence of bortezomib (40 nM). ($\Delta\Delta P < 0.01$, $\Delta P < 0.05$, $n = 4$).

Figure 3. Role of talin and kindlin-3 in $\alpha 4\beta 1$ -dependent MM cell attachment. **(a)** Primary CD138⁺ BM samples from MM patients were analyzed by RT-qPCR for talin and kindlin-3 mRNA levels (normalized to the reference gene TBP). **(b, left)** The indicated MM cell lines were analyzed by immunoblotting for talin or kindlin-3 expression. Loading control was assessed with anti-vinculin antibodies. **(Right)** Cells were serum starved and incubated for different times in the absence or presence of CXCL12, and subsequently subjected to immunoprecipitation and immunoblotting with the antibodies shown. **(c, left)** Cells were nucleofected with the indicated single or combined siRNA, and transfectants analyzed by western blotting. **(Medium)** Densitometric analyses of protein gel bands show the mean \pm s.d. of four independent experiments. **(Right)** the different control, talin and kindlin-3 siRNA transfectants were analyzed in adhesion assays to VCAM-1 co-immobilized with or without CXCL12. **(d)** Transfectants were tested by flow cytometry for binding of the anti- $\beta 1$ HUTS-21 mAb, in the absence or presence of CXCL12. Adhesions and binding ($n = 4$) were significantly inhibited, $***P < 0.001$, $*P < 0.05$. **(e, left)** NCI-H929 cells transfected with both talin and kindlin-3 or with control siRNA were perfused in flow chambers coated with VCAM-1 co-immobilized with CXCL12, and analyzed for rolling and stable cell arrest ($n = 3$). Data is presented as mean \pm s.d. of cell percentages from the total cell population. Adhesions were significantly inhibited in comparison with those of control siRNA transfectants, $*P < 0.05$. **(Right)** the indicated siRNA transfectants pre-attached onto co-immobilized VCAM-1 and CXCL12 in flow chambers, were subjected to cell detachment after sequential increases of shear stress. Data show mean \pm s.d. of cell percentages from the initial number of bound cells remaining attached at the indicated shear stresses ($n = 3$). **(f)** NCI-H929 cells were transfected with the indicated siRNA and GFP vector combinations, and analyzed in adhesion assays to VCAM-1 immobilized with CXCL12. Adhesion was significantly inhibited, $*P < 0.05$, or rescued, $\Delta P < 0.05$. **(g)** NCI-H929 cells were transfected either with control or with both talin and kindlin-3 siRNA, and fluorescently labeled transfectants were subsequently injected into NSG mice prepared for IVM of the calvarial BM. Bar graphs show the percentage of passing cells that rolled or arrested, and represent the mean \pm s.e.m. values obtained from the analysis of 16–20 venules from four mice ($***P < 0.001$).

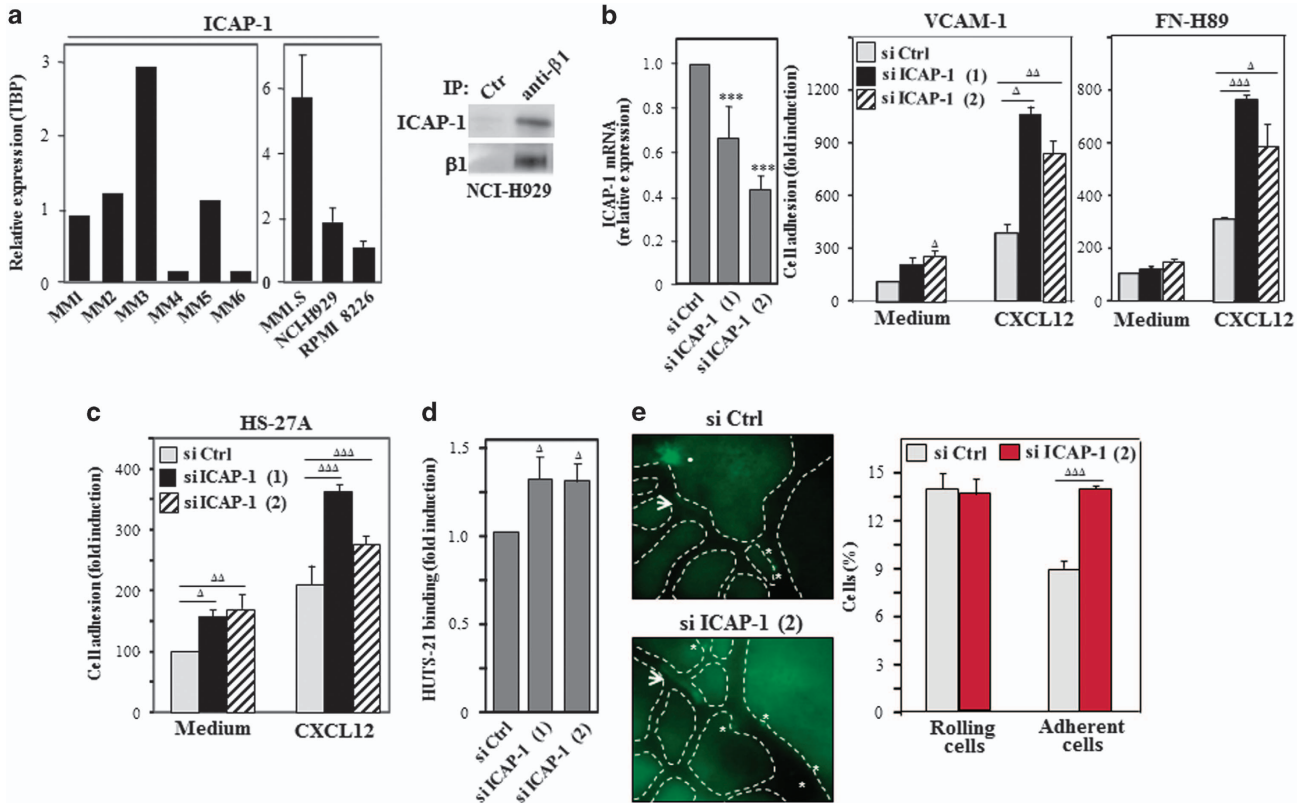


Figure 5. Increased $\alpha 4\beta 1$ -dependent adhesion of ICAP-1-depleted MM cells. **(a, left)** Primary CD138⁺ BM samples from MM patients, or the indicated MM cell lines were analyzed by RT-qPCR for ICAP-1 mRNA levels (normalized to the reference gene TBP). **(Right)** Cells were subjected to immunoprecipitation and immunoblotting with the antibodies shown. **(b, left)** NCI-H929 cells were nucleofected with the indicated siRNA and transfectants analyzed by RT-qPCR. Bars represent relative mRNA expression levels (mean \pm s.d.). Expression was significantly reduced, $***P < 0.001$ ($n = 4$). NCI-H929 transfectants were analyzed in adhesion assays to VCAM-1 ($n = 4$; middle) and FN-H89 ($n = 3$; right) co-immobilized with or without CXCL12. **(c)** NCI-H929 siRNA transfectants were pre-incubated with or without CXCL12 and subjected to adhesion assays to TNF- α -treated HS-27A stromal cells ($n = 4$). Adhesions were significantly stimulated, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$, $\Delta\Delta P < 0.01$ or $\Delta P < 0.05$. **(d)** The same siRNA transfectants were exposed to CXCL12 and tested by flow cytometry for binding of the anti- $\beta 1$ HUTS-21 mAb ($n = 5$; $\Delta P < 0.05$). **(e)** NCI-H929 cells were transfected with control or ICAP-1 siRNA, and labeled cells subsequently injected into mice prepared for IVM. Micrographs are representative images of collecting venules and sinusoids irrigating the BM. Bar graphs show the percentage of passing cells that rolled or arrested, and represent the mean \pm s.e.m. values obtained from the analysis of 16–20 venules from four mice ($\Delta\Delta\Delta P < 0.001$).

and CLL cells mediate interactions with P-selectin and E-selectin, which are constitutively expressed by the BM endothelium,⁵⁶ thus representing the main adhesive events accounting for the rolling of these cells onto the BM microvasculature. To our knowledge, this is the first *in vivo* demonstration showing the involvement of P- and E-selectin and $\alpha 4\beta 1$ in the rolling and firm arrest steps of circulating MM and CLL cells on the BM endothelium. Together with our intravital microscopy analyses revealing that CXCR4 blockade inhibits the MM cell attachment to the BM endothelium, in line with previous data,⁵⁷ the present results strongly suggest that CXCL12 exposed on BM endothelial cells stimulates $\alpha 4\beta 1$ activity of tethered MM cells, together crucially contributing to the initial steps of MM cell adhesion onto the BM microvasculature.

Talin and kindlin-3 bind to the $\beta 1$ subunit cytoplasmic domain and stimulate the affinity and avidity of leukocyte integrins.^{31–33} We show here that talin and kindlin-3 bind to $\beta 1$ in MM and CLL cells, and that this binding is activated by chemokines. Moreover, the *in vitro* adhesion data obtained both under static and flow conditions reveal that talin and kindlin-3 positively regulate the attachment of these cells to VCAM-1, both under basal and chemokine-stimulated conditions. Our results show that stimulation of adhesion by these positive regulators is based on induction of $\alpha 4\beta 1$ high-affinity conformations, and also on boosting the strength to the adhesions to VCAM-1/CXCL12. This later response

was especially detected in adhesion assays under flow conditions, providing high relevance to the finding. Further, a functional link between talin/kindlin-3 and Rac1 during chemokine-stimulated MM cell adhesion to VCAM-1 was found. Characterization of this link should provide additional mechanistic insights on the regulated MM cell adhesion. These *in vitro* results are strengthened by intravital imaging analyses with talin- and kindlin-3-silenced MM cells, which indicate that these proteins are required for efficient cell arrest on the BM microvasculature. Therefore, our data support a cooperative model between talin and kindlin-3 for efficient stimulation of $\alpha 4\beta 1$ -dependent MM cell attachment onto the BM endothelium (Figure 7), similar to the cooperation between these proteins during $\alpha 4\beta 1$ - and $\alpha L\beta 2$ -mediated leukocyte adhesion.^{39,40} As CCL21 is mainly expressed in lymph nodes, whereas no or low CCL21 has been detected in BM,⁵⁸ our data with CLL cells depict a putative role for talin and kindlin-3 in supporting $\alpha 4\beta 1$ -dependent CLL cell attachment to and migration across endothelium in the trafficking of these cells to lymph nodes.

Examination of the role of talin and kindlin-3 on CXCL12-stimulated migration of MM cells across endothelium involving $\alpha 4\beta 1$ revealed that this process is highly dependent on talin and to a lesser extent on kindlin-3. These results pose that talin is crucial for both $\alpha 4\beta 1$ -dependent MM cell attachment to and migration across endothelium, whereas kindlin-3 is important

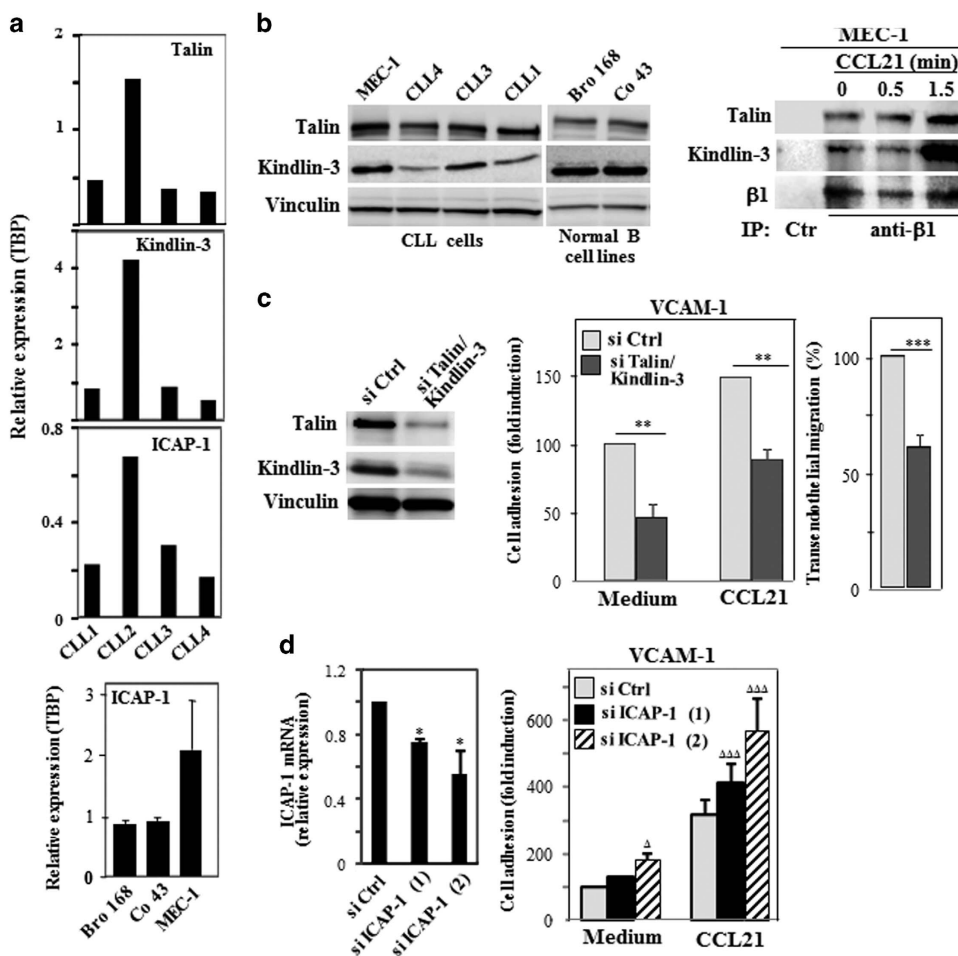


Figure 6. Talin, kindlin-3 and ICAP-1 regulate $\alpha 4\beta 1$ -dependent CLL cell adhesion and transendothelial migration. **(a)** Analyses by RT-qPCR showing talin, kindlin-3 and ICAP-1 mRNA levels in primary CLL samples (top), as well as in the MEC-1 CLL cell line and in EBV-transformed CO43 and BRO168 cells (normalized to the reference gene TBP) ($n = 4$). **(b)** (left) The indicated CLL cells were analyzed by immunoblotting for talin and kindlin-3 expression. Loading control was assessed with anti-vinculin antibodies. (Right) Cells were serum-starved and incubated for different times in the absence or presence of CCL21, and subsequently subjected to immunoprecipitation and immunoblotting with the antibodies shown. **(c)** (left) MEC-1 cells were nucleofected with both talin and kindlin-3 siRNA, and upon 48 h transfectants were analyzed by western blotting. Transfectants were subjected to adhesion assays to VCAM-1 co-immobilized with or without CCL21 (middle), or to transendothelial migration toward CCL21 across TNF- α -treated HUVEC (right). Adhesions and migrations were significantly inhibited, $***P < 0.001$ and $**P < 0.01$ ($n = 4$). **(d)** (left) MEC-1 cells were nucleofected with control or with the indicated ICAP-1 siRNA, and transfectants analyzed by RT-qPCR. Bars represent relative mRNA expression levels (mean \pm s.d.). Expression was significantly reduced, $*P < 0.05$ ($n = 3$). (Right) siRNA transfectants were analyzed in adhesion assays to VCAM-1 ($n = 3$) co-immobilized with or without CXCL12. Adhesions were significantly stimulated, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$.

especially at the attachment step. Notably, cooperation between talin and kindlin-3 was also observed during attachment of MM cells to components of the BM microenvironment, as the $\alpha 4\beta 1$ -mediated, CXCL12-stimulated MM cell adhesion to CS-1/fibronectin and to BM stromal cells required both talin and kindlin-3. These data strongly suggest that once MM cells cross the BM microvasculature, their lodging in the BM mediated by $\alpha 4\beta 1$ needs talin and kindlin-3 function. Furthermore, our data raise the possibility that talin- and kindlin-3-supported MM cell adhesion to BM stroma involving $\alpha 4\beta 1$ might contribute to MM disease progression and possibly to CAM-DR responses. An experimental insight into this later process revealed that talin/kindlin-3-knockdown MM cells exposed to $\alpha 4\beta 1$ ligands were more sensitive to cell death induced by bortezomib, highlighting that activators of $\alpha 4\beta 1$ -dependent MM cell adhesion contribute to CAM-DR. Therefore, the molecules that regulate $\alpha 4\beta 1$ -mediated MM cell adhesion to the BM microenvironment might constitute targets whose therapeutic relevance deserves to be explored.

In the present study we also addressed whether ICAP-1, a protein thought to compete with talin and kindlin-3 for binding to the $\beta 1$ cytoplasmic domain,^{41–43} thus acting as a putative integrin repressor,⁴⁴ could modulate MM and CLL $\alpha 4\beta 1$ -dependent cell adhesion. We found that ICAP-1 was expressed in primary MM and CLL cells, and importantly, ICAP-1 silencing in MM and CLL cell lines led to remarkable increases in $\alpha 4\beta 1$ -dependent adhesion involving stimulation of the integrin high-affinity conformations. Moreover, highlighting the regulatory role of ICAP-1, its silencing in MM cells resulted in enhanced attachment of circulating cells onto the BM microvasculature during IVM studies. Overall, these results indicate that ICAP-1 negatively regulates $\alpha 4\beta 1$ function in MM cells (Figure 7). Our data represent the first identification of an endogenous molecule strongly opposing $\alpha 4\beta 1$ activation and adhesion in MM and CLL cells. Thus, these findings provide an attractive scenario to be investigated in light of the importance of $\alpha 4\beta 1$ in the progression of these B-cell malignancies.

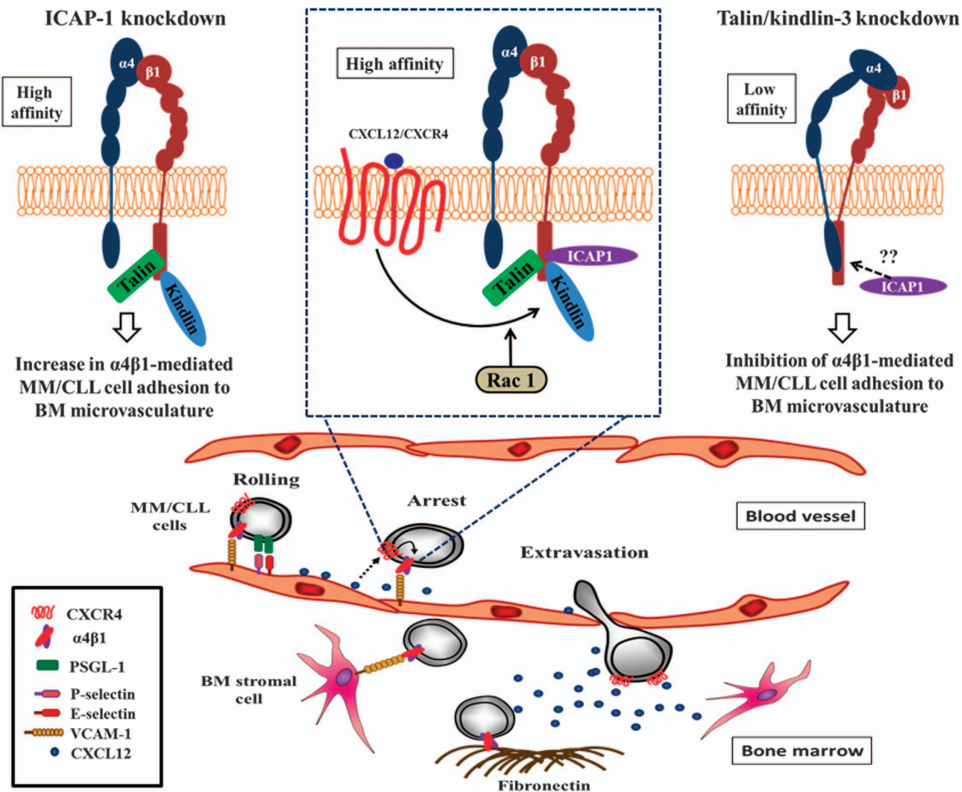


Figure 7. Working model of regulation of $\alpha 4\beta 1$ -dependent MM and CLL adhesion by talin, kindlin-3 and ICAP-1. After selectin-mediated cell rolling, inside-out signaling from CXCR4 leads to $\alpha 4\beta 1$ -dependent cell arrest on the BM microvasculature, followed by chemokine-guided cell extravasation and lodging onto the BM stroma involving $\alpha 4\beta 1$ function (bottom). A final step of this signaling involves stimulation of talin and kindlin-3 binding to the $\beta 1$ cytoplasmic domain, which results in the generation of $\alpha 4\beta 1$ high-affinity conformations and upregulation of cell attachment. Rac1 functional links to talin/kindlin-3 further contributes to enhanced cell adhesion. On the other hand, ICAP-1 represses the adhesion, which might involve competitive binding and displacement of the talin/kindlin-3 module. The effects of the silencing of this module or of ICAP-1 in expression of different $\alpha 4\beta 1$ conformations and on cell adhesion is also shown (top).

The proposed model (Figure 7) suggests that the global level of cell adhesion is likely the balance between the positive signals from talin and kindlin-3 and the inhibitory actions of ICAP-1. Following talin and kindlin-3 silencing, inactive $\alpha 4\beta 1$ conformations accumulate, perhaps due to enhanced ICAP-1 binding to $\beta 1$, leading to reduced $\alpha 4\beta 1$ -dependent MM and CLL cell attachment. When ICAP-1 is knocked down, the balance between positive and negative signals tilts toward higher stimulation of $\alpha 4\beta 1$ activity by talin and kindlin-3, resulting in enhanced MM and CLL cell adhesion to the BM endothelium.

The distinct regulation by the $\beta 1$ -interacting partners talin, kindlin-3 and ICAP-1 on MM and CLL cell adhesion involving $\alpha 4\beta 1$ could account for mechanisms associated with drug resistance and tumor progression in human B-cell malignancies. Thus, targeting intracellular regulators of the $\alpha 4\beta 1$ -integrin in combination with present therapies might exert beneficial effects to overcome the deleterious emergence of constitutive or transient integrin activation in clonal derivatives of drug-resistant malignant B cells.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the multiple myeloma and chronic lymphocytic leukemia patients who donated samples for this research. We thank Dr Pedro Lastres for his help in flow cytometry. We also thank JM Adrover for movie editing. This work was supported by

the following grants from the Ministerio de Economía y Competitividad (Spain): SAF2011-24022 to JT; SAF2012-31613 to AG-P; SAF2012-31142 and SAF2013-49662-EXP to AH; PI13/01454 to PS-M; RD12/0036/0061 to JT and AG-P; RD12/0036/0058 to NCG. The work was also funded by grant P2010/BMD-2314 from the Comunidad de Madrid to AG-P, JT, PS-M and AH, and partially supported by a CRIS foundation grant to fight cancer to JM-L. NCG is also funded by a grant from the Asociación Española Contra el Cáncer (GCB120981SAN), and from the Gerencia Regional de Salud, Junta de Castilla y León (GRS-702/A/11). The CNIC is supported by the Pro-CNIC Foundation.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MM-M, ML and NA-M performed experiments and analyzed data. SS-M, SIV and NA-S performed some experiments, analyzed data and prepared valuable reagents. NG, RM, JM-L, IB and JAG-M collected and provided primary cells from MM and CLL patients. JT, AG-P, AH and PS-M designed the research and wrote the manuscript. All authors reviewed and approved the manuscript.

REFERENCES

- Anderson KC, Carrasco RD. Pathogenesis of myeloma. *Annu Rev Pathol* 2011; **6**: 249–274.
- Kuehl WM, Bergsagel PL. Molecular pathogenesis of multiple myeloma and its premalignant precursor. *J Clin Invest* 2012; **122**: 3456–3463.
- Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2005; **352**: 804–815.
- Morgan GJ, Walker BA, Davies FE. The genetic architecture of multiple myeloma. *Nat Rev Cancer* 2012; **12**: 335–348.
- Damiano JS, Cress AE, Hazlehurst LA, Shtil AA, Dalton WS. Cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR): role of integrins and resistance to apoptosis in human myeloma cell lines. *Blood* 1999; **93**: 1658–1667.

- 6 Noborio-Hatano K, Kikuchi J, Takatoku M, Shimizu R, Wada T, Ueda M *et al*. Bortezomib overcomes cell-adhesion-mediated drug resistance through downregulation of VLA-4 expression in multiple myeloma. *Oncogene* 2009; **28**: 231–242.
- 7 Nowakowski GS, Witzig TE, Dingli D, Tracz MJ, Gertz MA, Lacy MQ *et al*. Circulating plasma cells detected by flow cytometry as a predictor of survival in 302 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Blood* 2005; **106**: 2276–2279.
- 8 Ghobrial IM. Myeloma as a model for the process of metastasis: implications for therapy. *Blood* 2012; **120**: 20–30.
- 9 Azab AK, Quang P, Azab F, Pitsillides C, Thompson B, Chonghaile T *et al*. P-selectin glycoprotein ligand regulates the interaction of multiple myeloma cells with the bone marrow microenvironment. *Blood* 2012; **119**: 1468–1478.
- 10 Uchiyama H, Barut BA, Chauhan D, Cannistra SA, Anderson KC. Characterization of adhesion molecules on human myeloma cell lines. *Blood* 1992; **80**: 2306–2314.
- 11 Lokhorst HM, Lamme T, de Smet M, Klein S, de Weger RA, van Oers R *et al*. Primary tumor cells of myeloma patients induce interleukin-6 secretion in long-term bone marrow cultures. *Blood* 1994; **84**: 2269–2277.
- 12 Sanz-Rodriguez F, Ruiz-Velasco N, Pascual-Salcedo D, Teixido J. Characterization of VLA-4-dependent myeloma cell adhesion to fibronectin and VCAM-1. *Br J Haematol* 1999; **107**: 825–834.
- 13 Sanz-Rodriguez F, Hidalgo A, Teixido J. Chemokine stromal cell-derived factor-1α modulates VLA-4 integrin-mediated multiple myeloma cell adhesion to CS-1/fibronectin and VCAM-1. *Blood* 2001; **97**: 346–351.
- 14 Hideshima T, Chauhan D, Schlossman R, Richardson P, Anderson KC. The role of tumor necrosis factor alpha in the pathophysiology of human multiple myeloma: therapeutic applications. *Oncogene* 2001; **20**: 4519–4527.
- 15 Till KJ, Spiller DG, Harris RJ, Chen H, Zuzel M, Cawley JC. CLL, but not normal, B cells are dependent on autocrine VEGF and alpha4beta1 integrin for chemokine-induced motility on and through endothelium. *Blood* 2005; **105**: 4813–4819.
- 16 Redondo-Munoz J, Escobar-Diaz E, Samaniego R, Terol MJ, Garcia-Marco JA, Garcia-Pardo A. MMP-9 in B-cell chronic lymphocytic leukemia is up-regulated by alpha4beta1 integrin or CXCR4 engagement via distinct signaling pathways, localizes to podosomes, and is involved in cell invasion and migration. *Blood* 2006; **108**: 3143–3151.
- 17 Hartmann TN, Grabovsky V, Wang W, Desch P, Rubenzer G, Wollner S *et al*. Circulating B-cell chronic lymphocytic leukemia cells display impaired migration to lymph nodes and bone marrow. *Cancer Res* 2009; **69**: 3121–3130.
- 18 Brachtl G, Sahakyan K, Denk U, Gibril T, Alinger B, Hofbauer SW *et al*. Differential bone marrow homing capacity of VLA-4 and CD38 high expressing chronic lymphocytic leukemia cells. *PLoS One* 2011; **6**: e23758.
- 19 Binsky I, Lantner F, Grabovsky V, Harpaz N, Shvidel L, Berrebi A *et al*. TAP63 regulates VLA-4 expression and chronic lymphocytic leukemia cell migration to the bone marrow in a CD74-dependent manner. *J Immunol* 2010; **184**: 4761–4769.
- 20 Bailon E, Ugarte-Berzal E, Amigo-Jimenez I, Van den Steen P, Opdenakker G, Garcia-Marco JA *et al*. Overexpression of progelatinase B/proMMP-9 affects migration regulatory pathways and impairs chronic lymphocytic leukemia cell homing to bone marrow and spleen. *J Leukoc Biol* 2014; **96**: 185–199.
- 21 Till KJ, Lin K, Zuzel M, Cawley JC. The chemokine receptor CCR7 and alpha4 integrin are important for migration of chronic lymphocytic leukemia cells into lymph nodes. *Blood* 2002; **99**: 2977–2984.
- 22 Bulian P, Shanafelt TD, Fegan C, Zucchetto A, Cro L, Nuckel H *et al*. CD49d is the strongest flow cytometry-based predictor of overall survival in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2014; **32**: 897–904.
- 23 Till KJ, Harris RJ, Linford A, Spiller DG, Zuzel M, Cawley JC. Cell motility in chronic lymphocytic leukemia: defective Rap1 and alpha4beta2 activation by chemokine. *Cancer Res* 2008; **68**: 8429–8436.
- 24 Montresor A, Bolomini-Vittori M, Simon SI, Rigo A, Vinante F, Laudanna C. Comparative analysis of normal versus CLL B-lymphocytes reveals patient-specific variability in signaling mechanisms controlling LFA-1 activation by chemokines. *Cancer Res* 2009; **69**: 9281–9290.
- 25 Pye DS, Rubio I, Pusch R, Lin K, Pettitt AR, Till KJ. Chemokine unresponsiveness of chronic lymphocytic leukemia cells results from impaired endosomal recycling of Rap1 and is associated with a distinctive type of immunological anergy. *J Immunol* 2013; **191**: 1496–1504.
- 26 Redondo-Munoz J, Ugarte-Berzal E, Terol MJ, Van den Steen PE, Hernandez del Cerro M, Roderfeld M *et al*. Matrix metalloproteinase-9 promotes chronic lymphocytic leukemia b cell survival through its hemopexin domain. *Cancer Cell* 2010; **17**: 160–172.
- 27 Ten Hacken E, Burger JA. Microenvironment dependency in Chronic Lymphocytic Leukemia: The basis for new targeted therapies. *Pharmacol Ther* 2014; **144**: 338–348.
- 28 Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 2007; **7**: 678–689.
- 29 Garcia-Bernal D, Redondo-Munoz J, Dios-Esponera A, Chevre R, Bailon E, Garayoa M *et al*. Sphingosine-1-phosphate activates chemokine-promoted myeloma cell adhesion and migration involving alpha4beta1 integrin function. *J Pathol* 2013; **229**: 36–48.
- 30 Azab AK, Azab F, Blotta S, Pitsillides CM, Thompson B, Runnels JM *et al*. RhoA and Rac1 GTPases play major and differential roles in stromal cell-derived factor-1-induced cell adhesion and chemotaxis in multiple myeloma. *Blood* 2009; **114**: 619–629.
- 31 Kim C, Ye F, Ginsberg MH. Regulation of integrin activation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2011; **27**: 321–345.
- 32 Moser M, Legate KR, Zent R, Fassler R. The tail of integrins, talin, and kindlins. *Science* 2009; **324**: 895–899.
- 33 Calderwood DA, Campbell ID, Critchley DR. Talins and kindlins: partners in integrin-mediated adhesion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013; **14**: 503–517.
- 34 Lefort CT, Rossaint J, Moser M, Petrich BG, Zarbock A, Monkley SJ *et al*. Distinct roles for talin-1 and kindlin-3 in LFA-1 extension and affinity regulation. *Blood* 2012; **119**: 4275–4282.
- 35 Manevich E, Grabovsky V, Feigelson SW, Alon R. Talin 1 and paxillin facilitate distinct steps in rapid VLA-4-mediated adhesion strengthening to vascular cell adhesion molecule 1. *J Biol Chem* 2007; **282**: 25338–25348.
- 36 Garcia-Bernal D, Pardo-Cabanias M, Dios-Esponera A, Samaniego R, Hernan PdiOD, Teixido J. Chemokine-induced Zap70 kinase-mediated dissociation of the Vav1-talin complex activates alpha4beta1 integrin for T cell adhesion. *Immunity* 2009; **31**: 953–964.
- 37 Manevich-Mendelson E, Grabovsky V, Feigelson SW, Cinamon G, Gore Y, Goverse G *et al*. Talin 1 is required for integrin-dependent B lymphocyte homing to lymph nodes and the bone marrow but not for follicular B-cell maturation in the spleen. *Blood* 2010; **116**: 5907–5918.
- 38 Ebisuno Y, Katagiri K, Katakai T, Ueda Y, Nemoto T, Inada H *et al*. Rap1 controls lymphocyte adhesion cascade and interstitial migration within lymph nodes in RAP1-dependent and -independent manners. *Blood* 2010; **115**: 804–814.
- 39 Moser M, Bauer M, Schmid S, Ruppert R, Schmidt S, Sixt M *et al*. Kindlin-3 is required for beta2 integrin-mediated leukocyte adhesion to endothelial cells. *Nat Med* 2009; **15**: 300–305.
- 40 Manevich-Mendelson E, Feigelson SW, Pasvolosky R, Aker M, Grabovsky V, Shulman Z *et al*. Loss of Kindlin-3 in LAD-III eliminates LFA-1 but not VLA-4 adhesiveness developed under shear flow conditions. *Blood* 2009; **114**: 2344–2353.
- 41 Chang DD, Wong C, Smith H, Liu J. ICAP-1, a novel beta1 integrin cytoplasmic domain-associated protein, binds to a conserved and functionally important NPXY sequence motif of beta1 integrin. *J Cell Biol* 1997; **138**: 1149–1157.
- 42 Zhang XA, Hemler ME. Interaction of the integrin beta1 cytoplasmic domain with ICAP-1 protein. *J Biol Chem* 1999; **274**: 11–19.
- 43 Degani S, Balzac F, Braccaccio M, Guazzone S, Retta SF, Silengo L *et al*. The integrin cytoplasmic domain-associated protein ICAP-1 binds and regulates Rho family GTPases during cell spreading. *J Cell Biol* 2002; **156**: 377–387.
- 44 Bouvard D, Millon-Fremillon A, Dupe-Manet S, Block MR, Albiges-Rizo C. Unraveling ICAP-1 function: toward a new direction? *Eur J Cell Biol* 2006; **85**: 275–282.
- 45 Bouvard D, Aszodi A, Kostka G, Block MR, Albiges-Rizo C, Fassler R. Defective osteoblast function in ICAP-1-deficient mice. *Development* 2007; **134**: 2615–2625.
- 46 Stacchini A, Aragno M, Vallario A, Alfano A, Circo P, Gottardi D *et al*. MEC1 and MEC2: two new cell lines derived from B-chronic lymphocytic leukaemia in prolymphocytoid transformation. *Leuk Res* 1999; **23**: 127–136.
- 47 Garcia-Bernal D, Wright N, Sotillo-Mallo E, Nombela-Arrieta C, Stein JV, Bustelo XR *et al*. Vav1 and Rac Control Chemokine-promoted T Lymphocyte Adhesion Mediated by the Integrin {alpha}4{beta}1. *Mol Biol Cell* 2005; **16**: 3223–3235.
- 48 Garcia-Bernal D, Sotillo-Mallo E, Nombela-Arrieta C, Samaniego R, Fukui Y, Stein JV *et al*. DOCK2 is required for chemokine-promoted human T lymphocyte adhesion under shear stress mediated by the integrin alpha4beta1. *J Immunol* 2006; **177**: 5215–5225.
- 49 Pardo-Cabanias M, Bartolome RA, Wright N, Hidalgo A, Drager AM, Teixido J. Integrin alpha4beta1 involvement in stromal cell-derived factor-1α-promoted myeloma cell transendothelial migration and adhesion: role of cAMP and the actin cytoskeleton in adhesion. *Exp Cell Res* 2004; **294**: 571–580.
- 50 Hidalgo A, Weiss LA, Frenette PS. Functional selectin ligands mediating human CD34(+) cell interactions with bone marrow endothelium are enhanced post-natally. *J Clin Invest* 2002; **110**: 559–569.
- 51 Mazo IB, Gutierrez-Ramos JC, Frenette PS, Hynes RO, Wagner DD, von Andrian UH. Hematopoietic progenitor cell rolling in bone marrow microvessels: parallel contributions by endothelial selectins and vascular cell adhesion molecule 1. *J Exp Med* 1998; **188**: 465–474.
- 52 Luque A, Gomez M, Puzon W, Takada Y, Sanchez-Madrid F, Cabanas C. Activated conformations of very late activation integrins detected by a group of antibodies (HUTS) specific for a novel regulatory region (355-425) of the common beta 1 chain. *J Biol Chem* 1996; **271**: 11067–11075.

- 53 Uchiyama H, Barut BA, Mohrbacher AF, Chauhan D, Anderson KC. Adhesion of human myeloma-derived cell lines to bone marrow stromal cells stimulates interleukin-6 secretion. *Blood* 1993; **82**: 3712–3720.
- 54 Mori Y, Shimizu N, Dallas M, Niewolna M, Story B, Williams PJ *et al*. Anti-alpha4 integrin antibody suppresses the development of multiple myeloma and associated osteoclastic osteolysis. *Blood* 2004; **104**: 2149–2154.
- 55 Olson DL, Burkly LC, Leone DR, Dolinski BM, Lobb RR. Anti-alpha4 integrin monoclonal antibody inhibits multiple myeloma growth in a murine model. *Mol Cancer Ther* 2005; **4**: 91–99.
- 56 Katayama Y, Hidalgo A, Furie BC, Vestweber D, Furie B, Frenette PS. PSGL-1 participates in E-selectin-mediated progenitor homing to bone marrow: evidence for cooperation between E-selectin ligands and alpha4 integrin. *Blood* 2003; **102**: 2060–2067.
- 57 Alsayed Y, Ngo H, Runnels J, Leleu X, Singha UK, Pitsillides CM *et al*. Mechanisms of regulation of CXCR4/SDF-1 (CXCL12)-dependent migration and homing in multiple myeloma. *Blood* 2007; **109**: 2708–2717.
- 58 Davids MS, Burger JA. Cell Trafficking in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Open J Hematol* 2012; **3**: 1–13.

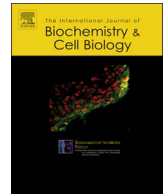
Supplementary Information accompanies this paper on the Leukemia website (<http://www.nature.com/leu>)

ANEXO III



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biochemistry and Cell Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biocel

Review article

The good and bad faces of the CXCR4 chemokine receptor

Joaquín Teixidó*, Mónica Martínez-Moreno, Marta Díaz-Martínez, Silvia Sevilla-Movilla

Department of Cellular and Molecular Medicine, Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Chemokines
 Signalling
 Hematopoiesis
 Cancer
 Antagonists

ABSTRACT

Chemokines are chemotactic cytokines that promote cell migration and activation under homeostatic and inflammatory conditions. Chemokines bind to seven transmembrane-spanning receptors that are coupled to heterotrimeric guanine nucleotide-binding (G) proteins, which are the responsible for intracellularly transmitting the activating signals for cell migration. Hematopoiesis, vascular development, lymphoid organ morphogenesis, cardiogenesis and neural differentiation are amongst the processes involving chemokine function. In addition, immune cell trafficking from bone marrow to blood circulation, and from blood and lymph to lymphoid and inflamed tissues, is tightly regulated by chemokines both under physiological conditions and also in autoimmune diseases. Furthermore, chemokine binding to their receptors stimulate trafficking to and positioning of cancer cells into target tissues and organs during tumour dissemination. The CXCL12 chemokine (also known as stromal-cell derived factor-1 α , SDF-1 α) plays key roles in hematopoiesis and lymphoid tissue architecture, in cardiogenesis, vascular formation and neurogenesis, as well as in the trafficking of solid and hematological cancer cell types. CXCL12 binds to the CXCR4 receptor, a multi-faceted molecule which tightly mirrors CXCL12 functions in homeostasis and disease. This review addresses the important roles of the CXCR4-CXCL12 axis in homeostasis, specially focusing in hematopoiesis, as well as it provides a picture of CXCR4 as mediator of cancer cell spreading, and a view of the available CXCR4 antagonists in different cancer types.

1. Introduction

Chemokines belong to a large family of structurally-related chemotactic cytokines that exert their functions upon binding to heterotrimeric guanine nucleotide-binding (G) protein-coupled receptors (GPCR) (Allen et al., 2007; Proudfoot, 2002; Rossi and Zlotnik, 2000). Chemokines stimulate cell migration and activation and play critical roles during hematopoiesis, immune surveillance and inflammation, morphogenesis and neovascularization, as well as in autoimmune diseases and cancer (Griffith et al., 2014; Schulz et al., 2016). Based on the location of the two N-terminal cysteine residues, the chemokine family has been divided into four subfamilies: the CXC subfamily presents a single residue between the cysteines; the CX3C chemokines contain three residues separating the cysteines, and the CC and C subfamilies show one or two adjacent cysteines, respectively (Zlotnik and Yoshie, 2012). In addition, chemokines have also been classified in inflammatory (or inducible) chemokines, whose expression increases upon inflammatory conditions and regulate leukocyte recruitment to inflamed tissues, and homeostatic chemokines, which display

constitutive expression and are involved in regulation of homeostatic cell migration. Inflammatory chemokines include CCL2, CCL3, CCL4 and CCL5, whereas CXCL12, CXCL13 and CCL21 represent examples of homeostatic counterparts. Several chemokines share both inflammatory and homeostatic properties and have been termed dual-function chemokines (Zlotnik and Yoshie, 2012). Furthermore, this classification is not constrained, as some inflammatory chemokines display homeostatic characteristics under certain circumstances, and expression of homeostatic chemokines can be enhanced under stress conditions.

A characteristic feature of most chemokines is that, in addition of binding chemokine receptors, they also interact with glycosaminoglycans (GAGs), which are attached either to cell surface proteins, or form part of the extracellular matrix (ECM) network (Kufareva et al., 2015). GAGs contribute to the retention of chemokines on the surface of high endothelial venules, a key step for chemokine-promoted leukocyte homing from blood into lymphoid tissue. Furthermore, within the ECM, GAGs facilitate the generation of haptokinetic chemokine gradients which are critical for the formation of B cell follicles and T cell zones (Schumann et al., 2010).

Abbreviations: GPCR, heterotrimeric guanine nucleotide-binding (G) protein-coupled receptors; GAG, glycosaminoglycan; BM, bone marrow; LN, lymph node; ACKR, atypical chemokine receptor; CAR, CXCL12-abundant reticular; HSC, hematopoietic stem cell; CLL, chronic lymphocytic leukemia; MM, multiple myeloma; AML, acute myeloid leukemia; SCLC, small cell lung cancer; NSCLC, non-small cell lung cancer

* Corresponding author at: Centro de Investigaciones Biológicas, Department of Cellular and Molecular Medicine. Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain.

E-mail address: joaquin@cib.csic.es (J. Teixidó).

<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2017.12.018>

Received 19 October 2017; Received in revised form 14 December 2017; Accepted 19 December 2017

Available online 27 December 2017

1357-2725/ © 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Classification of chemokine receptors follows that of their ligands, and thus they have been divided into CR, CCR, CXCR and CX3CR receptors based on the chemokine subfamily they bind (Zlotnik and Yoshie, 2012). Chemokine receptors consist of a single polypeptide chain of approximately 350 amino acids that crosses seven times the cell membrane. Ligand binding involves the receptor N-terminal domain and the three extracellular hydrophilic loops, whereas the intracellular loops and the Ser-Thr-rich C-terminal region are coupled to receptor internalization and to heterotrimeric G proteins, respectively (Allen et al., 2007). Located intracellularly after the third transmembrane domain, there is the conserved DRY motif, which is critical to couple the receptor to G proteins and for downstream signaling. Chemokine receptor-promoted signaling includes activation of phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K), phospholipases A2 and D, several tyrosine kinases, as well as mitogen-activated protein kinases (MAPK) (Mellado et al., 2001). Exceptions for this rule involve several atypical receptors (ACKR; D6, DARC, CCRL1, CCRL2 and ACKR3/CXCR7) which lack the DRY motif, and therefore are not associated with G proteins (Bachelier et al., 2014). This causes inability to signal, and hence they have been proposed to function as scavengers for chemokines (Graham et al., 2012). Dynamic homo- and heterodimerization of the chemokine receptors has been shown to upregulate the sensitivity and strength of chemokine responses (Mellado et al., 2001). In general, there is a strong redundancy and promiscuity between chemokines and their receptors, so that a chemokine can bind to several receptors, whereas a single receptor can transduce signals from different chemokines, but always maintaining the family specificity. This reflects the ability of chemokines to regulate different leukocyte populations, especially in complex contexts such as acute and chronic inflammatory responses.

Heterotrimeric G proteins consist of a α subunit and a complex formed by β and γ subunits (Neves et al., 2002; Offermanns, 2001; Pierce et al., 2002). Basally, $G\beta\gamma$ and GDP-bound $G\alpha$ are associated, and following chemokine receptor activation after binding to a chemokine, GTP replaces GDP and GTP- $G\alpha$ dissociates from the $G\beta\gamma$ -dimer. These two elements interact with effector proteins leading to the activation of distinct signaling pathways. The GTPase activity inherent to $G\alpha$ limits G protein activation, as GTP hydrolysis causes re-association of GDP- $G\alpha$ and $G\beta\gamma$ (Oldham and Hamm, 2008). Turning off heterotrimeric G protein signaling also involves G protein-coupled receptor kinases and subsequent β -arrestin binding to the phosphorylated chemokine receptor, which is then desensitized by internalization (Shenoy and Lefkowitz, 2011). Another level of termination of G protein-dependent signaling is provided by RGS (Regulators of G protein signaling) proteins, which are GTPase-accelerating proteins that promote GTP hydrolysis by the alpha subunit of the heterotrimeric G proteins, leading to inactivation of G proteins and subsequent blockade of signaling pathways (Kehrl, 2016; Woodard et al., 2015).

2. The CXCL12-CXCR4 axis

The CXCL12 chemokine plays critical roles in hematopoiesis, cardiogenesis and neurogenesis, and it regulates cancer metastasis (Pawig et al., 2015). Human and mouse CXCL12 are highly conserved, and their splicing gives rise to different isoforms, the α and β being the predominant and more ubiquitously expressed forms (Shirozu et al., 1995; Yu et al., 2006). CXCL12 α is mainly expressed in bone marrow (BM), lungs, lymph nodes (LN), heart, thymus and liver, although it can also be found in the skin and small intestine. The precursor pro-CXCL12 form contains a 21 amino acid signal peptide at the N-terminal region, which is cleaved before secretion of the mature, biologically active CXCL12 (Pawig et al., 2015). This mature CXCL12 is unstable, and protease-dependent N-terminal truncated forms have been detected in blood (De La Luz Sierra et al., 2004), which likely represents one of the mechanisms behind the reported short life of the chemokine in mouse blood (O'Boyle et al., 2009). Sequestration of CXCL12 by negatively-charged GAGs exposed on the surface of the endothelium also

contributes to the chemokine clearance from the bloodstream (Amara et al., 1999), it protects from protease cleavage (Sadir et al., 2004) and, as stated above, facilitates the generation of the chemokine haptotactic gradients that promote leukocyte diapedesis (Netelenbos et al., 2003). Therefore, both proteases and GAGs are important components for the regulation of CXCL12 activity.

CXCL12 presents a flexible N-terminus connected by an extended "N-loop", a three-stranded β -sheet followed by an α -helix that is stabilized by conserved cysteine residues that form two disulfide bonds (Crump et al., 1997). The CXCL12 receptor CXCR4 initially binds to residues 12–17 of the chemokine (motif REFESH), leading to a conformational change of the receptor which then interacts with the 1–8 N-terminal residues of CXCL12, from which residues 1 (Lys) and 2 (Pro) are those directly involved in CXCR4 activation (Crump et al., 1997).

The human (352 amino acids) and mouse (359 amino acids) CXCR4 share 89% similarity and are ubiquitously expressed both in embryonic and adult tissues (Loetscher et al., 1994; Oberlin et al., 1996). Analysis of crystal structures of CXCR4 complexed with a small-molecular antagonist and a cyclic peptide inhibitor revealed specific differences in the orientation of the α helices as compared with other available GPCR structures (Wu et al., 2010). A key difference is an extension of the extracellular end of helix VII, which is two helical turns longer in CXCR4 than other GPCRs, allowing a disulfide bond of Cys274 in helix VII with Cys28 in the N-terminal region. This disulfide bond, together with extracellular loop 2 (ECL2, Cys186) and the extracellular end of alpha helix III (Cys109) is critical for CXCL12 binding (Wu et al., 2010). Different from the extracellular half of CXCR4, the intracellular CXCR4 region is structurally quite similar to the intracellular half of other GPCRs. The third CXCR4 intracellular loop is required for $G\alpha_i$ -dependent signaling. Crystallization and combination of computational, functional, as well as biophysical methods supported a 1:1 over a 1:2 stoichiometry of CXCL12-CXCR4 binding (Kufareva et al., 2014).

Expression of CXCR4 is stimulated by the Nuclear Respiratory Factor 1 (NRF-1) (Moriuchi et al., 1997), and inhibited by the negative regulator Ying Yang 1 (YY1) (Moriuchi et al., 1999). Furthermore, CXCR4 transcription is regulated by several second messengers, cytokines and growth factors (Busillo and Benovic, 2007). Several post-translational modifications have been reported on CXCR4, including N-glycosylation and tyrosine sulfation (Busillo and Benovic, 2007). The CXCL12-CXCR4 axis promotes activation of several signaling pathways, including Ras-MAPK, PI3K-AKT-mTOR, Jak2,3-STAT2,4, PLC beta and gamma2, NF- κ B and JNK/p38 MAPK, while it inhibits adenylate cyclase and subsequent cAMP formation (Mellado et al., 2001) (Fig. 1). A key feature of CXCL12 is that it upregulates the adhesion of hematopoietic progenitors, T cells and myeloma cells involving activation of the VLA-4 integrin (Garcia-Bernal et al., 2009; Grabovsky et al., 2000; Hidalgo et al., 2001; Manevich et al., 2007; Peled et al., 1999; Sanz-Rodriguez et al., 2001). CXCR4 is desensitized following continuous CXCL12 binding, based on receptor phosphorylation, β -arrestin binding and internalization, followed by ubiquitination and lysosomal degradation (Marchese et al., 2003).

Studies with mice deficient in CXCL12 or CXCR4 revealed that the CXCL12-CXCR4 signaling is required during hematopoiesis, blood vessel formation in the gastrointestinal tract, cerebellar development, formation of the cardiac ventricular septum, and for embryo viability (Ma et al., 1998; Ma et al., 1999; Nagasawa et al., 1996; Tachibana et al., 1998; Zou et al., 1998), which initially suggested that they represent a unique ligand-receptor pair. More recently, it has been demonstrated that the atypical pro-inflammatory chemokine macrophage migration inhibitory factor (MIF) is capable of binding to CXCR4, which leads to receptor activation, chemotaxis and arrest of T lymphocytes (Bernhagen et al., 2007). It remains to be determined if MIF and CXCL12 influence each other binding to and activation of CXCR4. Moreover, the atypical chemokine receptor 3 (ACKR3; also known as CXCR7), displays CXCL12 and MIF binding, and exhibits scavenging activity for CXCL12 (Balabanian et al., 2005a), thus modulating the

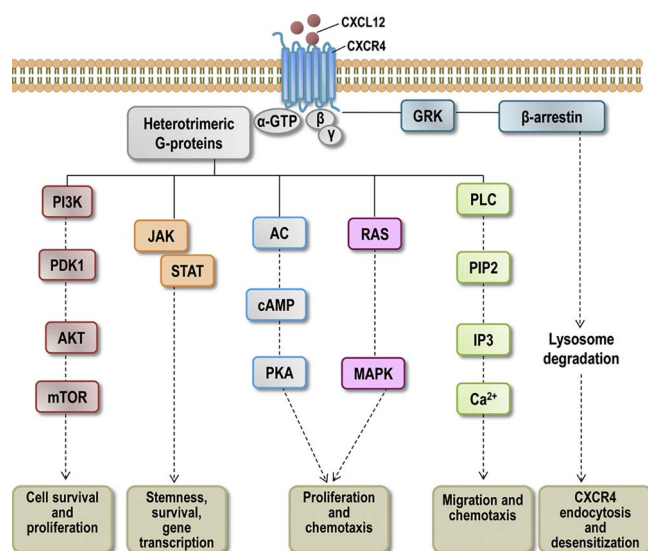


Fig. 1. Signalling promoted by the CXCL12-CXCR4 axis. Upon CXCL12 binding to CXCR4, GTP-G α and the G $\beta\gamma$ -dimer activate different downstream signaling pathways including PI3K-AKT-mTOR, Jak-STAT, Ras-MAPK and PLC, while blocking adenylate cyclase and cAMP production, together leading to regulation of cell migration, proliferation, survival and gene expression. The GTPase activity of G α limits G protein activation, as GTP hydrolysis causes re-association of GDP-G α and G $\beta\gamma$, resulting in termination of signaling. G protein-coupled receptor kinases (GRK) phosphorylate the receptor, and after subsequent β -arrestin binding, the receptor is desensitized by internalization.

CXCR4 activity. Additional CXCR4 ligands include extracellular ubiquitin (eUb) (Saini et al., 2011) and the HIV protein gp120 (De Clercq, 2000).

CXCR4-dependent function is not only critical for development, homeostasis and for binding of T cell-tropic strains of HIV-1, but strong evidence indicates that it also contributes to cancer cell survival and metastasis. The next sections focus on the regulation of hematopoiesis and immune cell trafficking by the CXCL12-CXCR4 axis, and its involvement in the positioning and dissemination of cancer cells.

3. CXCL12-CXCR4 signaling in hematopoiesis and immune cell trafficking

Immune cell progenitors develop and differentiate in primary lymphoid organs: bone marrow, thymus and fetal liver (Griffith et al., 2014; Schulz et al., 2016). In mammals, the fetal liver is the main hematopoietic site during mid-gestation stages, which then switches to the BM at late fetal phases and throughout the adult life. CXCL12- and CXCR4-deficient mice die perinatally (Ma et al., 1998; Nagasawa et al., 1996; Tachibana et al., 1998; Zou et al., 1998), and CXCL12-CXCR4 signaling is essential for B cell development in fetal liver and BM (Ma et al., 1998; Nagasawa et al., 1996), as well as for the homing of hematopoietic stem cells (HSCs) and neutrophils to BM (Ara et al., 2003). Studies with hematopoietic chimeras by transferring CXCR4^{-/-} cells into lethally irradiated recipients, or analyses with CXCR4 conditionally deficient mice indicated that the CXCL12-CXCR4 module was required for the maintenance of HSCs, for the production of B cells, plasmacytoid dendritic and NK cells, as well as for the homing of plasma cells to the BM (Kohara et al., 2007; Noda et al., 2011; Sugiyama et al., 2006; Tokoyoda et al., 2004; Tzeng et al., 2011). Furthermore, embryos lacking CXCL12 or CXCR4 display a reduction in myelopoiesis in fetal liver and a nearly complete loss of myelopoiesis in the BM (Ma et al., 1998; Nagasawa et al., 1996). Different from B cells, generation of early T cell precursors is not affected by absence of the CXCL12-CXCR4 axis (Noda et al., 2011). Only when CXCR4, as well as the chemokine receptors CCR7 and CCR9 are missing, the numbers of earliest T cell precursors are severely reduced (Calderon and Boehm, 2011).

CXCL12 is the most abundant chemokine produced in the BM, and importantly, it is critical for the regulation of HSC quiescence, retention and differentiation (Nie et al., 2004; Sugiyama et al., 2006). CXCR4 is expressed by most hematopoietic cells in the BM, including HSCs and hematopoietic progenitors (Broxmeyer et al., 2005; Liles et al., 2003). CXCL12 is expressed by several BM cells, including CXCL12-abundant reticular (CAR) cells, osteoblasts, sinusoidal endothelial cells and nestin-expressing cells (Ara et al., 2003; Dar et al., 2005; Nagasawa et al., 1996; Okada et al., 2002; Sugiyama et al., 2006; Tokoyoda et al., 2004) (Mendez-Ferrer et al., 2010). *In vivo* CAR cell ablation revealed the critical role of this cell type for maintenance of HSCs and for development of lymphoid and erythroid progenitors (Omatsu et al., 2010). Of note, analyses with mice lacking CXCL12 production by specific BM stromal cells has revealed that CAR and endothelial cells are key components of the HSC niches, and that CXCL12 produced by endothelial cells, as well as by a small population of nestin-negative CAR cells might contribute to HSC maintenance (Ding and Morrison, 2013; Greenbaum et al., 2013; Omatsu et al., 2010).

Interestingly, CXCL12 production is regulated by circadian signals, such as those coming from adrenergic hormones (norepinephrine), as well as by inflammatory mediators (Lucas et al., 2008; Mendez-Ferrer et al., 2008). Importantly, variations in the chemokine levels such as during infections or in sterile inflammation, cause strong changes in HSPC distribution between BM and blood, and are associated with fluctuations in hematopoietic lineage production (Ueda et al., 2005; Ueda et al., 2004). It has been proposed that the primarily function of CXCL12 would be to allow HSCs to position close to permissive niches for access to critical niche factors that promote quiescence (Lim et al., 2017). Therefore, fluctuations in the circadian clock control CXCL12 levels, resulting in HSC release from and homing back to the BM niche (Mendez-Ferrer et al., 2008), leading to cell cycle G1 entrance and division of HSCs towards hematopoietic progenitors for mobilization into blood, or back to quiescence (G0), respectively. Further confirmation of the critical role of the CXCL12-CXCR4 axis in HSC retention in the BM came from data of patients with the WHIM syndrome (warts, hypogammaglobulinemia, infection, myelokathexis). This disease is linked to autosomal dominant mutations in CXCR4 that causes C-terminal truncation of CXCR4, resulting in constitutive signaling due to inability of the receptor to be internalized and desensitized in response to CXCL12 (Balabanian et al., 2005b; Gorlin et al., 2000; Gulino et al., 2004; Hernandez et al., 2003). The constitutive signaling leads to pancytopenia based on increased BM retention of differentiated leukocytes, especially neutrophils. The importance of CXCL12-CXCR4 pair in the retention of HSPCs has been pharmacologically used to disrupt this interaction for HSC mobilization in the periphery as a source of progenitors for BM reconstitution in different hematological malignancies (Broxmeyer et al., 2005).

In addition to its prominent role during hematopoiesis, CXCL12-CXCR4 signaling regulates thymocyte trafficking inside the thymus, and contributes to migration of B and T cells to and inside lymph nodes (Griffith et al., 2014; Schulz et al., 2016). Studies with BM chimeras and conditional deletion of CXCR4 revealed that DN1 cells in the thymus require CXCR4 for outward migration and do not develop into DN2 or later stages (Plotkin et al., 2003). Entry of B and T cells into LN and Peyer's patches involves both the CCL19/21-CCR7 and CXCR4-CXCL12 receptor-ligand pairs (Okada et al., 2002). Inactivation of CXCR4 in the B-cell lineage leads to reduced numbers of B cells in splenic marginal zone and primary follicles, and impaired T-independent antibody responses (Nie et al., 2004). Furthermore, absence of CXCR4 signaling generates aberrant ectopic B cell follicles, and within a developing germinal center, the positioning of B cells is controlled by both CXCR4 and CXCR5 (Allen et al., 2004). In this latter case, CXCR4 regulates B lymphocyte distribution in the dark zone, whereas CXCR5 promotes B cell migration in the germinal center light zone.

4. The CXCL12-CXCR4 axis in hematological malignancies

As CXCL12 regulates hematopoietic cell trafficking to and positioning in the BM (Lim et al., 2017), it is not surprising that CXCR4 expression on cancer cells from several hematopoietic malignancies influences neoplasia progression by controlling cancer cell migration to BM as well as to LNs (Teicher and Fricker, 2010). CXCR4 is over-expressed in hematologic cancers, including chronic lymphocytic leukemia (CLL), acute myeloid leukemia (AML), multiple myeloma (MM) and in lymphomas (Balkwill, 2004), and the CXCL12-CXCR4 signaling is implicated in the regulation of cell adhesion, migration, invasion and dissemination in these hematological neoplasms (Scala, 2015). Several CXCR4 inhibitors like plerixafor (Mozobil, AMD 3100), and anti-CXCR4 antibodies have been employed to mobilize stem cells from the BM to the bloodstream, and together with granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) are being used for autologous transplants in several hematological malignancies (Hopman and DiPersio, 2014). Plerixafor was approved by the FDA in 2008 for use in combination with G-CSF for HSC mobilization to blood circulation for collection and subsequent autologous transplantation in lymphoma and MM patients (De Clercq, 2009; Devine et al., 2004), and it is currently investigated in several clinical trials for glioma, AML, and neuroblastoma (Fig. 2) (Scala, 2015). In this section we will focus on basic and clinical knowledge of CXCR4 on CLL, MM and AML.

4.1. Chronic lymphocytic leukemia

CLL is a highly prevalent adult leukemia characterized by dysfunctional B lymphocyte accumulation in the LNs and BM (Chiorazzi et al., 2005). Recirculation of malignant cells between peripheral blood, BM and lymphoid tissues contributes to clinical progression, and chemokine receptors and integrins may represent important prognostic markers and therapeutic targets. CXCR4 overexpression in CLL and associated CXCL12-dependent cell migration and activation were early described (Burger et al., 1999; Durig et al., 2001; Mohle et al., 1999). Examination of mechanisms controlling CXCR4 expression revealed that B cell receptor ligation down-regulates the chemokine receptor on CLL cells (Vlad et al., 2009), and that recycling and internalization are also key players regulating CXCR4 expression (Patrussi et al., 2015; Saint-Georges et al., 2016). In addition, it has been shown that inhibition of BTK leads to reduction in CXCR4 expression in CLL (Chen et al., 2016). CXCR4-driven signaling increases MMP-9 levels which in turn stimulates CLL cell invasion (Redondo-Munoz et al., 2006), and promotes VLA-4-mediated adhesion (Ganghammer et al., 2015). Moreover, the CXCL12-CXCR4 axis stimulates RAF-dependent

activation that is blocked by sorafenib (Messmer et al., 2011), as well as CD20 upregulation which is inhibited by ibrutinib (Pavlasova et al., 2016). CLL patients with high CXCR4 levels have an increased risk of lymphoid organ infiltration and poor prognosis (Calissano et al., 2009), and combined CXCR3/CXCR4 measurements are of high prognostic value in CLL (Ganghammer et al., 2016). Of note, CLL cells expressing high levels of ZAP-70, an important prognostic marker in CLL, display higher signaling and survival in response to CXCL12 than cells expressing low amounts of the marker (Richardson et al., 2006).

CXCR4 antagonists and antibodies have been explored as inhibitors in CLL treatment (Fig. 2). Thus, the T140, TC14012 and TN14003 small peptide CXCR4 inhibitors block CLL cell chemotaxis, migration and CXCL12-induced signaling, and resensitize CLL cells cultured with BM stroma to fludarabine-induced apoptosis (Burger et al., 2005). More recently, NOX-A12 (olaptesed pegol; Noxxon Pharma), an anti-CXCL12 aptamer that binds CXCL12 with high affinity and that inhibits the interaction of CXCL12 with CXCR4 and CXCR7 (Duda et al., 2011; Sayyed et al., 2009), has been shown to efficiently impair CLL cell chemotaxis and to block stroma-dependent drug resistance (Hoellenriegel et al., 2014). Interestingly, NOX-A12 competes with heparin for CXCL12 binding, leading to the release of CXCL12 from stromal cell-surface-bound GAGs, thereby neutralizing the chemokine gradient (Hoellenriegel et al., 2014). Furthermore, NOX-A12 strengthens the anti-angiogenic effect of anti-VEGF (Deng et al., 2017). NOX-A12 has been tested in a phase 2a clinical trial in combination with bendamustine and rituximab in patients with relapsed CLL (ClinicalTrials.gov, #NCT01486797), though results have not been yet presented.

BMS-936564/MDX-1338 (ulocuplumab; Bristol-Myers Squibb), a fully human IgG4 anti-CXCR4 antibody, induces CLL cell apoptosis and is efficacious as monotherapy in CLL mice models, as well as in AML and MM (Kashyap et al., 2016; Kuhne et al., 2013). An additional humanized anti-CXCR4 monoclonal antibody, LY2624587 (Eli Lilly), is a potent CXCR4 antagonist that inhibits CLL migration and signaling, and causes apoptosis *in vitro* and *in vivo* (Peng et al., 2016). Moreover, PF-06747143 (Pfizer) is a novel IgG1 anti-CXCR4 antibody that displays strong cytotoxicity in CLL cells (Kashyap et al., 2017), and whose phase 1 clinical trial (ClinicalTrials.gov, #NCT02954653) has recently ended.

4.2. Multiple myeloma

Multiple myeloma is a B-cell neoplasm characterized by clonal proliferation and accumulation of malignant plasma cells in the BM, by osteolytic bone lesions, hypercalcemia, anemia and renal disease (Kuehl and Bergsagel, 2012; Raab et al., 2009). MM cells were shown to express heterogeneous levels of CXCR4, and the CXCL12-CXCR4 signaling contributes to cell adhesion, migration and activation (Alsayed et al., 2007; Durig et al., 2001; Hideshima et al., 2002; Martinez-Moreno et al., 2016; Menu et al., 2006; Moller et al., 2003; Nakayama et al., 2003; Sanz-Rodriguez et al., 2001). Importantly, minimal residual disease subclones in MM express high CXCR4 levels (Paiva et al., 2016). CXCL12 upregulates adhesion of MM cells mediated by the VLA-4 integrin (Parmo-Cabanas et al., 2004; Sanz-Rodriguez et al., 2001), an adhesion receptor with important roles in MM cell survival and drug resistance (Mori et al., 2004; Noborio-Hatano et al., 2009; Olson et al., 2005). Additionally, CXCL12-promoted MM cell adhesion involving VLA-4 has been demonstrated to be regulated by S1P through the S1P1 receptor (Beider et al., 2017; Garcia-Bernal et al., 2013).

The expression of CXCR4 can be stimulated by Notch signaling, and blockade of this signaling leads to reduced MM cell infiltration in the marrow (Mirandola et al., 2013). Furthermore, increased CXCR4 levels were found to be associated with the acquisition of an epithelial-mesenchymal transition phenotype, favoring MM cell invasion and bone metastasis (Roccaro et al., 2015).

The CXCL12-CXCR4 axis provides therapeutic opportunities in MM (Lonial et al., 2016) (Fig. 2). Thus, plerixafor disrupts the interaction of

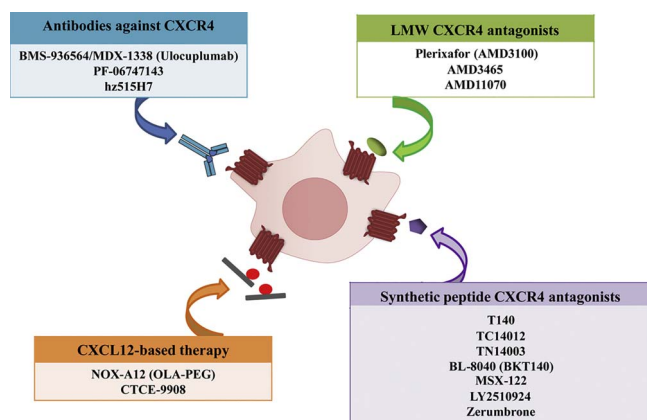


Fig. 2. CXCR4 antagonists. Anti-CXCR4 antibodies, low molecular weight (LMW) CXCR4 antagonists, therapies based on inhibition of CXCL12, and CXCR4 synthetic peptide antagonists have been tested as potential inhibitors of the CXCL12-CXCR4 axis. BMS-936564, PF-06747143, hz515H7, plerixafor, NOX-A12 and BL-8040 have entered into clinical trials, mainly in hematological malignancies (see text).

MM cells with the BM by blocking CXCL12 binding to CXCR4, and enhances the sensitivity of MM cell to multiple therapeutic agents (Azab et al., 2009). Furthermore, it promotes mobilization of CD34⁺ cells in MM treatments (Devine et al., 2004). Similarly as in CLL, NOX-A12 also exhibits anti-MM activity. Thus, *in vivo* CXCL12 neutralization with NOX-A12 generates a tumour microenvironment that is less receptive for MM cells, leading to decreased MM cell homing and growth, and thereby inhibiting MM disease progression (Roccaro et al., 2014). Moreover, NOX-A12 reduces the expression of genes known to be regulators of angiogenesis. In addition, recent reports indicated that NOX-A12 enhances the anti-MM capacity of combined bortezomib and dexamethasone (Ludwig et al., 2017) (ClinicalTrials.gov, #NCT01521533), and resensitizes MM cells to the HDAC inhibitor vorinostat, to pomalidomide and to proteasome inhibitors (Waldschmidt et al., 2017).

As with CLL, BMS-936564/MDX-1338 given as monotherapy exhibits anti-MM activity in established MM xenograft models (Broussas et al., 2016; Kuhne et al., 2013). A clinical phase I trial has been conducted using BMS-936564 alone and in combination with lenalidomide/dexamethasone or bortezomib/dexamethasone in relapsed/refractory MM (ClinicalTrials.gov, #NCT01359657), whose results have not yet been disclosed. Another anti-CXCR4 antibody, hz515H7, inhibits the CXCL12-induced signaling pathway, decreases MM cell migration and proliferation, and displays anti-MM capacity *in vivo* (Broussas et al., 2016; Kuhne et al., 2013). hz515H7 is currently under investigation in a phase I clinical trial.

Interestingly, MM cells recruit tumour-supportive macrophages through the CXCL12-CXCR4 axis and promote macrophage polarization toward the M2 phenotype (Beider et al., 2014), and it was recently shown that M2 macrophage repolarization to the M1 phenotype represents a potential new venue for MM treatment (Gutierrez-Gonzalez et al., 2016).

4.3. Acute myeloid leukemia

Acute myeloid leukemia (AML) is a heterogeneous clonal disorder of haemopoietic progenitor cells characterized by accumulation of immature myeloid cells in BM and peripheral blood, having a poor prognosis as most patients develop chemotherapy resistance (Estey and Dohner, 2006; Konopleva and Jordan, 2011). AML cell lines and AML cells from patient samples express CXCR4 (Brouwer et al., 2001; Burger et al., 2003a,b; Mohle et al., 1998; Voermans et al., 2002), and this receptor is considered to be a negative prognostic marker of the disease (Rombouts et al., 2004; Spoo et al., 2007).

Several CXCR4 inhibitors or neutralizing anti-CXCR4 antibodies have been tested in AML models. Thus, plerixafor impairs survival of human AML cells (Nervi et al., 2009; Tavor et al., 2008; Uy et al., 2012), and the CXCR4 antagonist LY2510924 (Eli Lilly) blocks surface CXCR4, inhibits AML cell proliferation and displays anti-leukemia effects as monotherapy as well as in combination with current chemotherapy for AML (Cho et al., 2015). The BL-8040 (4F-benzoyl-TN14003; formerly BKT140) anti-CXCR4 agent (BioLineRx), binds and inhibits CXCR4 with high affinity, inhibits cell migration and rapidly mobilizes stem cells (Abraham et al., 2007). BL-8040 induces robust mobilization of AML blasts from the BM, and promotes AML cell apoptosis (Abraham et al., 2017a,b). A phase IIa study evaluating safety and efficacy of BL-8040 in relapsed/refractory AML patients has been recently completed (ClinicalTrials.gov, #NCT01838395), whose results have not been yet presented.

Two anti-human CXCR4 antibodies have been tested in AML models. As mentioned above, the BMS-936564 antibody inhibits AML growth in mice models (Kuhne et al., 2013), whereas the PF-06747143 antibody induces cytotoxicity in AML cells via Fc-effector function, leading to significant reduction of the leukemia burden (Zhang et al., 2017).

5. The CXCL12-CXCR4 axis in solid tumors

Cells from solid tumors, including breast, prostate, colon and lung cancer, as well as melanoma and glioma, express CXCR4 which becomes a retention or invasive molecule upon binding CXCL12 (Scala, 2015). Several current clinical trials are testing the usefulness of targeting the CXCL12-CXCR4 signaling to inhibit cancer cell metastasis (Fig. 2). Following is a description of CXCR4 expression, function and antagonist testing in breast, prostate and lung cancer, and in melanoma.

5.1. Breast cancer

The involvement of CXCR4 in solid cancer dissemination was first described in 2001 by Müller and collaborators using mice breast cancer models (Muller et al., 2001). They found high CXCR4 expression in human breast cancer cells, malignant breast tumour samples and metastasis, coincident with high levels of CXCL12 in the main sites of breast cancer metastasis. Of note, the chemotactic and invasive responses mediated by CXCR4 through the induction of actin polymerization were diminished with neutralizing anti-CXCR4 antibodies, both *in vitro* and *in vivo* (Muller et al., 2001).

The key role of CXCR4 in breast cancer metastasis was later corroborated by small interfering RNA (siRNA) targeting CXCR4 in mouse xenograft models (Chen et al., 2003; Liang et al., 2005). Other studies have sustained the direct participation of the CXCL12-CXCR4 axis in *in vivo* breast cancer tumour growth and metastasis murine models, by using different antagonists such as plerixafor (Price et al., 2016; Smith et al., 2004), zerumbrone (Sung et al., 2008), MSX-122 (Liang et al., 2012), or by oncolytic virotherapy (Gil et al., 2013). Furthermore, blockade of CXCR4 with plerixafor in the MMTV-PyMT model of breast cancer selectively reduced M2 tumour-associated macrophages after chemotherapy, thereby reducing tumour burden (Hughes et al., 2015). Additionally, Ling and collaborators reported that the CXCR4 antagonist AMD3465 inhibited breast cancer growth and metastasis by acting on tumour cells as well as on immune cells present in the tumour microenvironment (Ling et al., 2013).

CXCR4 expression in breast cancer has been reported to be regulated by NF- κ B (Helbig et al., 2003) and by Slit proteins (Marlow et al., 2008). A significant correlation between HER2 and CXCR4 expression was detected in human breast tumour tissues, and CXCR4 expression was associated with poor survival in patients with breast cancer (Balkwill, 2004; Cabioglu et al., 2005; Hassan et al., 2009; Li et al., 2004). In addition, meta-analysis studies revealed that the overall survival and disease-free survival of breast cancer patients were negatively correlated with CXCR4 expression (Zhang et al., 2014; Zhao et al., 2015). In a retrospective analysis of the levels of expression of CXCR4 in invasive breast carcinomas and pre-invasive breast samples, CXCR4 was found to be associated with tumour progression, ranging from 20% in normal breast tissue to 43% in ductal carcinoma-in-situ, to 67% in invasive cancer (Salvucci et al., 2006). Importantly, high CXCR4 levels in triple-negative (TN) breast cancer patients were linked to a worse disease outcome (Chu et al., 2010). Accordingly, Azad et al. showed a therapeutic response of a fully human CXCR4 antibody correlating with the expression of CXCR4 in TN breast cancer (Azad et al., 2016). Nevertheless, the functional relevance of CXCR4 in TN breast cancer has been recently weakened in a recent study showing that CXCR4 inhibitors do not reduce tumour growth and even increase TN breast cancer metastatic spread, although they efficiently impair tumour growth and metastasis in HER2 breast cancer (Lefort et al., 2017).

5.2. Prostate cancer

Early reports described the expression of CXCR4 on prostate cancer cells and its responsiveness to CXCL12 in promoting cell migration, invasion and metastasis (Darash-Yahana et al., 2004; Taichman et al., 2002; Vaday et al., 2004). CXCR4 expression was detected in 94% of

prostate cancer patients, and it was found that those patients with high levels of this receptor had poorer survival than those with low expression (Akashi et al., 2008). From a cohort of over 600 patients, CXCR4 protein expression was described to be significantly elevated in localized and metastatic samples compared to normal epithelia, but not at the RNA level, suggesting an important post-transcriptionally regulation of CXCR4 in prostate cancer (Sun et al., 2003). Furthermore, the same study showed that CXCR4 expression increases with tumour aggressiveness and revealed higher expression in metastatic tissues than in primary tumors. The transcription factor ERG regulates CXCR4 expression in prostate cancer cells, and androgens modulate the receptor levels via increasing ERG expression (Singareddy et al., 2013).

Obesity is a prognostic risk factor in the progression of prostate cancer, and it has been recently proposed a role for CXCL12/CXCR4/CXCR7 axis in an obesity-driven mouse model of myc-induced prostate cancer (Saha et al., 2017). In this model, tumour-derived cells displayed an increase in the expression of CXCR4 and CXCR7, which mediated migration and invasion to CXCL12, and these responses were inhibited by plerixafor or by knocking down these receptors. The importance of CXCL12/CXCR4 axis in prostate cancer has also been described by Conley-LaComb and collaborators, who showed that inhibition of this molecular axis with plerixafor abrogates the initial establishment of tumour growth without affecting the growth of established bone tumors (Conley-LaComb et al., 2016). Additionally, the use of small molecules that block the CXCL12/CXCR4 axis, such as CTCE-9908 and ursolic acid (Fig. 2), which reduced the metastatic potential in several orthotopic and metastatic mouse xenograft models of prostate cancer (Gravina et al., 2015; Porvasnik et al., 2009; Shanmugam et al., 2011) has provided evidence of the importance of the CXCL12/CXCR4 signaling in prostate cancer cell dissemination.

5.3. Melanoma

Although melanoma only accounts for less than 5% of skin cancers, it is nevertheless responsible for 80% of deaths from skin cancers. Expression of CXCR4 in human melanoma was first reported in melanoma cell lines and samples from melanoma patients (Payne and Cornelius, 2002; Robledo et al., 2001), and importantly, its expression is closely linked to melanoma cell invasion and metastasis (Bartolome et al., 2009; Bartolome et al., 2004; Bartolome et al., 2006; Murakami et al., 2002). CXCR4 expression was detected in the vertical growth phase and on regional LNs, which correlated with poor prognosis and increased mortality (Longo-Imedio et al., 2005; Scala et al., 2005). The transcription factors PAX3 and FOXD3 were found to drive CXCR4 expression in melanoma (Kubic et al., 2015). Further evidence of the involvement of CXCR4 in melanoma metastasis came from several studies showing that CXCR4 blockade with plerixafor or AMD11070 inhibited tumour growth and metastasis (Kim et al., 2010; O'Boyle et al., 2013). However, CXCL12 expression by stromal cells in the primary melanoma microenvironment protects from metastasis by retaining tumour cells within the cutaneous microenvironment (McConnell et al., 2016), suggesting that this chemokine might play distinct roles in the different steps of melanoma metastasis.

In the context of BRAF status, multivariable analyses revealed a significant correlation between elevated CXCR4 mRNA and the presence of BRAF mutations (Mitchell et al., 2014), and it has been shown that downregulation of melanoma CXCL12 is associated with an aggressive BRAF/NRAS mutant phenotype (McConnell et al., 2016).

5.4. Lung cancer

Expression of CXCR4 on small cell lung cancer (SCLC) cell lines, as well as on non-small cell lung cancer (NSCLC) tumour specimens resected from patients and on NSCLC cell lines was first reported and described to mediate cell migration and activation in response to CXCL12 (Burger et al., 2003a,b; Hartmann et al., 2005; Kijima et al.,

2002; Phillips et al., 2003). Furthermore, a correlation between CXCR4 expression and poor prognosis in NSCLC has been reported (Spano et al., 2004; Su et al., 2005). Importantly, higher CXCR4 expression on NSCLC was described in primary and metastatic tumour tissue than in normal lung, and tumors expressing high CXCR4 levels were more prone to clinical metastasis in comparison with low-expression tumors (Choi et al., 2014; Su et al., 2005). Cellular localization of CXCR4 in NSCLC correlates with survival, as its cytomembranous expression confers worse disease-free survival compared with nuclear localization. These observations are consistent with a model in which cytomembranous CXCR4 promotes tumour cell proliferation and metastasis, whereas nuclear CXCR4 impairs these effects (Spano et al., 2004; Wagner et al., 2009).

Bertolini and collaborators found an enrichment of a subpopulation of CXCR4 expressing cells that were cisplatin resistant (Bertolini et al., 2009), and in a different study it was reported that upregulation of this chemokine receptor is crucial for the maintenance of stemness in drug resistant NSCLC through the activation of STAT3 (Jung et al., 2013). Due to the previously described role of CXCR4 in NSCLC resistance, the CXCR4 antagonist BL-8040 was tested against human NSCLC, which led to attenuation of tumour growth and to the improvement of chemotherapy and radiotherapy (Fahham et al., 2012). In addition, plerixafor reduced the growth of SCLC primary tumors (Taromi et al., 2016), and the BMS-936564/MDX-1338 anti-CXCR4 antibody demonstrated a therapeutic response correlating with the expression of CXCR4 (Azad et al., 2016) (Fig. 2).

6. Conclusions

CXCL12 and its receptor CXCR4 are critical during hematopoiesis for regulation of HSC quiescence, for HSC retention in the BM and differentiation into hematopoietic progenitors, and for B cell lymphopoiesis. Disruption of the CXCL12-CXCR4 interaction by plerixafor is currently in use to mobilize HSC and progenitors to collect them for autologous transplants in several hematological malignancies. This is an important point in the search of antagonists that inhibit tumour cell dissemination, as unwanted hematopoietic cell mobilization must be mostly avoided. Furthermore, potential mobilization of dormant tumour cells into circulation by blocking the binding of the chemokine-receptor pair by the antagonists is also a concern in this type of therapies. Present clinical trials especially in hematological tumors will provide important information on the convenience of adding CXCR4 inhibitors to impair tumour dissemination in combined therapies with ongoing anti-cancer treatments.

Acknowledgments

We thank the continuous and expert technical support of Nohemí Arellano Sánchez. This work was supported by grants SAF2014-53059-R and RD12/0036/0061 to J.T.

References

- Abraham, M., Biyder, K., Begin, M., Wald, H., Weiss, I.D., Galun, E., Nagler, A., Peled, A., 2007. Enhanced unique pattern of hematopoietic cell mobilization induced by the CXCR4 antagonist 4F-benzoyl-TN14003. *Stem Cells* 25 (9), 2158–2166.
- Abraham, M., Klein, S., Bulvik, B., Wald, H., Weiss, I.D., Olam, D., Weiss, L., Beider, K., Eizenberg, O., Wald, O., Galun, E., Avigdor, A., Benjamini, O., Nagler, A., Pereg, Y., Tavor, S., Peled, A., 2017a. The CXCR4 inhibitor BL-8040 induces the apoptosis of AML blasts by downregulating ERK, BCL-2, MCL-1 and cyclin-D1 via altered miR-15a/16-1 expression. *Leukemia*.
- Abraham, M., Pereg, Y., Bulvik, B., Klein, S., Mishalian, I., Wald, H., Eizenberg, O., Beider, K., Nagler, A., Golan, R., Vainstein, A., Aharon, A., Galun, E., Caraco, Y., Or, R., Peled, A., 2017b. Single dose of the CXCR4 antagonist BL-8040 induces rapid mobilization for the collection of human CD34+ cells in healthy volunteers. *Clin. Cancer Res.* 23 (November (22)), 6790–6801. <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-2919>. Epub 2017 Aug 23.
- Akashi, T., Koizumi, K., Tsuneyama, K., Saiki, I., Takano, Y., Fuse, H., 2008. Chemokine receptor CXCR4 expression and prognosis in patients with metastatic prostate cancer.

- Cancer Sci. 99 (3), 539–542.
- Allen, C.D., Ansel, K.M., Low, C., Lesley, R., Tamamura, H., Fujii, N., Cyster, J.G., 2004. Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. *Nat. Immunol.* 5 (9), 943–952.
- Allen, S.J., Crown, S.E., Handel, T.M., 2007. Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu. Rev. Immunol.* 25, 787–820.
- Alsayed, Y., Ngo, H., Runnels, J., Leleu, X., Singha, U.K., Pitsillides, C.M., Spencer, J.A., Kimlinger, T., Ghobrial, J.M., Jia, X., Lu, G., Timm, M., Kumar, A., Cote, D., Veilleux, I., Hedin, K.E., Roodman, G.D., Witzig, T.E., Kung, A.L., Hideshima, T., Anderson, K.C., Lin, C.P., Ghobrial, I.M., 2007. Mechanisms of regulation of CXCR4/SDF-1 (CXCL12)-dependent migration and homing in multiple myeloma. *Blood* 109 (7), 2708–2717.
- Amara, A., Lorthioir, O., Valenzuela, A., Magerus, A., Thelen, M., Montes, M., Virelizier, J.L., Delepiere, M., Baleux, F., Lortat-Jacob, H., Arenzana-Seisdedos, F., 1999. Stromal cell-derived factor-1alpha associates with heparan sulfates through the first beta-strand of the chemokine. *J. Biol. Chem.* 274 (34), 23916–23925.
- Ara, T., Tokoyoda, K., Sugiyama, T., Egawa, T., Kawabata, K., Nagasawa, T., 2003. Long-term hematopoietic stem cells require stromal cell-derived factor-1 for colonizing bone marrow during ontogeny. *Immunity* 19 (2), 257–267.
- Azab, A.K., Runnels, J.M., Pitsillides, C., Moreau, A.S., Azab, F., Leleu, X., Jia, X., Wright, R., Ospina, B., Carlson, A.L., Alt, C., Burwick, N., Roccaro, A.M., Ngo, H.T., Farag, M., Melhem, M.R., Sacco, A., Munshi, N.C., Hideshima, T., Rollins, B.J., Anderson, K.C., Kung, A.L., Lin, C.P., Ghobrial, I.M., 2009. CXCR4 inhibitor AMD3100 disrupts the interaction of multiple myeloma cells with the bone marrow microenvironment and enhances their sensitivity to therapy. *Blood* 113 (18), 4341–4351.
- Azad, B.B., Chatterjee, S., Lesniak, W.G., Lisok, A., Pullambhatla, M., Bhujwalla, Z.M., Pomper, M.G., Nimmagadda, S., 2016. A fully human CXCR4 antibody demonstrates diagnostic utility and therapeutic efficacy in solid tumor xenografts. *Oncotarget* 7 (11), 12344–12358.
- Bachelier, F., Graham, G.J., Locati, M., Mantovani, A., Murphy, P.M., Nibbs, R., Rot, A., Sozzani, S., Thelen, M., 2014. New nomenclature for atypical chemokine receptors. *Nat. Immunol.* 15 (3), 207–208.
- Balabanian, K., Lagane, B., Infantino, S., Chow, K.Y., Harriague, J., Moepf, B., Arenzana-Seisdedos, F., Thelen, M., Bachelier, F., 2005a. The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 280 (42), 35760–35766.
- Balabanian, K., Lagane, B., Pablos, J.L., Laurent, L., Planchenault, T., Verola, O., Lebbeck, C., Kerob, D., Dupuy, A., Hermine, O., Nicolas, J.F., Latger-Cannard, V., Bensussan, D., Bordignon, P., Baleux, F., Le Deist, F., Virelizier, J.L., Arenzana-Seisdedos, F., Bachelier, F., 2005b. WHIM syndromes with different genetic anomalies are accounted for by impaired CXCR4 desensitization to CXCL12. *Blood* 105 (6), 2449–2457.
- Balkwill, F., 2004. Cancer and the chemokine network. *Nat. Rev. Cancer* 4 (7), 540–550.
- Bartolome, R.A., Galvez, B.G., Longo, N., Baleux, F., Van Muijen, G.N., Sanchez-Mateos, P., Arroyo, A.G., Teixidó, J., 2004. Stromal cell-derived factor-1alpha promotes melanoma cell invasion across basement membranes involving stimulation of membrane-type 1 matrix metalloproteinase and Rho GTPase activities. *Cancer Res.* 64 (7), 2534–2543.
- Bartolome, R.A., Molina-Ortiz, I., Samaniego, R., Sanchez-Mateos, P., Bustelo, X.R., Teixidó, J., 2006. Activation of Vav/Rho GTPase signaling by CXCL12 controls membrane-type matrix metalloproteinase-dependent melanoma cell invasion. *Cancer Res.* 66 (1), 248–258.
- Bartolome, R.A., Ferreira, S., Miquilena-Colina, M.E., Martinez-Prats, L., Soto-Montenegro, M.L., Garcia-Bernal, D., Vaquero, J.J., Agami, R., Delgado, R., Desco, M., Sanchez-Mateos, P., Teixidó, J., 2009. The chemokine receptor CXCR4 and the metalloproteinase MT1-MMP are mutually required during melanoma metastasis to lungs. *Am. J. Pathol.* 174 (2), 602–612.
- Beider, K., Bitner, H., Leiba, M., Gutwein, O., Koren-Michowitz, M., Ostrovsky, O., Abraham, M., Wald, H., Galun, E., Peled, A., Nagler, A., 2014. Multiple myeloma cells recruit tumor-supportive macrophages through the CXCR4/CXCL12 axis and promote their polarization toward the M2 phenotype. *Oncotarget* 5 (22), 11283–11296.
- Beider, K., Rosenberg, E., Bitner, H., Shimon, A., Leiba, M., Koren-Michowitz, M., Ribakovsky, E., Klein, S., Olam, D., Weiss, L., Wald, H., Abraham, M., Galun, E., Peled, A., Nagler, A., 2017. The sphingosine-1-phosphate modulator FYT720 targets multiple myeloma via the CXCR4/CXCL12 pathway. *Clin. Cancer Res.* 23 (7), 1733–1747.
- Bernhagen, J., Krohn, R., Lue, H., Gregory, J.L., Zernecke, A., Koenen, R.R., Dewor, M., Georgiev, I., Schober, A., Leng, H., Kooistra, T., Fingerle-Rowson, G., Ghezzi, P., Kleemann, R., McColl, S.R., Bucala, R., Hickey, M.J., Weber, C., 2007. MIF is a noncognate ligand of CXCR4 chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. *Nat. Med.* 13 (5), 587–596.
- Bertolini, G., Roz, L., Perego, P., Tortoreto, M., Fontanella, E., Gatti, L., Pratesi, G., Fabbri, A., Andriani, F., Tinelli, S., Roz, E., Caserini, R., Lo Vullo, S., Caserini, T., Mariani, L., Delia, D., Calabro, E., Pastorino, U., Sozzi, G., 2009. Highly tumorigenic lung cancer CD133+ cells display stem-like features and are spared by cisplatin treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (38), 16281–16286.
- Broussas, M., Boute, N., Akla, B., Berger, S., Beau-Larvor, C., Champion, T., Robert, A., Beck, A., Haeuw, J.F., Goetsch, L., Bailly, C., Dumontet, C., Matthes, T., Corvaia, N., Klingner-Hamou, C., 2016. A new anti-CXCR4 antibody that blocks the CXCR4/SDF-1 axis and mobilizes effector cells. *Mol. Cancer Ther.* 15 (8), 1890–1899.
- Brouwer, R.E., Hoefnagel, J., Borger van Der Burg, B., Jedema, I., Zwinderman, K.H., Starrenburg, I.C., Kluijn-Nelemans, H.C., Barge, R.M., Willemze, R., Falkenburg, J.H., 2001. Expression of co-stimulatory and adhesion molecules and chemokine or apoptosis receptors on acute myeloid leukaemia: high CD40 and CD11a expression correlates with poor prognosis. *Br. J. Haematol.* 115 (2), 298–308.
- Broxmeyer, H.E., Orschell, C.M., Clapp, D.W., Hangoc, G., Cooper, S., Plett, P.A., Liles, W.C., Li, X., Graham-Evans, B., Campbell, T.B., Calandra, G., Bridger, G., Dale, D.C., Srour, E.F., 2005. Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist. *J. Exp. Med.* 201 (8), 1307–1318.
- Burger, J.A., Burger, M., Kipps, T.J., 1999. Chronic lymphocytic leukemia B cells express functional CXCR4 chemokine receptors that mediate spontaneous migration beneath bone marrow stromal cells. *Blood* 94 (11), 3658–3667.
- Burger, J.A., Spoo, A., Dwenger, A., Burger, M., Behringer, D., 2003a. CXCR4 chemokine receptors (CD184) and alpha4beta1 integrins mediate spontaneous migration of human CD34+ progenitors and acute myeloid leukaemia cells beneath marrow stromal cells (pseudoeemperipoleis). *Br. J. Haematol.* 122 (4), 579–589.
- Burger, M., Glodek, A., Hartmann, T., Schmitt-Graff, A., Silberstein, L.E., Fujii, N., Kipps, T.J., Burger, J.A., 2003b. Functional expression of CXCR4 (CD184) on small-cell lung cancer cells mediates migration, integrin activation, and adhesion to stromal cells. *Oncogene* 22 (50), 8093–8101.
- Burger, M., Hartmann, T., Krome, M., Rawluk, J., Tamamura, H., Fujii, N., Kipps, T.J., Burger, J.A., 2005. Small peptide inhibitors of the CXCR4 chemokine receptor (CD184) antagonize the activation, migration, and antiapoptotic responses of CXCL12 in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 106 (5), 1824–1830.
- Busillo, J.M., Benovic, J.L., 2007. Regulation of CXCR4 signaling. *Biochim. Biophys. Acta* 1768 (4), 952–963.
- Cabioglu, N., Yazici, M.S., Arun, B., Broglio, K.R., Hortobagyi, G.N., Price, J.E., Sahin, A., 2005. CCR7 and CXCR4 as novel biomarkers predicting axillary lymph node metastasis in T1 breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 11 (16), 5686–5693.
- Calderon, L., Boehm, T., 2011. Three chemokine receptors cooperatively regulate homing of hematopoietic progenitors to the embryonic mouse thymus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (18), 7517–7522.
- Calissano, C., Damle, R.N., Hayes, G., Murphy, E.J., Hellerstein, M.K., Moreno, C., Sison, C., Kaufman, M.S., Koltz, J.E., Allen, S.L., Rai, K.R., Chiorazzi, N., 2009. In vivo intraclonal and interclonal kinetic heterogeneity in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 114 (23), 4832–4842.
- Chen, Y., Stamatoyannopoulos, G., Song, C.Z., 2003. Down-regulation of CXCR4 by inducible small interfering RNA inhibits breast cancer cell invasion in vitro. *Cancer Res.* 63 (16), 4801–4804.
- Chen, S.S., Chang, B.Y., Chang, S., Tong, T., Ham, S., Sherry, B., Burger, J.A., Rai, K.R., Chiorazzi, N., 2016. BTK inhibition results in impaired CXCR4 chemokine receptor surface expression, signaling and function in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 30 (4), 833–843.
- Chiorazzi, N., Rai, K.R., Ferrarini, M., 2005. Chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 352 (8), 804–815.
- Cho, B.S., Zeng, Z., Mu, H., Wang, Z., Konoplev, S., McQueen, T., Protopopova, M., Cortes, J., Marszalek, J.R., Peng, S.B., Ma, W., Davis, R.E., Thornton, D.E., Andreeff, M., Kopyleva, M., 2015. Antileukemia activity of the novel peptidic CXCR4 antagonist LY2510924 as monotherapy and in combination with chemotherapy. *Blood* 126 (2), 222–232.
- Choi, Y.H., Burdick, M.D., Strieter, B.A., Mehrad, B., Strieter, R.M., 2014. CXCR4, but not CXCR7, discriminates metastatic behavior in non-small cell lung cancer cells. *Mol. Cancer Res.* 12 (1), 38–47.
- Chu, Q.D., Panu, L., Holm, N.T., Li, B.D., Johnson, L.W., Zhang, S., 2010. High chemokine receptor CXCR4 level in triple negative breast cancer specimens predicts poor clinical outcome. *J. Surg. Res.* 159 (2), 689–695.
- Conley-LaComb, M.K., Semaan, L., Singareddy, R., Li, Y., Heath, E.I., Kim, S., Cher, M.L., Chinni, S.R., 2016. Pharmacological targeting of CXCL12/CXCR4 signaling in prostate cancer bone metastasis. *Mol. Cancer* 15 (1), 68.
- Crump, M.P., Gong, J.H., Loetscher, P., Rajarathnam, K., Amara, A., Arenzana-Seisdedos, F., Virelizier, J.L., Baggiolini, M., Sykes, B.D., Clark-Lewis, I., 1997. Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1. *EMBO J.* 16 (23), 6996–7007.
- Dar, A., Goichberg, P., Shinder, V., Kalinkovich, A., Kollet, O., Netzer, N., Margalit, R., Zsak, M., Nagler, A., Hardan, I., Resnick, I., Rot, A., Lapidot, T., 2005. Chemokine receptor CXCR4-dependent internalization and resecretion of functional chemokine SDF-1 by bone marrow endothelial and stromal cells. *Nat. Immunol.* 6 (10), 1038–1046.
- Darash-Yahana, M., Pikarsky, E., Abramovitch, R., Zeira, E., Pal, B., Karplus, R., Beider, K., Avniel, S., Kasem, S., Galun, E., Peled, A., 2004. Role of high expression levels of CXCR4 in tumor growth, vascularization, and metastasis. *FASEB J.* 18 (11), 1240–1242.
- De Clercq, E., 2000. Inhibition of HIV infection by bicyclams, highly potent and specific CXCR4 antagonists. *Mol. Pharmacol.* 57 (5), 833–839.
- De Clercq, E., 2009. The AMD3100 story: the path to the discovery of a stem cell mobilizer (Mozobil). *Biochem. Pharmacol.* 77 (11), 1655–1664.
- De La Luz Sierra, M., Yang, F., Narazaki, M., Salvucci, O., Davis, D., Yarchoan, R., Zhang, H.H., Fales, H., Tosato, G., 2004. Differential processing of stromal-derived factor-1alpha and stromal-derived factor-1beta explains functional diversity. *Blood* 103 (7), 2452–2459.
- Deng, L., Stafford, J.H., Liu, S.C., Chernikova, S.B., Merchant, M., Recht, L., Martin Brown, J., 2017. SDF-1 blockade enhances anti-VEGF therapy of glioblastoma and can be monitored by MRI. *Neoplasia* 19 (1), 1–7.
- Devine, S.M., Flomenberg, N., Vesole, D.H., Liesveld, J., Weisdorf, D., Badel, K., Calandra, G., DiPersio, J.F., 2004. Rapid mobilization of CD34+ cells following administration of the CXCR4 antagonist AMD3100 to patients with multiple myeloma and non-Hodgkin's lymphoma. *J. Clin. Oncol.* 22 (6), 1095–1102.
- Ding, L., Morrison, S.J., 2013. Hematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. *Nature* 495 (7440), 231–235.
- Duda, D.G., Kozin, S.V., Kirkpatrick, N.D., Xu, L., Fukumura, D., Jain, R.K., 2011. CXCL12

- (SDF1alpha)-CXCR4/CXCR7 pathway inhibition: an emerging sensitizer for anticancer therapies? *Clin. Cancer Res.* 17 (8), 2074–2080.
- Durig, J., Schmucker, U., Duhrsen, U., 2001. Differential expression of chemokine receptors in B cell malignancies. *Leukemia* 15 (5), 752–756.
- Estey, E., Dohner, H., 2006. Acute myeloid leukaemia. *Lancet* 368 (9550), 1894–1907.
- Fahham, D., Weiss, I.D., Abraham, M., Beider, K., Hanna, W., Shlomai, Z., Eizenberg, O., Zamir, G., Izhar, U., Shapira, O.M., Peled, A., Wald, O., 2012. In vitro and in vivo therapeutic efficacy of CXCR4 antagonist BKT140 against human non-small cell lung cancer. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 144 (5), 1167–1175 (e1161).
- Ganghammer, S., Hutterer, E., Hinterseer, E., Brachtl, G., Asslaber, D., Krenn, P.W., Girbl, T., Berghammer, P., Geisberger, R., Egle, A., Zucchetto, A., Kruschinski, A., Gattei, V., Chigavev, A., Greil, R., Hartmann, T.N., 2015. CXCL12-induced VLA-4 activation is impaired in trisomy 12 chronic lymphocytic leukemia cells: a role for CCL21. *Oncotarget* 6 (14), 12048–12060.
- Ganghammer, S., Gutjahr, J., Hutterer, E., Krenn, P.W., Pucher, S., Zelle-Rieser, C., Johrer, K., Wijnmans, M., Leurs, R., Smit, M.J., Gattei, V., Greil, R., Hartmann, T.N., 2016. Combined CXCR3/CXCR4 measurements are of high prognostic value in chronic lymphocytic leukemia due to negative co-operativity of the receptors. *Haematologica* 101 (3), e99–102.
- Garcia-Bernal, D., Pardo-Cabanas, M., Dios-Esponera, A., Samaniego, R., Hernan, P.d.I.O.D., Teixido, J., 2009. Chemokine-induced Zap70 kinase-mediated dissociation of the Vav1-talin complex activates alpha4beta1 integrin for T cell adhesion. *Immunity* 31 (6), 953–964.
- Garcia-Bernal, D., Redondo-Munoz, J., Dios-Esponera, A., Chevre, R., Bailon, E., Garayoa, M., Arellano-Sanchez, N., Gutierrez, N.C., Hidalgo, A., Garcia-Pardo, A., Teixido, J., 2013. Sphingosine-1-phosphate activates chemokine-promoted myeloma cell adhesion and migration involving alpha4beta1 integrin function. *J. Pathol.* 229 (1), 36–48.
- Gil, M., Seshadri, M., Komorowski, M.P., Abrams, S.I., Kozbor, D., 2013. Targeting CXCL12/CXCR4 signaling with oncolytic virotherapy disrupts tumor vasculature and inhibits breast cancer metastases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (14), E1291–1300.
- Gorlin, R.J., Gelb, B., Diaz, G.A., Lofness, K.G., Pittelkow, M.R., Fenk Jr., J.R., 2000. WHIM syndrome, an autosomal dominant disorder: clinical, hematological, and molecular studies. *Am. J. Med. Genet.* 91 (5), 368–376.
- Grabovsky, V., Feigelson, S., Chen, C., Bleijs, D.A., Peled, A., Cinamon, G., Baleux, F., Arenzana-Seisdedos, F., Lapidot, T., van Kooyk, Y., Lobb, R.R., Alon, R., 2000. Subsecond induction of alpha4 integrin clustering by immobilized chemokines stimulates leukocyte tethering and rolling on endothelial vascular cell adhesion molecule 1 under flow conditions. *J. Exp. Med.* 192 (4), 495–506.
- Graham, G.J., Locati, M., Mantovani, A., Rot, A., Thelen, M., 2012. The biochemistry and biology of the atypical chemokine receptors. *Immunol. Lett.* 145 (1–2), 30–38.
- Gravina, G.L., Mancini, A., Muzi, P., Ventura, L., Biordi, L., Ricevuto, E., Pompili, S., Mattei, C., Di Cesare, E., Jannini, E.A., Festuccia, C., 2015. CXCR4 pharmacological inhibition reduces bone and soft tissue metastatic burden by affecting tumor growth and tumorigenic potential in prostate cancer preclinical models. *Prostate* 75 (12), 1227–1246.
- Greenbaum, A., Hsu, Y.M., Day, R.B., Schuettelpelz, L.G., Christopher, M.J., Borgerding, J.N., Nagasawa, T., Link, D.C., 2013. CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance. *Nature* 495 (7440), 227–230.
- Griffith, J.W., Sokol, C.L., Luster, A.D., 2014. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 32, 659–702.
- Gulino, A.V., Moratto, D., Sozzani, S., Cavadini, P., Otero, K., Tassone, L., Imberti, L., Pirovano, S., Notarangelo, L.D., Soresina, R., Mazzolari, E., Nelson, D.L., Badolato, R., 2004. Altered leukocyte response to CXCL12 in patients with warts hypogammaglobulinemia, infections, myelokathexis (WHIM) syndrome. *Blood* 104 (2), 444–452.
- Gutierrez-Gonzalez, A., Martinez-Moreno, M., Samaniego, R., Arellano-Sanchez, N., Salinas-Munoz, L., Relloso, M., Valeri, A., Martinez-Lopez, J., Corbi, A.L., Hidalgo, A., Garcia-Pardo, A., Teixido, J., Sanchez-Mateos, P., 2016. Evaluation of the potential therapeutic benefits of macrophage reprogramming in multiple myeloma. *Blood* 128 (18), 2241–2252.
- Hartmann, T.N., Burger, J.A., Glodek, A., Fujii, N., Burger, M., 2005. CXCR4 chemokine receptor and integrin signaling co-operate in mediating adhesion and chemoresistance in small cell lung cancer (SCLC) cells. *Oncogene* 24 (27), 4462–4471.
- Hassan, S., Ferrario, C., Saragovi, U., Quenneville, L., Gaboury, L., Baccarelli, A., Salvucci, O., Basik, M., 2009. The influence of tumor-host interactions in the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 ligand/receptor axis in determining metastatic risk in breast cancer. *Am. J. Pathol.* 175 (1), 66–73.
- Helbig, G., Christopherson 2nd, K.W., Bhat-Nakshatri, P., Kumar, S., Kishimoto, H., Miller, K.D., Broxmeyer, H.E., Nakshatri, H., 2003. NF-kappaB promotes breast cancer cell migration and metastasis by inducing the expression of the chemokine receptor CXCR4. *J. Biol. Chem.* 278 (24), 21631–21638.
- Hernandez, P.A., Gorlin, R.J., Lukens, J.N., Taniuchi, S., Bohinjec, J., Francois, F., Klotman, M.E., Diaz, G.A., 2003. Mutations in the chemokine receptor gene CXCR4 are associated with WHIM syndrome, a combined immunodeficiency disease. *Nat. Genet.* 34 (1), 70–74.
- Hidalgo, A., Sanz-Rodriguez, F., Rodriguez-Fernandez, J.L., Albella, B., Blaya, C., Wright, N., Cabanas, C., Prosper, F., Gutierrez-Ramos, J.C., Teixido, J., 2001. Chemokine stromal cell-derived factor-1alpha modulates VLA-4 integrin-dependent adhesion to fibronectin and VCAM-1 on bone marrow hematopoietic progenitor cells. *Exp. Hematol.* 29 (3), 345–355.
- Hideshima, T., Chauhan, D., Hayashi, T., Podar, K., Akiyama, M., Gupta, D., Richardson, P., Munshi, N., Anderson, K.C., 2002. The biological sequelae of stromal cell-derived factor-1alpha in multiple myeloma. *Mol. Cancer Ther.* 1 (7), 539–544.
- Hoellenriegel, J., Zboralski, D., Maasch, C., Rosin, N.Y., Wierda, W.G., Keating, M.J., Kruschinski, A., Burger, J.A., 2014. The Spiegelmer NOX-A12, a novel CXCL12 inhibitor, interferes with chronic lymphocytic leukemia cell motility and causes chemosensitization. *Blood* 123 (7), 1032–1039.
- Hopman, R.K., DiPersio, J.F., 2014. Advances in stem cell mobilization. *Blood Rev.* 28 (1), 31–40.
- Hughes, R., Qian, B.Z., Rowan, C., Muthana, M., Keklikoglou, I., Olson, O.C., Tazzyman, S., Danson, S., Addison, C., Clemons, M., Gonzalez-Angulo, A.M., Joyce, J.A., De Palma, M., Pollard, J.W., Lewis, C.E., 2015. Perivascular M2 macrophages stimulate tumor relapse after chemotherapy. *Cancer Res.* 75 (17), 3479–3491.
- Jung, M.J., Rho, J.K., Kim, Y.M., Jung, J.E., Jin, Y.B., Ko, Y.G., Lee, J.S., Lee, S.J., Lee, J.C., Park, M.J., 2013. Upregulation of CXCR4 is functionally crucial for maintenance of stemness in drug-resistant non-small cell lung cancer cells. *Oncogene* 32 (2), 209–221.
- Kashyap, M.K., Kumar, D., Jones, H., Amaya-Chanaga, C.I., Choi, M.Y., Melo-Cardenas, J., Ale-Ali, A., Kuhne, M.R., Sabbatini, P., Cohen, L.J., Shelat, S.G., Rassenti, L.Z., Kipps, T.J., Cardarelli, P.M., Castro, J.E., 2016. Ulocuplumab (BMS-936564/MDX1338): a fully human anti-CXCR4 antibody induces cell death in chronic lymphocytic leukemia mediated through a reactive oxygen species-dependent pathway. *Oncotarget* 7 (3), 2809–2822.
- Kashyap, M.K., Amaya-Chanaga, C.I., Kumar, D., Simmons, B., Huser, N., Gu, Y., Hallin, M., Lindquist, K., Yafawi, R., Choi, M.Y., Amine, A.A., Rassenti, L.Z., Zhang, C., Liu, S.H., Smeal, T., Fantin, V.R., Kipps, T.J., Pernesetti, F., Castro, J.E., 2017. Targeting the CXCR4 pathway using a novel anti-CXCR4 IgG1 antibody (PF-06747143) in chronic lymphocytic leukemia. *J. Hematol. Oncol.* 10 (1), 112.
- Kehrl, J.H., 2016. The impact of RGS and other G-protein regulatory proteins on Galpha-mediated signaling in immunity. *Biochem. Pharmacol.* 114, 40–52.
- Kijima, T., Maulik, G., Ma, P.C., Tibaldi, E.V., Turner, R.E., Rollins, B., Sattler, M., Johnson, B.E., Salgia, R., 2002. Regulation of cellular proliferation, cytoskeletal function, and signal transduction through CXCR4 and c-Kit in small cell lung cancer cells. *Cancer Res.* 62 (21), 6304–6311.
- Kim, M., Koh, Y.J., Kim, K.E., Koh, B.I., Nam, D.H., Alitalo, K., Kim, I., Koh, G.Y., 2010. CXCR4 signaling regulates metastasis of chemoresistant melanoma cells by a lymphatic metastatic niche. *Cancer Res.* 70 (24), 10411–10421.
- Kohara, H., Omatsu, Y., Sugiyama, T., Noda, M., Fujii, N., Nagasawa, T., 2007. Development of plasmacytoid dendritic cells in bone marrow stromal cell niches requires CXCL12-CXCR4 chemokine signaling. *Blood* 110 (13), 4153–4160.
- Konopleva, M.Y., Jordan, C.T., 2011. Leukemia stem cells and microenvironment: biology and therapeutic targeting. *J. Clin. Oncol.* 29 (5), 591–599.
- Kubic, J.D., Lui, J.W., Little, E.C., Ludvik, A.E., Konda, S., Salgia, R., Aplin, A.E., Lang, D., 2015. PAX3 and FOXD3 promote CXCR4 expression in melanoma. *J. Biol. Chem.* 290 (36), 21901–21914.
- Kuehl, W.M., Bergsagel, P.L., 2012. Molecular pathogenesis of multiple myeloma and its premalignant precursor. *J. Clin. Invest.* 122 (10), 3456–3463.
- Kufareva, I., Stephens, B.S., Holden, L.G., Qin, L., Zhao, C., Kawamura, T., Abagyan, R., Handel, T.M., 2014. Stoichiometry and geometry of the CXCR4 chemokine receptor 4 complex with CXCR4 ligand 12: molecular modeling and experimental validation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111 (50), E5363–5372.
- Kufareva, I., Salanga, C.L., Handel, T.M., 2015. Chemokine and chemokine receptor structure and interactions: implications for therapeutic strategies. *Immunol. Cell Biol.* 93 (4), 372–383.
- Kuhne, M.R., Mulvey, T., Belanger, B., Chen, S., Pan, C., Chong, C., Cao, F., Niekro, W., Kempe, T., Henning, K.A., Cohen, L.J., Korman, A.J., Cardarelli, P.M., 2013. BMS-936564/MDX-1338: a fully human anti-CXCR4 antibody induces apoptosis in vitro and shows antitumor activity in vivo in hematologic malignancies. *Clin. Cancer Res.* 19 (2), 357–366.
- Lefort, S., Thuleau, A., Kieffer, Y., Sirven, P., Bieche, I., Marangoni, E., Vincent-Salomon, A., Mechta-Grigoriou, F., 2017. CXCR4 inhibitors could benefit to HER2 but not to triple-negative breast cancer patients. *Oncogene* 36 (9), 1211–1222.
- Li, Y.M., Pan, Y., Wei, Y., Cheng, X., Zhou, B.P., Tan, M., Zhou, X., Xia, W., Hortobagyi, G.N., Yu, D., Hung, M.C., 2004. Upregulation of CXCR4 is essential for HER2-mediated tumor metastasis. *Cancer Cell* 6 (5), 459–469.
- Liang, Z., Yoon, Y., Votaw, J., Goodman, M.M., Williams, L., Shim, H., 2005. Silencing of CXCR4 blocks breast cancer metastasis. *Cancer Res.* 65 (3), 967–971.
- Liang, Z., Zhan, W., Zhu, A., Yoon, Y., Lin, S., Sasaki, M., Klapproth, J.M., Yang, H., Grossniklaus, H.E., Xu, J., Rojas, M., Voll, R.J., Goodman, M.M., Arrendale, R.F., Liu, J., Yun, C.C., Snyder, J.P., Liotta, D.C., Shim, H., 2012. Development of a unique small molecule modulator of CXCR4. *PLoS One* 7 (4), e34038.
- Liles, W.C., Broxmeyer, H.E., Rodger, E., Wood, B., Hubel, K., Cooper, S., Hangoc, G., Bridger, G.J., Henson, G.W., Calandra, G., Dale, D.C., 2003. Mobilization of hematopoietic progenitor cells in healthy volunteers by AMD3100, a CXCR4 antagonist. *Blood* 102 (8), 2728–2730.
- Lim, V.Y., Zehentmeier, S., Fistonich, C., Pereira, J.P., 2017. A chemoattractant-guided walk through lymphopoiesis: from hematopoietic stem cells to mature B lymphocytes. *Adv. Immunol.* 134, 47–88.
- Ling, X., Spaeth, E., Chen, Y., Shi, Y., Zhang, W., Schober, W., Hail Jr., N., Konopleva, M., Andreeff, M., 2013. The CXCR4 antagonist AMD3465 regulates oncogenic signaling and invasiveness in vitro and prevents breast cancer growth and metastasis in vivo. *PLoS One* 8 (3), e58426.
- Loetscher, M., Geiser, T., O'Reilly, T., Zwahlen, R., Baggiolini, M., Moser, B., 1994. Cloning of a human seven-transmembrane domain receptor, LESTR, that is highly expressed in leukocytes. *J. Biol. Chem.* 269 (1), 232–237.
- Longo-Imedio, M.I., Longo, N., Trevino, I., Lazaro, P., Sanchez-Mateos, P., 2005. Clinical Significance of CXCR3 and CXCR4 Expression in Primary Melanoma. *Int J. Cancer.*
- Lonial, S., Durie, B., Palumbo, A., San-Miguel, J., 2016. Monoclonal antibodies in the treatment of multiple myeloma: current status and future perspectives. *Leukemia* 30 (3), 526–535.

- Lucas, D., Battista, M., Shi, P.A., Isola, L., Frenette, P.S., 2008. Mobilized hematopoietic stem cell yield depends on species-specific circadian timing. *Cell Stem Cell* 3 (4), 364–366.
- Ludwig, H., Weisel, K., Petrucci, M.T., Leleu, X., Cafro, A.M., Garder, L., Leitgeb, C., Foa, R., Greil, R., Yakoub-Agha, I., Zboralski, D., Vauleon, S., Dummler, T., Beyer, D., Kruschinski, A., Riecke, K., Baumann, M., Engelhardt, M., 2017. Olaptesed pegol, an anti-CXCL12/SDF-1 Spiegelmer, alone and with bortezomib-dexamethasone in relapsed/refractory multiple myeloma: a Phase IIa Study. *Leukemia* 31 (4), 997–1000.
- Ma, Q., Jones, D., Borghesani, P.R., Segal, R.A., Nagasawa, T., Kishimoto, T., Bronson, R.T., Springer, T.A., 1998. Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (16), 9448–9453.
- Ma, Q., Jones, D., Springer, T.A., 1999. The chemokine receptor CXCR4 is required for the retention of B lineage and granulocytic precursors within the bone marrow microenvironment. *Immunity* 10 (4), 463–471.
- Manevich, E., Grabovsky, V., Feigelson, S.W., Alon, R., 2007. Talin 1 and paxillin facilitate distinct steps in rapid VLA-4-mediated adhesion strengthening to vascular cell adhesion molecule 1. *J. Biol. Chem.* 282 (35), 25338–25348.
- Marchese, A., Raiborg, C., Santini, F., Keen, J.H., Stenmark, H., Benovic, J.L., 2003. The E3 ubiquitin ligase AIP4 mediates ubiquitination and sorting of the G protein-coupled receptor CXCR4. *Dev. Cell* 5 (5), 709–722.
- Marlow, R., Strickland, P., Lee, J.S., Wu, X., Pebenito, M., Binnewies, M., Le, E.K., Moran, A., Macias, H., Cardiff, R.D., Sukumar, S., Hinck, L., 2008. SLITs suppress tumor growth in vivo by silencing Sdf1/Cxcr4 within breast epithelium. *Cancer Res.* 68 (19), 7819–7827.
- Martinez-Moreno, M., Leiva, M., Aguilera-Montilla, N., Sevilla-Movilla, S., Isern de Val, S., Arellano-Sanchez, N., Gutierrez, N.C., Maldonado, R., Martinez-Lopez, J., Buno, I., Garcia-Marco, J.A., Sanchez-Mateos, P., Hidalgo, A., Garcia-Pardo, A., Teixido, J., 2016. In vivo adhesion of malignant B cells to bone marrow microvasculature is regulated by alpha4beta1 cytoplasmic-binding proteins. *Leukemia* 30 (4), 861–872.
- McConnell, A.T., Ellis, R., Pathy, B., Plummer, R., Lovat, P.E., O'Boyle, G., 2016. The prognostic significance and impact of the CXCR4-CXCR7-CXCL12 axis in primary cutaneous melanoma. *Br. J. Dermatol.* 175 (6), 1210–1220.
- Mellado, M., Rodriguez-Frade, J.M., Manes, S., Martinez, A.C., 2001. Chemokine signaling and functional responses: the role of receptor dimerization and TK pathway activation. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 397–421.
- Mendez-Ferrer, S., Lucas, D., Battista, M., Frenette, P.S., 2008. Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations. *Nature* 452 (7186), 442–447.
- Mendez-Ferrer, S., Michurina, T.V., Ferraro, F., Mazloom, A.R., Macarthur, B.D., Lira, S.A., Scadden, D.T., Ma'ayan, A., Enikolopov, G.N., Frenette, P.S., 2010. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* 466 (7308), 829–834.
- Menu, E., Asosingh, K., Indraccolo, S., De Raeve, H., Van Riet, I., Van Valckenborgh, E., Vande Broek, I., Fujii, N., Tamamura, H., Van Camp, B., Vanderkerken, K., 2006. The involvement of stromal derived factor 1alpha in homing and progression of multiple myeloma in the 5TMM model. *Haematologica* 91 (5), 605–612.
- Messmer, D., Fecteau, J.F., O'Hayre, M., Bharati, L.S., Handel, T.M., Kipps, T.J., 2011. Chronic lymphocytic leukemia cells receive RAF-dependent survival signals in response to CXCL12 that are sensitive to inhibition by sorafenib. *Blood* 117 (3), 882–889.
- Mirandola, L., Apicella, L., Colombo, M., Yu, Y., Berta, D.G., Platonova, N., Lazzari, E., Lancellotti, M., Bulfamante, G., Cobos, E., Chiriva-Internati, M., Chiaramonte, R., 2013. Anti-Notch treatment prevents multiple myeloma cells localization to the bone marrow via the chemokine system CXCR4/SDF-1. *Leukemia* 27 (7), 1558–1566.
- Mitchell, B., Leone, D., Feller, J.K., Bondzie, P., Yang, S., Park, H.Y., Mahalingam, M., 2014. Correlation of chemokine receptor CXCR4 mRNA in primary cutaneous melanoma with established histopathologic prognosticators and the BRAF status. *Melanoma Res.* 24 (6), 621–625.
- Mohle, R., Bautz, F., Raffi, S., Moore, M.A., Brugger, W., Kanz, L., 1998. The chemokine receptor CXCR-4 is expressed on CD34+ hematopoietic progenitors and leukemic cells and mediates transendothelial migration induced by stromal cell-derived factor-1. *Blood* 91 (12), 4523–4530.
- Mohle, R., Failenschmid, C., Bautz, F., Kanz, L., 1999. Overexpression of the chemokine receptor CXCR4 in B cell chronic lymphocytic leukemia is associated with increased functional response to stromal cell-derived factor-1 (SDF-1). *Leukemia* 13 (12), 1954–1959.
- Moller, C., Stromberg, T., Juremalm, M., Nilsson, K., Nilsson, G., 2003. Expression and function of chemokine receptors in human multiple myeloma. *Leukemia* 17 (1), 203–210.
- Mori, Y., Shimizu, N., Dallas, M., Niewolna, M., Story, B., Williams, P.J., Mundy, G.R., Yoneda, T., 2004. Anti-alpha4 integrin antibody suppresses the development of multiple myeloma and associated osteoclastic osteolysis. *Blood* 104 (7), 2149–2154.
- Moriuchi, M., Moriuchi, H., Turner, W., Fauci, A.S., 1997. Cloning and analysis of the promoter region of CXCR4, a coreceptor for HIV-1 entry. *J. Immunol.* 159 (9), 4322–4329.
- Moriuchi, M., Moriuchi, H., Margolis, D.M., Fauci, A.S., 1999. USF/c-Myc enhances, while Yin-Yang 1 suppresses, the promoter activity of CXCR4, a coreceptor for HIV-1 entry. *J. Immunol.* 162 (10), 5986–5992.
- Muller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M.E., McClanahan, T., Murphy, E., Yuan, W., Wagner, S.N., Barrera, J.L., Mohar, A., Verastegui, E., Zlotnik, A., 2001. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410 (6824), 50–56.
- Murakami, T., Maki, W., Cardones, A.R., Fang, H., Tun Kyi, A., Nestle, F.O., Hwang, S.T., 2002. Expression of CXCR4 chemokine receptor-4 enhances the pulmonary metastatic potential of murine B16 melanoma cells. *Cancer Res.* 62 (24), 7328–7334.
- Nagasawa, T., Hirota, S., Tachibana, K., Takakura, N., Nishikawa, S., Kitamura, Y., Yoshida, N., Kikutani, H., Kishimoto, T., 1996. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature* 382 (6592), 635–638.
- Nakayama, T., Hieshima, K., Izawa, D., Tatsumi, Y., Kanamaru, A., Yoshie, O., 2003. Cutting edge: profile of chemokine receptor expression on human plasma cells accounts for their efficient recruitment to target tissues. *J. Immunol.* 170 (3), 1136–1140.
- Nervi, B., Ramirez, P., Rettig, M.P., Uy, G.L., Holt, M.S., Ritchey, J.K., Prior, J.L., Piwnica-Worms, D., Bridger, G., Ley, T.J., DiPersio, J.F., 2009. Chemosensitization of acute myeloid leukemia (AML) following mobilization by the CXCR4 antagonist AMD3100. *Blood* 113 (24), 6206–6214.
- Netelenbos, T., van den Born, J., Kessler, F.L., Zweegman, S., Merle, P.A., van Oostveen, J.W., Zwaginga, J.J., Huijgens, P.C., Drager, A.M., 2003. Proteoglycans on bone marrow endothelial cells bind and present SDF-1 towards hematopoietic progenitor cells. *Leukemia* 17 (1), 175–184.
- Neves, S.R., Ram, P.T., Iyengar, R., 2002. G protein pathways. *Science* 296 (5573), 1136–1140.
- Nie, Y., Waite, J., Brewer, F., Sunshine, M.J., Littman, D.R., Zou, Y.R., 2004. The role of CXCR4 in maintaining peripheral B cell compartments and humoral immunity. *J. Exp. Med.* 200 (9), 1145–1156.
- Noborio-Hatano, K., Kikuchi, J., Takatoku, M., Shimizu, R., Wada, T., Ueda, M., Nobuyoshi, M., Oh, I., Sato, K., Suzuki, T., Ozaki, K., Mori, M., Nagai, T., Muroi, K., Kano, Y., Furukawa, Y., Ozawa, K., 2009. Bortezomib overcomes cell-adhesion-mediated drug resistance through downregulation of VLA-4 expression in multiple myeloma. *Oncogene* 28 (2), 231–242.
- Noda, M., Omatsu, Y., Sugiyama, T., Oishi, S., Fujii, N., Nagasawa, T., 2011. CXCL12-CXCR4 chemokine signaling is essential for NK-cell development in adult mice. *Blood* 117 (2), 451–458.
- O'Boyle, G., Mellor, P., Kirby, J.A., Ali, S., 2009. Anti-inflammatory therapy by intravenous delivery of non-heparan sulfate-binding CXCL12. *FASEB J.* 23 (11), 3906–3916.
- O'Boyle, G., Swidenbank, I., Marshall, H., Barker, C.E., Armstrong, J., White, S.A., Fricker, S.P., Plummer, R., Wright, M., Lovat, P.E., 2013. Inhibition of CXCR4-CXCL12 chemotaxis in melanoma by AMD11070. *Br. J. Cancer* 108 (8), 1634–1640.
- Oberlin, E., Amara, A., Bachelier, F., Bessia, C., Virelizier, J.L., Arenzana-Seisdedos, F., Schwartz, O., Heard, J.M., Clark-Lewis, I., Legler, D.F., Loetscher, M., Baggiolini, M., Moser, B., 1996. The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature* 382 (6594), 833–835.
- Offermanns, S., 2001. In vivo functions of heterotrimeric G-proteins: studies in Galpha-deficient mice. *Oncogene* 20 (13), 1635–1642.
- Okada, T., Ngo, V.N., Eklund, E.H., Forster, R., Lipp, M., Littman, D.R., Cyster, J.G., 2002. Chemokine requirements for B cell entry to lymph nodes and Peyer's patches. *J. Exp. Med.* 196 (1), 65–75.
- Oldham, W.M., Hamm, H.E., 2008. Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9 (1), 60–71.
- Olson, D.L., Burkly, L.C., Leone, D.R., Dolinski, B.M., Lobb, R.R., 2005. Anti-alpha4 integrin monoclonal antibody inhibits multiple myeloma growth in a murine model. *Mol. Cancer Ther.* 4 (1), 91–99.
- Omatsu, Y., Sugiyama, T., Kohara, H., Kondoh, G., Fujii, N., Kohno, K., Nagasawa, T., 2010. The essential functions of adipo-osteogenic progenitors as the hematopoietic stem and progenitor cell niche. *Immunity* 33 (3), 387–399.
- Paiva, B., Corchete, L.A., Vidriales, M.B., Puig, N., Maiso, P., Rodriguez, I., Alignani, D., Burgos, L., Sanchez, M.L., Barcena, P., Echeveste, M.A., Hernandez, M.T., Garcia-Sanz, R., Ocio, E.M., Oriol, A., Gironella, M., Palomera, L., De Arriba, F., Gonzalez, Y., Johnson, S.K., Epstein, J., Barlogie, B., Lahuerta, J.J., Blade, J., Orfao, A., Mateos, M.V., San Miguel, J.F., 2016. Phenotypic and genomic analysis of multiple myeloma minimal residual disease tumor cells: a new model to understand chemoresistance. *Blood* 127 (15), 1896–1906.
- Parmo-Cabanas, M., Bartolome, R.A., Wright, N., Hidalgo, A., Drager, A.M., Teixido, J., 2004. Integrin alpha4beta1 involvement in stromal cell-derived factor-1alpha-promoted myeloma cell transendothelial migration and adhesion: role of cAMP and the actin cytoskeleton in adhesion. *Exp. Cell Res.* 294 (2), 571–580.
- Patrusi, L., Capitani, N., Martini, V., Pizzi, M., Trimarco, V., Frezzato, F., Marino, F., Semenzato, G., Trentin, L., Baldari, C.T., 2015. Enhanced chemokine receptor recycling and impaired S1P1 expression promote leukemic cell infiltration of lymph nodes in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res.* 75 (19), 4153–4163.
- Pavlasova, G., Borsky, M., Seda, V., Cerna, K., Osickova, J., Doubek, M., Mayer, J., Calogero, R., Trbusek, M., Pospisilova, S., Davids, M.S., Kipps, T.J., Brown, J.R., Mraz, M., 2016. Ibrutinib inhibits CD20 upregulation on CLL B cells mediated by the CXCR4/SDF-1 axis. *Blood* 128 (12), 1609–1613.
- Pawig, L., Klasen, C., Weber, C., Bernhagen, J., Noels, H., 2015. Diversity and interconnections in the CXCR4 chemokine receptor/ligand family: molecular perspectives. *Front. Immunol.* 6, 429.
- Payne, A.S., Cornelius, L.A., 2002. The role of chemokines in melanoma tumor growth and metastasis. *J. Invest. Dermatol.* 118 (6), 915–922.
- Peled, A., Grabovsky, V., Habler, L., Sandbank, J., Arenzana-Seisdedos, F., Petit, I., Ben-Hur, H., Lapidot, T., Alon, R., 1999. The chemokine SDF-1 stimulates integrin-mediated arrest of CD34(+) cells on vascular endothelium under shear flow. *J. Clin. Invest.* 104 (9), 1199–1211.
- Peng, S.B., Zhang, X., Paul, D., Kays, L.M., Ye, M., Vaillancourt, P., Dowless, M., Stancato, L.F., Stewart, J., Uhlir, M.T., Long, H., Chu, S., Obungu, V.H., 2016. Inhibition of CXCR4 by LY2624587, a fully humanized anti-CXCR4 antibody induces apoptosis of hematologic malignancies. *PLoS One* 11 (3), e0150585.
- Phillips, R.J., Burdick, M.D., Lutz, M., Belperio, J.A., Keane, M.P., Strieter, R.M., 2003. The stromal derived factor-1/CXCL12-CXCR4 chemokine receptor 4 biological axis in non-small cell lung cancer metastases. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 167 (12),

- 1676–1686.
- Pierce, K.L., Premont, R.T., Lefkowitz, R.J., 2002. Seven-transmembrane receptors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3 (9), 639–650.
- Plotkin, J., Prockop, S.E., Lepique, A., Petrie, H.T., 2003. Critical role for CXCR4 signaling in progenitor localization and T cell differentiation in the postnatal thymus. *J. Immunol.* 171 (9), 4521–4527.
- Porvasnik, S., Sakamoto, N., Kusmartsev, S., Eruslanov, E., Kim, W.J., Cao, W., Urbanek, C., Wong, D., Goodison, S., Rosser, C.J., 2009. Effects of CXCR4 antagonist CTCE-9908 on prostate tumor growth. *Prostate* 69 (13), 1460–1469.
- Price, T.T., Burness, M.L., Sivan, A., Warner, M.J., Cheng, R., Lee, C.H., Olivere, L., Comatas, K., Magnani, J., Kim Lyerly, H., Cheng, Q., McCall, C.M., Sipkins, D.A., 2016. Dormant breast cancer micrometastases reside in specific bone marrow niches that regulate their transit to and from bone. *Sci. Transl. Med.* 8 (340), 340ra373.
- Proudfoot, A.E., 2002. Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets. *Nat. Rev. Immunol.* 2 (2), 106–115.
- Raab, M.S., Podar, K., Breitkreutz, I., Richardson, P.G., Anderson, K.C., 2009. Multiple myeloma. *Lancet* 374 (9686), 324–339.
- Redondo-Munoz, J., Escobar-Diaz, E., Samaniego, R., Terol, M.J., Garcia-Marco, J.A., Garcia-Pardo, A., 2006. MMP-9 in B-cell chronic lymphocytic leukemia is up-regulated by alpha4beta1 integrin or CXCR4 engagement via distinct signaling pathways, localizes to podosomes, and is involved in cell invasion and migration. *Blood* 108 (9), 3143–3151.
- Richardson, S.J., Matthews, C., Catherwood, M.A., Alexander, H.D., Carey, B.S., Farrugia, J., Gardiner, A., Mould, S., Oscier, D., Coppleson, J.A., Prentice, A.G., 2006. ZAP-70 expression is associated with enhanced ability to respond to migratory and survival signals in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Blood* 107 (9), 3584–3592.
- Robledo, M.M., Bartolome, R.A., Longo, N., Rodriguez-Frade, J.M., Mellado, M., Longo, I., van Muijen, G.N., Sanchez-Mateos, P., Teixido, J., 2001. Expression of functional chemokine receptors CXCR3 and CXCR4 on human melanoma cells. *J. Biol. Chem.* 276 (48), 45098–45105.
- Roccaro, A.M., Sacco, A., Purschke, W.G., Moschetta, M., Buchner, K., Maasch, C., Zboralski, D., Zollner, S., Vonhoff, S., Mishima, Y., Maiso, P., Reagan, M.R., Lonardi, S., Ungari, M., Facchetti, F., Eulberg, D., Kruschinski, A., Vater, A., Rossi, G., Klusmann, S., Ghobrial, I.M., 2014. SDF-1 inhibition targets the bone marrow niche for cancer therapy. *Cell Rep.* 9 (1), 118–128.
- Roccaro, A.M., Mishima, Y., Sacco, A., Moschetta, M., Tai, Y.T., Shi, J., Zhang, Y., Reagan, M.R., Huynh, D., Kawano, Y., Sahin, I., Chiarini, M., Manier, S., Cea, M., Aljawai, Y., Glavey, S., Morgan, E., Pan, C., Michor, F., Cardarelli, P., Kuhne, M., Ghobrial, I.M., 2015. CXCR4 regulates extra-medullary myeloma through epithelial-mesenchymal-transition-like transcriptional activation. *Cell Rep.* 12 (4), 622–635.
- Rombouts, E.J., Pavic, B., Lowenberg, B., Ploemacher, R.E., 2004. Relation between CXCR-4 expression, Flt3 mutations, and unfavorable prognosis of adult acute myeloid leukemia. *Blood* 104 (2), 550–557.
- Rossi, D., Zlotnik, A., 2000. The biology of chemokines and their receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 217–242.
- Sadir, R., Imberty, A., Baleux, F., Lortat-Jacob, H., 2004. Heparan sulfate/heparin oligosaccharides protect stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)/CXCL12 against proteolysis induced by CD26/dipeptidyl peptidase IV. *J. Biol. Chem.* 279 (42), 43854–43860.
- Saha, A., Ahn, S., Blando, J., Su, F., Kolonin, M.G., DiGiovanni, J., 2017. Proinflammatory CXCL12-CXCR4/CXCR7 signaling axis drives myc-induced prostate cancer in obese mice. *Cancer Res.* 77 (18), 5158–5168.
- Saini, V., Staren, D.M., Ziarek, J.J., Nashaat, Z.N., Campbell, E.M., Volkman, B.F., Marchese, A., Majetschak, M., 2011. The CXCR4 chemokine receptor 4 ligands ubiquitin and stromal cell-derived factor-1alpha function through distinct receptor interactions. *J. Biol. Chem.* 286 (38), 33466–33477.
- Saint-Georges, S., Quettier, M., Bouyaba, M., Le Coquil, S., Lauriente, V., Guitat, L., Levy, V., Ajchenbaum-Cymbalista, F., Varin-Blank, N., Le Roy, C., Ledoux, D., 2016. Protein kinase D-dependent CXCR4 down-regulation upon BCR triggering is linked to lymphadenopathy in chronic lymphocytic leukaemia. *Oncotarget* 7 (27), 41031–41046.
- Salvucci, O., Bouchard, A., Baccarelli, A., Deschenes, J., Sauter, G., Simon, R., Bianchi, R., Basik, M., 2006. The role of CXCR4 receptor expression in breast cancer: a large tissue microarray study. *Breast Cancer Res. Treat.* 97 (3), 275–283.
- Sanz-Rodriguez, F., Hidalgo, A., Teixido, J., 2001. Chemokine stromal cell-derived factor-1alpha modulates VLA-4 integrin-mediated multiple myeloma cell adhesion to CS-1/fibronectin and VCAM-1. *Blood* 97 (2), 346–351.
- Sayyed, S.G., Hagele, H., Kulkarni, O.P., Endlich, K., Segerer, S., Eulberg, D., Klusmann, S., Anders, H.J., 2009. Podocytes produce homeostatic chemokine stromal cell-derived factor-1/CXCL12, which contributes to glomerulosclerosis, podocyte loss and albuminuria in a mouse model of type 2 diabetes. *Diabetologia* 52 (11), 2445–2454.
- Scala, S., Ottaiano, A., Ascierto, P.A., Cavalli, M., Simeone, E., Giuliano, P., Napolitano, M., Franco, R., Botti, G., Castello, G., 2005. Expression of CXCR4 predicts poor prognosis in patients with malignant melanoma. *Clin. Cancer Res.* 11 (5), 1835–1841.
- Scala, S., 2015. Molecular pathways: targeting the CXCR4-CXCL12 axis—untapped potential in the tumor microenvironment. *Clin. Cancer Res.* 21 (19), 4278–4285.
- Schulz, O., Hammerschmidt, S.I., Moschovakis, G.L., Forster, R., 2016. Chemokines and chemokine receptors in lymphoid tissue dynamics. *Annu. Rev. Immunol.* 34, 203–242.
- Schumann, K., Lammermann, T., Bruckner, M., Legler, D.F., Polleux, J., Spatz, J.P., Schuler, G., Forster, R., Lutz, M.B., Sorokin, L., Sixt, M., 2010. Immobilized chemokine fields and soluble chemokine gradients cooperatively shape migration patterns of dendritic cells. *Immunity* 32 (5), 703–713.
- Shanmugam, M.K., Manu, K.A., Ong, T.H., Ramachandran, L., Surana, R., Bist, P., Lim, L.H., Kumar, A.P., Hui, K.M., Sethi, G., 2011. Inhibition of CXCR4/CXCL12 signaling axis by ursolic acid leads to suppression of metastasis in transgenic adenocarcinoma of mouse prostate model. *Int. J. Cancer* 129 (7), 1552–1563.
- Shenoy, S.K., Lefkowitz, R.J., 2011. beta-Arrestin-mediated receptor trafficking and signal transduction. *Trends Pharmacol. Sci.* 32 (9), 521–533.
- Shirozu, M., Nakano, T., Inazawa, J., Tashiro, K., Tada, H., Shinohara, T., Honjo, T., 1995. Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene. *Genomics* 28 (3), 495–500.
- Singareddy, R., Semaan, L., Conley-Lacomb, M.K., St John, J., Powell, K., Iyer, M., Smith, D., Heilbrun, L.K., Shi, D., Sakr, W., Cher, M.L., Chinni, S.R., 2013. Transcriptional regulation of CXCR4 in prostate cancer: significance of TMPRSS2-ERG fusions. *Mol. Cancer Res.* 11 (11), 1349–1361.
- Smith, M.C., Luker, K.E., Garbow, J.R., Prior, J.L., Jackson, E., Piwnicka-Worms, D., Luker, G.D., 2004. CXCR4 regulates growth of both primary and metastatic breast cancer. *Cancer Res.* 64 (23), 8604–8612.
- Spano, J.P., Andre, F., Morat, L., Sabatier, L., Besse, B., Combadiere, C., Deterre, P., Martin, A., Azorin, J., Valeyre, D., Khayat, D., Le Chevalier, T., Soria, J.C., 2004. Chemokine receptor CXCR4 and early-stage non-small cell lung cancer: pattern of expression and correlation with outcome. *Ann. Oncol.* 15 (4), 613–617.
- Spoor, A.C., Lubbert, M., Wierda, W.G., Burger, J.A., 2007. CXCR4 is a prognostic marker in acute myelogenous leukemia. *Blood* 109 (2), 786–791.
- Su, L., Zhang, J., Xu, H., Wang, Y., Chu, Y., Liu, R., Xiong, S., 2005. Differential expression of CXCR4 is associated with the metastatic potential of human non-small cell lung cancer cells. *Clin. Cancer Res.* 11 (23), 8273–8280.
- Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M., Nagasawa, T., 2006. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity* 25 (6), 977–988.
- Sun, Y.X., Wang, J., Shelburne, C.E., Lopatin, D.E., Chinnaiyan, A.M., Rubin, M.A., Pienta, K.J., Taichman, R.S., 2003. Expression of CXCR4 and CXCL12 (SDF-1) in human prostate cancers (PCa) in vivo. *J. Cell. Biochem.* 89 (3), 462–473.
- Sung, B., Jhurani, S., Ahn, K.S., Mastuo, Y., Yi, T., Guha, S., Liu, M., Aggarwal, B.B., 2008. Zerbombone down-regulates chemokine receptor CXCR4 expression leading to inhibition of CXCL12-induced invasion of breast and pancreatic tumor cells. *Cancer Res.* 68 (21), 8938–8944.
- Tachibana, K., Hirota, S., Iizasa, H., Yoshida, H., Kawabata, K., Kataoka, Y., Kitamura, Y., Matsushima, K., Yoshida, N., Nishikawa, S., Kishimoto, T., Nagasawa, T., 1998. The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature* 393 (6685), 591–594.
- Taichman, R.S., Cooper, C., Keller, E.T., Pienta, K.J., Taichman, N.S., McCauley, L.K., 2002. Use of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 pathway in prostate cancer metastasis to bone. *Cancer Res.* 62 (6), 1832–1837.
- Taromi, S., Kayser, G., Catusse, J., von Elverfeldt, D., Reichardt, W., Braun, F., Weber, W.A., Zeiser, R., Burger, M., 2016. CXCR4 antagonists suppress small cell lung cancer progression. *Oncotarget* 7 (51), 85185–85195.
- Tavor, S., Eisenbach, M., Jacob-Hirsch, J., Golan, T., Petit, I., Benzion, K., Kay, S., Baron, S., Amariglio, N., Deutsch, V., Naparstek, E., Rechavi, G., 2008. The CXCR4 antagonist AMD3100 impairs survival of human AML cells and induces their differentiation. *Leukemia* 22 (12), 2151–2158.
- Teicher, B.A., Fricker, S.P., 2010. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. *Clin. Cancer Res.* 16 (11), 2927–2931.
- Tokoyoda, K., Egawa, T., Sugiyama, T., Choi, B.I., Nagasawa, T., 2004. Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development. *Immunity* 20 (6), 707–718.
- Tzeng, Y.S., Li, H., Kang, Y.L., Chen, W.C., Cheng, W.C., Lai, D.M., 2011. Loss of Cxcl12/Sdf-1 in adult mice decreases the quiescent state of hematopoietic stem/progenitor cells and alters the pattern of hematopoietic regeneration after myelosuppression. *Blood* 117 (2), 429–439.
- Ueda, Y., Yang, K., Foster, S.J., Kondo, M., Kelsoe, G., 2004. Inflammation controls B lymphopoiesis by regulating chemokine CXCL12 expression. *J. Exp. Med.* 199 (1), 47–58.
- Ueda, Y., Kondo, M., Kelsoe, G., 2005. Inflammation and the reciprocal production of granulocytes and lymphocytes in bone marrow. *J. Exp. Med.* 201 (11), 1771–1780.
- Uy, G.L., Rettig, M.P., Motabi, I.H., McFarland, K., Trinkaus, K.M., Hladnik, L.M., Kulkarni, S., Abboud, C.N., Cashen, A.F., Stockerl-Goldstein, K.E., Vij, R., Westervelt, P., DiPersio, J.F., 2012. A phase 1/2 study of chemosensitization with the CXCR4 antagonist plerixafor in relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood* 119 (17), 3917–3924.
- Vaday, G.G., Hua, S.B., Peehl, D.M., Pauling, M.H., Lin, Y.H., Zhu, L., Lawrence, D.M., Foda, H.D., Zucker, S., 2004. CXCR4 and CXCL12 (SDF-1) in prostate cancer: inhibitory effects of human single chain Fv antibodies. *Clin. Cancer Res.* 10 (16), 5630–5639.
- Vlad, A., Deglesne, P.A., Letestu, R., Saint-Georges, S., Chevallier, N., Baran-Marszak, F., Varin-Blank, N., Ajchenbaum-Cymbalista, F., Ledoux, D., 2009. Down-regulation of CXCR4 and CD62L in chronic lymphocytic leukemia cells is triggered by B-cell receptor ligation and associated with progressive disease. *Cancer Res.* 69 (16), 6387–6395.
- Voermans, C., van Heese, W.P., de Jong, I., Gerritsen, W.R., van Der Schoot, C.E., 2002. Migratory behavior of leukemic cells from acute myeloid leukemia patients. *Leukemia* 16 (4), 650–657.
- Wagner, P.L., Hyjek, E., Vazquez, M.F., Meherally, D., Liu, Y.F., Chadwick, P.A., Rengifo, T., Sica, G.L., Port, J.L., Lee, P.C., Paul, S., Altorki, N.K., Saqi, A., 2009. CXCL12 and CXCR4 in adenocarcinoma of the lung: association with metastasis and survival. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 137 (3), 615–621.
- Waldschmidt, J.M., Simon, A., Wider, D., Muller, S.J., Follo, M., Ithorst, G., Decker, S., Lorenz, J., Chatterjee, M., Azab, A.K., Duyster, J., Wasch, R., Engelhardt, M., 2017. CXCL12 and CXCR7 are relevant targets to reverse cell adhesion-mediated drug resistance in multiple myeloma. *Br. J. Haematol.* 179 (1), 36–49.
- Woodard, G.E., Jardin, I., Berna-Ero, A., Salido, G.M., Rosado, J.A., 2015. Regulators of G-protein-signaling proteins: negative modulators of G-protein-coupled receptor

- signaling. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 317, 97–183.
- Wu, B., Chien, E.Y., Mol, C.D., Fenalti, G., Liu, W., Katritch, V., Abagyan, R., Brooun, A., Wells, P., Bi, F.C., Hamel, D.J., Kuhn, P., Handel, T.M., Cherezov, V., Stevens, R.C., 2010. Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. *Science* 330 (6007), 1066–1071.
- Yu, L., Cecil, J., Peng, S.B., Schrementi, J., Kovacevic, S., Paul, D., Su, E.W., Wang, J., 2006. Identification and expression of novel isoforms of human stromal cell-derived factor 1. *Gene* 374, 174–179.
- Zhang, Z., Ni, C., Chen, W., Wu, P., Wang, Z., Yin, J., Huang, J., Qiu, F., 2014. Expression of CXCR4 and breast cancer prognosis: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer* 14, 49.
- Zhang, Y., Saavedra, E., Tang, R., Gu, Y., Lappin, P., Trajkovic, D., Liu, S.H., Smeal, T., Fantin, V., De Botton, S., Legrand, O., Delhommeau, F., Parnasetti, F., Louache, F., 2017. Targeting primary acute myeloid leukemia with a new CXCR4 antagonist IgG1 antibody (PF-06747143). *Sci. Rep.* 7 (1), 7305.
- Zhao, H., Guo, L., Zhao, J., Weng, H., Zhao, B., 2015. CXCR4 over-expression and survival in cancer: a system review and meta-analysis. *Oncotarget* 6 (7), 5022–5040.
- Zlotnik, A., Yoshie, O., 2012. The chemokine superfamily revisited. *Immunity* 36 (5), 705–716.
- Zou, Y.R., Kottmann, A.H., Kuroda, M., Taniuchi, I., Littman, D.R., 1998. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* 393 (6685), 595–599.

ANEXO IV

Lateral Mobility and Nanoscale Spatial Arrangement of Chemokine-activated $\alpha 4\beta 1$ Integrins on T Cells*^[5]

Received for publication, April 20, 2016, and in revised form, July 29, 2016 Published, JBC Papers in Press, August 1, 2016, DOI 10.1074/jbc.M116.733709

Alberto Sosa-Costa^{‡1}, Sol Isern de Val^{§1}, Silvia Sevilla-Movilla[§],  Kyra J. E. Borgman[‡],  Carlo Manzo[‡],
 Joaquin Teixido^{§2}, and  Maria F. Garcia-Parajo^{‡1,2,3}

From the [‡]Institut de Ciències Fotoniques, Barcelona Institute of Science and Technology, 08860 Castelldefels, Barcelona, Spain, the [§]Centro de Investigaciones Biológicas, Department of Cellular and Molecular Medicine, 28040 Madrid, Spain, and the ¹ICREA, Pg. Lluís Companys 23, 08010 Barcelona, Spain

Chemokine stimulation of integrin $\alpha 4\beta 1$ -dependent T lymphocyte adhesion is a key step during lymphocyte trafficking. A central question regarding $\alpha 4\beta 1$ function is how its lateral mobility and organization influence its affinity and avidity following cell stimulation with chemokines and/or ligands. Using single particle tracking and superresolution imaging approaches, we explored the lateral mobility and spatial arrangement of individual $\alpha 4\beta 1$ integrins on T cells exposed to different activating stimuli. We show that CXCL12 stimulation leads to rapid and transient $\alpha 4\beta 1$ activation, measured by induction of the activation epitope recognized by the HUTS-21 anti- $\beta 1$ antibody and by increased talin- $\beta 1$ association. CXCL12-dependent $\alpha 4\beta 1$ activation directly correlated with restricted lateral diffusion and integrin immobilization. Moreover, co-stimulation by CXCL12 together with soluble VCAM-1 potentiated integrin immobilization with a 5-fold increase in immobile integrins compared with unstimulated conditions. Our data indicate that docking by talin of the chemokine-activated $\alpha 4\beta 1$ to the actin cytoskeleton favors integrin immobilization, which likely facilitates ligand interaction and increased adhesiveness. Superresolution imaging showed that the nanoscale organization of high-affinity $\alpha 4\beta 1$ remains unaffected following chemokine and/or ligand addition. Instead, newly activated $\alpha 4\beta 1$ integrins organize on the cell membrane as independent units without joining pre-established integrin sites to contribute to cluster formation. Altogether, our results provide a rationale to understand how the spatiotemporal organization of activated $\alpha 4\beta 1$ integrins regulates T lymphocyte adhesion.

Integrins control morphogenesis, immunity, tissue healing, and tumor growth and metastasis. In particular, the $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4) and $\alpha L\beta 2$ (LFA-1) integrins are key players in T lymphocyte trafficking from the blood circulation to lymphoid tissues and to sites of injury and infection (2). Their adhesiveness is rapidly and transiently activated by chemokines (3, 4), allowing highly dynamic T cell interactions with the endothelium that facilitate crawling and diapedesis. Binding of chemokines to their receptors generates an inside-out signaling that impinges on the cytoplasmic domains of β subunits (5–7), leading to the extension of high-affinity conformations of the extracellular $\alpha 4\beta 1$ and $\alpha L\beta 2$ integrins that are competent for binding to their ligands VCAM-1 and ICAM-1, respectively. It is generally accepted that interactions of talin and kindlin with specific cytoplasmic motifs on $\beta 1$ and $\beta 2$ integrin subunits represent critical steps for the generation of active $\alpha 4\beta 1$ and $\alpha L\beta 2$ integrins (7–10).

The role played by $\alpha 4\beta 1$ is especially important during T lymphocyte trafficking to sites of inflammation. Its interaction with VCAM-1 as well as with the CS-1 region of fibronectin allows optimal T cell migration, which contributes to subsequent immune responses. In addition to the critical involvement of talin in stimulating active $\alpha 4\beta 1$ conformations (11, 12), the characterization of the inside-out signaling required for chemokine-promoted $\alpha 4\beta 1$ activation revealed that Vav1 plays a key role in the optimal stimulation of T cell adhesion mediated by this integrin (13).

A central question regarding integrin function on lymphocytes is how the lateral organization and mobility of $\alpha 4\beta 1$ and $\alpha L\beta 2$ influence their activation and adhesiveness after contact with chemokines and/or ligands. This question is important to improve our understanding on how these integrins spatially regulate their affinity and avidity and would ultimately allow interference in this process. Earlier reports showed that lateral mobility controls $\alpha L\beta 2$ rearrangement into clusters upon leukocyte activation, which occurs following release of cytoskeleton constraints, allowing integrin motion (14). These studies led to the proposal that inactive $\alpha L\beta 2$ integrins are anchored to the cytoskeleton and released to strengthen ligand binding (14), suggesting that $\alpha L\beta 2$ integrin activation precedes clustering. However, high-affinity integrins are more prone to interact with the cytoskeleton via their cytoplasmic domains (1), causing integrin immobilization and compromising their lateral diffusion. Indeed, high-affinity $\alpha L\beta 2$ appears immobile in phorbol 12-myristate 13-acetate-activated cells (15). Along the same

Integrins are heterodimeric cell membrane adhesion receptors composed of non-covalently associated α and β subunits that mediate cell-cell and cell-extracellular matrix adhesion (1).

* This work was supported by Erasmus Mundus Doctorate Program Europhotonics Grant 159224-1-2009-1-FR-ERA MUNDUS-EMJD), Spanish Ministry of Economy and Competitiveness "Severo Ochoa" Programme for Centres of Excellence in R&D Grants SEV-2015-0522, FIS2014-5617-R, SAF2014-53059-R, and RD12/0036/0061; Fundacio Privada CELLEX (Barcelona); HFSP Grant GA RGP0027/2012; and LaserLab Europe 4 Grant GA 654148. The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

✂ Author's Choice—Final version free via Creative Commons CC-BY license.

^[5] This article contains Figures S1–S5 and Movie S1.

¹ Both authors contributed equally to this work.

² Both authors are equally contributing senior authors.

³ To whom correspondence should be addressed: E-mail: maria.garcia-parajo@icfo.es.

Spatiotemporal Regulation of CXCL12-activated $\alpha 4\beta 1$ Integrin

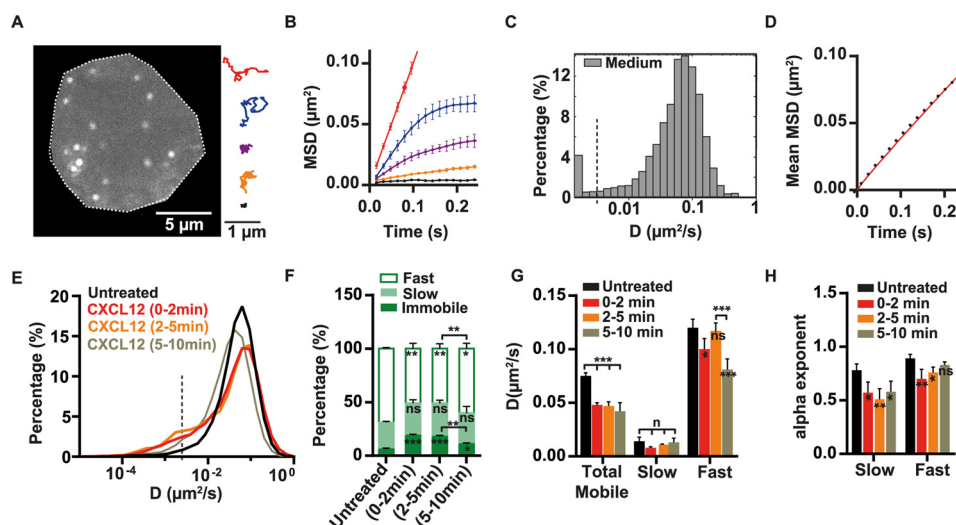


FIGURE 1. Characterization of the lateral mobility of $\alpha 4\beta 1$ on T cells and effect of CXCL12 stimulation. A, representative frame from the tracking of individual $\alpha 4\beta 1$ molecules on Molt-4 T cells using clone 18 anti- $\beta 1$ -QD-655 conjugates (an untreated cell is depicted). Examples of individual $\alpha 4\beta 1$ trajectories displaying different types of motion are shown in the *right panel*. B, MSD over time for representative trajectories displayed in A using the same color code. C, semi-log histogram of D_{1-4} for $\alpha 4\beta 1$. Values below $D_{1-4} = 0.0025 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (dashed vertical line) correspond to immobile trajectories. D, overall MSD plot of the total mobile $\alpha 4\beta 1$ population at different time lags. E, overlay semi-log distributions of D_{1-4} for the indicated incubation conditions. The dashed vertical line at $D = 0.0025 \mu\text{m}^2/\text{s}$ denotes the threshold value for discriminating immobile (*left*) from mobile (*right*) trajectories. F, percentage of immobile, slow, and fast $\alpha 4\beta 1$ subpopulations for untreated or CXCL12-exposed cells. G, diffusion coefficient values of the total mobile population and for the slow and fast $\alpha 4\beta 1$ fractions. H, anomalous α exponents for the slow and fast $\alpha 4\beta 1$ subpopulations under the indicated conditions. Unless indicated otherwise, statistical comparisons were done with respect to untreated cells. Statistics over three separate experiments are as follows: 4021 trajectories on 40 cells (untreated) (C and D); for different conditions (E–H), 20 untreated cells (1637 trajectories), 6 cells stimulated with CXCL12 for 0–2 min (816 trajectories), 9 cells stimulated with CXCL12 for 2–5 min (1014 trajectories), and 21 cells stimulated with CXCL12 for 5–10 min (1937 trajectories). ns, not significant ($p > 0.05$); *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

lines, we recently showed that $\alpha L\beta 2$ activation by extracellular cations or chemokine stimulation increased the percentage of immobile $\alpha L\beta 2$ nanoclusters in dendritic cells, indicating that $\alpha L\beta 2$ immobilization correlates with integrin activation (16, 17).

Little is known about the mobility of $\alpha 4\beta 1$ integrins on lymphocytes. On BMPCs,⁴ the lateral diffusion of $\alpha 4$ integrins was found to be slow and correlated with strong BMPC adhesiveness (18). Furthermore, examination of the lateral diffusion of a mutant *Drosophila* $\alpha\text{PS2}\beta\text{PS}$ integrin exhibiting high affinity for its ligand revealed slower diffusion than the wild-type counterpart (19). No studies have yet been undertaken that focus on the membrane lateral organization of $\alpha 4\beta 1$ following lymphocyte exposure to chemokines and/or ligands. Here we applied single-molecule approaches and superresolution microscopy together with reporters of $\beta 1$ activation to study the potential lateral mobility alterations and spatial regulation of $\alpha 4\beta 1$ in response to chemokine and/or ligand stimuli.

Results

Chemokine Stimulation Transiently Restricts the Lateral Mobility of $\alpha 4\beta 1$ Integrins on T Cells—The chemokine CXCL12 triggers an inside-out signaling that induces high-affinity conformations of $\alpha 4\beta 1$, leading to strengthening of $\alpha 4\beta 1$ -VCAM-1 interaction and to increased leukocyte adhesiveness (13). To investigate the effect of chemokine stimula-

tion on $\alpha 4\beta 1$ lateral mobility on T cells, we used SPT approaches (20). Molt-4 cells were employed as a model, as $\alpha 4\beta 1$ constitutes the predominant $\beta 1$ integrin heterodimer in these cells, with very low $\alpha 5\beta 1$ expression (supplemental Fig. S1), and it is highly responsive to CXCL12 stimulation (13). Cells were stretched onto PLL-coated coverslips and labeled at low density with the conformation-independent anti- $\beta 1$ clone 18 antibody previously biotinylated and conjugated with streptavidin-coated QD655. To ensure a 1:1 QD:antibody stoichiometry, the anti- $\beta 1$ -QD conjugate was prepared in an excess of free biotin to occlude streptavidin-QD extra binding sites. We recorded the motion of individual QDs by using an SPT setup working under oblique illumination. Subsequently, trajectories were reconstructed and analyzed. To minimize effects of internalization of the conjugated antibodies, measurements were always performed during the first 20 min after labeling. Moreover, to prevent potential artifacts because of the relative large size of QDs and the proximity between the cell membrane and the substrate, we exclusively imaged the apical side of the cells (Fig. 1A, *left panel*). Experiments were carried out as follows. During the first 10 min, measurements of $\alpha 4\beta 1$ integrin diffusion were performed with T cells kept in RPMI 1640 medium, *i.e.* the untreated condition. Then CXCL12 was added and maintained for another 10 min. Measurements during this period were further separated into three time windows: 0–2 min, 2–5 min, and 5–10 min.

In general, the trajectories of individual $\alpha 4\beta 1$ integrins under untreated conditions exhibited heterogeneous behavior, with some trajectories showing high mobility and others a more restricted motion (Fig. 1A, *right panel*, and supplemental Movie S1). To quantitatively describe the diffusion of $\alpha 4\beta 1$, MSD

⁴ The abbreviations used are: BMPC, undifferentiated human bone marrow-derived progenitor cell; SPT, single particle tracking; PLL, poly-L-lysine; MSD, mean square displacement; CPD, cumulative probability distribution; STED, stimulated emission depletion microscopy; FA, focal adhesion; QD, quantum dots; PFA, paraformaldehyde.

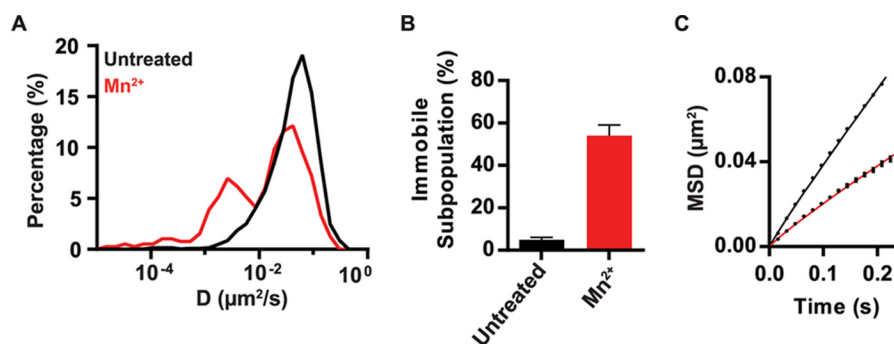


FIGURE 2. **Effect of Mn^{2+} stimulation on the lateral mobility of $\alpha 4\beta 1$ on T cells.** *A*, overlay semi-log distributions of D_{1-4} values for untreated Molt-4 cells (black line) or stimulated with Mn^{2+} for 10 min (red line). *B*, plot of the immobile trajectories for both conditions. *C*, MSD plot of mobile trajectories as a function of time for untreated (black line) and Mn^{2+} -treated cells (red line). Seven untreated cells (320 trajectories) and eight cells stimulated with Mn^{2+} (223 trajectories) over two separate experiments.

curves were generated per trajectory (examples are shown in Fig. 1*B*). Different diffusion modes were detected: immobile, confined, and Brownian motion (Fig. 1, *A* and *B*). The diffusion coefficients at short time lags (D_{1-4}) were then determined by linear fitting of the MSD curves over the first four points, and their values were plotted as a semi-log histogram to show the full distribution of the $\alpha 4\beta 1$ diffusive behavior. On untreated cells, $\alpha 4\beta 1$ integrins showed a broad variation over more than 2 orders of magnitude in the D_{1-4} values, with only a small fraction being immobile ($\sim 6\%$; see “Experimental Procedures”) (Fig. 1*C*). On the other hand, the mean MSD curve of the total mobile population showed a linear relationship with time lag (Fig. 1*D*), indicating Brownian diffusion of the integrin on unperturbed cells, with a mean value of $D = (0.083 \pm 0.005) \mu\text{m}^2/\text{s}$.

Addition of CXCL12 significantly altered $\alpha 4\beta 1$ diffusion during the first 2 min after stimulation, with the appearance of a shoulder at lower D_{1-4} values and an increase of immobile trajectories compared with untreated samples (Fig. 1*E*). To better quantify these changes, we applied CPD analysis on the mobile $\alpha 4\beta 1$ population (21). By using this approach, two different $\alpha 4\beta 1$ subpopulations having slow and fast diffusion were retrieved (see “Experimental Procedures”). For each subpopulation we determined their relative occurrence (expressed in percentages), average diffusion coefficient D_i , and anomalous α_i exponents (where α indicates the type of motion, *i.e.* $\alpha = 1$ for Brownian diffusion and $\alpha < 1$ for anomalous diffusion) with the subscript $i = s, f$ referring to the slow or the fast subpopulation, respectively.

A remarkable 3-fold increase in immobile $\alpha 4\beta 1$ trajectories (from 5% to 20%) was observed during the first 2 min of CXCL12 treatment compared with untreated cells (Fig. 1*F* and supplemental Fig. S2*A*). This increase was mostly due to a reduction of the fast subpopulation (from 70% to 50%) (Fig. 1*F*). In addition, the D values for the total mobile and the fast subpopulation were reduced with respect to unstimulated cells (Fig. 1*G*) together with a slight but significant increase in the anomalous diffusion of the fast subpopulation (from $\alpha_f = 0.89$ to $\alpha_f = 0.76$; Fig. 1*H*). Moreover, although the percentage and diffusion coefficient of the slow mobile subpopulation did not significantly change upon CXCL12 stimulation (Fig. 1, *F* and *G*), its mobility became highly anomalous (from $\alpha_s = 0.78$ to $\alpha_s = 0.48$) (Fig. 1*H*). These major changes in $\alpha 4\beta 1$ mobility

were maintained during the subsequent 2–5 min of CXCL12 exposure (Fig. 1, *E–H*).

During the 5- to 10-min time window after CXCL12 addition, the overall distribution of D_{1-4} remained shifted toward lower values with respect to untreated cells (Fig. 1*E*), with comparable values in terms of diffusion coefficients (Fig. 1*G*) and anomalous behavior (Fig. 1*H*) to those obtained during the first 5 min of CXCL12 stimulation. However, a partial recovery of the percentage of mobile molecules was observed in the 5- to 10-min period of CXCL12 treatment, concomitant with a decrease in the percentage of immobile $\alpha 4\beta 1$ (around 11%) compared with the first 5-min interval (Fig. 1*F* and supplemental Fig. S2*A*). Together, these results show that CXCL12 stimulation leads to both immobilization and slowing down of the overall lateral mobility of $\alpha 4\beta 1$ integrins on the surface of T cells. Because CXCL12 promotes high-affinity $\alpha 4\beta 1$, these results suggest the existence of a direct correlation between the integrin-restricted diffusion and increased immobilization and its activation. Moreover, the recovery in the mobile fraction in the 5- to 10-min period of exposure to CXCL12 is consistent with the reported transient effect of chemokines on integrin activation (14, 17, 22–25).

$\alpha 4\beta 1$ Integrin Immobilization Correlates with Integrin Activation—To determine whether the level of integrin activation is indeed linked to $\alpha 4\beta 1$ immobilization, we exposed Molt-4 cells to Mn^{2+} , a potent extracellular activator of integrin affinity (26). Activated $\alpha 4\beta 1$ showed a high percentage of immobile integrins compared with untreated cells (Fig. 2, *A* and *B*) and nearly the same slower diffusion as that obtained upon CXCL12 treatment, with mean D values of $0.040 \pm 0.004 \mu\text{m}^2/\text{s}$ and $D = 0.043 \pm 0.009 \mu\text{m}^2/\text{s}$ for Mn^{2+} and CXCL12 treatment, respectively (Fig. 2*C*). These results thus confirm that immobilization and reduced mobility of $\alpha 4\beta 1$ directly correlate with integrin activation.

Soluble VCAM-1 Has a Weak Effect on the Lateral Diffusion of $\alpha 4\beta 1$ Integrins—Because ligands can activate integrins extracellularly (1, 27), we sought to investigate whether Molt-4 exposure to soluble VCAM-1-Fc would also influence the lateral mobility of $\alpha 4\beta 1$. Surprisingly, no differences in the diffusivity of $\alpha 4\beta 1$ molecules were observed after ligand addition (Fig. 3, *A–D*). However, a nearly 2-fold increase in the percentage of immobile trajectories, from 6% (untreated) to 11% upon VCAM-1 stimulation, was observed during the first 2 min of

Spatiotemporal Regulation of CXCL12-activated $\alpha 4\beta 1$ Integrin

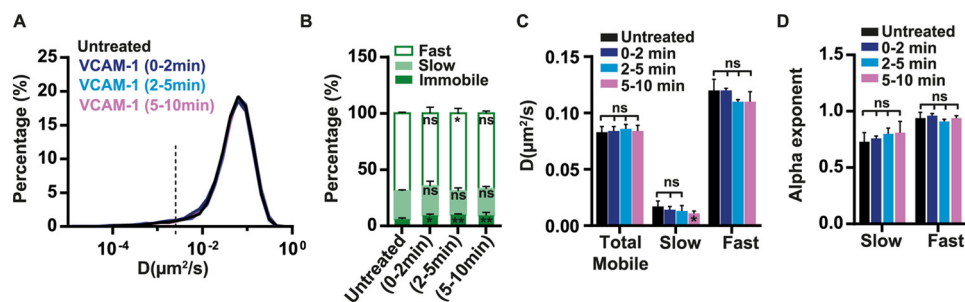


FIGURE 3. Effect of soluble VCAM-1 on the lateral mobility of $\alpha 4\beta 1$ in T cells. *A*, overlay semi-log distributions of D_{1-4} values for untreated cells or cells exposed to soluble VCAM-1-Fc in solution for 0–2, 2–5, and 5–10 min. *B*, percentage of immobile, slow, and fast $\alpha 4\beta 1$ subpopulations for untreated or VCAM-1-exposed cells. *C*, diffusion coefficients of the total mobile population and for the slow and fast fractions of $\alpha 4\beta 1$. *D*, anomalous α exponents for the slow and fast $\alpha 4\beta 1$ subpopulations. Ten untreated cells (1939 trajectories), five cells stimulated with VCAM-1 for 0–2 min (787 trajectories), eight cells stimulated with VCAM-1 for 2–5 min (1582 trajectories), and 11 cells stimulated with VCAM-1 for 5–10 min (1550 trajectories) over three separate experiments. *ns*, not significant ($p > 0.05$); *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

VCAM-1 exposure (supplemental Fig. S2B), and this percentage remained constant up to 10 min (our observation time) (Fig. 3B and supplemental Fig. S2B). Therefore, these data indicate that soluble VCAM-1-Fc is capable of inducing stable immobilization of a small subset of integrins without altering the overall diffusion of the remaining mobile molecules.

Addition of Soluble VCAM-1 to CXCL12 Stimulation Increases Immobilization of $\alpha 4\beta 1$ Integrins—Given the strong relationship between CXCL12-induced $\alpha 4\beta 1$ integrin activation and its restricted diffusion, we reasoned that the minor changes in $\alpha 4\beta 1$ mobility observed after exposure to soluble VCAM-1 could indicate that the ligand alone is insufficient to fully activate the integrin. We thus inquired whether co-stimulation by both CXCL12 and soluble VCAM-1 could alter $\alpha 4\beta 1$ diffusivity beyond that of VCAM-1 or CXCL12 alone. During the first 0- to 2-min treatment with CXCL12 and VCAM-1-Fc, we detected a prominent shoulder at lower D_{1-4} values compared with unstimulated cells or those stimulated with VCAM-1-Fc or CXCL12 alone (Fig. 4A). Importantly, combined stimulation by CXCL12 and VCAM-1 resulted in a remarkable increase in $\alpha 4\beta 1$ immobilization ($\sim 30\%$ versus 6% for untreated cells and 20% for CXCL12 alone, Fig. 4B and supplemental Fig. S2C) that was maintained during the subsequent 2–5 min of combined stimulation (Fig. 4, C and D, and supplemental Fig. S2D). Notably, this increase in the percentage of immobile integrins was mostly due to a reduction of the slow subpopulation (Fig. 4, B and D). On the other hand, the diffusion of the slow and fast mobile $\alpha 4\beta 1$ subpopulations did not significantly change upon co-stimulation compared with CXCL12 alone (supplemental Fig. S3, A–D), indicating that CXCL12 is the main stimulus impacting $\alpha 4\beta 1$ mobility. A similar trend was observed during 5–10 min of co-stimulation with CXCL12 and VCAM-1-Fc (Fig. 4, E and F, and supplemental Figs. S2E and S3, E and F), albeit more modest. That is, the percentage of immobile integrins in the presence of both stimuli was reduced from $\sim 30\%$ to 23% (Fig. 4F and supplemental Fig. S2E) compared with cells co-stimulated for 0–5 min, suggesting that, similar to CXCL12, the combined effect of CXCL12 and VCAM-1 is also transient. Taken together, these results suggest that integrin binding to its soluble ligand alone does not lead to robust integrin immobilization and restricted diffusion, a condition best achieved upon simultaneous stimulation with CXCL12 and VCAM-1.

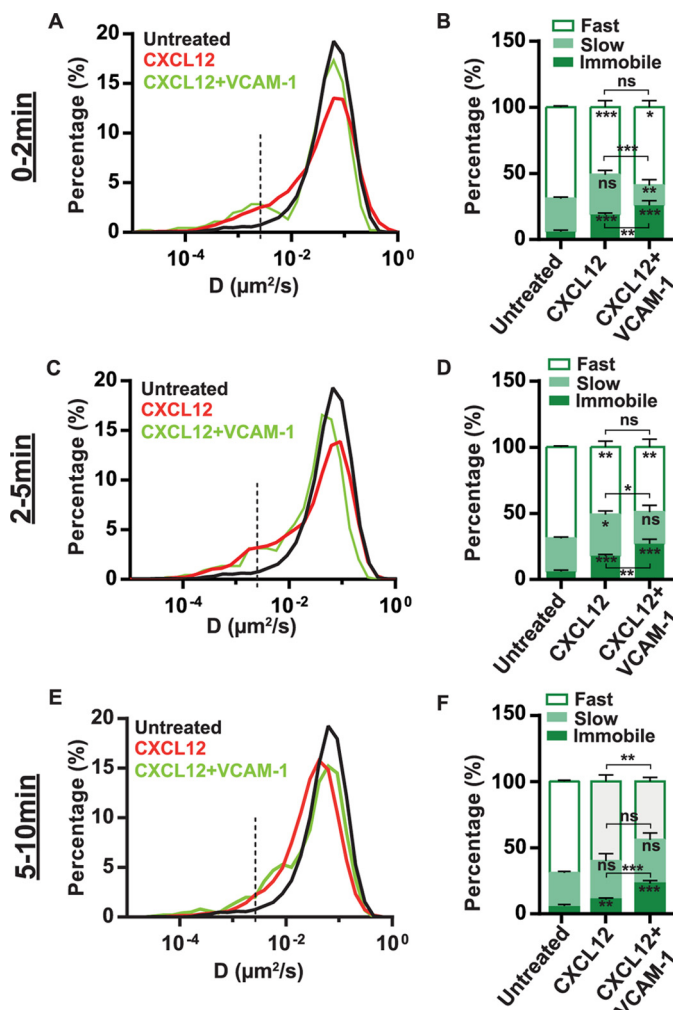


FIGURE 4. Effect of CXCL12 and VCAM-1 co-stimulation on the lateral mobility of $\alpha 4\beta 1$ in T-cells. *A* and *B*, data correspond to the first 0- to 2-min period of the different stimulation conditions. *A*, overlay semi-log distributions of D_{1-4} values for the indicated conditions. Data from the CXCL12 stimulation experiments (Fig. 1) are included to allow easier comparison of both conditions. *B*, percentage of immobile, slow, and fast $\alpha 4\beta 1$ subpopulations. *C* and *D*, the same as *A* and *B* at the 2- to 5-min interval of stimulation. *E* and *F*, the same as in *A* and *B* at the 5- to 10-min interval of stimulation. 29 untreated cells (2382 trajectories), five cells co-stimulated with CXCL12 and VCAM-1 (260 trajectories) during 0–2 min, seven cells co-stimulated with CXCL12 and VCAM-1 (301 trajectories) during 2–5 min, and nine cells (587 trajectories) during 5–10 min over two separate experiments. *ns*, not significant ($p > 0.05$); *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

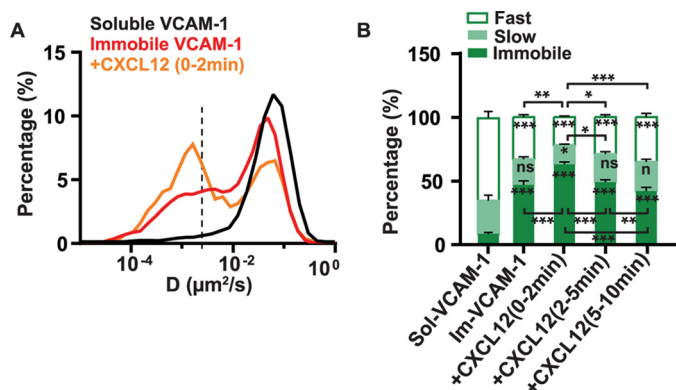


FIGURE 5. Effect of immobilized VCAM-1 and CXCL12 co-stimulation on the lateral mobility of $\alpha 4\beta 1$ in T-cells. *A*, overlay semi-log distributions of D_{1-4} values for soluble VCAM-1 (black line), immobilized VCAM-1 (red line), and immobilized VCAM-1 together with CXCL12 stimulation for 2 min (orange line). Data from the soluble VCAM-1 stimulation experiments (Fig. 3) are included to allow easier comparison of both conditions. *B*, percentage of immobile, slow, and fast $\alpha 4\beta 1$ subpopulations for the different stimulation conditions compared with soluble VCAM-1 (sol-VCAM-1). Im-VCAM-1, immobilized VCAM-1. 18 untreated cells on immobilized VCAM-1 (1920 trajectories), seven cells stimulated with CXCL12 for 0–2 min (759 trajectories), eight cells stimulated with CXCL12 for 2–5 min (865 trajectories), and 13 cells stimulated with CXCL12 for 5–10 min (1588 trajectories) over three separate experiments. ns, not significant ($p > 0.05$); *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

Immobilized VCAM-1 Strongly Arrests the Mobility of $\alpha 4\beta 1$ Integrins, an Effect That Is Potentiated by CXCL12 Stimulation—It has been shown that multimeric and/or immobilized ICAM-1 ligands increase the high-affinity form of $\alpha L\beta 2$ integrins (28) and strongly affect their lateral mobility on the cell surface (28, 17). To investigate the effect of immobilized versus soluble VCAM-1 on the diffusion profile of $\alpha 4\beta 1$, we performed SPT experiments on Molt-4 cells seeded on immobilized VCAM-1. Immobilization of the ligand led to a massive reduction of $\alpha 4\beta 1$ mobility (Fig. 5A) and more than a 4-fold increase in the percentage of immobilized integrins (Fig. 5B) compared with soluble ligand exposure (from 11% for soluble to 47% for immobilized VCAM-1). CXCL12 stimulation further increased $\alpha 4\beta 1$ immobilization to 63% during the first 2 min of exposure (Fig. 5B). Again, the effect of CXCL12 was transient so that, after 2 min of chemokine stimulation, integrin immobilization progressively returned to similar values as those without stimulation. Interestingly, ligand immobilization also reduced the diffusion of mobile integrins to values comparable with those obtained upon CXCL12 and Mn^{2+} treatments (compare supplemental Fig. S4 with Figs. 1G and 2C). Thus, these results indicate that immobilized but not soluble VCAM-1 triggers the activation of $\alpha 4\beta 1$ integrins, which is further potentiated by chemokine stimulation.

The Decrease in $\alpha 4\beta 1$ Lateral Mobility by CXCL12 and CXCL12/VCAM-1 Is Linked to Integrin Activation—The results shown so far indicate that $\alpha 4\beta 1$ immobilization is increased in T cells exposed to different integrin-activating conditions. To further analyze whether this increase is directly linked to $\alpha 4\beta 1$ activation, we followed the time-dependent expression of a $\beta 1$ activation epitope on CXCL12-exposed Molt-4 cells by means of flow cytometry. As the activation reporter we used HUTS-21, an anti- $\beta 1$ mAb that recognizes high-affinity $\beta 1$ integrins (29). Because Molt-4 cells

express predominantly $\alpha 4\beta 1$ integrins (supplemental Fig. S1), HUTS-21 selectively reports on high-affinity $\alpha 4\beta 1$. CXCL12 triggered a rapid induction of high-affinity $\alpha 4\beta 1$ integrin conformations (Fig. 6A), with a strong reactivity to HUTS-21 already detected at 0.5 min of treatment. The induction of these high-affinity $\alpha 4\beta 1$ forms decreased at longer times, although, after 7.5 min, their expression levels were still notably higher compared with untreated cells (Fig. 6A). VCAM-1-Fc alone was also able to induce high-affinity integrins at 0.5 min, albeit to a lower extent compared with CXCL12 (Fig. 6B). Importantly, co-stimulation by CXCL12 and VCAM-1-Fc resulted in a 2.5-fold increase in high-affinity integrins at 0.5 min that remained remarkably above that of untreated conditions even after 7.5 min of co-stimulation (Fig. 6B). Of note, the activation of $\alpha 4\beta 1$ by CXCL12/VCAM-1 remained higher up to 2.5 min than that of single CXCL12 or VCAM-1 at the 0.5-min time point.

Next we assessed talin interaction with the $\beta 1$ subunit as an additional measurement of integrin activation (30). For this purpose, we exposed Molt-4 cells for different times to CXCL12, and, following cell lysis, cell extracts were immunoprecipitated with the TS2/16 anti- $\beta 1$ mAb and subjected to immunoblotting using anti- $\beta 1$ and anti-talin antibodies (12). Similar to the results obtained by flow cytometry using the HUTS-21 mAb, the immunoprecipitation data indicated that $\beta 1$ -talin association was rapid and transient and mainly detected in the first 5 min of exposure to the chemokine, especially in the 0.5- to 1-min window, nicely coinciding (within the temporal accuracy of the experiments) with the reactivity to HUTS-21 (Fig. 6C, center panel). However, under our experimental immunoprecipitation conditions, we were not able to detect a further increase in $\beta 1$ -talin association upon addition of soluble VCAM-1 to CXCL12 compared with incubation with CXCL12 alone (Fig. 6C, right panel). Together, these results further confirm that the reduction in $\alpha 4\beta 1$ mobility upon CXCL12 stimulation observed by SPT directly correlates with the activation of this integrin. Furthermore, as talin connects the β subunits with the actin cytoskeleton, our data strongly suggest that the observed reduction in $\alpha 4\beta 1$ mobility is the result of its increased talin-dependent interaction with the cytoskeleton.

The Nanoscale Spatial Arrangement of $\alpha 4\beta 1$ Integrins Is Unaffected by Integrin Activation—To investigate the effect of integrin-activating conditions on the spatial regulation of $\alpha 4\beta 1$, we performed high-resolution confocal and STED super-resolution microscopy on Molt-4 cells. Cells were adhered onto PLL-coated slides and subjected to stimulation for 2.5 min by CXCL12, VCAM-1-Fc, or a combination of both, followed by rapid fixation and staining using HUTS-21. To estimate changes in the number of high-affinity integrins as a function of the stimulating conditions, we performed extensive confocal imaging of individual cells (Fig. 7A) and analyzed the images in terms of their fluorescence intensity. The largest increase in fluorescent intensity, and therefore the largest enhancement in the number of high-affinity $\alpha 4\beta 1$ molecules, was obtained upon co-stimulation with CXCL12 and VCAM-1-Fc (Fig. 7B). Stimulation with VCAM-1 or CXCL12 alone also led to an increase, albeit more modest, in activated $\alpha 4\beta 1$. Surprisingly, stimulation with VCAM-1-Fc appeared to induce a higher

Spatiotemporal Regulation of CXCL12-activated $\alpha 4\beta 1$ Integrin

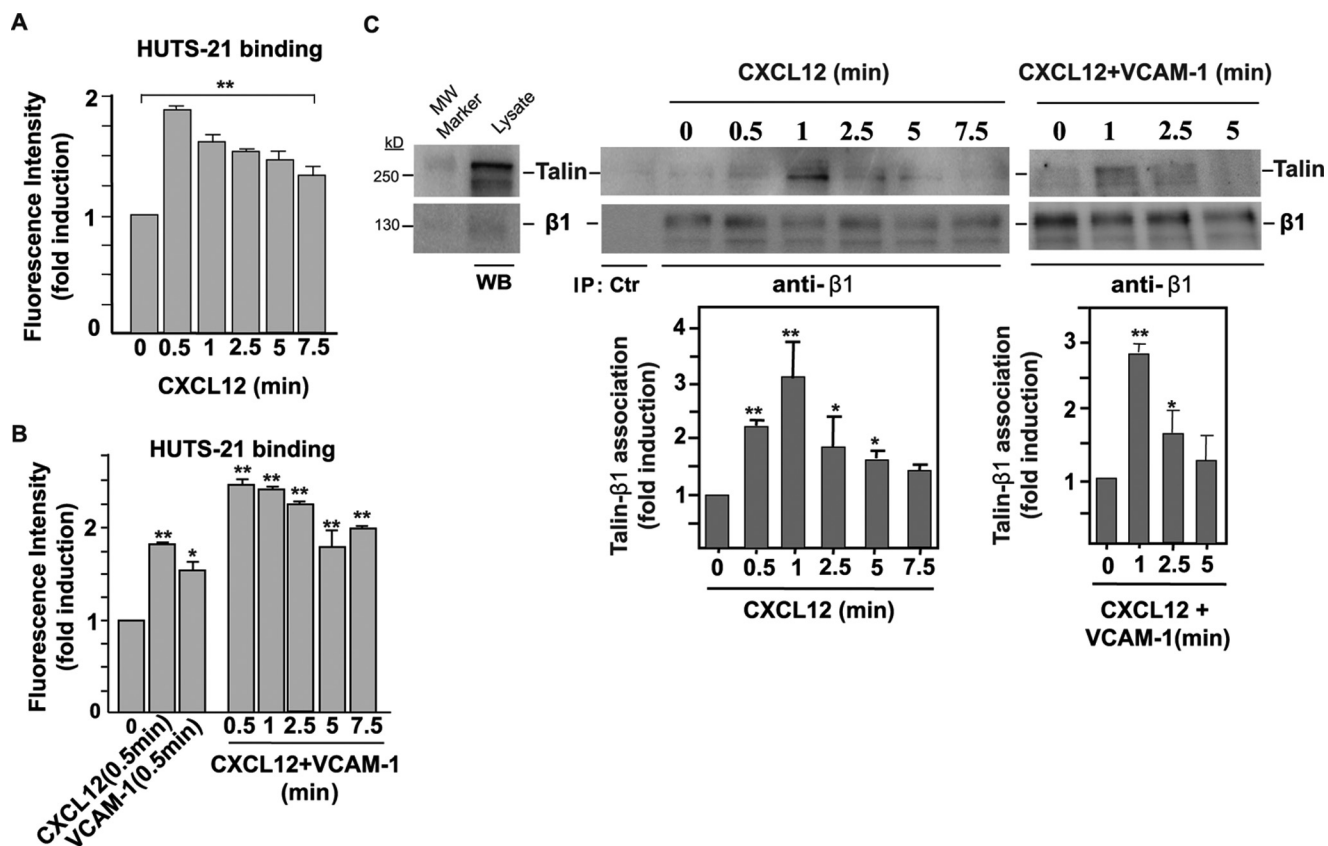


FIGURE 6. **Analyses of $\alpha 4\beta 1$ integrin activation.** *A* and *B*, Molt-4 cells were exposed for the indicated times to CXCL12 or VCAM-1-Fc alone and subjected to flow cytometry with the HUTS-21 anti- $\beta 1$ mAb ($n = 3$). *C*, cells were exposed to CXCL12 alone (*center panel*) or combined with soluble VCAM-1-Fc (*right panel*) for the indicated times and subsequently subjected to immunoprecipitation with the TS2/16 anti- $\beta 1$ mAb followed by immunoblotting with antibodies to the indicated proteins. Also shown are densitometric analyses of gel bands from the immunoprecipitations displaying the mean \pm S.D. of four independent experiments (*bottom panels*). *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$. MW, molecular weight; WB, Western blot; IP, immunoprecipitation.

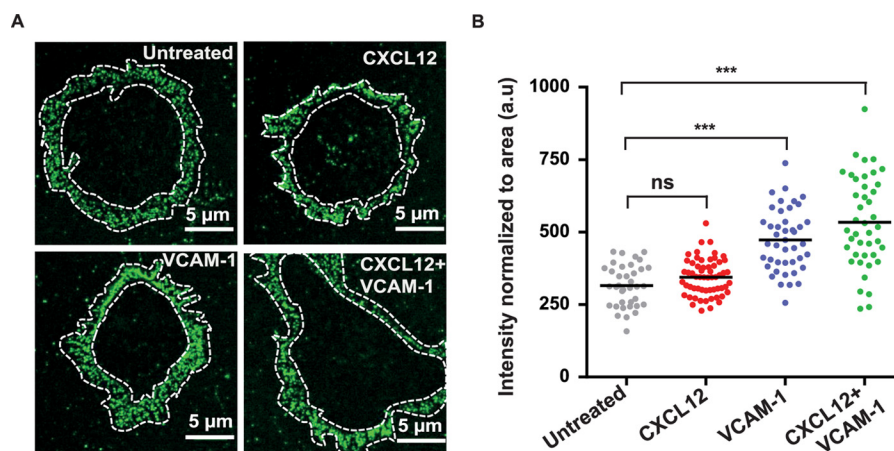


FIGURE 7. *A*, representative confocal images of Molt-4 cells labeled with HUTS-21 mAb for different stimulation conditions. The white dashed lines denote the regions of the cell membrane subjected to fluorescence intensity analysis. *B*, fluorescence intensity of HUTS-21 mAb normalized to the area for different conditions from confocal images of individual cells. Each dot corresponds to an individual cell. Unless indicated, statistical comparisons were done with respect to untreated cells. ns, not significant ($p > 0.05$); ***, $p < 0.001$; a.u., arbitrary units.

number of high-affinity integrins than exposure to CXCL12, in apparent contradiction to the mobility data shown above.

To then map the nanoscale organization of high-affinity integrins under different stimulation conditions, we switched to STED imaging using the HUTS-21 mAb. With an increased spatial resolution of ~ 120 nm (supplemental Fig. S5), individual fluorescent spots became clearly distinguishable from the images (Fig. 8A). Individual spots were identified, and their

intensity was quantified and normalized to the mean spot intensity obtained for untreated cells. Interestingly, very little differences in spot intensities were observed among the different conditions (Fig. 8B). Only co-stimulation of T cells with CXCL12 and VCAM-1-Fc resulted in a slight but significant increase in mean spot intensity, with an average number of high-affinity integrins per spot ~ 1.4 times larger than on unstimulated cells. As the fluorescence intensity in each spot is

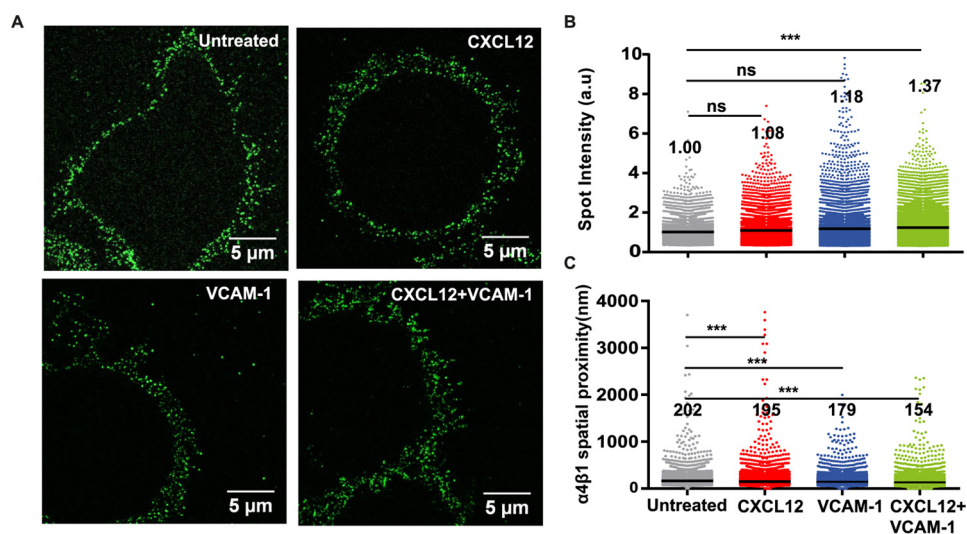


FIGURE 8. **Nanoscale organization of high-affinity $\alpha 4\beta 1$ integrins on T cells.** *A*, representative STED images of Molt-4 cells subjected to the indicated stimuli and stained with the HUTS-21 mAb. *B*, distribution of spot intensity per condition (at least 10 cells/condition). Values indicate the mean of the distribution. *C*, distribution of $\alpha 4\beta 1$ spatial proximity on the different conditions (at least 10 cells/condition). Values indicate the mean of the distribution. *ns*, not significant ($p > 0.05$); *****, $p < 0.001$.

proportional to the number of molecules, these results indicate no major changes in the nanoscale organization of $\alpha 4\beta 1$ for the different stimulation conditions. As additional quantification, we also measured the spatial proximity between adjacent fluorescent spots. Cells stimulated with CXCL12 or VCAM-1-Fc alone showed a modest but significant reduction in their spatial proximity that became more pronounced upon co-stimulation with CXCL12 and VCAM-1-Fc compared with untreated cells (Fig. 8C). Taken together, these results indicate that the nanoscale organization of high-affinity $\alpha 4\beta 1$ remains largely unaltered under the investigated stimulation conditions. Instead, the increased proximity of individual spots upon co-stimulation with CXCL12 and VCAM-1 suggests that newly formed high-affinity $\alpha 4\beta 1$ integrins distribute on the cell membrane as independent units instead of joining pre-established integrin sites to form nano- or microclusters.

Discussion

Using single-molecule dynamic approaches together with superresolution imaging, we explored the lateral mobility and spatial arrangement of individual $\alpha 4\beta 1$ integrins on T cells exposed to different stimuli that promote integrin activation, with a particular emphasis on the role of chemokines. Our data demonstrate that conditions that promote $\alpha 4\beta 1$ activation, such as incubation with the chemokine CXCL12, trigger $\alpha 4\beta 1$ immobilization, most probably through talin recruitment to the integrin. These results are fully in line with recent reports on other integrins, including $\beta 1$ and $\beta 3$ integrins associated with focal adhesions (FAs) and on $\alpha L\beta 2$ on leukocytes, where integrin immobilization correlated with integrin activation (15–17, 31). Also, in analogy with other integrins (17, 32), robust immobilization of $\alpha 4\beta 1$, triggered in our case by CXCL12 stimulation, required the tripartite interaction between $\alpha 4\beta 1$, its ligand VCAM-1, and actin-binding proteins such as talin.

Although CXCL12 was able to trigger rapid immobilization and restrict the diffusion of $\alpha 4\beta 1$ integrins, co-stimulation by

the chemokine together with soluble VCAM-1 resulted in a 5-fold increase in immobile integrins compared with untreated cells. Although SPT approaches revealed that T cell binding to soluble VCAM-1 was capable of inducing immobilization of a small subset of $\alpha 4\beta 1$, its overall effect on integrin mobility was very modest. Surprisingly, confocal and STED imaging using the activation reporter HUTS-21 anti- $\beta 1$ mAb showed the induction of a larger number of high-affinity integrins upon VCAM-1 stimulation compared with CXCL12 stimulation. Together, these results suggest that, although soluble VCAM-1 is able to induce high-affinity $\alpha 4\beta 1$ integrins, this subset of integrins is most likely not bound to the actin cytoskeleton, therefore remaining mobile. As such, $\alpha 4\beta 1$ true activation in the sense of the generation of high-affinity forms and actin cytoskeleton anchorage (through recruitment of talin) mostly occurs upon CXCL12 stimulation, which is then potentiated by co-stimulation with VCAM-1. This effect is consistent with the role of ligands in stabilizing the active form of integrins brought about by chemokine-induced transient stimulation (32).

We also performed SPT experiments of $\alpha 4\beta 1$ in the presence of immobilized VCAM-1. In stark contrast to soluble ligand, immobilized VCAM-1 led to a massive immobilization of the integrin and reduction of its lateral mobility. These results can be rationalized in the context of mechanical forces being exerted between the mobile integrin and the immobilized ligand. As the integrin laterally diffuses on the cell membrane, the fixed ligand resists translation of the integrin, increasing the force and resulting in extension of the β subunit and activation of the integrin. This force-induced activation will then lead to integrin anchorage to the actin cytoskeleton and its immobilization. Addition of chemokines will further contribute to the activation of $\alpha 4\beta 1$ so that the overall result is the generation of a large population of active integrins that anchor to the cytoskeleton via talin and their concomitant immobilization on the cell surface, as observed in our experiments. Such a traction force model has already been proposed for $\alpha L\beta 2$ integrins to

Spatiotemporal Regulation of CXCL12-activated $\alpha 4\beta 1$ Integrin

explain the substantially higher affinity of $\alpha L\beta 2$ for ligand on substrates compared with the solution phase (28).

The overall conclusions of our work are based both on the well accepted role talin plays in the transmission of inside-out signaling induced by chemokines for the generation of active $\alpha 4\beta 1$ and $\alpha L\beta 2$ integrins (11, 12, 33) and on our present results achieved using a combination of different techniques to link integrin activation and integrin immobilization. Thus, our data reveal a direct correlation between rapid and transient $\alpha 4\beta 1$ immobilization with talin association with $\beta 1$ and induction of HUTS-21 epitopes, which constitute clear indications of integrin activation. Therefore, talin anchors the activated integrin to the actin cytoskeleton, favoring receptor immobilization. Interestingly, although the generation by CXCL12 of high-affinity $\alpha 4\beta 1$ integrins and their immobilization persisted for more than 5 min, as detected with the HUTS-21 mAb, association of talin to $\alpha 4\beta 1$ after chemokine stimulation was short-lived. These results might indicate that talin is only involved in bridging the first contacts between $\alpha 4\beta 1$ and the actin cytoskeleton, whereas other proteins, including kindlin-3 (8), could concomitantly or subsequently cooperate with talin to stabilize the active conformation and immobilization of $\alpha 4\beta 1$ over several minutes.

To facilitate T cell adhesion, crawling and diapedesis on and across the endothelium for efficient cell trafficking toward sites of inflammation, integrin-mediated adhesion (mainly involving $\alpha 4\beta 1$ and $\alpha L\beta 2$) to their respective ligands must be brief and highly dynamic, which is contributed by chemokines. This process is phenomenologically different to that of cell adhesion involving FAs, where the formation of FA clusters involving $\beta 1$ and $\beta 3$ integrins is required (31). Our results provide novel insights into the different biophysical properties of integrin adhesion associated with these two processes. Although, in both cases, integrin activation occurs, long-lived and robust integrin immobilization is observed on FAs as well as in the formation of large integrin-enriched microclusters (34–36). In remarkable contrast, our results indicate that physiological conditions that promote integrin activation, such as chemokines, lead to a modest but significant subset of transiently active and immobile $\alpha 4\beta 1$ integrins on T cells, with no significant changes in their nanoscale spatial organization. As a low number of leukocyte integrins is involved in adhesive contacts with their ligands, their interaction is expected to be brief and highly dynamic, allowing effective T cell migration. In summary, our data indicate that fine-tuning and tight regulation of $\alpha 4\beta 1$ immobilization and spatial arrangement on the cell surface are crucial processes that modulate integrin adhesiveness.

Experimental Procedures

Cells, Antibodies, and Reagents—The human Molt-4 T cell line was cultured in RPMI 1640 medium (Lonza, Verviers, Belgium) and 10% fetal bovine serum (Gibco). Control P3X63 and anti- $\beta 1$ TS2/16 mAbs were gifts from Dr. Francisco Sánchez-Madrid (Hospital de la Princesa, Madrid, Spain), and polyclonal anti- $\beta 1A$ antibodies were from Dr. Guido Tarone (Turin University, Italy). The clone 18 anti- $\beta 1$ and HUTS-21 anti- $\beta 1$ mAbs were from BD Biosciences, and the talin clone 8D4 antibody was from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). CXCL12 was

purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN). Streptavidin-coated QD, biotin, and the secondary goat-anti-mouse antibody conjugated to Alexa Fluor 488 were purchased from Invitrogen. PLL and PFA were from Merck (Darmstadt, Germany).

Flow Cytometry—For detection of high-affinity $\beta 1$ by flow cytometry, cells were stimulated for different times with CXCL12 and/or VCAM-1-Fc (R&D Systems) and fixed with 2% PFA before adding the HUTS-21 anti- $\beta 1$ mAb (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 30 min at 4 °C. After washing, cells were incubated with Alexa Fluor 488-conjugated rabbit anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Fluorescence intensity data indicate fold-induction values relative to those from control untreated cells, which were given an arbitrary value of 1.

Immunoprecipitation—We essentially followed the same methodology as described previously (37). Briefly, cell lysate supernatants were incubated with antibodies, followed by coupling to protein G-Sepharose. Proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes that were sequentially incubated with primary antibodies and horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies. Protein visualization was achieved using Immobilon Western chemiluminescent substrate (Millipore, Billerica, MA).

QD-Antibody Conjugation—Streptavidin-coated QD655 was added to an equimolar solution of biotinylated clone 18 anti- $\beta 1$ antibody and a 5-fold excess of free biotin to obtain a 1:1 anti- $\beta 1$ -QD ratio. The mixture was then gently shaken for 2 h at 4 °C, and the concentration was finally adjusted to obtain sub-labeling conditions ($\sim 0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$).

Sample Preparation for SPT—Glass coverslips (Fluorodishes, 35 mm, Menzel Glasses, Braunschweig, Germany) were coated previously with 200 μl of PLL (10 mg/ml) for 30 min at 37 °C. Molt-4 cells were diluted to $8 \times 10^5/\text{ml}$ in RPMI 1640 medium and spread on PLL for 30 min. Subsequently, cells were blocked by incubation for 15 min with 3% BSA, 2% human serum, and 20 mM glycine in PBS. 200 μl of the clone 18 anti- $\beta 1$ -QD655 conjugate was then added to the cells for 3 min at room temperature, and then cells were carefully washed 5–10 times with RPMI 1640 medium. Finally, samples were placed under an SPT microscope, and, after recording individual trajectories for 10 min, the medium was removed, and 200 μl of the different stimuli (either CXCL12 at 200 ng/ml, MnCl_2 at 0.5 mM, soluble VCAM-1-Fc at 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, or combined CXCL12 and VCAM-1-Fc) were added to samples for the following 10 min.

VCAM-1-Fc Immobilization and Sample Preparation for SPT—100 μl of goat-human IgG F (ab) $'_2$ (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Jackson ImmunoResearch Laboratories) were passively absorbed onto the center of 35-mm glass coverslips by incubating for 60 min. The anti-Fc-coated area was then incubated with 100 μl of VCAM-1-Fc (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 60 min. Molt-4 cells were stretched onto immobilized VCAM-1 substrates for 30 min. Labeling of $\alpha 4\beta 1$ integrins for SPT experiments and CXCL12 stimulation was performed as described above.

Sample Preparation for Confocal and STED Imaging—Chambered coverglasses (8 wells, Nunc Lab-TekII, Rochester, NY) were coated with 0.2 ml of PLL (10 mg/ml) for 30 min at 37 °C. Cells were resuspended in RPMI 1640 medium to a final concentration of $8 \times 10^5/\text{ml}$ and attached to the bottom of

glasses by incubation for 30 min. Subsequently, cells were incubated for 2.5 min with the different soluble stimuli using the same concentrations as for the SPT analyses. Immediately thereafter, samples were fixed using 2% PFA and blocked for 1 h at room temperature with 3% BSA, 2% human serum, and 20 mM glycine in PBS. Next, 150 μ l of the HUTS-21 mAb (5 μ g/ml) was added at room temperature for 30 min, followed by secondary labeling with Alexa Fluor 488 goat anti-mouse (5 μ g/ml). Finally, cells were fixed again with 2% PFA.

SPT Setup—Single QD655 tracking was performed using a custom setup built around an inverted microscope (IX70, Olympus) equipped with a 1.49 numerical aperture oil immersion objective (Apon $\times 60$ total internal reflection fluorescence, Olympus). Samples were excited using a 488-nm laser (Sapphire 488–150CW CDRH) in oblique illumination configuration. A dichroic mirror (Semrock, FF500/646-Di01) was used to direct the laser light onto the sample while allowing transmission of the QD fluorescence emission, which was directed onto a CMOS camera (Hamamatsu, ORCA-Flash 4.0) after further long-pass filtering (Semrock, BLP01–635R-25). A custom-made incubator built around the microscope allowed the samples to be maintained at 37 °C with 5% CO₂ during the measurements. During a typical experiment, movies of 1000 frames were recorded every 60 s at a frame rate of 62 Hz.

Single Trajectory Analyses—Analysis of individual trajectories was performed as described previously (16, 17). Briefly, a particle-tracking algorithm was programmed in MatLab to reconstruct the 2D trajectories. MSD curves were generated for each individual trajectory and subsequently fitted from the first to the fourth point to obtain the diffusion coefficient at short time lags (D_{1-4}). The full distribution of D_{1-4} was then plotted as a semi-log histogram containing information from multiple trajectories on different cells. Measurements of the apparent diffusion coefficient of quantum dots on fixed cells were used to estimate the threshold value to define the immobile population. The threshold was determined as the 95th percentile of the diffusion coefficient distribution, which resulted to be $D = 0.0025 \mu\text{m}^2/\text{s}$. The fit of the first four points of the MSD averaged over all the mobile trajectories was then used to calculate the mean diffusion coefficient. In addition, CPD analysis was performed as described earlier to quantify the diffusion of the mobile population of integrins (16, 17, 21). In essence, the CPD method calculates the distribution function for square displacements of individual molecules at different time lags. The best fitting of the square displacements distribution was obtained using a two-component model and allowed us to obtain parameters describing the diffusion and the relative contribution of two different fractions (labeled slow and fast) within the total mobile population of integrins. For both components, MSD plots were generated and anomalous exponents (α) were obtained by fitting the curves with an anomalous diffusion function: $r^2(t) = \Gamma t^\alpha + \Delta^2$, where r^2 is the MSD, Γ is the transport coefficient, and Δ^2 is the square displacement at $t = 0$. The slow and fast diffusion coefficients were calculated by fitting the first four points of the corresponding MSD curve using a linear model: $r^2(t) = 4Dt + \Delta^2$.

Confocal and STED Imaging—Both confocal and STED superresolution images of T cells were collected with a com-

mercial microscope (CW-STED SP-5, Leica Microsystems) equipped with an oil immersion objective (HCX PL APO CS $\times 100.0$, Leica) with 1.4 numerical aperture. Samples were excited with an argon laser at 488 nm set at 25% of its power, and their fluorescence was detected in the range of 500–580 nm. In confocal mode, images (512×512 pixels) were recorded with a scanning speed of 400 Hz and averaged over 3 frames with a line accumulation of 3 times. The STED laser beam intensity was set to 100% of its power (~ 100 – 130 milliwatt), and the images (1024×1024) were acquired with a line accumulation of 6, a frame average of 6, and a scanning speed set at 1000 Hz.

Analysis of STED Images—Analysis of STED images was performed by a modified version of an algorithm described previously (38) that allowed us to automatically detect isolated fluorescent spots. Spots were fitted with a 2D Gaussian profile to determine their centroid position, peak intensity, and full width at half-maximum. Spatial proximity was quantified by determining for each spot the distance at which the nearest neighbor was located.

Statistical Analysis—Results are displayed as mean \pm S.D. calculated from separate experiments. To determine statistical differences between the mean of different datasets, one-way analysis of variance was used, followed by Turkey's multiple comparison test (Figs. 1 and 3–6). For non-Gaussian distributed datasets, statistical differences between the means were calculated using Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's multiple comparison test (Figs. 7B and 8). The resulting p values are indicated as follows: ns, not significant ($p > 0.05$); *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

Author Contributions—A. S. C. and S. I. d. V. performed the experiments and data analysis. S. S. M., K. J. E. B., and C. M. contributed technical assistance to the experiments, data analysis, and interpretation. J. T. and M. F. G. P. designed and supervised the research and interpreted the data. A. S. C., J. T., and M. F. G. P. wrote the manuscript. All authors contributed significantly to the writing of the manuscript and provided useful feedback. All authors reviewed the results and approved the final version of the manuscript.

Acknowledgments—We thank Merche Rivas and Nohemi Arellano-Sánchez for technical support. STED imaging was performed at the super-resolution light nanoscopy (SLN) facility at ICFO.

References

- Hynes, R. O. (2002) Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**, 673–687
- Alon, R., and Feigelson, S. W. (2012) Chemokine-triggered leukocyte arrest: force-regulated bi-directional integrin activation in quantal adhesive contacts. *Curr. Opin. Cell Biol.* **24**, 670–676
- Luster, A. D., Alon, R., and von Andrian, U. H. (2005) Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat. Immunol.* **6**, 1182–1190
- Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M. I., and Nourshargh, S. (2007) Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 678–689
- Laudanna, C., Kim, J. Y., Constantin, G., and Butcher, E. (2002) Rapid leukocyte integrin activation by chemokines. *Immunol. Rev.* **186**, 37–46
- Thelen, M., and Stein, J. V. (2008) How chemokines invite leukocytes to dance. *Nat. Immunol.* **9**, 953–959

Spatiotemporal Regulation of CXCL12-activated $\alpha 4\beta 1$ Integrin

- Hogg, N., Patzak, I., and Willenbrock, F. (2011) The insider's guide to leukocyte integrin signalling and function. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 416–426
- Moser, M., Legate, K. R., Zent, R., and Fässler, R. (2009) The tail of integrins, talin, and kindlins. *Science* **324**, 895–899
- Kim, C., Ye, F., and Ginsberg, M. H. (2011) Regulation of integrin activation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **27**, 321–345
- Calderwood, D. A., Campbell, I. D., and Critchley, D. R. (2013) Talins and kindlins: partners in integrin-mediated adhesion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 503–517
- Manevich, E., Grabovsky, V., Feigelson, S. W., and Alon, R. (2007) Talin 1 and paxillin facilitate distinct steps in rapid VLA-4-mediated adhesion strengthening to vascular cell adhesion molecule 1. *J. Biol. Chem.* **282**, 25338–25348
- García-Bernal, D., Pardo-Cabañas, M., Dios-Esponera, A., Samaniego, R., Hernán-P de la Ossa, D., and Teixidó, J. (2009) Chemokine-induced Zap70 kinase-mediated dissociation of the Vav1-talin complex activates $\alpha 4\beta 1$ integrin for T cell adhesion. *Immunity* **31**, 953–964
- García-Bernal, D., Wright, N., Sotillo-Mallo, E., Nombela-Arrieta, C., Stein, J. V., Bustelo, X. R., and Teixidó, J. (2005) Vav1 and Rac control chemokine-promoted T lymphocyte adhesion mediated by the integrin $\alpha 4\beta 1$. *Mol. Biol. Cell* **16**, 3223–3235
- Constantin, G., Majeed, M., Giagulli, C., Piccio, L., Kim, J. Y., Butcher, E. C., and Laudanna, C. (2000) Chemokines trigger immediate $\beta 2$ integrin affinity and mobility changes: differential regulation and roles in lymphocyte arrest under flow. *Immunity* **13**, 759–769
- Cairo, C. W., Mirchev, R., and Golan, D. E. (2006) Cytoskeletal regulation couples LFA-1 conformational changes to receptor lateral mobility and clustering. *Immunity* **25**, 297–308
- Bakker, G. J., Eich, C., Torreno-Pina, J. A., Diez-Ahedo, R., Perez-Samper, G., van Zanten, T. S., Figdor, C. G., Cambi, A., and Garcia-Parajo, M. F. (2012) Lateral mobility of individual integrin nanoclusters orchestrates the onset for leukocyte adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 4869–4874
- Borgman, K. J., van Zanten, T. S., Manzo, C., Cabezón, R., Cambi, A., Benítez-Ribas, D., and Garcia-Parajo, M. F. (2014) Priming by chemokines restricts lateral mobility of the adhesion receptor LFA-1 and restores adhesion to ICAM-1 nano-aggregates on human mature dendritic cells. *PLoS ONE* **9**, e99589
- Chen, H., Titushkin, I., Stroschio, M., and Cho, M. (2007) Altered membrane dynamics of quantum dot-conjugated integrins during osteogenic differentiation of human bone marrow derived progenitor cells. *Biophys. J.* **92**, 1399–1408
- Mainali, D., and Smith, E. A. (2013) The effect of ligand affinity on integrins' lateral diffusion in cultured cells. *Eur. Biophys. J.* **42**, 281–290
- Manzo, C., and Garcia-Parajo, M. F. (2015) A review of progress in single particle tracking: from methods to biophysical insights. *Rep. Prog. Phys.* **78**, 124601
- Schütz, G. J., Schindler, H., and Schmidt, T. (1997) Single-molecule microscopy on model membranes reveals anomalous diffusion. *Biophys. J.* **73**, 1073–1080
- Springer, T. A. (1994) Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* **76**, 301–314
- Butcher, E. C., and Picker, L. J. (1996) Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* **272**, 60–66
- Grabovsky, V., Feigelson, S., Chen, C., Bleijs, D. A., Peled, A., Cinamon, G., Baleux, F., Arenzana-Seisdedos, F., Lapidot, T., van Kooyk, Y., Lobb, R. R., and Alon, R. (2000) Subsecond induction of $\alpha 4$ integrin clustering by immobilized chemokines stimulates leukocyte tethering and rolling on endothelial vascular cell adhesion molecule 1 under flow conditions. *J. Exp. Med.* **192**, 495–506
- Sanz-Rodríguez, F., Hidalgo, A., and Teixidó, J. (2001) Chemokine stromal cell-derived factor-1 α modulates VLA-4 integrin-mediated multiple myeloma cell adhesion to CS-1/fibronectin and VCAM-1. *Blood* **97**, 346–351
- Dransfield, I., Cabañas, C., Craig, A., and Hogg, N. (1992) Divalent cation regulation of the function of the leukocyte integrin LFA-1. *J. Cell Biol.* **116**, 219–226
- Takagi, J., Petre, B. M., Walz, T., and Springer, T. A. (2002) Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling. *Cell* **110**, 599–611
- Schürpf, T., and Springer, T. A. (2011) Regulation of integrin affinity on cell surfaces. *EMBO J.* **30**, 4712–4727
- Luque, A., Gómez, M., Puzon, W., Takada, Y., Sánchez-Madrid, F., and Cabañas, C. (1996) Activated conformations of very late activation integrins detected by a group of antibodies (HUTS) specific for a novel regulatory region (355–425) of the common $\beta 1$ chain. *J. Biol. Chem.* **271**, 11067–11075
- Tadokoro, S., Shattil, S. J., Eto, K., Tai, V., Liddington, R. C., de Pereda, J. M., Ginsberg, M. H., and Calderwood, D. A. (2003) Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation. *Science* **302**, 103–106
- Rossier, O., Octeau, V., Sibarita, J. B., Leduc, C., Tessier, B., Nair, D., Gatterdam, V., Destaing, O., Albigez-Rizo, C., Tampé, R., Cognet, L., Choquet, D., Lounis, B., and Giannone, G. (2012) Integrins $\beta 1$ and $\beta 3$ exhibit distinct dynamic nanoscale organizations inside focal adhesions. *Nat. Cell Biol.* **14**, 1057–1067
- Shamri, R., Grabovsky, V., Gauguier, J. M., Feigelson, S., Manevich, E., Kolanus, W., Robinson, M. K., Staunton, D. E., von Andrian, U. H., and Alon, R. (2005) Lymphocyte arrest requires instantaneous induction of an extended LFA-1 conformation mediated by endothelium-bound chemokines. *Nat. Immunol.* **6**, 497–506
- Lefort, C. T., Rossaint, J., Moser, M., Petrich, B. G., Zarbock, A., Monkley, S. J., Critchley, D. R., Ginsberg, M. H., Fässler, R., and Ley, K. (2012) Distinct roles for talin-1 and kindlin-3 in LFA-1 extension and affinity regulation. *Blood* **119**, 4275–4282
- Schoenwaelder, S. M., and Burridge, K. (1999) Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 274–286
- Gallant, N. D., Michael, K. E., and García, A. J. (2005) Cell adhesion strengthening: contributions of adhesive area, integrin binding, and focal adhesion assembly. *Mol. Biol. Cell* **16**, 4329–4340
- Wolfenson, H., Lavelin, I., and Geiger, B. (2013) Dynamic regulation of the structure and functions of integrin adhesions. *Dev. Cell* **24**, 447–458
- Ticchioni, M., Charvet, C., Noraz, N., Lamy, L., Steinberg, M., Bernard, A., and Deckert, M. (2002) Signaling through Zap70 is required for CXCL12-mediated T-cell transendothelial migration. *Blood* **99**, 3111–3118
- Manzo, C., van Zanten, T. S., Saha, S., Torreno-Pina, J. A., Mayor, S., and Garcia-Parajo, M. F. (2014) PSF decomposition of nanoscopy images via Bayesian analysis unravels distinct molecular organization of the cell membrane. *Sci. Rep.* **4**, 4354

ANEXO V

Positive and negative regulation by SLP-76/ADAP and Pyk2 of chemokine-stimulated T-lymphocyte adhesion mediated by integrin $\alpha 4\beta 1$

Ana Dios-Esponera^{a,*}, Soledad Isern de Val^{a,*}, Silvia Sevilla-Movilla^a, Rosa García-Verdugo^{a,‡}, David García-Bernal^{a,§}, Nohemí Arellano-Sánchez^a, Carlos Cabañas^b, and Joaquin Teixidó^a

^aCentro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Department of Cellular and Molecular Medicine, 28040 Madrid, Spain;

^bCentro de Biología Molecular (CSIC), Department of Cell Biology and Immunology, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

ABSTRACT Stimulation by chemokines of integrin $\alpha 4\beta 1$ -dependent T-lymphocyte adhesion is a crucial step for lymphocyte trafficking. The adaptor Vav1 is required for chemokine-activated T-cell adhesion mediated by $\alpha 4\beta 1$. Conceivably, proteins associating with Vav1 could potentially modulate this adhesion. Correlating with activation by the chemokine CXCL12 of T-lymphocyte attachment to $\alpha 4\beta 1$ ligands, a transient stimulation in the association of Vav1 with SLP-76, Pyk2, and ADAP was observed. Using T-cells depleted for SLP-76, ADAP, or Pyk2, or expressing Pyk2 kinase-inactive forms, we show that SLP-76 and ADAP stimulate chemokine-activated, $\alpha 4\beta 1$ -mediated adhesion, whereas Pyk2 opposes T-cell attachment. While CXCL12-promoted generation of high-affinity $\alpha 4\beta 1$ is independent of SLP-76, ADAP, and Pyk2, the strength of $\alpha 4\beta 1$ -VCAM-1 interaction and cell spreading on VCAM-1 are targets of regulation by these three proteins. GTPase assays, expression of activated or dominant-negative Rac1, or combined ADAP and Pyk2 silencing indicated that Rac1 activation by CXCL12 is a common mediator response in SLP-76-, ADAP-, and Pyk2-regulated cell adhesion involving $\alpha 4\beta 1$. Our data strongly suggest that chemokine-stimulated associations between Vav1, SLP-76, and ADAP facilitate Rac1 activation and $\alpha 4\beta 1$ -mediated adhesion, whereas Pyk2 opposes this adhesion by limiting Rac1 activation.

Monitoring Editor

Mark H. Ginsberg
University of California,
San Diego

Received: Jul 30, 2014

Revised: Jul 2, 2015

Accepted: Jul 13, 2015

INTRODUCTION

Trafficking of T-lymphocytes from blood circulation to lymphoid tissue and to sites of injury and infection depends on rapid and

This article was published online ahead of print in MBoC in Press (<http://www.molbiolcell.org/cgi/doi/10.1091/mbc.E14-07-1246>) on July 22, 2015.

*These authors equally contributed to this work.

Present addresses: ¹Center for Cancer Research, National Cancer Institute, Laboratory of Cellular and Molecular Biology, Building 37, Room 2066, Bethesda, MD 20892; [‡]Max Planck Institute for Neurobiology, Am Klopferspitz 18, 82152 Martinsried, Germany; [§]Hematology Department, Virgen de la Arrixaca Clinical University Hospital, IMIB, University of Murcia, Ctra. Madrid-Cartagena, s/n 30120 Murcia, Spain.

Address correspondence to: Joaquin Teixidó (joaquin@cib.csic.es).

Abbreviations used: GAP, GTPase-activating protein; GEF, guanine nucleotide exchange factor; GFP, green fluorescent protein; IgG, immunoglobulin G; mAb, monoclonal antibody; PRNK, Pyk2-related nonkinase; PTx, pertussis toxin; siRNA, small interfering RNA; TCR, T-cell receptor.

© 2015 Dios-Esponera, Isern de Val, et al. This article is distributed by The American Society for Cell Biology under license from the author(s). Two months after publication it is available to the public under an Attribution–Noncommercial–Share Alike 3.0 Unported Creative Commons License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0>).

“ASCB®,” “The American Society for Cell Biology®,” and “Molecular Biology of the Cell®” are registered trademarks of The American Society for Cell Biology.

transient activation of $\alpha L\beta 2$ and $\alpha 4\beta 1$ integrin function by chemokines located on the endothelium and inside tissues (Luster et al., 2005; Ley et al., 2007). Following the binding of chemokines to their receptors, an inside-out signaling that impinges on the cytoplasmic domains of integrins is generated (Thelen and Stein, 2008). The final consequence of this signaling is the generation of high-affinity extracellular $\alpha L\beta 2$ - and $\alpha 4\beta 1$ -integrin conformations that are competent for binding to their ligands ICAM-1 and VCAM-1, respectively, which are expressed on lymphoid or inflamed endothelium, and also facilitates $\alpha 4\beta 1$ interaction with the CS-1 region of tissue fibronectin.

While talin binding to cytoplasmic motifs on $\beta 1$ - and $\beta 2$ -integrin subunits represents a common and central event for transmission of inside-out signaling from chemokine receptors to generate active $\alpha 4\beta 1$ and $\alpha L\beta 2$ (Moser et al., 2009b; Hogg et al., 2011; Kim et al., 2011; Calderwood et al., 2013), important differences exist in the molecular pattern of this signaling to either integrin. $\alpha L\beta 2$ -dependent leukocyte adhesion stimulated through inside-out signaling shows a crucial requirement for kindlin 3, another important β subunit-binding protein, and to a lesser extent for $\alpha 4\beta 1$ (Malinin et al., 2009; Manevich-Mendelson et al., 2009; Moser et al., 2009a; Svensson

et al., 2009). Of note, the RAPL-Rap1 and Rho/Rac-phospholipase D pathways are critical for chemokine-stimulated T-cell adhesion involving α L β 2, with no or lesser roles in α 4 β 1-mediated adhesion (Katagiri et al., 2003; Ghandour et al., 2007; Bolomini-Vittori et al., 2009). Instead, the Vav1-Rac1 pathway is required for T-cell adhesion involving α 4 β 1 upon exposure to chemokines (Garcia-Bernal et al., 2005). Vav1 is a multidomain adaptor protein that functions as a guanine nucleotide exchange factor (GEF) predominantly for the Rac1 GTPase (Bustelo, 2000; Turner and Billadeau, 2002; Tybulewicz, 2005). In T-cells, chemokine-induced, ZAP-70-dependent Vav1 tyrosine phosphorylation and Vav1 dissociation from talin represent an important event involved in α 4 β 1 activation and in adhesion strengthening mediated by this integrin (Garcia-Bernal et al., 2009).

Vav1 binds key molecules involved in T-lymphocyte activation, such as SLP-76 and Pyk2 (Tuosto et al., 1996; Wu et al., 1996; Katagiri et al., 2000; Gismondi et al., 2003). SLP-76 is an adaptor molecule that is essential for T-cell activation and actin reorganization following T-cell receptor (TCR) stimulation (Koretzky et al., 2006). On TCR activation, ZAP-70-mediated phosphorylation of SLP-76 on N-terminal tyrosine residues allows its binding to the SH2 domain of Vav1 (Tuosto et al., 1996; Wu et al., 1996; Raab et al., 1997), whereas the C-terminal SH2 domain of SLP-76 interacts with several tyrosines on ADAP (da Silva et al., 1997; Musci et al., 1997; Geng et al., 1999; Boerth et al., 2000), a key molecule that also regulates T-cell activation (Griffiths and Penninger, 2002).

Pyk2 is a non receptor tyrosine kinase that is homologous to FAK (Avraham et al., 1995; Lev et al., 1995; Sasaki et al., 1995) and is activated following TCR stimulation and cell exposure to chemoattractants (Dikic et al., 1996; Davis et al., 1997; Ganju et al., 1997; Qian et al., 1997). Early data showed that Pyk2 is capable of associating with Vav1 in T and NK cells (Katagiri et al., 2000; Gismondi et al., 2003; Gao and Blystone, 2009). There are three Pyk2 isoforms of 110 kDa, 105 kDa, and a third species called PRNK (Pyk2-related nonkinase) that only contains 238 amino acids from the C-terminus and lacks the catalytic and N-terminal regions (Xiong et al., 1998; Ivankovic-Dikic et al., 2000). A Tyr-402 residue is a target of Pyk2 autophosphorylation, which in turns recruits and activates Src kinases, leading to Src-dependent phosphorylation of several tyrosine residues on Pyk2 (Dikic et al., 1996; Li et al., 1999; Avraham et al., 2000).

The role of SLP-76, ADAP, and Pyk2 in integrin-mediated T-lymphocyte adhesion has been mostly studied in TCR-activated cells. Thus SLP-76 mediates α L β 2-dependent T-cell adhesion in response to TCR stimulation (Baker et al., 2009; Horn et al., 2009). In addition, it has been demonstrated that ADAP is required for TCR-stimulated cell adhesion mediated by β 1 and β 2 integrins (Griffiths et al., 2001; Peterson et al., 2001), a process regulated by an ADAP/SKAP-55 signaling module (Wang et al., 2003, 2007; Kliche et al., 2006). As for Pyk2, its tyrosine phosphorylation as a consequence of integrin-dependent outside-in signaling was earlier demonstrated (Li et al., 1996; van Seventer et al., 1998; Zheng et al., 1998), and it was shown that Pyk2 regulates TCR-stimulated, LFA-1-dependent CD8⁺ cell adhesion (Beinke et al., 2010).

Little is known on the potential involvement of SLP-76 and Pyk2, as well as of ADAP, in chemokine-stimulated T-cell adhesion dependent on integrins. For instance, SLP-76 is required for optimal T-lymphocyte arrest on ICAM-1 under flow conditions (Lee et al., 2012). In addition, it has been recently shown that CCR7-mediated α L β 2 functions in T-cells are regulated by two independent ADAP/SKAP55 modules (Kliche et al., 2012). The integrin α 4 β 1 is especially involved in chemokine-stimulated T-lymphocyte trafficking to sites of inflammation, with lesser roles in cell migration to lymphoid

tissues (Berlin-Rufenach et al., 1999), thus highlighting the structural and functional differences between α 4 β 1 and α L β 2. The role of SLP-76, ADAP, and Pyk2 in chemokine-activated T-cell adhesion mediated by α 4 β 1 has not yet been addressed. In the present work, we have studied the potential involvement of these signaling molecules in T-lymphocyte adhesion dependent on α 4 β 1.

RESULTS

Role of SLP-76, ADAP, and Pyk2 on chemokine-activated T-cell adhesion mediated by α 4 β 1

Coimmunoprecipitation analyses using anti-SLP-76 monoclonal antibody (mAb) revealed that CXCL12 stimulates a transient increase in SLP-76 association with Vav1 and ADAP (Figure 1A). In agreement with previous work (Fischer et al., 1998), talin was found in anti-SLP-76 immunoprecipitates, and CXCL12 also up-regulated this association. No β 1-integrin subunit was found in anti-SLP-76 immunoprecipitates (unpublished data). Cell fractionation experiments showed that SLP-76 is mainly found on the membrane-associated fraction, and its localization was not altered by CXCL12 (Supplemental Figure S1A). Instead, ADAP mostly displayed a cytosolic localization in nonstimulated cells, but it was rapidly and transiently recruited to the membrane following incubation with CXCL12, coincident with the stimulation by this chemokine of SLP-76-ADAP association.

To study potential connections between SLP-76 and ADAP in chemokine-activated T-cell adhesion involving α 4 β 1, we knocked them down using RNA interference in Molt-4 and peripheral blood T-lymphocytes (PBL-T). SLP-76 was depleted with a pool of SLP-76 small interfering RNA (siRNA; see *Materials and Methods*), whereas ADAP was found to be more efficiently silenced by ADAP-2 than ADAP-1 siRNA (Figure 1B), and we therefore used ADAP-2 siRNA to carry out the subsequent functional assays. Control experiments indicated that SLP-76 or ADAP depletion did not affect cell viability or the expression of CXCR4, α 4 or β 1 (unpublished data). ADAP knocking down did not alter the coprecipitation between Vav1 and SLP-76 in nonstimulated cells ($t = 0$), but their increased association in CXCL12-incubated cells was delayed and of smaller magnitude (Figure 1C), suggesting that a critical level of ADAP expression and/or its localization was needed for enhanced Vav1-SLP-76 association.

Previous data showed that the kinase Pyk2 binds to the SH3 domain of Vav1 in Jurkat T-cells (Katagiri et al., 2000). Likewise, Vav1 associated with Pyk2 in Molt-4 cells, and CXCL12 triggered a transient increase in Vav1-Pyk2 binding (Figure 1D, top, and Supplemental Figure S1B), in line with previous findings (Okabe et al., 2005). In addition, low amounts of SLP-76 were also detected in anti-Pyk2 immunoprecipitates. ADAP was minimally detected only in Pyk2 immunoprecipitates from cells not exposed to CXCL12 (unpublished data). Furthermore, we found that Vav1-Pyk2 coimmunoprecipitation was independent of SLP-76 or ADAP, as this association was similarly detected in control, SLP-76 (Supplemental Figure S1C, left), or ADAP siRNA transfectants (unpublished data). Interestingly, antibodies to talin, an additional Vav1 binding partner (Fischer et al., 1998; Garcia-Bernal et al., 2009), coprecipitated Pyk2 in addition to Vav1 in Molt-4 and PBL-T (Figure 1D, bottom). Supporting the specificity of talin-Pyk2 assembly, talin-Pyk2 coprecipitation was diminished in Pyk2 knockdown cells (Figure 1, E and F). Whether Pyk2 directly binds to talin, as in FAK-talin interaction (Mitra et al., 2005), or indirectly through its association with Vav1 has not been addressed in the present study. In addition, Pyk2 knocking down did not significantly alter Vav1-talin association or CXCL12-promoted Vav1-talin dissociation (Figure 1G), an event contributing to the initial steps of α 4 β 1-mediated T-cell adhesion (Garcia-Bernal et al., 2009). Moreover, Vav1 and SLP-76 (Supplemental Figure S1C, right)

and SLP-76-talin (unpublished data) interactions were not altered following Pyk2 silencing. We also observed that Pyk2-depleted cells had similar Erk1/2 MAP kinase activation at early time points following stimulation with CXCL12, but this activation was defective at the longest times tested (Supplemental Figure S1D). Instead, CXCL12-promoted Akt stimulation was not altered in Pyk2-knockdown transfectants.

We next tested SLP-76-, ADAP-, and Pyk2-depleted T-cells in $\alpha 4\beta 1$ -mediated static cell adhesion assays. As chemokine-up-regulated T-cell attachment is rapid and transient (Grabovsky *et al.*, 2000), the adhesion assays to $\alpha 4\beta 1$ ligands coimmobilized with chemokines were performed using short incubation times (2 min) upon a brief cell centrifugation (15 s) to place cells immediately in contact with ligands. Under these conditions, we observed that SLP-76-depleted Molt-4 and PBL-T had modest reductions in adhesion to FN-H89 (CS-1/FN), whereas their attachment to VCAM-1 displayed small but nonsignificant decreases compared with control siRNA transfectants (Figure 2A). Similarly, SLP-76-deficient J14 cells displayed chemokine-promoted adhesion to VCAM-1 comparable with parental Jurkat cells, whereas activated adhesiveness of Lck-deficient JCaM1.6 cells was fully abrogated (Figure 2B), consistent with previous data (Feigelson *et al.*, 2001). ADAP depletion generally affected to a higher degree the stimulation of $\alpha 4\beta 1$ -dependent T-cell attachment compared with SLP-76 knocking down (Figure 2A). In addition, ADAP-depleted Molt-4 cells exhibited a substantial inhibition of CXCL12-triggered, $\alpha 4\beta 1$ -mediated migration across tumor necrosis factor α -treated HUVEC monolayers under static conditions (Supplemental Figure S2), whereas transfectants knocked down for SLP-76 (Supplemental Figure S2) and J14 cells (unpublished data) displayed partial impairments in migration.

Of note, Pyk2 knocking down resulted in significant increases in chemokine-triggered T-cell adhesion to both FN-H89 and VCAM-1 relative to control siRNA transfectants (Figure 2A). Instead, we were unable to detect alterations in attachment to ICAM-1 with CXCL12-incubated, Pyk2-silenced cells (Figure 2C), in line with previous results using Pyk2^{-/-} T-cells exposed to standard doses of anti-CD3 antibodies (Beinke *et al.*, 2010). Moreover, overexpression of PRNK, a Pyk2 C-terminal region isoform that lacks the kinase domain (Xiong *et al.*, 1998) and inhibits the endogenous Pyk2 kinase activity, led to up-regulation of $\alpha 4\beta 1$ -dependent attachment of nonstimulated T-cells, which achieved a further enhancement in the presence of CXCL12 (Figure 2D). In support of an involvement of Pyk2 kinase activity in the regulation of $\alpha 4\beta 1$ -mediated T-cell adhesion, we found that the expression of the Pyk2-K457A kinase-inactive mutant (Katagiri *et al.*, 2000) resulted in a remarkable increase in cell attachment to VCAM-1 (Figure 2E). Instead, mutation at the Tyr-402 Pyk2 autophosphorylation site (Pyk2-Y402F) did not alter this adhesion. We were unable to use transfectants overexpressing wild-type Pyk2 in the adhesion assays, as they displayed a high degree of cell death (unpublished data), consistent with previously reported data (Xiong and Parsons, 1997).

Next we carried out adhesion assays under flow conditions using SLP-76-, ADAP-, or Pyk2-depleted T-cells, measuring the cells that rapidly (< 20 s) and stably adhere under a shear stress of 1 dyne/cm² to VCAM-1 coimmobilized with CXCL12. Results revealed that Molt-4 and PBL-T knocked down for SLP-76 or ADAP have a decrease (40–75%) in stable cell arrest on VCAM-1/CXCL12 compared with control siRNA transfectants (Figure 3A). Confirming the involvement of SLP-76, J14 cells also displayed a significant reduction in cell arrest relative to parental Jurkat cells (Figure 3A). Therefore the contribution of SLP-76 in chemokine-stimulated

lymphocyte adhesion to VCAM-1 is especially relevant under shear stress but hardly seen in static conditions, similar to what has been reported in CXCL12-up-regulated, $\alpha L\beta 2$ -dependent adhesion to ICAM-1 of J14 and SLP-76-depleted cells (Horn *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2012). Contrary to SLP-76 and ADAP silencing, Pyk2 knockdown transfectants showed stronger cell arrest than control siRNA transfectants (Figure 3A). Control experiments indicated that adhesion was abolished by pretreating cells with pertussis toxin (PTx; unpublished data).

Generation of $\alpha 4\beta 1$ high-affinity conformations upon CXCL12 stimulation is independent of SLP-76, ADAP, or Pyk2 activities

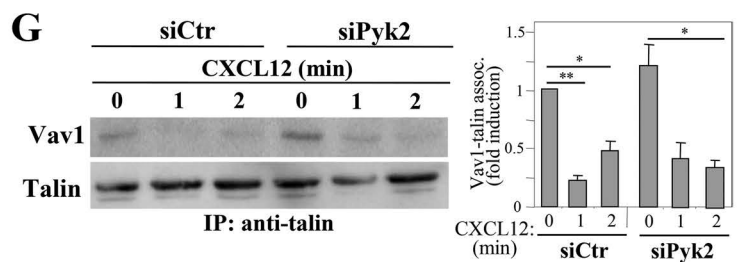
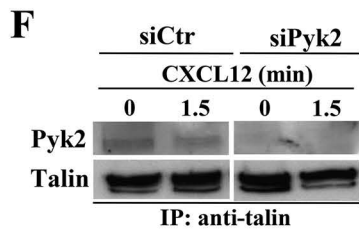
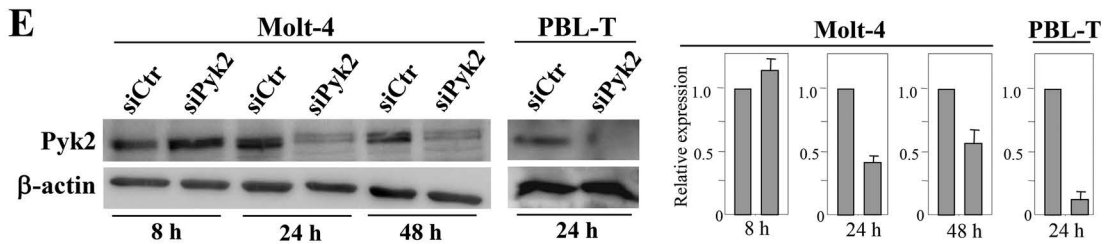
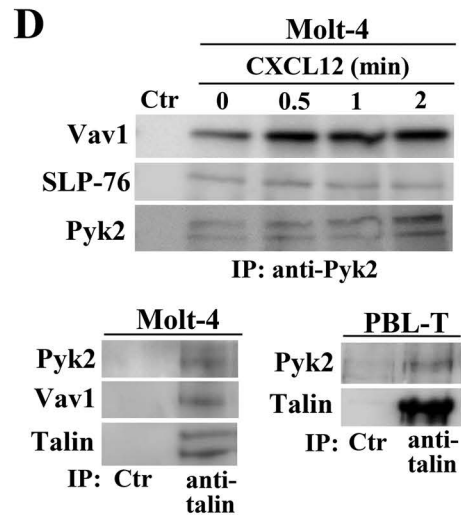
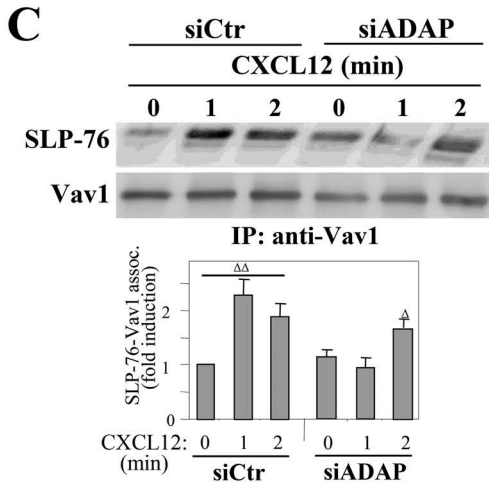
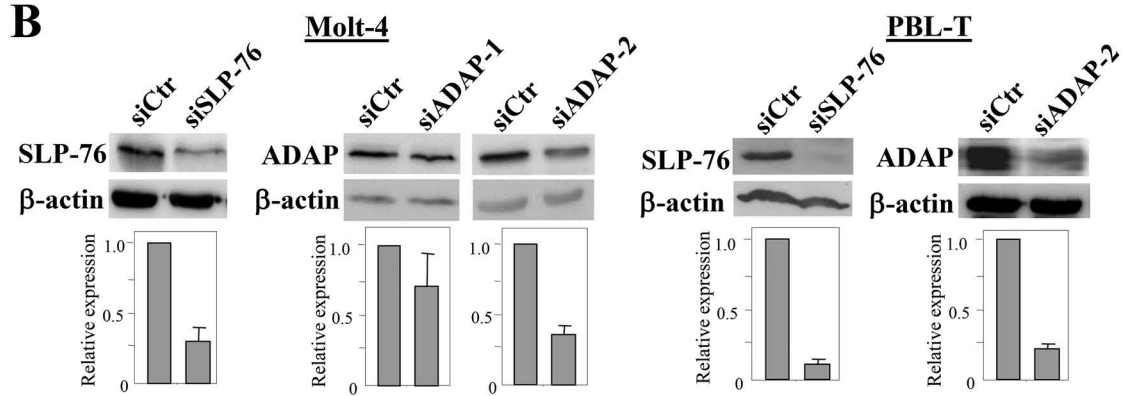
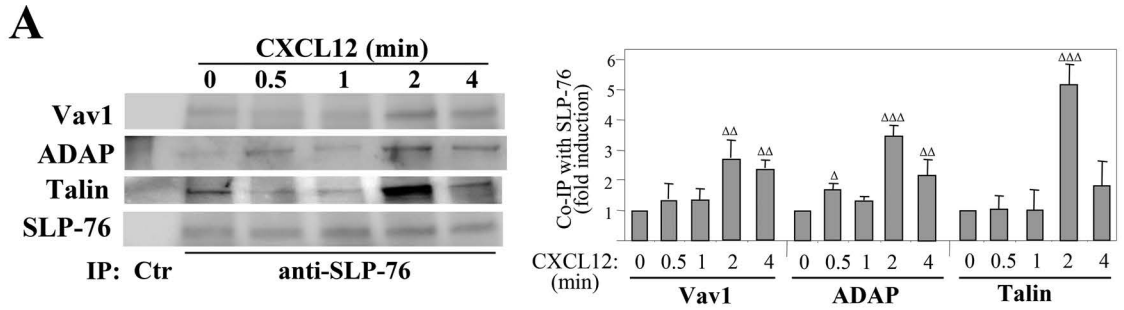
Changes in adhesion to VCAM-1 following SLP-76, ADAP, or Pyk2 depletion could arise from altered acquisition of integrin high-affinity conformations. We used HUTS-21, a reporter mAb that recognizes a $\beta 1$ -integrin activation epitope, to analyze whether knockdown of these proteins affects the affinity of $\alpha 4\beta 1$. Chemokine-incubated SLP-76-, ADAP-, or Pyk2-depleted cells, as well as PRNK transfectants, showed no gross alterations in HUTS-21 binding (Figure 3, B and C). Control experiments revealed that all transfectants retained similar degrees of HUTS-21 mAb binding upon exposure to Mn²⁺ (Figure 3, B and C), a positive control for integrin-affinity regulation. These results indicate that chemokine-stimulated high-affinity $\alpha 4\beta 1$ does not require SLP-76, ADAP, or Pyk2 functions.

To further examine a potential involvement of these three proteins in early steps of CXCL12-stimulated, $\alpha 4\beta 1$ -dependent cell adhesion, we used VCAM-1-Fc in soluble binding assays to determine the efficiency of $\alpha 4\beta 1$ -VCAM-1 interaction without the subsequent cell spreading step. Using short-incubation conditions to obtain a two- to threefold induction in VCAM-1-Fc binding (20-s stimulation with CXCL12 followed by 75-s incubation with VCAM-1-Fc; Garcia-Bernal *et al.*, 2005), we observed similar VCAM-1-Fc binding to SLP-76-, ADAP-, or Pyk2-depleted cells relative to control siRNA transfectants (Figure 3D, left), which was inhibited by 80% by PTx (unpublished data). When we tested longer incubations with VCAM-1-Fc, we observed that while control and ADAP siRNA transfectants (Figure 3D, right) and SLP-76 knockdown cells (unpublished data) have maximal interaction with VCAM-1 between 2 and 3 min, after which binding decreases, Pyk2-depleted cells displayed a consistent sustainment of $\alpha 4\beta 1$ -VCAM-1-Fc interaction that was inhibited by PTx. All transfectants displayed comparable VCAM-1-Fc binding upon exposure to Mn²⁺ (unpublished data). These results suggest that Pyk2 silencing allows a G α_i -dependent sustained signaling to regulate $\alpha 4\beta 1$ avidity, which likely contributes to maintaining $\alpha 4\beta 1$ -VCAM-1 interaction.

Role of SLP-76, ADAP, and Pyk2 in adhesion strengthening and spreading mediated by $\alpha 4\beta 1$

To analyze the $\alpha 4\beta 1$ -dependent adhesion strength of transfectants depleted for SLP-76, ADAP, or Pyk2, we subjected cells that had been attached to VCAM-1/CXCL12 at 1 dyne/cm² to detachment at sequential increases of shear stress. ADAP- and SLP-76-depleted PBL-T and Molt-4 transfectants, as well as J14 cells, were found to develop lower resistance to detachment at high shear stress than control siRNA transfectants, although ADAP silencing consistently led to higher detachment rates than SLP-76 knockdown (Figure 4, A and B). Instead, Pyk2-depleted T-cells exhibited higher resistance to detachment than control siRNA transfectants (Figure 4A).

In the adhesion process, cells undergo spreading after the strengthening of the adhesion. Both SLP-76- and ADAP-knockdown



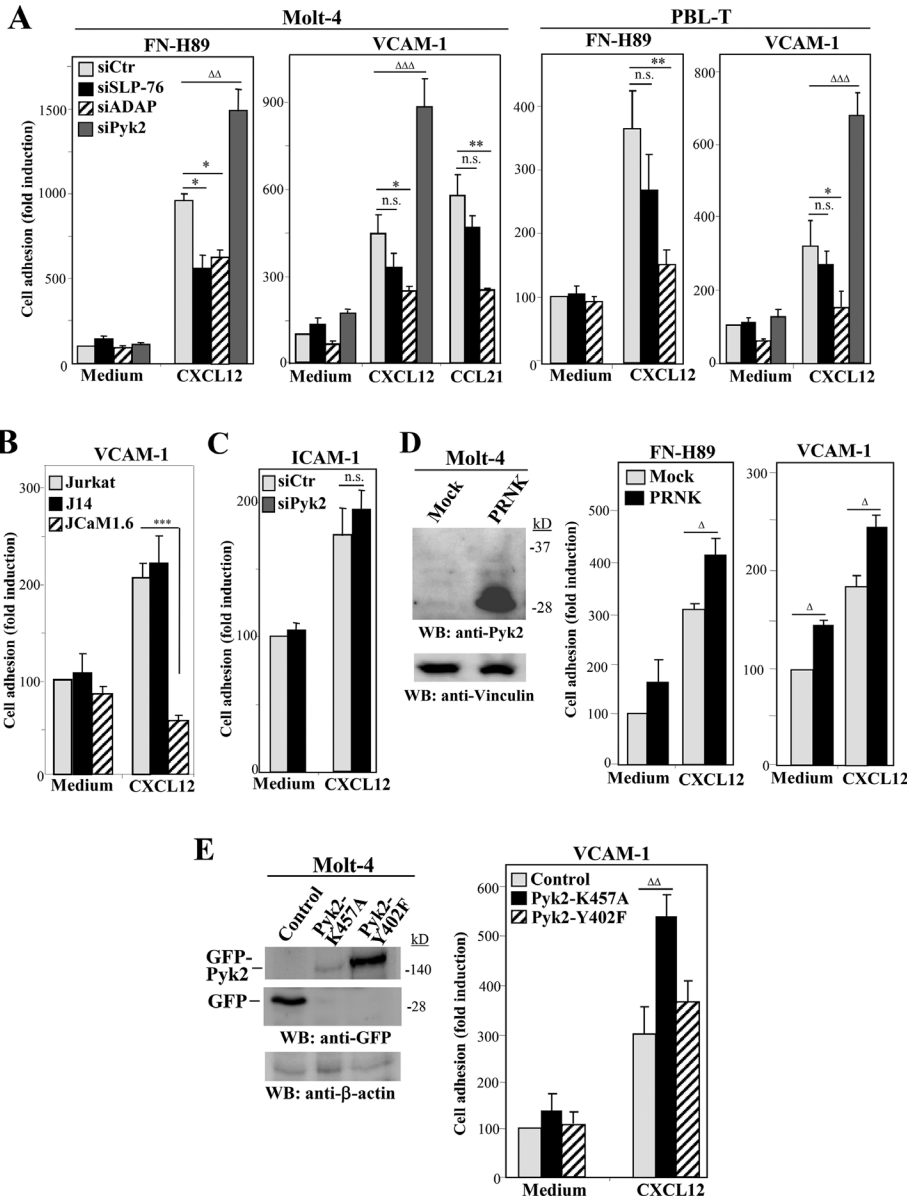


FIGURE 2: Chemokine-stimulated static adhesion of SLP-76, ADAP, or Pyk2 transfectants to $\alpha 4\beta 1$ ligands. (A) Control, SLP-76-, ADAP-, or Pyk2-knockdown Molt-4 or PBL-T transfectants were subjected to adhesion assays to FN-H89 or VCAM-1 in the absence (Medium) or presence of coimmobilized CXCL12 or CCL21 ($n = 3-5$). (B) Parental Jurkat, J14, and JCaM1.6 cells were tested in adhesion assays to VCAM-1 as in A ($n = 2$). (C) Molt-4 cells were transfected with control or Pyk2 siRNA and transfectants tested in adhesion assays to ICAM-1 coimmobilized

FIGURE 1: Chemokine-stimulated associations between Vav1, SLP-76, ADAP, and Pyk2. (A) Left, Molt-4 T-cells incubated for the indicated times with CXCL12 were subjected to immunoprecipitation with anti-SLP-76 followed by immunoblotting with antibodies to the indicated proteins. Right, bars represent densitometric quantification of gel bands showing the mean \pm SD of six independent experiments ($\Delta\Delta\Delta$, $p < 0.001$; $\Delta\Delta$, $p < 0.01$; Δ , $p < 0.05$). (B) Top, cells were transfected with SLP-76, ADAP, or control siRNA, and expression of SLP-76 and ADAP was analyzed by immunoblotting. Control loading is shown by blotting with anti- β -actin antibodies. Bottom, densitometric quantification of gel bands showing the mean \pm SD of four (Molt-4) or three (PBL-T) independent experiments. (C) CXCL12-incubated control or ADAP siRNA Molt-4 transfectants were assayed by immunoprecipitation with anti-Vav1 antibodies, followed by immunoblotting with antibodies to the proteins shown ($\Delta\Delta$, $p < 0.01$; Δ , $p < 0.05$). (D) Cells were incubated in the absence or presence of CXCL12, and subsequently subjected to immunoprecipitation and Western blotting. (E) Left, Cells were transfected with Pyk2 or control siRNA, and transfectants were assayed by Western blotting at the indicated times. Right, densitometric analyses of gel bands showing the mean \pm SD of three independent experiments. (F and G) Control or Pyk2 siRNA transfectants were subjected to immunoprecipitation with anti-talin antibodies, followed by immunoblotting with antibodies to the shown proteins. Talin-Vav1 coprecipitation was significantly diminished (**, $p < 0.001$; *, $p < 0.05$; $n = 4$).

Molt-4 and PBL-T transfectants developed a time-dependent progressive reduction in the spreading on VCAM-1/CXCL12 compared with control counterparts (Figure 4C, left and middle). On the contrary, Pyk2 knockdown and PRNK transfectants displayed higher spreading than control cells (Figure 4C). These data indicate that ADAP and Pyk2 regulate the chemokine-stimulated T-cell adhesion strengthening and spreading steps mediated by $\alpha 4\beta 1$, whereas SLP-76 mainly contributes to cell spreading, with lesser roles in adhesion strengthening.

Rac1 involvement in SLP-76, ADAP, and Pyk2 regulation of CXCL12-activated T-cell adhesion dependent on $\alpha 4\beta 1$

The strength of $\alpha 4\beta 1$ -mediated adhesion and the subsequent spreading process in chemokine-stimulated T-cells depends on the activation of the GTPase Rac1 (Garcia-Bernal et al., 2005). Compared with control cells, knocking down SLP-76 led to a less efficient Rac1 activation in Molt-4 cells in response to CXCL12, which was rapidly lost at the longest incubation time tested (Figure 5A, top). Moreover, CXCL12-exposed J14 cells displayed no stimulation of Rac activation relative to parental Jurkat cells (Figure 5A, bottom). In addition, ADAP-depleted transfectants displayed a blockade

with or without CXCL12 ($n = 3$). (D) Cells were transfected with empty (Mock) or PRNK vectors, and transfectants were tested by Western blotting for PRNK expression (left) or in adhesion assays (middle and right) ($n = 4$). (E) Cells were transfected with control GFP vector or with the indicated GFP-fused Pyk2 mutants, and transfectants were subjected to immunoblotting or to adhesion assays ($n = 4$). Adhesions were significantly inhibited (***, $p < 0.001$; **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$) or significantly stimulated ($\Delta\Delta\Delta$, $p < 0.001$; $\Delta\Delta$, $p < 0.01$; Δ , $p < 0.05$) (n.s., nonsignificant).

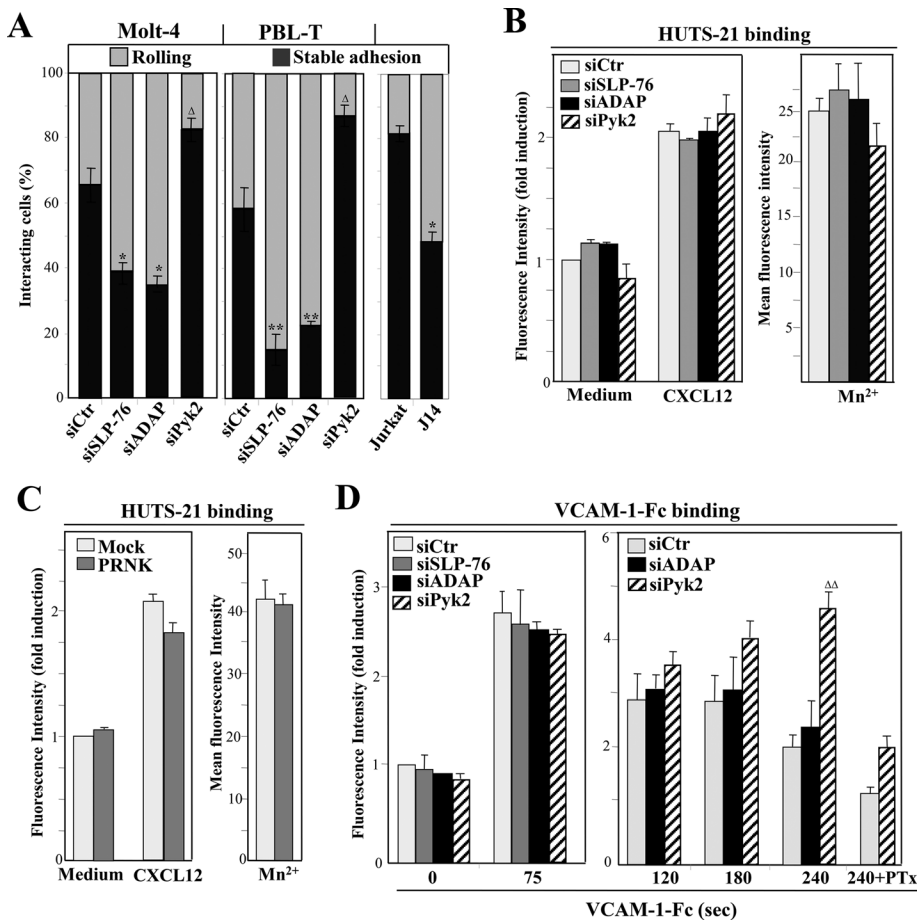


FIGURE 3: Flow-chamber adhesion assays and determination of high-affinity $\alpha 4\beta 1$ expression in SLP-76-, ADAP-, or Pyk2-depleted T-cells. (A) Control, SLP-76, ADAP, or Pyk2 siRNA transfectants or Jurkat or J14 cells were perfused in flow chambers coated with VCAM-1 coimmobilized with CXCL12 and analyzed for rolling and stable cell arrest ($n = 3-4$). Data are presented as mean \pm SD of cell percentages from the total cell population. Adhesions were significantly inhibited or stimulated in comparison with those of control siRNA transfectants or parental Jurkat cells, * $p < 0.05$ or $\Delta p < 0.05$, respectively. (B and C) The indicated siRNA Molt-4 transfectants or cells transfected with PRNK or empty vector were tested by flow cytometry for HUTS-21 mAb binding after stimulation with CXCL12 or Mn^{2+} . (D) Following exposure to CXCL12 for 20 s, transfectants were analyzed by flow cytometry for VCAM-1-Fc binding after the indicated times. PTx denotes cells preincubated with pertussis toxin.

of CXCL12-stimulated Rac activation (Figure 5B). Furthermore, inhibition of Rac activation in SLP-76- and ADAP-knockdown transfectants was associated with impaired stimulation by CXCL12 of F-actin polymerization (Supplemental Figure S3A). In contrast, Pyk2 silencing led to a more sustained Rac1 activation and F-actin polymerization than control transfectants (Figure 5C and Supplemental Figure S3B).

Chemokine-stimulated Rac1 activation in T-cells was previously shown to involve Vav1 tyrosine phosphorylation (Garcia-Bernal et al., 2005). In SLP-76-silenced cells, impaired Rac1 activation was associated with a lower degree and less maintained chemokine-promoted Vav1 tyrosine phosphorylation compared with control siRNA transfectants, whereas no gross alterations in Vav1 phosphorylation were detected in ADAP-depleted cells (Figure 5D), similar to the unaltered Vav1 phosphorylation in ADAP knockout mice (Reynolds et al., 2002). Furthermore, the CXCL12-triggered enhancement in Rac1 activation seen in Pyk2-silenced transfectants did not correlate with higher Vav1 tyrosine phosphorylation than control counterparts, and this phosphorylation generally displayed lower intensity compared with control transfectants (Figure 5D). Similar to Molt-4

cells, SLP-76 knockdown in PBL-T resulted in inefficient Vav1 tyrosine phosphorylation in response to CXCL12, whereas phosphorylation was not affected in ADAP-depleted cells (Figure 5E). Again, Pyk2-silenced PBL-T exhibited CXCL12-stimulated Vav1 tyrosine phosphorylation but of lower magnitude and less maintained than control siRNA transfectants (Figure 5E).

Next we tested the relevance of the deficient Rac activation shown by SLP-76- and ADAP-deficient T-cells on their impaired adhesion. For this, we transfected green fluorescent protein (GFP)-fused, constitutively active forms of Rac (GFP-Rac V12) in J14 and parental Jurkat cells or expressed GFP-Rac V12 together with ADAP siRNA, and then we tested the transfectants in adhesion assays to VCAM-1 coimmobilized with CXCL12. Flow-chamber adhesion assays revealed that the reduction in stable adhesion shown by J14-GFP cells relative to parental Jurkat-GFP was significantly rescued upon expression of GFP-Rac V12 (Figure 6A). Likewise, GFP-Rac V12 expression reversed the inhibitory effects of ADAP siRNA transfection on the stimulation of cell adhesion to VCAM-1/CXCL12 (Figure 6B). Moreover, the up-regulated adhesion to VCAM-1/CXCL12 shown by Pyk2-knockdown Molt-4 and PBL-T transfectants was partially reversed when dominant-negative, GFP-fused Rac1 (GFP-Rac N17) was transfected together with Pyk2 siRNA (Figure 6, C and D). These results strongly suggest that altered Rac1 activation in SLP-76-, ADAP-, or Pyk2-knockdown T-cells represents an important mechanism mediating their changes in chemokine-stimulated, $\alpha 4\beta 1$ -dependent cell adhesion.

As the adhesion data indicate that T-cell attachment involving $\alpha 4\beta 1$ is especially altered upon knocking down ADAP or Pyk2, we next analyzed the effect of their combined depletion on cell adhesion to VCAM-1. Results revealed that the inefficient stimulation of adhesion displayed by ADAP-silenced cells could be rescued by Pyk2 siRNA cotransfection, although the double-knockdown transfectants did not reach the adhesion values exhibited by cells transfected with Pyk2 siRNA alone (Figure 7A). In addition, the up-regulated cell attachment following Pyk2 silencing was not detected when both SLP-76 and Pyk2 were knocked down (Figure 7B), suggesting that cooperative responses between ADAP and SLP-76 exist during their positive regulation of $\alpha 4\beta 1$ -dependent T-cell adhesion. Similar to ADAP-Pyk2 siRNA cotransfection, PRNK transfection together with ADAP siRNA led to a recovery of adhesion to VCAM-1/CXCL12 (Figure 7C). Notably, the rescue in adhesion shown by cells knocked down for both ADAP and Pyk2 correlated with longer, sustained Rac1 activation in these transfectants (Figure 7D). The small decrease in activation of Rac at early time points might reflect initial inhibition due to ADAP depletion that is later recovered by siPyk2 silencing. These results suggest that the stimulatory actions of ADAP and the inhibitory activity of Pyk2 during CXCL12-activated adhesion mediated by $\alpha 4\beta 1$ are connected through Rac1.

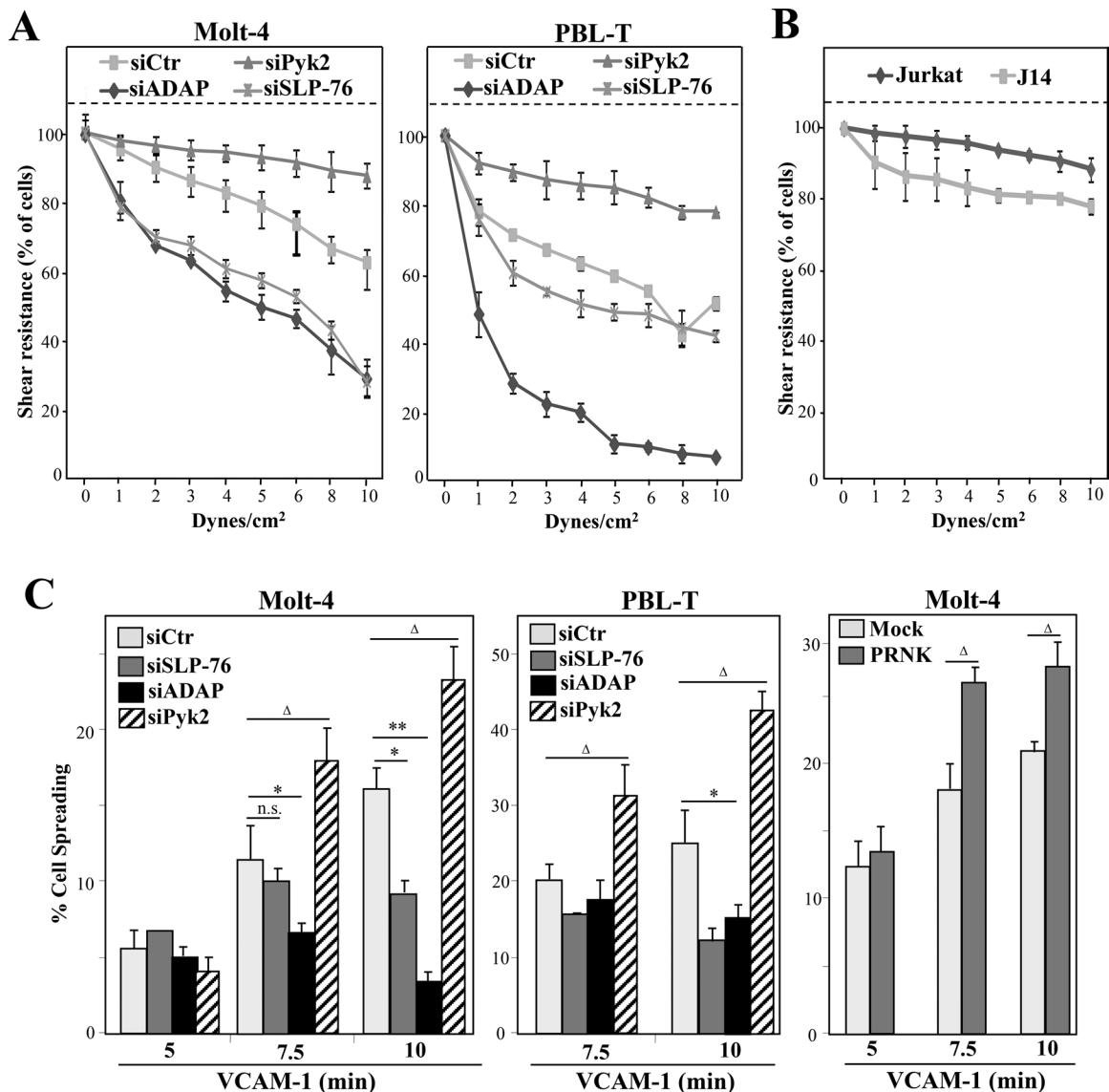


FIGURE 4: Analyses of T-cell adhesion strengthening and spreading on VCAM-1. The indicated siRNA transfectants (A) or Jurkat and J14 cells (B), preattached onto coimmobilized VCAM-1 and CXCL12 in flow chambers, were subjected to cell detachment after sequential increases of shear stress. Data show mean \pm SD of cell percentages from the initial number of bound cells remaining attached at the indicated shear stresses (A, $n = 4$; B, $n = 3$). (C) Molt-4 and PBL-T were transfected with the indicated siRNA or vectors, and transfectants were allowed to attach to VCAM-1 immobilized with CXCL12. Spreading was evaluated from Nomarski images at the indicated times. Percentage of cell spreading was determined from cells (2500–3000) from different fields of view. Spreading was significantly inhibited (**, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$) or stimulated (Δ , $p < 0.05$) compared with control siRNA or mock transfectants ($n = 3$). n.s., nonsignificant.

DISCUSSION

Vav1 is needed for chemokine-stimulated T-cell adhesion involving $\alpha 4\beta 1$ (Garcia-Bernal *et al.*, 2005, 2009), and thus it is conceivable that Vav1-binding proteins such as SLP-76 and Pyk2 could modulate this process. Using Molt-4 and primary human PBL-T depleted for SLP-76 or for ADAP, an SLP-76-interacting partner, as well as SLP-76-deficient J14 cells, we show here that these two proteins contribute to optimal stimulation by CXCL12 of $\alpha 4\beta 1$ -mediated T-cell attachment under flow conditions. Instead, Pyk2 negatively regulates this adhesion, as its depletion or expression of kinase-inactive Pyk2 forms led to increased cell attachment. Of note, modulation of cell adhesion by SLP-76, ADAP, and Pyk2 correlated with a chemokine-stimulated transient increase in association of these

proteins with Vav1, strongly suggesting that the dynamics of this protein module can regulate the extent of $\alpha 4\beta 1$ -mediated T-cell attachment.

Alterations in adhesion to $\alpha 4\beta 1$ ligands exhibited by SLP-76-, ADAP-, or Pyk2-depleted cells were independent of changes in $\alpha 4\beta 1$ affinity following CXCL12 stimulation. Rather, flow-chamber adhesion assays revealed that the strengthening of $\alpha 4\beta 1$ -dependent attachment was regulated by SLP-76 and ADAP, though the strength of ADAP-knockdown transfectant attachment was consistently lower than SLP-76-depleted counterparts. Moreover, we show that spreading on VCAM-1/CXCL12 was similarly decreased in T-cells silenced for SLP-76 and ADAP. Compared with the absolute requirement of talin and Vav1 in the control of $\alpha 4\beta 1$ affinity and strength of

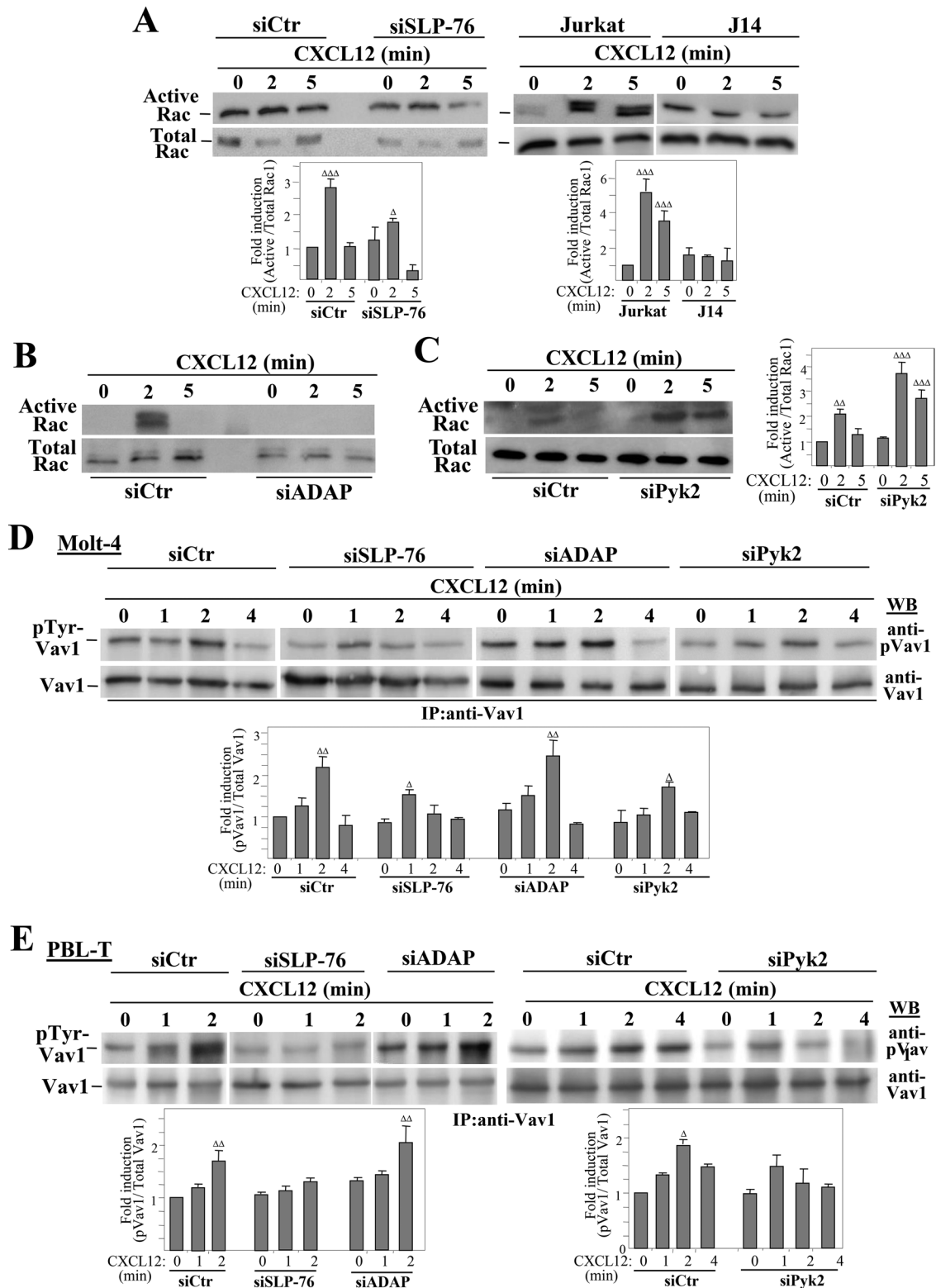


FIGURE 5: Analyses of Rac1 activation and Vav1 tyrosine phosphorylation in SLP-76-, ADAP-, or Pyk2-deficient T-cells. Control, SLP-76, ADAP, or Pyk2 siRNA transfectants in Molt-4 cells, or Jurkat and J14 cells (A–C) were stimulated with CXCL12 and subjected to GTPase assays to detect Rac1 activation. Activation was significantly increased compared with untreated cells ($\Delta\Delta\Delta$, $p < 0.001$; $\Delta\Delta$, $p < 0.01$; Δ , $p < 0.05$; A, $n = 7$; B and C, $n = 3$). The indicated Molt-4 (D) or PBL-T (E) siRNA transfectants incubated with or without CXCL12 for the indicated times were analyzed by immunoprecipitation and Western blotting. Vav1 tyrosine phosphorylation was significantly up-regulated compared with untreated cells ($\Delta\Delta$, $p < 0.01$; Δ , $p < 0.05$; D, $n = 6$; E, left, $n = 2$; E, right, $n = 3$).

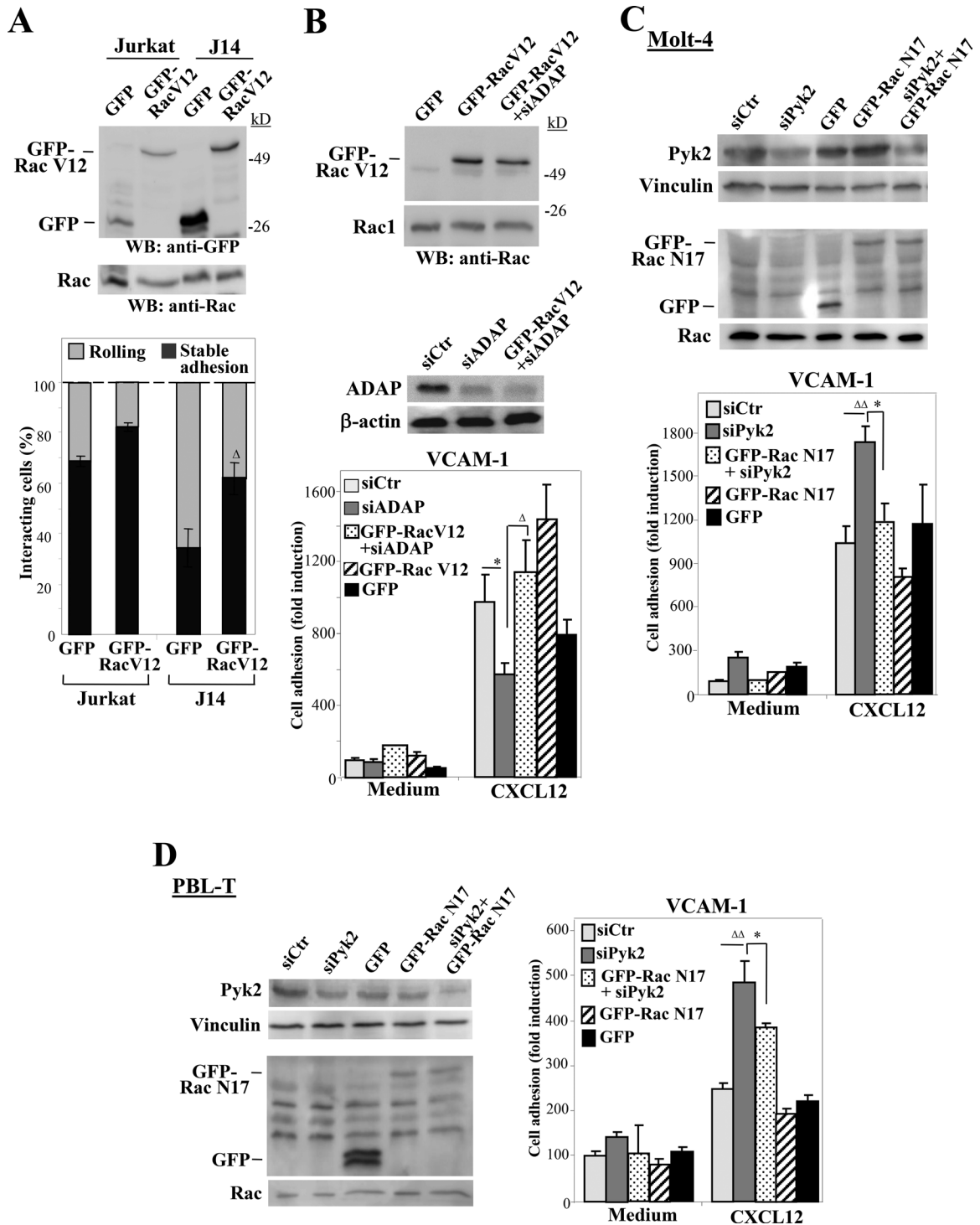


FIGURE 6: Rac1 involvement in SLP-76, ADAP, and Pyk2 regulation of CXCL12-activated T-cell adhesion dependent on $\alpha 4\beta 1$. (A) Cells were transfected with GFP or GFP-Rac V12 vectors and were analyzed by immunoblotting (top) or were subjected to flow-chamber adhesion assays to VCAM-1 coimmobilized with CXCL12 (bottom). Adhesion was significantly rescued in comparison with J14-GFP transfectants (Δ , $p < 0.05$; $n = 3$). (B) Molt-4 cells were transfected with the indicated siRNA and GFP vector combinations and were analyzed by Western blotting (top) or in static adhesion assays to VCAM-1 immobilized with or without CXCL12 (bottom). Adhesion was significantly inhibited ($*$, $p < 0.05$) or recovered (Δ , $p < 0.05$). (C and D) The indicated Molt-4 or PBL-T transfectants were tested by immunoblotting or were subjected to adhesion assays to VCAM-1 immobilized with or without CXCL12. Adhesion was significantly stimulated ($\Delta\Delta$, $p < 0.01$) or inhibited ($*$, $p < 0.05$) (B–D, $n = 3$).

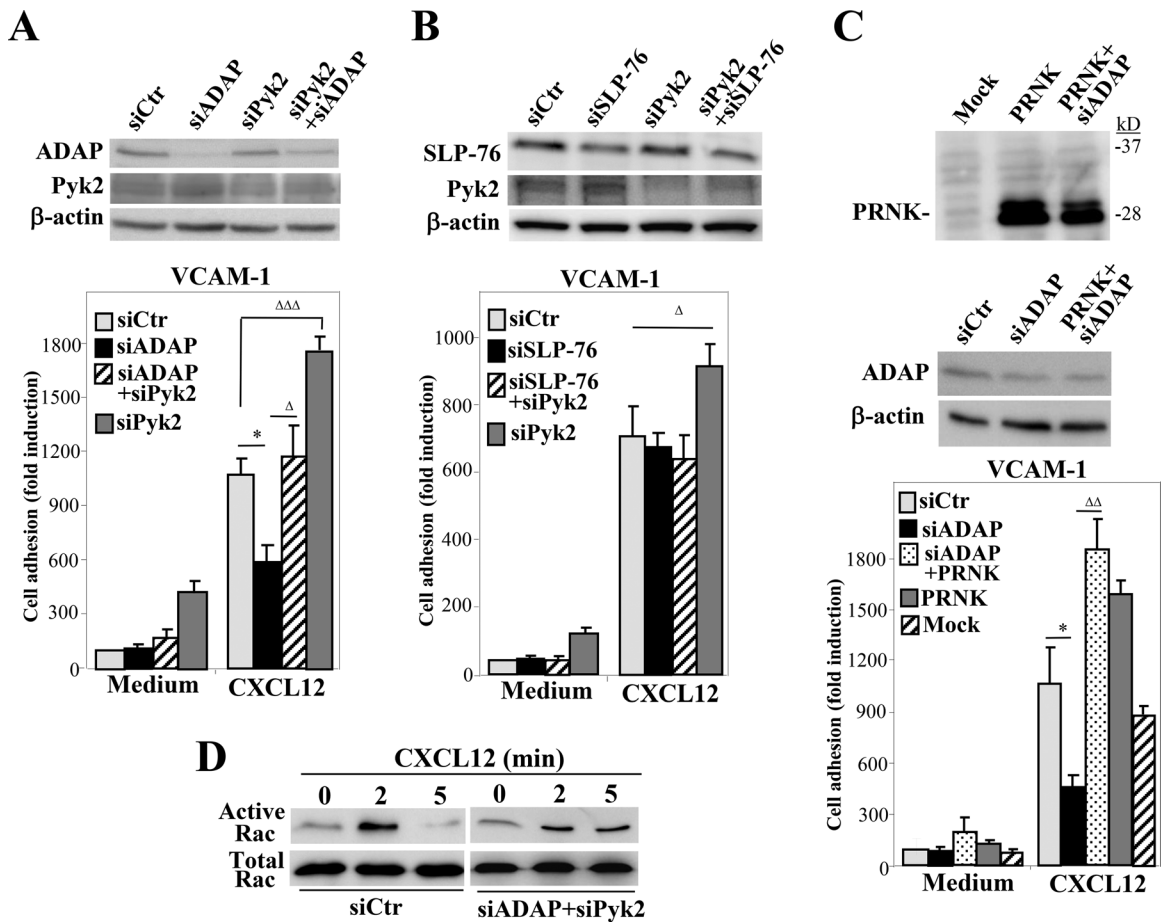


FIGURE 7: Analysis of functional connections between ADAP and Pyk2 in CXCL12-stimulated adhesion mediated by $\alpha 4\beta 1$. (A–C) Molt-4 cells were transfected with the indicated individual or combined siRNA and/or vectors, and transfectants were analyzed by immunoblotting or in adhesion assays to VCAM-1 immobilized with or without CXCL12. Adhesions were significantly inhibited ($*p < 0.05$) or significantly stimulated or rescued ($\Delta\Delta\Delta$, $p < 0.001$; $\Delta\Delta$, $p < 0.01$; or Δ , $p < 0.05$) (A, $n = 4$; B and C, $n = 3$). (D) The indicated transfectants were tested in GTPase assays to detect active Rac.

chemokine-activated T-cell attachment (Garcia-Bernal *et al.*, 2006, 2009; Manevich *et al.*, 2007), the contribution of SLP-76 and ADAP in these processes appears to be of lesser magnitude. However, both adaptors are clearly needed to achieve optimal stability of this adhesion.

VCAM-1-Fc soluble binding to Pyk2-silenced cells was maintained longer than with control transfectants, suggesting that Pyk2 can regulate the avidity of $\alpha 4\beta 1$. Sustained VCAM-1 binding likely represents one of the mechanisms accounting for the stronger cell arrest and resistance to detachment under shear stress shown by Pyk2-knockdown cells relative to control counterparts. Associated with increased strength of attachment to VCAM-1/CXCL12 exhibited by Pyk2-depleted cells, they displayed enhanced spreading, an observation in line with previous results showing high spreading correlating with defective cell detachment of Pyk2^{-/-} macrophages (Okigaki *et al.*, 2003). Therefore our data indicate that Pyk2 negatively regulates the strength and spreading phases of chemokine-activated T-cell attachment involving $\alpha 4\beta 1$.

Our previous results revealed that Vav1-mediated Rac1 activation in response to CXCL12 in T-cells represents an important event for strengthening of $\alpha 4\beta 1$ -VCAM-1 interaction, as well as for cell spreading (Garcia-Bernal *et al.*, 2005). The present data indicate that Rac1 is a common mediator of SLP-76-, ADAP-, and Pyk2-modulated T-cell adhesion to $\alpha 4\beta 1$ ligands. Thus SLP-76

and ADAP likely function as adaptors with Vav1 to optimize chemokine-promoted Rac activation and stimulation of $\alpha 4\beta 1$ -dependent cell adhesion. Instead, Pyk2 restricts this attachment by limiting Rac activation. As knocking down any of these three proteins influences the outcome of Rac activation, the data strongly suggest that depletion-mediated changes in the composition of the complex formed by Vav1, SLP-76, ADAP, and Pyk2 could account for alterations in Rac activation. In this regard, we show that knocking down ADAP delays Vav1-SLP-76 association and impairs Rac activation in response to CXCL12, suggesting that the Vav1-SLP-76-ADAP module facilitates Rac1 activation upon chemokine stimulation and optimizes the strength and spreading of $\alpha 4\beta 1$ -mediated T-cell adhesion. On this point, SLP-76 assembly with Vav1 and Nck contributes to TCR-stimulated Rac1 activation (Bubeck-Wardenburg *et al.*, 1998; Barda-Saad *et al.*, 2010), and importantly, ADAP associates with these complexes together with WASP (Krause *et al.*, 2000; Coppolino *et al.*, 2001) and cooperates with Nck in the recruitment of SLP-76 for regulation of Rho GTPase-mediated actin rearrangement (Pauker *et al.*, 2011). Earlier results reported that SLP-76 depletion in Jurkat cells did not affect the CXCL12-stimulated Rac1 activation (Horn *et al.*, 2009). The basis for the discrepancies between these results and our observation of inefficient Rac1 activation by CXCL12 in SLP-76-deficient cells is not known at present.

Characterization of the mechanics of Pyk2-regulated, $\alpha 4\beta 1$ -mediated cell attachment reveals that the Pyk2 kinase domain negatively controls this adhesion. Thus expression of PRNK, which lacks the Pyk2 kinase domain, as well as of a point mutant, kinase-inactive Pyk2 form, mimicked the effects of Pyk2 depletion on the increase in $\alpha 4\beta 1$ -mediated attachment, strongly suggesting that Pyk2-dependent tyrosine phosphorylation activity in T-cells contributes to keep Rac1 activation levels under control. Of note, negative regulation of Rac activation and cell adhesion to VCAM-1 by Pyk2 directly opposed the stimulatory activity of ADAP in these processes, as detected in cells silenced for both proteins. In this experimental setting, the absence of Pyk2 might rescue the activation of Rac1 concurrent with the inhibitory effects of ADAP knock-down, leading to stimulation of adhesion to VCAM-1, but we cannot exclude that recovery of these activities occurs subsequent to the negative actions of ADAP depletion. Our data are in line with early work proposing that Pyk2 regulates Rac1 activation (Tokiwa *et al.*, 1996) and with results showing that macrophages from mice knocked out for the Pyk2 closely related kinase FAK have elevated Rac activation (Owen *et al.*, 2007). However, the level of activation of this GTPase based on Pyk2 activity might be cell-context dependent (Chapman and Houtman, 2014), as NK cells expressing a kinase-dead Pyk2 displayed reduced Rac activation (Gismondi *et al.*, 2003).

CXCL12 promotes tyrosine phosphorylation of Vav1 associated with Rac1 activation and stimulation of $\alpha 4\beta 1$ -mediated T-cell adhesion (Garcia-Bernal *et al.*, 2005). Inefficient phosphorylation of Vav1 in response to CXCL12 in SLP-76-depleted T-cells correlated with their impaired Rac activation, whereas ADAP-knockdown cells displayed fully competent chemokine-promoted phosphorylation of this GEF, in spite of their defective Rac activation. These results might reflect the fact that ADAP does not directly interact with Vav1 but associates with the Vav1-SLP-76 module, possibly in a SLP-76-dependent manner. Interestingly, the increased Rac activation following CXCL12 stimulation in Pyk2-silenced cells was not coupled with enhanced Vav1 phosphorylation, but rather phosphorylation

was not as efficient as in control transfectants. These data reveal that SLP-76 and Pyk2 but not ADAP contribute to optimal Vav1 tyrosine phosphorylation in T-cells in response to CXCL12, and indicate that net Rac activation is the result of Vav1-dependent and Vav1-independent mechanisms. It remains puzzling that inefficient Vav1 phosphorylation in SLP-76- and Pyk2-depleted T-cells led to opposite effects on Rac activation. The molecular basis underlying these distinct responses is not known at present. SLP-76 and Pyk2 knock-down might similarly affect recruitment and/or activity of tyrosine kinases involved in Vav1 tyrosine phosphorylation, such as ZAP-70 and Lck (Gulbins *et al.*, 1993; Ottoson *et al.*, 2001). But it is also clear that the subsequent Rac activation is differentially regulated and likely involves distinct GEFs and GTPase-activating proteins (GAPs). GEFs and GAPs that are known to regulate CXCL12-stimulated Rac activation and $\alpha 4\beta 1$ -mediated T-cell adhesion include the GEF DOCK2 and the GAP β -chimerin. Of note, lymphocytes from DOCK2 knockout mice display minimal chemokine-induced Rac activation compared with control cells (Fukui *et al.*, 2001). Furthermore, we showed that DOCK2 cooperates with Vav1 for CXCL12-promoted Rac activation, and its silencing inhibits T-cell attachment mediated by $\alpha 4\beta 1$ under flow conditions (Garcia-Bernal *et al.*, 2006). Instead, β -chimerin overexpression in T-cells results in impaired Rac activation in response to CXCL12 associated with inhibition of $\alpha 4\beta 1$ -dependent T-cell adhesion (Siliceo *et al.*, 2006). Although it has not yet been tested, the possibility exists that DOCK2 and β -chimerin might be recruited to the Vav1-Pyk2-SLP-76-ADAP module, thus contributing to the regulation of Rac activity and subsequent cell attachment mediated by $\alpha 4\beta 1$. Other GEFs and GAPs expressed on T-lymphocytes that are known to regulate Rac activation include PlekhG2, Pix, and ArhGAP15 (Seoh *et al.*, 2003; Phee *et al.*, 2005; Runne and Chen, 2013), though their role in the control of $\alpha 4\beta 1$ -dependent T-cell adhesion has not been addressed.

SKAP-55 is an additional molecule that could modulate ADAP-controlled T-cell attachment to $\alpha 4\beta 1$ ligands following chemokine stimulation. Thus ADAP binds SKAP-55, an adaptor protein that mediates up-regulation of T-cell adhesion to ICAM-1 and fibronectin upon TCR activation (Marie-Cardine *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2003, 2007). The ADAP-SKAP-55 module interacts with RIAM through SKAP-55, facilitating TCR-mediated integrin activation (Kliche *et al.*, 2006; Menasche *et al.*, 2007; Horn *et al.*, 2009). Furthermore, independent ADAP-SKAP-55 modules regulate CCR7-mediated $\alpha L\beta 2$ functions in T-cells (Kliche *et al.*, 2012), and recent data indicate that ADAP can also bind talin and kindlin to promote integrin- $\alpha 11\beta 3$ activation and fibrinogen binding (Kasirer-Friede *et al.*, 2014). Whether the ADAP-SKAP-55 association contributes to chemokine-stimulated Rac activation and T-cell adhesion involving $\alpha 4\beta 1$ is currently unknown.

A model can be proposed from the present results (Figure 8). The net Rac1 activation levels needed to develop sufficient adhesion strength and cell spreading mediated by $\alpha 4\beta 1$ are possibly the result of opposing activities inside the Vav1-SLP-76-ADAP-Pyk2 module. Thus Pyk2 kinase activity would oppose the Rac1 activation

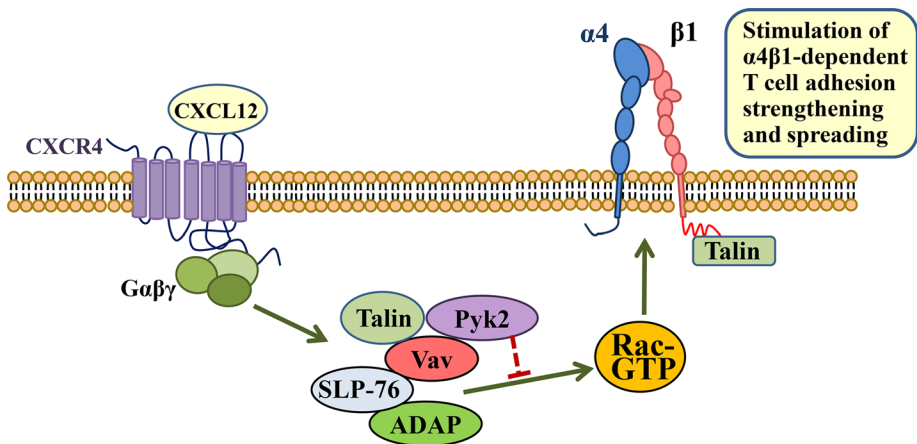


FIGURE 8: Model for regulation by Vav1-associated proteins of chemokine-stimulated, $\alpha 4\beta 1$ -dependent T-cell adhesion. Rac1 activation by CXCL12 is a well-known event for stimulation of the adhesion strength and spreading mediated by $\alpha 4\beta 1$ in T-cells. A transient complex formed by Vav1, SLP-76, ADAP, and Pyk2 regulates this adhesion. While Vav1-SLP-76-ADAP stimulates chemokine-promoted Rac1 activation (green arrow), the presence of Pyk2 in the complex opposes this activation (red blocking symbol). The result of these opposing actions is a net Rac activation and up-regulation of T-cell adhesion strengthening and spreading dependent on $\alpha 4\beta 1$. Talin can also be found in this complex, perhaps as an independent pool from $\beta 1$ -associated talin. Its role in the assembly and function of this complex has not been addressed in the present study.

stimulated by Vav1-SLP-76-ADAP and possibly additional costimulatory molecules, potentially by activating a GAP or by inhibiting a GEF for Rac1. Talin can also be found in this protein module, but its role in the stability and function of the complex and whether it represents a different pool from β 1-associated talin has not been addressed here. Furthermore, the present data, together with our previous results (Garcia-Bernal *et al.*, 2009), raise the possibility that separate pools of SLP-76 with either Vav1 or talin might exist. Our data should add molecular mechanistic insights into the process of chemokine-stimulated T-cell adhesion mediated by α 4 β 1, a key step during T-lymphocyte trafficking to sites of inflammation.

MATERIALS AND METHODS

Cells, antibodies, and reagents

The human Molt-4 and Jurkat T-cell lines were cultured in RPMI 1640 medium (Lonza, Verviers, Belgium) and 10% fetal bovine serum (Life Technologies, Paisley, UK) (complete medium). The Jurkat-derived cell lines JCaM1.6 (American Type Culture Collection) and J14 (a gift from Arthur Weiss, University of California, San Francisco, CA) were grown in complete medium. Peripheral blood T-lymphocytes (PBL-T) were prepared as previously described (Garcia-Bernal *et al.*, 2005). The Consejo Superior de Investigaciones Científicas Ethics Committee (Madrid, Spain) approved the protocols used to obtain and process the human blood samples. Control P3 \times 63 and anti- β 1 TS2/16 mAb were gifts from Francisco Sánchez-Madrid (Hospital de la Princesa, Madrid, Spain), and polyclonal anti- β 1A antibodies were from Guido Tarone (Turin University, Italy). Antibodies to SLP-76 and Vav1 (C14) were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), anti-phospho-Vav (Y174; ab47282) was from Abcam (Cambridge, MA), anti-Rac1 and anti-ADAP were from BD Biosciences (San Diego, CA), and anti-GFP was from Molecular Probes (Eugene, OR). Antibodies to β -actin, vinculin, and talin clone 8D4 were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), and antibody to Pyk2 was from Millipore (Billerica, MA). The HUTS-21 anti- β 1 mAb has been previously characterized (Luque *et al.*, 1996). CXCL12 was purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN) and CCL21 was purchased from Peprotech (Rocky Hill, NJ).

Transfections and RNA interference

Vectors coding for Rac wild-type (wt), Rac V12, Rac N17, Pyk2-Y402F, Pyk2-K457A, and Pyk2-wt fused with GFP were provided by Francisco Sánchez-Madrid. The vector pRK5-myc-PRNK (Ivankovic-Dikic *et al.*, 2000) was a gift from Ivan Dikic (Goethe University School of Medicine, Frankfurt, Germany). The siRNA against human SLP-76 (ON-TARGETplus, SMARTpool) was purchased from Dharmacon (Lafayette, CO). The siRNAs for ADAP-1, sense: CAAAUGUUGACCGACGAAtt; ADAP-2, sense: GAGAUUUCAGUUUGCCCCUtt; Pyk2, sense: GAUGUGUCCUGAAUCGUAtt; and control siRNA (Garcia-Bernal *et al.*, 2005) were purchased from Sigma-Aldrich. Vectors and siRNA were nucleofected (Amaxa, Cologne, Germany) following a previously described procedure (Garcia-Bernal *et al.*, 2005). Molt-4 or PBL-T siRNA transfectants were assayed 22–24 h posttransfection, and transfection did not affect cell viability, as assessed in cell cycle analyses by flow cytometry.

Cell adhesion and spreading assays

For static adhesions, we used the reported method (Garcia-Bernal *et al.*, 2005). Briefly, cells were plated in triplicate on wells coated with the fibronectin fragment FN-H89, which contains the CS-1 region, or with VCAM-1 together with CXCL12 or CCL21

(650 ng/ml), and plates were incubated and adhesion measured. Adhesion data are presented relative to control untreated cells, which have been given an arbitrary value of 100. For flow-chamber adhesion assays, we followed the described protocol (Garcia-Bernal *et al.*, 2006). In brief, cells were infused at a flow rate of 1 dyne/cm² into flow chambers containing coimmobilized VCAM-1 and CXCL12. Rolling cells that subsequently firmly attached were expressed as stable arrest, whereas tethering cells that did not arrest at any moment were expressed as rolling cells. For evaluation of shear resistance, cells were allowed to attach and then were subjected to sequential increases of the flow rate. The number of cells remaining bound was determined as the percentage of total adhered cells after the adhesion step. For cellular spreading, CXCL12-stimulated cells attached on VCAM-1 were fixed and analyzed as previously described (Garcia-Bernal *et al.*, 2006).

Soluble VCAM-1 binding and flow cytometry

For cell binding to VCAM-1-Fc (R&D Systems), cells were stimulated for 20 s with CXCL12 before VCAM-1-Fc was added, which was detected by flow cytometry using phycoerythrin-conjugated AffiniPure F(ab')₂ fragment goat anti-human immunoglobulin G (IgG), Fc γ -fragment specific (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). For the detection of high-affinity β 1, cells were stimulated for 20 s with CXCL12 before HUTS-21 anti- β 1 mAb (10 μ g/ml) was added for 30 min at 4°C. After washing, cells were incubated with FITC-conjugated rabbit anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch). Fluorescence intensity data indicate fold-induction values relative to those from control untreated cells, which were given an arbitrary value of one.

Immunoprecipitation, immunoblotting, and GTPase assays

For immunoprecipitation, we followed the described method (Garcia-Bernal *et al.*, 2009). In brief, cell lysate supernatants were incubated with antibodies followed by coupling to protein G-Sepharose. Proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to membranes that were sequentially incubated with primary antibodies and with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies. Protein visualization was achieved using Immobilon Western chemiluminescent substrate (Millipore). For GTPase assays, we used the reported method (Garcia-Bernal *et al.*, 2005). Briefly, cells exposed to CXCL12 were lysed, and aliquots from extracts were separated for total lysate controls and for incubation with GST-PAK-CD fusion protein, followed by incubation with glutathione-Sepharose beads (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Bound proteins were eluted and subjected to immunoblotting using anti-Rac1 antibodies.

Statistical analyses

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

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Balbino Alarcón, Aldo Borroto, José Luis Rodríguez-Fernández, Danay Cibrian, and Angeles García-Pardo for reagents, technical help, and helpful discussions; and Pedro Lastres for help in flow cytometry experiments. This work was supported by grants SAF2011-24022 from Ministerio de Economía y Competitividad, RD12/0036/0061, and S2010/BMD-2314 from Comunidad de Madrid to J.T.

REFERENCES

- Avraham H, Park SY, Schinkmann K, Avraham S (2000). RAFTK/Pyk2-mediated cellular signalling. *Cell Signal* 12, 123–133.
- Avraham S, London R, Fu Y, Ota S, Hiregowdara D, Li J, Jiang S, Pasztor LM, White RA, Groopman JE, et al. (1995). Identification and characterization of a novel related adhesion focal tyrosine kinase (RAFTK) from megakaryocytes and brain. *J Biol Chem* 270, 27742–27751.
- Baker RG, Hsu CJ, Lee D, Jordan MS, Maltzman JS, Hammer DA, Baumgart T, Koretzky GA (2009). The adapter protein SLP-76 mediates “outside-in” integrin signaling and function in T cells. *Mol Cell Biol* 29, 5578–5589.
- Barda-Saad M, Shirasu N, Pauker MH, Hassan N, Perl O, Balbo A, Yamaguchi H, Houtman JC, Appella E, Schuck P, Samelson LE (2010). Cooperative interactions at the SLP-76 complex are critical for actin polymerization. *EMBO J* 29, 2315–2328.
- Beinke S, Phee H, Clingan JM, Schlessinger J, Matloubian M, Weiss A (2010). Proline-rich tyrosine kinase-2 is critical for CD8 T-cell short-lived effector fate. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 16234–16239.
- Berlin-Rufenach C, Otto F, Mathies M, Westermann J, Owen MJ, Hamann A, Hogg N (1999). Lymphocyte migration in lymphocyte function-associated antigen (LFA)-1-deficient mice. *J Exp Med* 189, 1467–1478.
- Boerth NJ, Judd BA, Koretzky GA (2000). Functional association between SLAP-130 and SLP-76 in Jurkat T cells. *J Biol Chem* 275, 5143–5152.
- Bolomini-Vitorini M, Montresor A, Giagulli C, Staunton D, Rossi B, Martinello M, Constantin G, Laudanna C (2009). Regulation of conformer-specific activation of the integrin LFA-1 by a chemokine-triggered Rho signaling module. *Nat Immunol* 10, 185–194.
- Bubeck-Wardenburg J, Pappu R, Bu JY, Mayer B, Chernoff J, Straus D, Chan AC (1998). Regulation of PAK activation and the T cell cytoskeleton by the linker protein SLP-76. *Immunity* 9, 607–616.
- Bustelo XR (2000). Regulatory and signaling properties of the Vav family. *Mol Cell Biol* 20, 1461–1477.
- Calderwood DA, Campbell ID, Critchley DR (2013). Talins and kindlins: partners in integrin-mediated adhesion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14, 503–517.
- Chapman NM, Houtman JC (2014). Functions of the FAK family kinases in T cells: beyond actin cytoskeletal rearrangement. *Immunol Res* 59, 23–34.
- Coppolino MG, Krause M, Hagendorff P, Monner DA, Trimble W, Grinstein S, Wehland J, Sechi AS (2001). Evidence for a molecular complex consisting of Fyb/SLAP, SLP-76, Nck, VASP and WASP that links the actin cytoskeleton to Fcγ receptor signalling during phagocytosis. *J Cell Sci* 114, 4307–4318.
- da Silva AJ, Li Z, de Vera C, Canto E, Findell P, Rudd CE (1997). Cloning of a novel T-cell protein Fyb that binds FYN and SH2-domain-containing leukocyte protein 76 and modulates interleukin 2 production. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 7493–7498.
- Davis CB, Dikic I, Unutmaz D, Hill CM, Arthos J, Siani MA, Thompson DA, Schlessinger J, Littman DR (1997). Signal transduction due to HIV-1 envelope interactions with chemokine receptors CXCR4 or CCR5. *J Exp Med* 186, 1793–1798.
- Dikic I, Tokiwa G, Lev S, Courtneidge SA, Schlessinger J (1996). A role for Pyk2 and Src in linking G-protein-coupled receptors with MAP kinase activation. *Nature* 383, 547–550.
- Feigelson SW, Grabovsky V, Winter E, Chen LL, Pepinsky RB, Yednock T, Yablonski D, Lobb R, Alon R (2001). The Src kinase p56(lck) up-regulates VLA-4 integrin affinity. Implications for rapid spontaneous and chemokine-triggered T cell adhesion to VCAM-1 and fibronectin. *J Biol Chem* 276, 13891–13901.
- Fischer KD, Kong YY, Nishina H, Tedford K, Marengere LE, Kozieradzki I, Sasaki T, Starr M, Chan G, Gardener S, et al. (1998). Vav is a regulator of cytoskeletal reorganization mediated by the T-cell receptor. *Curr Biol* 8, 554–562.
- Fukui Y, Hashimoto O, Sanui T, Oono T, Koga H, Abe M, Inayoshi A, Noda M, Oike M, Shirai T, Sasazuki T (2001). Haematopoietic cell-specific CDM family protein DOCK2 is essential for lymphocyte migration. *Nature* 412, 826–831.
- Ganju RK, Hatch WC, Avraham H, Ona MA, Druker B, Avraham S, Groopman JE (1997). RAFTK, a novel member of the focal adhesion kinase family, is phosphorylated and associates with signaling molecules upon activation of mature T lymphocytes. *J Exp Med* 185, 1055–1063.
- Gao C, Blystone SD (2009). A Pyk2-Vav1 complex is recruited to β3-adhesion sites to initiate Rho activation. *Biochem J* 420, 49–56.
- Garcia-Bernal D, Pardo-Cabanias M, Dios-Esponera A, Samaniego R, Hernan PdiOD, Teixido J (2009). Chemokine-induced Zap70 kinase-mediated dissociation of the Vav1-talin complex activates α4β1 integrin for T cell adhesion. *Immunity* 31, 953–964.
- Garcia-Bernal D, Sotillo-Mallo E, Nombela-Arrieta C, Samaniego R, Fukui Y, Stein JV, Teixido J (2006). DOCK2 is required for chemokine-promoted human T lymphocyte adhesion under shear stress mediated by the integrin α4β1. *J Immunol* 177, 5215–5225.
- Garcia-Bernal D, Wright N, Sotillo-Mallo E, Nombela-Arrieta C, Stein JV, Bustelo XR, Teixido J (2005). Vav1 and Rac control chemokine-promoted T lymphocyte adhesion mediated by the integrin α4β1. *Mol Biol Cell* 16, 3223–3235.
- Geng L, Raab M, Rudd CE (1999). Cutting edge: SLP-76 cooperativity with Fyb/FYN-T in the up-regulation of TCR-driven IL-2 transcription requires SLP-76 binding to Fyb at Tyr595 and Tyr651. *J Immunol* 163, 5753–5757.
- Ghandour H, Cullere X, Alvarez A, Lusinskas FW, Mayadas TN (2007). Essential role for Rap1 GTPase and its guanine exchange factor CalDAG-GEFI in LFA-1 but not VLA-4 integrin mediated human T-cell adhesion. *Blood* 110, 3682–3690.
- Gismondi A, Jacobelli J, Strippoli R, Mainiero F, Soriani A, Cifaldi L, Piccoli M, Frati L, Santoni A (2003). Proline-rich tyrosine kinase 2 and Rac activation by chemokine and integrin receptors controls NK cell transendothelial migration. *J Immunol* 170, 3065–3073.
- Grabovsky V, Feigelson S, Chen C, Bleijs DA, Peled A, Cinamon G, Baleux F, Arenzana-Seisdedos F, Lapidot T, van Kooyk Y, et al. (2000). Subsecond induction of α4 integrin clustering by immobilized chemokines stimulates leukocyte tethering and rolling on endothelial vascular cell adhesion molecule 1 under flow conditions. *J Exp Med* 192, 495–506.
- Griffiths EK, Krawczyk C, Kong YY, Raab M, Hyduk SJ, Bouchard D, Chan VS, Kozieradzki I, Oliveira-Dos-Santos AJ, Wakeham A, et al. (2001). Positive regulation of T cell activation and integrin adhesion by the adapter Fyb/Slap. *Science* 293, 2260–2263.
- Griffiths EK, Penninger JM (2002). Communication between the TCR and integrins: role of the molecular adapter ADAP/Fyb/Slap. *Curr Opin Immunol* 14, 317–322.
- Gulbins E, Coggeshall KM, Baier G, Katzav S, Burn P, Altman A (1993). Tyrosine kinase-stimulated guanine nucleotide exchange activity of Vav in T cell activation. *Science* 260, 822–825.
- Hogg N, Patzak I, Willenbrock F (2011). The insider’s guide to leukocyte integrin signalling and function. *Nat Rev Immunol* 11, 416–426.
- Horn J, Wang X, Reichardt P, Stradal TE, Warnecke N, Simeoni L, Gunzer M, Yablonski D, Schraven B, Kliche S (2009). Src homology 2-domain containing leukocyte-specific phosphoprotein of 76 kDa is mandatory for TCR-mediated inside-out signaling, but dispensable for CXCR4-mediated LFA-1 activation, adhesion, and migration of T cells. *J Immunol* 183, 5756–5767.
- Ivankovic-Dikic I, Gronroos E, Blaukat A, Barth BU, Dikic I (2000). Pyk2 and FAK regulate neurite outgrowth induced by growth factors and integrins. *Nat Cell Biol* 2, 574–581.
- Kasirer-Friede A, Kang J, Kahner B, Ye F, Ginsberg MH, Shattil SJ (2014). ADAP interactions with talin and kindlin promote platelet integrin αIIbβ3 activation and stable fibrinogen binding. *Blood* 123, 3156–3165.
- Katagiri K, Maeda A, Shimonaka M, Kinashi T (2003). RAPL, a Rap1-binding molecule that mediates Rap1-induced adhesion through spatial regulation of LFA-1. *Nat Immunol* 4, 741–748.
- Katagiri T, Takahashi T, Sasaki T, Nakamura S, Hattori S (2000). Protein-tyrosine kinase Pyk2 is involved in interleukin-2 production by Jurkat T cells via its tyrosine 402. *J Biol Chem* 275, 19645–19652.
- Kim C, Ye F, Ginsberg MH (2011). Regulation of integrin activation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 27, 321–345.
- Kliche S, Breitling D, Togni M, Pusch R, Heuer K, Wang X, Freund C, Kasirer-Friede A, Menasche G, Koretzky GA, Schraven B (2006). The ADAP/SKAP55 signaling module regulates T-cell receptor-mediated integrin activation through plasma membrane targeting of Rap1. *Mol Cell Biol* 26, 7130–7144.
- Kliche S, Worbs T, Wang X, Degen J, Patzak I, Meineke B, Togni M, Moser M, Reinhold A, Kiefer F, et al. (2012). CCR7-mediated LFA-1 functions in T cells are regulated by 2 independent ADAP/SKAP55 modules. *Blood* 119, 777–785.
- Koretzky GA, Abtahian F, Silverman MA (2006). SLP76 and SLP65: complex regulation of signalling in lymphocytes and beyond. *Nat Rev Immunol* 6, 67–78.
- Krause M, Sechi AS, Konradt M, Monner D, Gertler FB, Wehland J (2000). Fyn-binding protein (Fyb)/SLP-76-associated protein (SLAP), Ena/vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) proteins and the Arp2/3 complex link T cell receptor (TCR) signaling to the actin cytoskeleton. *J Cell Biol* 149, 181–194.

- Lee D, Kim J, Baker RG, Koretzky GA, Hammer DA (2012). SLP-76 is required for optimal CXCR4-stimulated T lymphocyte firm arrest to ICAM-1 under shear flow. *Eur J Immunol* 42, 2736–2743.
- Lev S, Moreno H, Martinez R, Canoll P, Peles E, Musacchio JM, Plowman GD, Rudy B, Schlessinger J (1995). Protein tyrosine kinase PYK2 involved in Ca²⁺-induced regulation of ion channel and MAP kinase functions. *Nature* 376, 737–745.
- Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 7, 678–689.
- Li J, Avraham H, Rogers RA, Raja S, Avraham S (1996). Characterization of RAFTK, a novel focal adhesion kinase, and its integrin-dependent phosphorylation and activation in megakaryocytes. *Blood* 88, 417–428.
- Li X, Dy RC, Cance WG, Graves LM, Earp HS (1999). Interactions between two cytoskeleton-associated tyrosine kinases: calcium-dependent tyrosine kinase and focal adhesion tyrosine kinase. *J Biol Chem* 274, 8917–8924.
- Luque A, Gomez M, Puzon W, Takada Y, Sanchez-Madrid F, Cabanas C (1996). Activated conformations of very late activation integrins detected by a group of antibodies (HUTS) specific for a novel regulatory region (355–425) of the common $\beta 1$ chain. *J Biol Chem* 271, 11067–11075.
- Luster AD, Alon R, von Andrian UH (2005). Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat Immunol* 6, 1182–1190.
- Malinin NL, Zhang L, Choi J, Ciocea A, Razorenova O, Ma YQ, Podrez EA, Tosi M, Lennon DP, Caplan AI, et al. (2009). A point mutation in KINDLIN3 ablates activation of three integrin subfamilies in humans. *Nat Med* 15, 313–318.
- Manevich E, Grabovsky V, Feigelson SW, Alon R (2007). Talin 1 and paxillin facilitate distinct steps in rapid VLA-4-mediated adhesion strengthening to vascular cell adhesion molecule 1. *J Biol Chem* 282, 25338–25348.
- Manevich-Mendelson E, Feigelson SW, Pasvolosky R, Aker M, Grabovsky V, Shulman Z, Kilic SS, Rosenthal-Allieri MA, Ben-Dor S, Mory A, et al. (2009). Loss of kindlin-3 in LAD-III eliminates LFA-1 but not VLA-4 adhesiveness developed under shear flow conditions. *Blood* 114, 2344–2353.
- Marie-Cardine A, Hendricks-Taylor LR, Boerth NJ, Zhao H, Schraven B, Koretzky GA (1998). Molecular interaction between the Fyn-associated protein SKAP55 and the SLP-76-associated phosphoprotein SLAP-130. *J Biol Chem* 273, 25789–25795.
- Menasche G, Kliche S, Chen EJ, Stradal TE, Schraven B, Koretzky G (2007). RIAM links the ADAP/SKAP-55 signaling module to Rap1, facilitating T-cell-receptor-mediated integrin activation. *Mol Cell Biol* 27, 4070–4081.
- Mitra SK, Hanson DA, Schlaepfer DD (2005). Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 56–68.
- Moser M, Bauer M, Schmid S, Ruppert R, Schmidt S, Sixt M, Wang HV, Sperandio M, Fassler R (2009a). Kindlin-3 is required for $\beta 2$ integrin-mediated leukocyte adhesion to endothelial cells. *Nat Med* 15, 300–305.
- Moser M, Legate KR, Zent R, Fassler R (2009b). The tail of integrins, talin, and kindlins. *Science* 324, 895–899.
- Musci MA, Hendricks-Taylor LR, Motto DG, Paskind M, Kamens J, Turck CW, Koretzky GA (1997). Molecular cloning of SLAP-130, an SLP-76-associated substrate of the T cell antigen receptor-stimulated protein tyrosine kinases. *J Biol Chem* 272, 11674–11677.
- Okabe S, Fukuda S, Kim YJ, Niki M, Pelus LM, Ohyashiki K, Pandolfi PP, Broxmeyer HE (2005). Stromal cell-derived factor-1 α /CXCL12-induced chemotaxis of T cells involves activation of the RasGAP-associated docking protein p62Dok-1. *Blood* 105, 474–480.
- Okigaki M, Davis C, Falasca M, Harroch S, Felsenfeld DP, Sheetz MP, Schlessinger J (2003). Pyk2 regulates multiple signaling events crucial for macrophage morphology and migration. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 10740–10745.
- Ottoson NC, Pribila JT, Chan AS, Shimizu Y (2001). Cutting edge: T cell migration regulated by CXCR4 chemokine receptor signaling to ZAP-70 tyrosine kinase. *J Immunol* 167, 1857–1861.
- Owen KA, Pixley FJ, Thomas KS, Vicente-Manzanares M, Ray BJ, Horwitz AF, Parsons JT, Beggs HE, Stanley ER, Bouton AH (2007). Regulation of lamellipodial persistence, adhesion turnover, and motility in macrophages by focal adhesion kinase. *J Cell Biol* 179, 1275–1287.
- Pauker MH, Reicher B, Fried S, Perl O, Barda-Saad M (2011). Functional cooperation between the proteins Nck and ADAP is fundamental for actin reorganization. *Mol Cell Biol* 31, 2653–2666.
- Peterson EJ, Woods ML, Dmowski SA, Derimanov G, Jordan MS, Wu JN, Myung PS, Liu QH, Pribila JT, Freedman BD, et al. (2001). Coupling of the TCR to integrin activation by Slap-130/Fyb. *Science* 293, 2263–2265.
- Phee H, Abraham RT, Weiss A (2005). Dynamic recruitment of PAK1 to the immunological synapse is mediated by PIX independently of SLP-76 and Vav1. *Nat Immunol* 6, 608–617.
- Qian D, Lev S, van Oers NS, Dikic I, Schlessinger J, Weiss A (1997). Tyrosine phosphorylation of Pyk2 is selectively regulated by Fyn during TCR signaling. *J Exp Med* 185, 1253–1259.
- Raab M, da Silva AJ, Findell PR, Rudd CE (1997). Regulation of Vav-SLP-76 binding by ZAP-70 and its relevance to TCR zeta/CD3 induction of interleukin-2. *Immunity* 6, 155–164.
- Reynolds LF, Smyth LA, Norton T, Freshney N, Downward J, Kioussis D, Tybulewicz VL (2002). Vav1 transduces T cell receptor signals to the activation of phospholipase C- $\gamma 1$ via phosphoinositide 3-kinase-dependent and -independent pathways. *J Exp Med* 195, 1103–1114.
- Runne C, Chen S (2013). PLEKHG2 promotes heterotrimeric G protein $\beta \gamma$ -stimulated lymphocyte migration via Rac and Cdc42 activation and actin polymerization. *Mol Cell Biol* 33, 4294–4307.
- Sasaki H, Nagura K, Tobioka H, Kotani K, Sasaki T (1995). Cloning and characterization of cell adhesion kinase β , a novel protein-tyrosine kinase of the focal adhesion kinase subfamily. *J Biol Chem* 270, 21206–21219.
- Seoh ML, Ng CH, Yong J, Lim L, Leung T (2003). ArhGAP15, a novel human RacGAP protein with GTPase binding property. *FEBS Lett* 539, 131–137.
- Siliceo M, Garcia-Bernal D, Carrasco S, Diaz-Flores E, Coluccio Leskow F, Teixido J, Kazanietz MG, Merida I (2006). $\beta 2$ -chimaerin provides a diacylglycerol-dependent mechanism for regulation of adhesion and chemotaxis of T cells. *J Cell Sci* 119, 141–152.
- Svensson L, Howarth K, McDowall A, Patzak I, Evans R, Ussar S, Moser M, Metin A, Fried M, Tomlinson I, Hogg N (2009). Leukocyte adhesion deficiency-III is caused by mutations in KINDLIN3 affecting integrin activation. *Nat Med* 15, 306–312.
- Thelen M, Stein JV (2008). How chemokines invite leukocytes to dance. *Nat Immunol* 9, 953–959.
- Tokiwa G, Dikic I, Lev S, Schlessinger J (1996). Activation of Pyk2 by stress signals and coupling with JNK signaling pathway. *Science* 273, 792–794.
- Tuosto L, Michel F, Acuto O (1996). p95^{av} associates with tyrosine-phosphorylated SLP-76 in antigen-stimulated T cells. *J Exp Med* 184, 1161–1166.
- Turner M, Billadeau DD (2002). VAV proteins as signal integrators for multi-subunit immune-recognition receptors. *Nat Rev Immunol* 2, 476–486.
- Tybulewicz VL (2005). Vav-family proteins in T-cell signalling. *Curr Opin Immunol* 17, 267–274.
- van Seventer GA, Mullen MM, van Seventer JM (1998). Pyk2 is differentially regulated by $\beta 1$ integrin- and CD28-mediated co-stimulation in human CD4⁺ T lymphocytes. *Eur J Immunol* 28, 3867–3877.
- Wang H, Liu H, Lu Y, Lovatt M, Wei B, Rudd CE (2007). Functional defects of SKAP-55-deficient T cells identify a regulatory role for the adaptor in LFA-1 adhesion. *Mol Cell Biol* 27, 6863–6875.
- Wang H, Moon EY, Azouz A, Wu X, Smith A, Schneider H, Hogg N, Rudd CE (2003). SKAP-55 regulates integrin adhesion and formation of T cell-APC conjugates. *Nat Immunol* 4, 366–374.
- Wu J, Motto DG, Koretzky GA, Weiss A (1996). Vav and SLP-76 interact and functionally cooperate in IL-2 gene activation. *Immunity* 4, 593–602.
- Xiong W, Parsons JT (1997). Induction of apoptosis after expression of PYK2, a tyrosine kinase structurally related to focal adhesion kinase. *J Cell Biol* 139, 529–539.
- Xiong WC, Macklem M, Parsons JT (1998). Expression and characterization of splice variants of PYK2, a focal adhesion kinase-related protein. *J Cell Sci* 111, 1981–1991.
- Zheng C, Xing Z, Bian ZC, Guo C, Akbay A, Warner L, Guan JL (1998). Differential regulation of Pyk2 and focal adhesion kinase (FAK). The C-terminal domain of FAK confers response to cell adhesion. *J Biol Chem* 273, 2384–2389.