



**UNIVERSITAT DE BARCELONA  
FACULTAT DE BIOLOGIA**

**Departament de Biologia Cel·lular**

# **Expressió i funció de sindecà-2 en limfòcits T CD4<sup>+</sup> humans**

**Tesi presentada per  
Trini Teixé Ferran**

**Per optar al grau de  
DOCTORA**

**Directors: Dr. Enric Espel Masferrer  
Dr. Manuel Reina del Pozo**

Programa de doctorat en Biologia cel·lular i molecular  
Bienni: 2005-2007

Vist-i-plau dels directors,

La interessada,

**Dr. Enric Espel**

**Dr. Manuel Reina**

**Trini Teixé Ferran**

**Barcelona  
Desembre, 2009**



# ÍNDIX

ABREVIATURES .....	1
--------------------	---

I. INTRODUCCIÓ.....	5
---------------------	---

1. ELS SINDECANS.....	7
1.1. <i>Proteoglicans heparà sulfat (HSPGs)</i> .....	7
1.2. <i>Família de sindecans</i> .....	10
1.3. <i>Estructura molecular dels sindecans</i> .....	11
1.3.1. Organització genòmica.....	11
1.3.2. Estructura proteica.....	11
1.3.2.1. El nucli o core proteic.....	11
1.3.2.2. Les cadenes de glucosaminoglicans (GAGs).....	14
1.4. <i>Propietats bioquímiques dels sindecans</i> .....	15
1.4.1. Escissió del domini extracel·lular.....	15
1.4.2. Oligomerització mediada pel nucli proteic.....	16
1.4.3. Fosforilació del domini citoplasmàtic dels sindecans.....	16
1.4.4. Localització dels sindecans a la membrana.....	17
1.5. <i>Regulació de l'expressió de sindecans</i> .....	17
1.6. <i>Funcions dels sindecans</i> .....	18
1.6.1. Funcions dels sindecans en el Desenvolupament.....	18
1.6.2. Sindecà-1 i les interaccions cèl·lula-matriu.....	19
1.6.3. Sindecà-2 i la senyalització de TGFβ.....	20
1.6.4. Sindecà-3 i senyalització de factors de creixement.....	21
1.6.5. Sindecà-4, senyalització d'FGF i la matriu extracel·lular.....	21
1.6.6. Els sindecans en la inflamació.....	22
2. SINDECÀ-2.....	26
2.1. <i>Expressió</i> .....	26
2.2. <i>Funció biològica</i> .....	27
2.3. <i>Antecedents al laboratori del treball amb sindecans</i> .....	29
3. ELS LIMFÒCITS.....	30
3.1. <i>El receptor antigènic de la cèl·lula T (TCR/CD3)</i> .....	31
3.2. <i>Fenòmens d'interacció cel·lular</i> .....	31
3.2.1. Molècules CD4 i CD8.....	32
3.2.2. Molècules CD2.....	33
3.2.3. Molècules CD28.....	33
3.3. <i>Diferenciació i maduració dels limfòcits T</i> .....	33
3.4. <i>Activació dels limfòcits T CD4<sup>+</sup></i> .....	35
3.5. <i>Vies de senyalització intracel·lular induïdes pel complex TCR/CD3</i> .....	38
3.6. <i>La via de les MAPK</i> .....	40
3.6.1. La via d'ERK1/2.....	41
3.6.2. La via de JNK.....	42
3.6.3. La via de p38.....	43

3.6.4. La via d'ERK5 .....	44
3.7. <i>Factors de transcripció</i> .....	45
3.8. <i>Cèl·lules T reguladores i anèrgia</i> .....	47
<b>II. HIPÒTESI I OBJECTIUS .....</b>	<b>49</b>
<b>III. MATERIAL I MÈTODES .....</b>	<b>53</b>
<b>1. ANTICOSSOS I REACTIUS .....</b>	<b>55</b>
<b>2. CÈL·LULES I CULTIUS CEL·LULARS .....</b>	<b>56</b>
2.1. <i>Limfòcits T CD4</i> .....	56
2.2. <i>Cèl·lules 300.19</i> .....	56
2.3. <i>Cèl·lules Jurkat</i> .....	57
2.4. <i>Cèl·lules COS</i> .....	57
2.5. <i>Cèl·lules Huvec</i> .....	57
2.6. <i>Cèl·lules HMEC</i> .....	57
<b>3. PRODUCCIÓ D'ANTICOSSOS MONOCLONALS ANTI-SINDECÀ-2 .....</b>	<b>58</b>
3.1. <i>Transfecció estable de cèl·lules 300.19 amb el gen de sindecà-2</i> .....	58
3.1.1. Anàlisi dels clons transfectats .....	59
3.1.1.1. Lisat cel·lular .....	59
3.1.1.2. Dot-blot .....	59
3.1.1.3. Immunocitoquímica dels clons seleccionats .....	60
3.1.1.4. RT-qPCR dels clons seleccionats .....	60
3.1.1.5. Citometria dels clons seleccionats .....	60
3.2. <i>Immunització</i> .....	60
3.3. <i>Fusió cel·lular</i> .....	61
3.3.1. <i>Obtenció i preparació de les cèl·lules feeders</i> .....	61
3.3.2. <i>Obtenció dels esplenòcits</i> .....	62
3.3.3. <i>Obtenció de les cèl·lules del mieloma (NS-1)</i> .....	62
3.3.4. <i>Fusió</i> .....	62
3.4. <i>Selecció en medi HAT</i> .....	63
3.5. <i>Selecció dels hibridomes d'interès</i> .....	63
3.5.1. <i>Citometria de flux en selecció d'hibridomes</i> .....	64
3.5.2. <i>Transfecció transitòria en cèl·lules COS</i> .....	64
3.6. <i>Cultiu secundari</i> .....	65
3.7. <i>Subclonatge dels hibridomes mitjançant dilució límit</i> .....	65
3.8. <i>Expansió dels hibridomes</i> .....	65
3.9. <i>Congelació dels hibridomes</i> .....	66
3.10. <i>Purificació d'anticossos</i> .....	66
3.11. <i>Biotinilació d'anticossos</i> .....	67
<b>4. PREPARACIÓ DE LIMFÒCITS T HUMANS .....</b>	<b>67</b>
<b>5. CITOMETRIA DE FLUX .....</b>	<b>68</b>
<b>6. SEPARACIÓ CEL·LULAR (FACS) .....</b>	<b>69</b>

7. SEPARACIÓ CEL·LULAR PER COLUMNES DE CROMATOGRAFIA D'AFINITAT .....	70
8. REACCIÓ LIMFOCITÀRIA MIXTA .....	70
9. ACTIVACIÓ DE LIMFÒCITS EN PLAQUES RECOBERTES .....	71
10. ACTIVACIÓ DE LIMFÒCITS AMB ANTICOSSOS BIOTINATS I BOLES DE STREPTAVIDINA-SEPHAROSA .....	72
11. LISI CEL·LULAR I DIGESTIÓ AMB HEPARINASA I CHONDROITINASA .....	72
12. ELECTROFORESI DE PROTEÏNES I DETECCIÓ PER <i>WESTERN BLOT</i> .....	73
13. IMMUNOFLUORESCÈNCIA .....	74
14. PCR QUANTITATIVA A TEMPS REAL .....	75
15. ANÀLISI DE CICLE CEL·LULAR .....	77
16. BIOTINILACIÓ DE PROTEÏNES DE MEMBRANA I IMMUNOPRECIPITACIÓ .....	77
17. CONSTRUCCIÓ DE PLASMIDIS .....	78
18. SILENCIAMENT D'ERK5 .....	79
19. SISTEMES DE TRANSFECCIÓ .....	80
19.1. <i>Transfectants transitòris</i> .....	80
19.2. <i>Transfectants estables</i> .....	80
20. ANÀLISI DE L' APOPTOSI MITJANÇANT LA UNIÓ D' ANNEXINA V .....	81
<b>IV. RESULTATS .....</b>	<b>83</b>
1. PRODUCCIÓ D' ANTICOSSOS MONOCLONALS ANTI-SINDECÀ-2 .....	85
1.1. <i>Transfecció estable de cèl·lules 300.19 amb el gen de sindecà-2</i> .....	85
1.2. <i>Obtenció d' anticossos monoclonals dirigits contra sindecà-2</i> .....	87
1.3. <i>Caracterització de l' anticòs SD2.1.186.CL.C</i> .....	89
1.3.1. Anàlisi per citometria de flux .....	89
1.3.2. Anàlisi per WB i IP .....	90
1.4. <i>Caracterització de l' anticòs SD2.1.51.CL.C</i> .....	90
1.4.1. Anàlisi per IP .....	90
2. EXPRESSIÓ DELS SINDECANS EN CÈL·LULES T CD4 HUMANES .....	92
2.1. <i>Sindecà-2 i sindecà-4 s' expressen en limfòcits T CD4 humans durant l' activació cel·lular</i> .....	93
2.2. <i>Sindecà-2 i sindecà-4 s' expressen en cèl·lules T CD4 verges i memòria</i> .....	100
3. ELS SINDECANS ATUREN L' ACTIVACIÓ DE LA CÈL·LULA T .....	101

3.1. <i>La lligació de sindecà-2 i -4 comporta la inhibició de l'activació i proliferació de la cèl·lula T</i> .....	101
3.2. <i>Sindecà-2 atura el cicle cel·lular en cèl·lules T</i> .....	105
3.3. <i>Sindecà-2 inhibeix la producció de les citocines IL-2, IL-10, TNF i TGFβ en limfòcits TCD4 humans</i> .....	106
3.4. <i>Sindecà-2 inhibeix la producció de la citocina IL-2 en Jurkat</i> .....	108
<b>4. LA INHIBICIÓ DE LA MAPK P38 BLOQUEJA L'EXPRESSIÓ DE SINDECÀ-2</b> .....	111
<b>5. SENYALITZACIÓ INDUÏDA PER SINDECÀ-2</b> .....	113
5.1. <i>Sindecà-2 indueix la fosforilació d'una proteïna que té el mateix motiu de fosforilació que ERK1/2 en T CD4 i en Jurkat</i> .....	113
5.2. <i>El bloqueig d'ERK5 en Jurkat reverteix la inhibició de IL-2</i> .....	116
<b>V. DISCUSSIÓ</b> .....	119
<b>1. ESTUDI DE L'EXPRESSIÓ DE SINDECÀ-2 I -4 EN LIMFÒCITS T CD4<sup>+</sup> HUMANS</b> ....	121
1.1. <i>L'expressió de sindecà-2 i -4 té un paper en la regulació de la resposta immune</i> .....	123
1.2. <i>L'expressió de sindecà-2 en limfòcits T pot afavorir la infecció de certs virus</i> .....	124
<b>2. ESTUDI DEL BLOQUEIG DE L'ACTIVACIÓ T CAUSAT PER L'EXPRESSIÓ DE SINDECÀ-2 I 4</b> .....	125
2.1. <i>La unió de sindecà-2 i -4 mitjançant anticossos bloqueja la proliferació. Sindecà-2 és capaç d'aturar el cicle cel·lular</i> .....	125
2.2. <i>L'expressió de sindecà-2 inhibeix la producció de citocines en cèl·lules T.</i>	127
<b>3. LA INHIBICIÓ DE LA MAPK P38 BLOQUEJA L'EXPRESSIÓ DE SINDECÀ-2</b> .....	130
<b>4. ESTUDI DE LA SENYALITZACIÓ INDUÏDA PER SINDECÀ-2</b> .....	131
<b>VI. CONCLUSIONS</b> .....	133
<b>VII. BIBLIOGRAFIA</b> .....	137
<b>ANNEX</b> .....	155

## ABREVIATURES

<b>AP-1</b>	Proteïna activadora 1 ( <i>Activating protein-1</i> )
<b>APC</b>	Cèl·lula presentadora d'antigen ( <i>Antigen Presenting Cell</i> )
<b>APS</b>	Persulfat d'amoni
<b>BCA</b>	<i>Bicinchoninic acid</i>
<b>BMK1</b>	<i>Big MAP Kinase 1</i>
<b>CD</b>	<i>Cluster of Differentiation</i>
<b>cDNA</b>	ADN de cadena complementària ( <i>Complementary DNA</i> )
<b>CHO</b>	<i>Chinese hamster ovary</i>
<b>Chs</b>	Chondroitin sulfat
<b>Ct</b>	Cicle llindar ( <i>Threshold Cycle</i> )
<b>CTLA-4</b>	Antígen 4 citotòxic associat al limfòcit T ( <i>Cytotoxic T lymphocyte antigen 4</i> )
<b>Da</b>	Dalton
<b>DAG</b>	Diacilglicerol
<b>DC-HIL</b>	<i>Dendritic cell-associated heparin sulfate proteoglycan-dependent integrin ligand</i>
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
<b>DN</b>	Doble negatiu
<b>DNA</b>	Àcid Desoxirribonucleic ( <i>Deoxyribonucleic acid</i> )
<b>DP</b>	Doble positiu
<b>ECGS</b>	<i>Endothelial cell growth supplement</i>
<b>ECL</b>	<i>Enhanced Chemiluminescence Substrate</i>
<b>ECM</b>	Matriu extracel·lular ( <i>Extracellular matrix</i> )
<b>EGF</b>	Factor de creixement epidèrmic ( <i>Epidermal growth factor</i> )
<b>Eph</b>	Ephrina
<b>ERK1/2</b>	<i>Extracellular Regulated Kinase</i>
<b>FACS</b>	<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i>
<b>FCS</b>	Sèrum fetal boví ( <i>Fetal calf serum</i> )
<b>FGF2</b>	Factor de creixement de fibroblasts-2 ( <i>Fibroblast growth factor-2</i> )
<b>FITC</b>	<i>Fluorescein</i>

<b>G418</b>	Geneticina
<b>GAG</b>	Glicosaminoglicans
<b>Gal</b>	Galactosa
<b>GFP</b>	Proteïna verda fluorescent ( <i>Green Fluorescent Protein</i> )
<b>GLcA</b>	Àcid glucorònic
<b>GlcNAc</b>	N-acetilglucosamina
<b>Gly</b>	Glicina
<b>GM-CSF</b>	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
<b>GPCR</b>	Receptor cel·lular associat a proteïna G ( <i>G protein-coupled receptor</i> )
<b>GPI</b>	Glicosilfosfatidilinositol
<b>h</b>	hores
<b>HA</b>	Hemaglutinina
<b>HAT</b>	Hipoxantina-Aminopterina-Timidina
<b>HGPRT</b>	Hipoxantina-guanosina fosforribosiltransferasa
<b>HIV</b>	Virus de la immunodeficiència humana ( <i>Human immunodeficiency virus</i> )
<b>HMEC</b>	Cèl·lules endotelials de la microvasculatura humana ( <i>Human microvascular endothelial cells</i> )
<b>HRP</b>	Peroxidasa de rave ( <i>Horseradish peroxidase</i> )
<b>HS</b>	Heparà sulfat
<b>HSPG</b>	Proteoglicans heparà-sulfat ( <i>Heparan Sulphate Proteoglycans</i> )
<b>HT</b>	Hipoxantina-Timidina
<b>HTLV-1</b>	<i>Human T-cell leukemia virus type 1</i>
<b>HUVEC</b>	Cèl·lules endotelials de vena de cordó umbilical humà ( <i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i> )
<b>ICAM</b>	<i>Inter-cellular adhesion molecule</i>
<b>IE</b>	<i>Immediate early</i>
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	Interferó gamma
<b>Ig</b>	Immunoglobulines
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IP</b>	Immunoprecipitació
<b>IP3</b>	Inositol Trifosfat ( <i>Inositol 1,4,5 triphosphate</i> )
<b>ITAM</b>	Motiu d'activació de l'immunoreceptor basat en tirosina ( <i>Immunoreceptor tyrosine based activation motif</i> )
<b>JNK</b>	<i>Jun NH2 Terminal Kinase</i>



<b>L-gln</b>	L-glutamina
<b>LPS</b>	Lipopolisacàrid
<b>mAb</b>	<i>Monoclonal Antibody</i>
<b>MAPK</b>	Proteïnes cinasa activades per mitògens ( <i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i> )
<b>MAPKK</b>	<i>MAPK kinase</i>
<b>MAPKKK</b>	<i>MAPKK kinase</i>
<b>MEK</b>	<i>Mitogen extracellular signal-related kinase</i>
<b>MHC</b>	Complex major d'histocompatibilitat ( <i>Major Histocompatibility complex</i> )
<b>min</b>	minuts
<b>MLR</b>	<i>Mixed Lymphocyte Reaction</i>
<b>mRNA</b>	RNA missatger ( <i>Messenger RNA</i> )
<b>MW</b>	Pes molecular ( <i>Molecular Weight</i> )
<b>NF-κB</b>	Factor nuclear κB
<b>o/n</b>	<i>over/night</i>
<b>P/S</b>	Penicil·lina i estreptomina
<b>PAGE</b>	Elestroforesi en gel d'acrilamida
<b>PBLs</b>	Limfòcits de sang perifèrica ( <i>Peripheral Blood Lymphocytes</i> )
<b>PCR</b>	Reacció en cadena de la polimerasa ( <i>Polimerase Chain Reaction</i> )
<b>PDGF</b>	Factor de creixement derivat de plaquetes ( <i>Platelet-derived growth factor</i> )
<b>PDZ</b>	<i>Postsynaptic density protein, Disks large, Zonula occludens domains</i>
<b>PE</b>	<i>Phycoerythrin</i>
<b>PG</b>	Proteoglicà
<b>PGE2</b>	Prostaglandina E2
<b>PHA</b>	Fitohemaglutinina ( <i>Phytohaemagglutinin</i> )
<b>PIP2</b>	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfat
<b>PKC</b>	Proteïna cinasa C
<b>PLC</b>	Fosfolipasa C
<b>PMA</b>	<i>Phorbol Myristate Acetate</i>
<b>PMSF</b>	<i>Phenylmethanesulphonylfluoride</i>
<b>Pro</b>	Prolina
<b>PSGL-1</b>	<i>P-selectin glycoprotein ligand-1</i>
<b>PTK</b>	Proteïna Tirosina Cinasa

<b>RNA</b>	Àcid ribonuclèic ( <i>Ribonucleic Acid</i> )
<b>rpm</b>	revolucions per minut
<b>RT-qPCR</b>	<i>Real-Time quantitative Polymerase Chain Reaction</i> (PCR quantitativa a temps real)
<b>s</b>	segons
<b>SD</b>	Desviació estàndard ( <i>Standard Deviation</i> )
<b>SDS</b>	Sodi Dodecilsulfat
<b>Ser</b>	Serina
<b>SH2</b>	Domini 2 d'homologia amb la cinasa Src ( <i>Src homology domain</i> )
<b>shRNA</b>	<i>Small hairpin RNA</i>
<b>TA</b>	Temperatura ambient
<b>TACI</b>	<i>Transmembrane activator and calcium-modulator and cyclophilin ligand interactor</i>
<b>TBS</b>	Tampó Tris salí ( <i>Tris buffered saline</i> )
<b>Tc</b>	T citotòxics
<b>TCR</b>	Receptor de la cèl·lula T ( <i>T Cell Receptor</i> )
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-tretametiletlenodiamida
<b>TGFβ</b>	<i>Transforming Growth Factor beta</i>
<b>Th</b>	<i>T helpers</i>
<b>Thr</b>	Threonina
<b>TIMP</b>	Inhibidor Tissular de Metal·loproteinasses
<b>TNFR</b>	Receptor de TNF ( <i>Tumor necrosis factor receptor</i> )
<b>TNFα</b>	<i>Tumor Necrosis Factor α</i>
<b>Tris</b>	Trietanolamina
<b>Tyr</b>	Tirosina
<b>VEGF</b>	Factor de creixement endotelial vascular ( <i>Vascular endothelial growth factor</i> )
<b>WB</b>	<i>Western Blot</i>
<b>Xyl</b>	Xilosa
<b>ZAP-70</b>	Proteïna de 70 KDa associada a la cadena zeta ( <i>Zeta chain associated protein 70</i> )

# **I. INTRODUCCIÓ**



# I. INTRODUCCIÓ

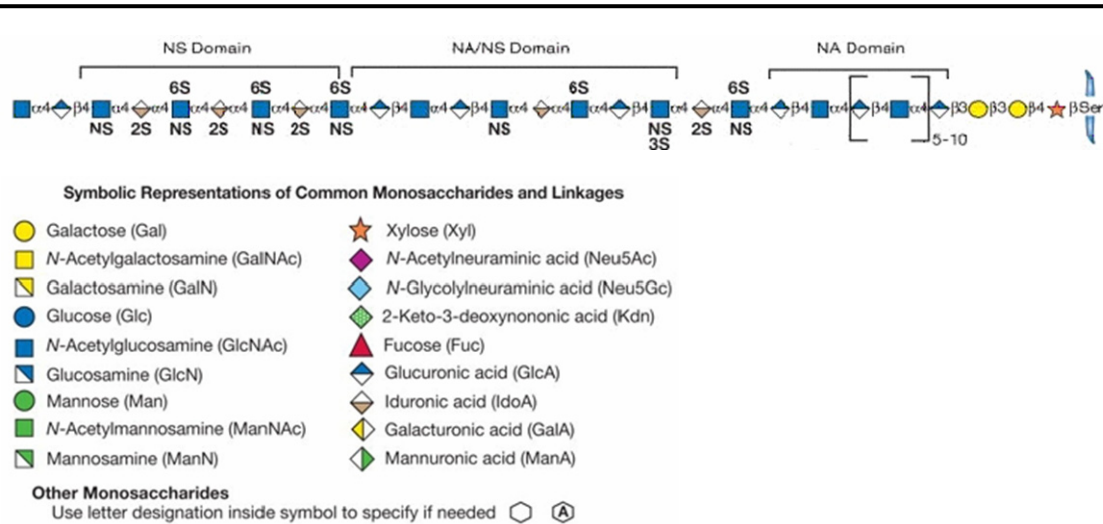
## **I.1. Els Sindecans**

Hi ha molècules de l'ambient extracel·lular que dirigeixen la proliferació cel·lular, la diferenciació, la migració i canvis en la forma de la cèl·lula. Aquests components exerceixen els seus efectes en les cèl·lules mitjançant la unió a receptors altament específics de la superfície cel·lular, els quals, quan són ocupats, són internalitzats o condueixen senyals intracel·lulars. Aquests receptors transmeten senyals dins la cèl·lula i sovint utilitzen heparà sulfats (HS) de la superfície cel·lular per reconèixer els seus lligands o per regular la seva activació. Les cadenes d'HS són estructuralment heterogènies i tenen la capacitat d'unir-se a un divers repertori de proteïnes sota condicions fisiològiques. Les cadenes HS són presents en varies proteïnes de superfície cel·lular però es troben de manera constitutiva en les dues famílies més importants de proteoglicans (PGs) units a membrana, els sindecans i els glipicans. Via les seves cadenes d'HS, els sindecans i glipicans poden unir-se a una gran varietat de lligands extracel·lulars tant solubles com insolubles (Bernfield et al., 1999).

### **I.1.1. Proteoglicans Heparà Sulfat (HSPGs)**

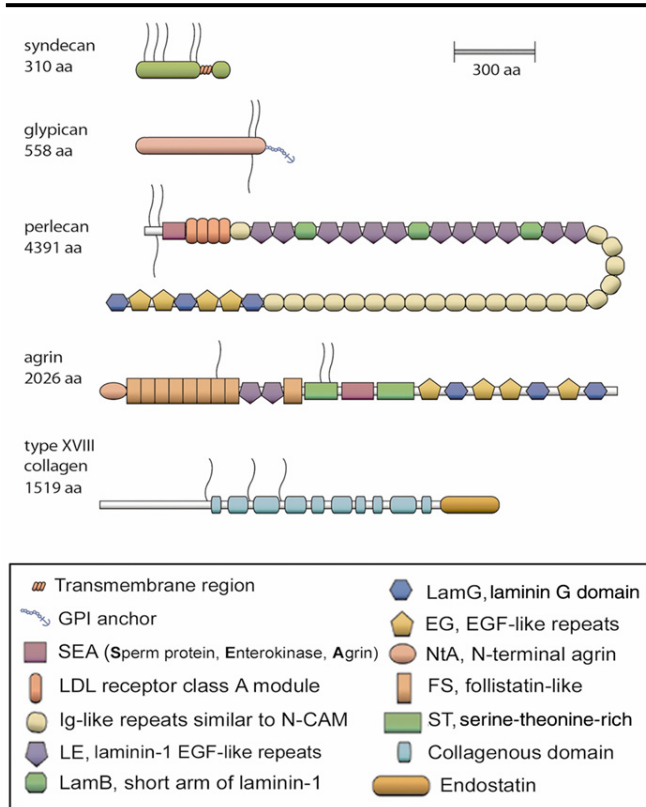
El terme Proteoglicà heparà sulfat (HSPG) es refereix a una estructura dicotòmica, una proteïna unida a una cadena de glucosaminoglicà caracteritzada per la unió d'un arsenal de disacàrids. Ambdós, el nucli proteic i les cadenes laterals experimenten una sèrie de modificacions que els dota d'un paper molt complex (Iozzo, 1998). El producte final és un component sofisticat que pot fluctuar en mida, estructura i biologia (Bernfield et al., 1999; Iozzo, 2000; Lander and Selleck, 2000; Perrimon and Bernfield, 2000). Hi ha qui creu que el que és realment important són els HS essent el nucli proteic un simple transportador i qui opina que els HS no jugarien cap paper si no fos per la proteïna. El cert és en les dues hipòtesis. Ambdues estructures posseeixen característiques úniques que en alguns aspectes actuen de manera sinèrgica per donar la màxima força de senyalització i activitat biològica (Iozzo, 2001). Les cadenes d'HS es sintetitzen per (a) la formació de la regió d'anclatge (el tetrasacàrid: -GLcA-Gal-Gal-Xyl-Ser) de les cadenes HS a la proteïna, (b) la generació de la cadena polisacàridica, i (c) la

modificació enzimàtica de les cadenes per formar les seqüència de polisacàrids específics i la organització estructural responsable per la unió de proteïnes (Lindahl et al., 1998) (Fig.I.1.).



**Figura I.1. Cadenes HS.** Les cadenes d'HS consten de diferents dominis que varien en el grau de modificació per sulfatació i epimerització. (NS) Dominis N-sulfatats; (NA/NS) Dominis de sulfatació variable; (NA) Dominis N-acetilats. Els dominis modificats formen llocs d'unió per diversos lligands. (Esquema adaptat de *The Consortium of Glycobiology Editors, La Jolla, California*)

Es distingeixen cinc classes diferents de HSPGs: els HSPGs associats a la cèl·lula inclouen els sindecans integrats a la membrana i els glicoproteïnes ancorats al GPI (glycosyl-phosphatidylinositol) i els HSPGs pericel·lulars o solubles inclouen el perlecan, l'agrinina i el col·lagen de tipus XVIII (Fig.I.2.). A més a més existeixen variants per *splicing* dels nuclis proteics (Iozzo, 2001).



**Figura I.2. Representació esquemàtica dels cinc prototips d'HSPGs.** La mida és proporcional al número de residus aminoacídics. L'esquema linear no té en compte dominis globulars o altre tipus de plegament de la proteïna. Les cadenes HS estan representades com a línies ondulades (Iozzo, 2001).

Les cadenes d'HS de la superfície cel·lular estan majoritàriament ancorades als nuclis proteics de sindecans i glipicans. Aquests nuclis proteics determinen la proximitat de les cadenes HS a la superfície cel·lular; quan, on i quin grau de cadenes d'HS s'expressen; i l'assiduïtat i el mecanisme de renovació (Bernfield et al., 1999).

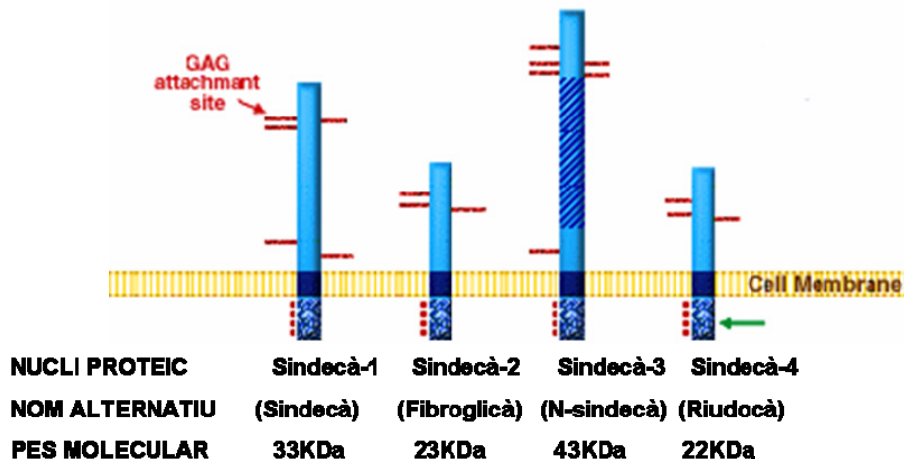
Els HSPGs de la superfície cel·lular poden intensificar la formació de complexes de senyalització receptor-ligand, poden dirigir els lligands dins la cèl·lula per la seva degradació o reciclatge i poden ser escindits (*shedding*) de la superfície cel·lular com a PGs solubles. Aquesta escissió pot ser part del seu moviment de renovació però també pot ser accelerada per efectors, generant potents inhibidors solubles d'HSPGs i fent que les cèl·lules siguin menys sensibles als seus lligands (Bernfield et al., 1999).

Els proteoglicans estan presents a cada compartiment tissular, a les matrius extracel·lulars, a les superfícies cel·lulars, intracel·lulars en grànuls i fins i tot en el nucli. Com a molècules de matriu extracel·lular (ECM) i receptors d'adhesió, la diversitat dels proteoglicans ha augmentat amb l'evolució dels vertebrats, i alguns proteoglicans són essencials pel desenvolupament i la funció de l'esquelet vertebrat, el sistema immunitari i el sistema nerviós central (Perrimon and Bernfield, 2000; Selleck, 2000).

### I.1.2. Família de sindecans.

Els sindecans són proteoglicans heparà sulfat transmembrana de tipus I expressats en un patró específic del tipus cel·lular i de l'estadi de desenvolupament, els quals participen en diversos processos biològics (Bernfield et al., 1999; Couchman, 2003; Iozzo and San Antonio, 2001; Rapraeger, 2001). Són una família formada per quatre membres (sindecà -1, -2, -3 i -4) i tenen diverses funcions que inclouen la participació en l'adhesió cèl·lula-cèl·lula, la regulació de la senyalització induïda per factors de creixement units a les cadenes HS, i la organització de l'adhesió i senyalització cèl·lula-matriu (Rapraeger, 2000).

Tots els tipus cel·lulars expressen almenys un representant dels sindecans, però és habitual la presència de més d'una de les seves formes. En general, l'expressió de sindecà-1 (CD138) és molt abundant en cèl·lules epitelials, el sindecà-2 (o fibroglicà) predomina en fibroblasts, el sindecà-3 (o N-sindecà) es localitza de manera quasi exclusiva en cèl·lules neuronals i el sindecà-4 que s'expressa de manera ubiqüa en molts teixits tot i que no és molt abundant en cap tipus cel·lular concret (David, 1993; Zimmermann and David, 1999) (Fig.I.3).



**Figura I.3. Família de sindecans.** Els llocs d'ancoratge de glucosaminoglicans (GAGs) potencials i indentificats estan representats com a línies vermelles. També està representat el domini transmembrana (blau fosc) i el domini intracel·lular amb les tirosines conservades (punts vermells), i també el domini de sindecà-3 ric en Thr, Ser i Pro (línies inclinades). (Esquema adaptat de (Rosenberg et al., 1997)).



### **I.1.3. Estructura molecular dels sindecans.**

Tots els sindecans presenten una estructura general similar, un nucli proteic ancorat a la membrana plasmàtica, al qual s'uneixen diverses cadenes de glucosaminoglicans (GAGs). Encara que trobem regions molt conservades, els quatre representants han evolucionat de manera força divergent, sobretot en el seu domini extracel·lular, fet que els ha permès desenvolupar funcions especialitzades (Carey, 1997; Chakravarti and Adams, 2006).

#### **I.1.3.1. Organització genòmica.**

El nucli proteic dels sindecans comprèn una família de quatre gens en mamífers. La seva localització cromosòmica, organització exònica i seqüència, els relaciona amb el sindecà únic de *Drosophila* (sindecà D) suggerint que la família de gens va sorgir per duplicació gènica i una evolució divergent a partir d'un únic gen ancestral, i que els sindecans -1 i -3 i els sindecans -2 i -4 representen subfamílies (Bernfield et al., 1992). Cada producte gènic correspon a una única proteïna transmembrana de tipus I amb un domini extracel·lular de mida variable que conté cadenes HS ancorades covalentment a la zona distal de la membrana plasmàtica (Bernfield et al., 1999).

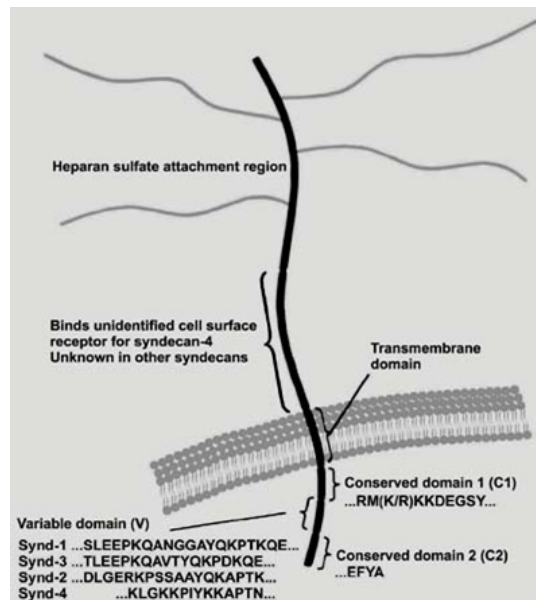
Els gens que codifiquen pels sindecans estan formats per cinc exons. L'exó 1 codifica per la regió 5'-UTR (no traduïda) i el pèptid senyal, l'exó 2 codifica el *cluster* de llocs d'unió a GAG localitzat a l'extrem N-terminal, l'exó 3 codifica la regió espaciadora del domini extracel·lular, que és la regió que presenta una variabilitat més elevada, l'exó 4 codifica el *cluster* de llocs d'unió a GAG més proximal a la membrana i 10 parells de bases de la regió transmembrana i l'exó 5 codifica la resta de la regió transmembrana, el domini C-terminal i la regió 3'-UTR (Carey, 1997).

#### **I.1.3.2. Estructura proteica.**

##### **I.1.3.2.1. El nucli o *core* proteic**

La organització del nucli proteic, de la mateixa manera que la seva organització gènica, comparteix moltes característiques en tots els sindecans.

De manera addicional a una seqüència senyal, el nucli proteic dels sindecans conté almenys vuit dominis funcionals (Bernfield et al., 1992). Els dominis extracel·lulars (ectodominis) estan entre les proteïnes que més ràpidament han divergit en vertebrats amb l'excepció de les seves regions per (1) ancoratge de glucosaminoglicans (GAGs), (2) la interacció cel·lular, (3) el domini proteolític i (4) la regió d'oligomerització. Els dominis transmembrana són relativament estables en l'evolució ja que només uns pocs aminoàcids difereixen entre les seqüències de vertebrats. Aquests dominis contenen (5) regions per interaccions amb altres proteïnes de membrana i per la localització en diferents compartiments de membrana. Els dominis citoplasmàtics contenen dues regions invariables, (6) una regió comú pròxima a la membrana (C1) que conté una serina i una tirosina i (7) una regió comú C-terminal (C2), ambdues regions constants estan separades per (8) una regió variable (V) quant a longitud i composició. La regió V específica dels diferents sindecans està altament conservada entre espècies de vertebrats. Aquestes relacions suggereixen que cada membre de la família dels sindecans interacciona amb les mateixes proteïnes (domini transmembrana i regions C) encara que també té interaccions úniques (ectodomini i regió V) (Bernfield et al., 1999) (Fig I.4.).



**Figura I.4. Estructura del nucli proteic dels sindecans.** Els dominis extracel·lulars dels 4 sindecans de vertebrats contenen diversos llocs d'ancoratge de cadenes d'HS. El domini transmembrana està altament conservat entre els membres de la família. Els dominis citoplasmàtics contenen dues regions (C1 i C2) altament conservades a cadascun dels quatre sindecans i flanquegen una regió

central variable (V) que és diferent en cada membre de la família. Synd = sindecà. (Lopes et al., 2006).

---

### **Ectodomini**

Els ectodomini contenen dues regions per la unió de GAG. Una regió propera a l'extrem N-terminal que conté dues o tres seqüències consecutives Ser-Gly flanquejades per residus hidrofòbics i àcids (Bourdon and Ruoslahti, 1989; Esko and Zhang, 1996), porta constantment cadenes d'HS. Mentrestant, els sindecans -1 i -3 contenen també una regió propera a la membrana plasmàtica (portadora de seqüències Ser-Gly) que pot servir com a lloc d'ancoratge per cadenes ChS (Chondroitin sulfats). El sindecà-4 també pot unir cadenes de ChS, tot i que ho fa pel domini N-terminal (Bernfield et al., 1999; Kokenyesi and Bernfield, 1994).

Tots els sindecans estudiats poden ser escindits (*shedding*) de la superfície cel·lular per mecanismes proteolítics en una zona pròxima a la membrana plasmàtica (Kim et al., 1994). L'escissió dels ectodomini dels sindecans està altament regulada i pot ser accelerada per diversos efectors cel·lulars, que, curiosament, no acostumen a unir HS. La zona de reconeixement pel tall de l'ectodomini és un mono o dipèptid bàsic adjacent a la membrana plasmàtica en els sindecans de vertebrats (Subramanian et al., 1997).

### **Domini transmembrana**

El domini transmembrana pot localitzar els sindecans dins de discrets microdomini de la membrana. Per exemple, el sindecà-1 polaritza a la superfície basolateral de l'epiteli a través del seu domini EFYA (Maday et al., 2008; Rapraeger et al., 1986), mentre el sindecà-4 es localitza a les adhesions focals (Woods and Couchman, 1994).

Els receptors de membrana que activen vies de senyalització intracel·lular normalment oligomeritzen (Klemm et al., 1998), la oligomerització dels sindecans es dona a través d'aquest domini transmembrana. La primera sospita d'oligomerització en sindecans es va donar al veure que el pes molecular aparent de nuclis proteics lliures de GAGs en gels de poliacrilamida excedia el seu pes real (Saunders et al., 1989). Tots els sindecans són capaços de formar oligòmers (especialment dímers) resistents al SDS. La oligomerització, al incrementar la proximitat entre els nuclis proteics dels sindecans, augmenta la seva superfície d'interacció i incrementa la probabilitat d'interacció amb altres proteïnes de membrana (Bernfield et al., 1999; Klemm et al., 1998).

### **Domini citoplasmàtic**

El domini citoplasmàtic, tot i ser relativament curt, té unes regions importants. Es poden diferenciar tres zones: dues de constants (C1 i C2) molt conservades en tots els sindecans que flanquegen una regió variable (V) que és específica de cada representant. El domini C1, immediatament adjacent a la membrana plasmàtica, és idèntic en els quatre sindecans de mamífer. Se l'involucra en processos de dimerització i en la unió de diferents proteïnes intracel·lulars com ezrina, tubulina, la cinasa Src i la contractina (Granes et al., 2003; Granes et al., 2000).

La regió C2, també molt conservada, conté la seqüència d'aminoàcids característica EFYA, que és una seqüència de reconeixement per la unió de proteïnes PDZ. Hi ha varies proteïnes identificades que interaccionen amb el domini d'interacció a PDZ dels sindecans, entre elles hi ha: sintenina, sinectina, sinbindina, i la proteïna serina cinasa dependent de calci/calmodulina (Ethell et al., 2000; Gao et al., 2000).

El domini V és altament heterogeni entre els quatre sindecans de mamífers. Aquesta regió ha estat més àmpliament estudiada en el sindecà-4 degut a les seves característiques úniques. La regió V de sindecà-4 inclou un lloc d'unió a fosfatidilinositol-4,5-bifosfat (PIP<sub>2</sub>) que està involucrat en la dimerització de sindecà-4. A més a més, el PIP<sub>2</sub> unit a la regió V té un paper molt important en l'activació de PKC $\alpha$ , un enzim que té un rol clau en la senyalització de sindecà-4 (Horowitz and Simons, 1998; Oh et al., 1997a; Oh et al., 1998; Tkachenko et al., 2005).

#### **I.1.3.2.2. Les cadenes de glucosaminoglicans (GAGs)**

L'addició de cadenes de GAGs als sindecans és crítica ja que els proveeix dels llocs d'unió a lligands extracel·lulars. La majoria de cadenes de GAGs afegides als nuclis proteics dels sindecans són del tipus heparà sulfat, tanmateix el sindecà-1 (Rapraeger et al., 1985) i el sindecà-4 (Shworak et al., 1994) són sensibles a ser modificats per cadenes de chondroitin sulfat. L'elecció del tipus de GAG pot tenir importants conseqüències funcionals. Si bé les cadenes de chondroitin sulfat tenen una càrrega neta negativa més elevada que els heparà sulfats, aquests presenten una major afinitat per molts lligands extracel·lulars.

La seqüència consens per l'ancoratge de GAGs és l'aminoàcid serina seguit d'una glicina. L'estructura pel lligament de tetrasacàrids que connecta els heparà sulfat i chondroitin sulfat al nucli proteic és idèntica. Durant la biosíntesi, la selecció dels llocs

d'ancoratge de les cadenes d'heparà sulfat depèn de l'activitat enzimàtica de la  $\alpha$ -*N*-acetylglucosaminyltransferase I, la qual addiciona motius GlcNAc al tetrasacàrid i duu a la síntesi de l'heparà sulfat. L'elongació de les cadenes d'HS segueix amb l'addició seqüencial i alternativa de motius d'àcid glucorònic i GlcNAc. Un cop és construïda la cadena de GAGs, les unitats individuals de sacàrids es sotmeten a reaccions de modificació enzimàtica. Finalment, es duu a terme la O-sulfatació de diversos llocs. La importància d'aquestes modificacions radica en que la unió d'alta afinitat de certs lligands dels heparà sulfats depèn d'un determinat patró de modificació. Diferents tipus cel·lulars poden sintetitzar sindecans amb diferents estructures de GAGs i, en alguns casos, amb activitats funcionals diferents (Carey, 1997).

Les funcions específiques de cada tipus de sindecà poden ser conseqüència de les diferències en la orientació espacial de les cadenes de GAGs en la superfície cel·lular. La principal funció del domini extracel·lular és precisament disposar les cadenes de GAGs en la superfície cel·lular en una orientació particular única per cada sindecà, que els conferirà capacitats diferents per interaccionar amb lligands extracel·lulars o receptors de membrana (Carey, 1997).

#### **I.1.4. Propietats bioquímiques dels sindecans**

##### **I.1.4.1. Escissió del domini extracel·lular**

Un mecanisme habitual de renovació de les proteïnes de membrana implica la seva endocitosi i degradació als lisosomes. Una part important dels sindecans es renova de la superfície cel·lular mitjançant aquest mecanisme. Però els ectodomis dels sindecans són expulsats de la membrana plasmàtica espontàniament per un mecanisme addicional, l'escissió o *shedding* (Carey, 1997).

Els quatre sindecans també poden existir com a HSPGs solubles ja que poden ser proteolíticament separats de la membrana i expulsats a l'ambient extracel·lular (Asundi et al., 2003; Bernfield et al., 1999; Fears et al., 2006; Fitzgerald et al., 2000; Jalkanen et al., 1987; Yang et al., 2007). L'escissió de l'ectodomini no és una propietat única dels sindecans sinó que és extensament utilitzat per secretar molts mediadors inflamatoris (per exemple, citocines, factors de creixement, molècules d'adhesió cel·lular), suggerint, precisament, que l'escissió de l'ectodomini és un mecanisme inflamatori (Arribas and Borroto, 2002; Blobel, 2002; Garton et al., 2006).

L'escissió dels sindecans és un procés regulat que és estimulat *in vitro* per diversos factors inflamatoris, i activat *in vivo* per certes condicions d'inflamació. A més a més, l'escissió dels sindecans està selectivament inhibida per l'inhibidor tissular de les metal·loproteïnases (TIMPs), indicant que les metal·loproteïnases són capaces d'escindir els sindecans (Bartlett et al., 2007).

#### **I.1.4.2. Oligomerització mediada pel nucli proteic**

Els nuclis proteics dels sindecans són propensos a formar dímers lligats de manera no covalent i fins i tot oligòmers. En una electroforesi en gel d'acrilamida on podem observar els nuclis proteics dels sindecans (ja que han estat enzimàticament deglicanats), apareix una fracció significant de nuclis proteics de sindecans que han migrat en forma de dímers resistents al SDS (Carey, 1997). La dimerització és un procés conegut per l'activació de receptors de cinases (Heldin, 1995). El reclutament en l'interior de la membrana també sembla ser d'importància quant l'activació de receptors no catalítics (Chacko et al., 1994; Letourneur and Klausner, 1992) i molècules d'adhesió (Miyamoto et al., 1995a; Miyamoto et al., 1995b).

#### **I.1.4.3. Fosforilació del domini citoplasmàtic dels sindecans**

Les fosforilacions solen ser crucials en la propagació de senyals intracel·lulars. El domini citoplasmàtic dels sindecans conté tres tirosines conservades, una serina conservada i varies serines / threonines no conservades que són susceptibles a fosforilació. Entre les tirosines conservades n'hi ha dues que són en un context favorable per ser fosforilades (Kemp and Pearson, 1990; Pawson, 1995; Songyang et al., 1995). Una està localitzada en la regió C1 dins la seqüència DEGSY i l'altra és a la regió C2 dins la seqüència EFYA. Això fa pensar en la fosforilació com una eina de regulació. Per analogia amb altres sistemes, la fosforilació de tirosines del domini citoplasmàtic dels sindecans pot afavorir llocs de reconeixement per les proteïnes que contenen dominis SH2 i promoure el reclutament de complexes de senyalització a la superfície cel·lular (Zimmermann and David, 1999).

#### **I.1.4.4. Localització dels sindecans a la membrana**

Hi ha evidències que els sindecans estan localitzats en compartiments específics de la membrana plasmàtica i a més a més que els diferents sindecans poden tenir localitzacions diferents (Carey, 1997). Així, els sindecans, poden, per exemple, integrar-se als *lipid raft*, regions de la membrana conegudes per la seva associació amb molècules senyalitzadores, però també amb altres regions especialitzades com els contactes focals, les unions adherents, o les sinapsis.

#### **I.1.5. Regulació de l'expressió de sindecans**

Cada membre de la família dels sindecans té un patró d'expressió temporal i espacial diferent.

El sindecà-1 s'expressa de manera predominant en l'epiteli i els teixits mesenquimals, els sindecà-2 en cèl·lules d'origen mesenquimal i neuronal i en cèl·lules epitelials, el sindecà-3 quasi exclusivament en teixit neuronal i musculoesquelètic, i el sindecà-4 es troba de manera ubiqua en tots els tipus cel·lulars (Couchman, 2003).

Donat el seu paper en afinar nombrosos processos de senyalització, no és d'estranyar que els nivells dels sindecans estiguin estretament regulats. Els factors de creixement tenen un rol important en la regulació de l'expressió dels sindecans. Així, el TNF $\alpha$  regula positivament el sindecà-2 i negativament el sindecà-1 en cèl·lules endotelials (Halden et al., 2004). De manera similar, el TGF- $\beta$ 2 regula positivament el sindecà-4 i negativament el sindecà-1 en cèl·lules epitelials (Dobra et al., 2003). En les cèl·lules musculars llises de l'aorta, el FGF2 indueix l'expressió de sindecà-4 però no la de sindecà-1 o sindecà-2 (Cizmeci-Smith et al., 1997). L'estrès mecànic també és un inductor de l'expressió de sindecà-4 en la musculatura llisa durant l'angiogènesi (Li and Chaikof, 2002). Els nivells de sindecà-4 estan realment regulats positivament en diversos estats de malaltia, incloent el dany arterial (Geary et al., 1995) i l'infart agut de miocardi (Li et al., 1997). Una altra condició associada a un increment pronunciat de l'expressió de sindecà-1 i sindecà-4 és la cicatrització de ferides (Gallo et al., 1996; Oksala et al., 1995). Es coneix poca cosa sobre la regulació de l'expressió de sindecà-2 i sindecà-3. Els nivells de sindecà-2 augmenten durant la transformació d'adipòcits en miofibroblasts, mentre els nivells de sindecà-1, sindecà-3 i sindecà-4 resten constants

(Weiner et al., 1996). El sindecà-3 és fortament regulat durant el desenvolupament (Tkachenko et al., 2005).

### **I.1.6. Funcions dels sindecans**

En aquesta secció es descriuen algunes de les funcions més importants de cada membre dels sindecans.

#### **I.1.6.1. Funcions dels sindecans en el Desenvolupament**

Diferents estudis han anat clarificant el rol que juguen els sindecans durant el procés de desenvolupament. La disrupció en homozigosi del gen de sindecà-1 en ratolins dona una descendència viable. Els ratolins són en gran part normals però mostren una re-epitelització anormalment lenta després d'una lesió (Stepp et al., 2002) i una incrementada adhesió leucocitària (Reizes et al., 2003). El sindecà-1 sembla estar involucrat en la modulació de la senyalització de Wnt-1 perquè l'expressió específica de Wnt-1 en glàndules mamàries causa el desenvolupament de tumors en ratolins salvatges però no en ratolins *knockout* per sindecà-1 (Alexander et al., 2000).

Estudis de sindecà-2 en peix zebra han demostrat que sindecà-2 juga un paper important en el desenvolupament vascular que involucra la modulació de la senyalització de VEGF. El *knockout* de sindecà-2 té una supressió dels vasos intersegmentals, mentre la formació dels vasos dorsals no es veu afectada (Chen et al., 2004a). El sindecà-2 també participa en la regulació de l'asimetria esquerra-dreta en *Xenopus* (Couchman, 2003).

S'ha demostrat que els nivells de sindecà-3 en l'hipotàlam regulen fisiològicament el comportament en l'alimentació, i els ratolins amb disrupció en homozigosi dels dos al·lels de sindecà-3 redueix el seu comportament alimentari en resposta a una privació d'aliment (Reizes et al., 2001), així com es deterioren les funcions que utilitzen el mecanisme hipocampal, indicant anormalitats en l'aprenentatge i la memòria (Ishiguro et al., 2002).

La deficiència de sindecà-4 ha generat molt interès. El ratolí *knockout* és viable i fèrtil però presenta una sèrie de defectes subtils. Els embrions nuls per sindecà-4 presenten una formació de trombosi molt més freqüent, implicant-lo en la regulació de la coagulació de la sang (Ishiguro et al., 2000). El ratolí adult nul en sindecà-4 té una mortalitat incrementada després de la injecció amb LPS, suggerint un increment en la



seva sensibilitat per l'endotoxina (Ishiguro et al., 2001) i la seva habilitat per regular negativament la supressió de l'expressió de IL-1 $\beta$  induïda per TNF $\beta$  en macròfags (Ishiguro et al., 2002). Altres observacions interessants són un deteriorament en la cicatrització de ferides que aparentment deriva d'un defecte en l'angiogènesi (Echtermeyer et al., 2001; Tkachenko et al., 2005).

### **I.1.6.2. Sindecà-1 i les interaccions cèl·lula-matriu**

El sindecà-1 és un regulador important de les interaccions cèl·lula-cèl·lula i cèl·lula-matriu (Tkachenko et al., 2005). La regulació negativa de sindecà-1 en cèl·lules epitelials resulta en la pèrdua de la polaritat cel·lular associada a una reducció dels nivells d'E-cadherina en la superfície cel·lular, suggerint la seva participació en el canvi epitelial-mesenquimal durant el desenvolupament i en la cicatrització de ferides (Couchman et al., 2001). La sobreexpressió de sindecà-1 o l'escissió del seu ectodomini inhibeix la proliferació induïda per FGF2 (Mali et al., 1993). Un ratolí que sobreexpressa sindecà-1 té una reparació tissular dèrmica retardada deguda a l'efecte inhibitori de l'ectodomini soluble de sindecà-1 (Elenius et al., 2004). Tot i això, sota certes circumstàncies, les heparinases poden convertir l'ectodomini de sindecà-1 de ser un inhibidor a ser un activador de FGF2 (Kato et al., 1998a). L'habilitat de la sobreexpressió de sindecà-1 per inhibir el creixement i la migració pot explicar el perquè del comportament invasor agressiu de les cèl·lules tumorals deficientes en sindecà-1 (Harada et al., 2003; Reiland et al., 2004). Per altra banda, la regulació negativa de l'expressió de sindecà-1 en cèl·lules carcinogèniques té com a conseqüència una propagació cel·lular deteriorada en vitronectina però no en fibronectina (Beauvais et al., 2004), degut a que sindecà-1 modula la interacció de la vitronectina amb el seu receptor integrina  $\alpha\beta3$ .

El sindecà-1 té un rol important en la regulació de la inflamació (Gotte, 2003), ja que els ratolins deficientes en sindecà-1 presenten incrementades interaccions leucòcits-endoteli (Gotte et al., 2002). També té un paper important en la formació del gradient de citocines per la migració de neutròfils trans-endotelial i trans-epitelial (Gotte, 2003). Aquest procés es veu facilitat pel complex IL-8/sindecà-1 i està regulat per l'escissió de sindecà-1 (Marshall et al., 2003).

Finalment el sindecà-1 també participa en la regulació de la senyalització de ephrina que està involucrada en la diferenciació venoarterial. La Ephrina-B4 (EphB4)

s'expressa en l'endoteli de les vènules i la seva activació en les cèl·lules endotelials causa una sobrerregulació de sindecà-1 (Yuan et al., 2004), que té com a conseqüència la supressió de la senyalització d'FGF2. L'anul·lació de Eph4 o un dels seus lligands, ephrina-B2, causa defectes vasculars greus (Gerety et al., 1999; Wang et al., 1998).

### **I.1.6.3. Sindecà-2 i la senyalització de TGF $\beta$**

El sindecà-2 és el sindecà que s'expressa de manera predominant en el desenvolupament embrionari. Encara que el seu paper en les cèl·lules de l'adult no està del tot establert, hi ha diversos estudis que l'involucren en la regulació de la senyalització de TGF $\beta$ . Si bé el TGF $\beta$  pot unir-se a cadenes d'HS, el sindecà-2, però no els altres sindecans, pot unir-se directament al TGF $\beta$  per interaccions proteïna-proteïna força complexes. A més a més el sindecà-2 coimmunoprecipita amb el TGF $\beta$  tal i com amb el receptor de TGF $\beta$  de tipus III (betaglicà), i l'expressió d'un mutant de sindecà-2 amb el domini citoplasmàtic truncat resulta en una resposta deteriorada de TGF $\beta$  (Chen et al., 2004b).

De manera similar al sindecà-1, el sindecà-2 també participa en la senyalització d'ephrina. La senyalització ephrina-Eph en la superfície cel·lular indueix l'agrupament de sindecà-2 i el reclutament de molècules citoplasmàtiques, que causa una polimerització d'actina localitzada, via la família de les Rho GTPases, la proteïna del síndrome N-Wiscott-Aldrich i el complex Arp2/3 (Irie and Yamaguchi, 2004).

Hi ha estudis que suggereixen un paper important del sindecà-2 en la vasculatura. Hi ha factors pro-angiogènics com EGF, FGF2 i VEGF que indueixen l'escissió de sindecà-2 de manera que l'ectodomini exògen de sindecà-2 causa un increment en la migració de cèl·lules endotelials i la formació de capil·lars (Fears et al., 2006). Estudis com aquest suggereixen que almenys l'ectodomini de sindecà-2 juga un paper important en l'angiogènesi.

Sindecà-2 també participa en altres processos cel·lulars importants que seran descrits en més detall en la secció I.2.

#### **I.1.6.4. Sindecà-3 i senyalització de factors de creixement**

El sindecà-3 és una molècula que s'expressa de manera abundant en el teixit neural i en el desenvolupament de teixits musculoesquelètics. El sindecà-3 juga un paper important en la diferenciació i desenvolupament del múscul esquelètic, ja que s'ha observat que la seva inhibició causa l'expressió de la miogenina, un factor de transcripció per la diferenciació del múscul, i com a conseqüència esdevé una diferenciació accelerada del múscul esquelètic i una fusió de mioblasts (Fuentealba et al., 1999).

El sindecà-3 també està relacionat amb la regulació de la senyalització de Hh (Hedgehog), que és una família de proteïnes de senyalització secretades que participen en l'embriogenesi i la diferenciació (Shimo et al., 2004).

#### **I.1.6.5. Sindecà-4, senyalització d'FGF i la matriu extracel·lular**

El sindecà-4 és possiblement el membre més estudiat de la família dels sindecans. Desenvolupa diverses activitats com la modulació de la senyalització d'FGF2, la regulació de la migració cel·lular interferint amb la integrina  $\beta 1$ , i el control de l'adhesió mitjançant modificacions del citoesquelet. Tots aquests efectes són assolits per la seva cua citoplasmàtica de 33 aminoàcids (Tkachenko et al., 2005).

A més a més de ser capaç d'unir l'FGF2 a les cadenes HS i de presentar-lo als receptors tirosina-cinasa de FGF, el sindecà-4 directament inicia nombrosos processos de senyalització intracel·lular. La presència del domini citoplasmàtic de sindecà-4 i no un simple increment de les cadenes HS a la superfície cel·lular (amb el corresponent increment de llocs d'unió de baixa afinitat per FGF2) és necessari per la senyalització. No obstant, la retirada de les cadenes d'HS del sindecà-4 també bloqueja la sensibilitat de l'FGF2, demostrant que les cadenes HS de sindecà-4 i la seva cua citoplasmàtica són necessaris per la senyalització d'FGF2 (Volk et al., 1999).

La localització de sindecà-4 en la membrana plasmàtica i la seva participació en l'endocitosi de FGF2, planteja la seva relació amb els *lipid rafts*, dominis de la membrana plasmàtica que proporcionen plataformes fluides per segregar components de membrana i crear compartiments dinàmics en les membranes (Simons and Vaz, 2004).

Una altra característica en la senyalització de sindecà-4 és l'activació de PKC $\alpha$  en absència de Ca<sup>+2</sup>. L'habilitat de sindecà-4 per activar una PKC dependent de calci requereix la multimerització de sindecà-4 i la presència de PIP<sub>2</sub> (Oh et al., 1997a; Oh et

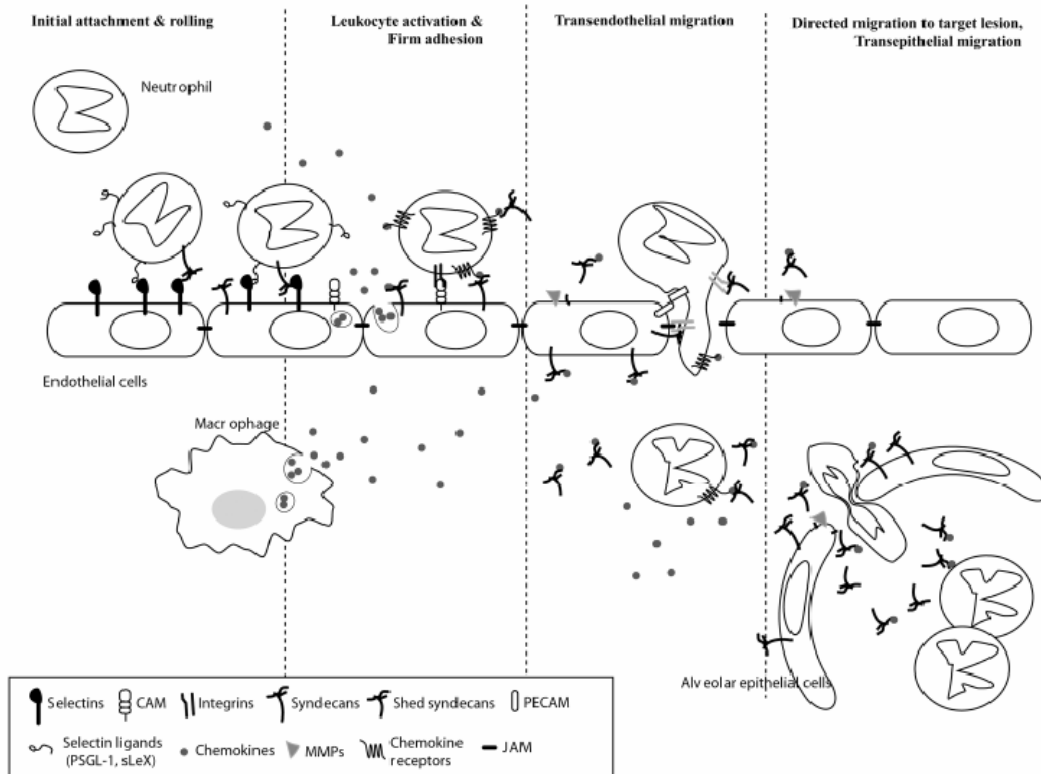
al., 1997b) (a la qual sindecà-4 s'uneix directament), processos que depenen de l'estat de fosforilació de la Ser<sup>183</sup> del domini citoplasmàtic (Horowitz et al., 2002). La fosforilació d'aquesta serina està regulada per PKC $\delta$  (Murakami et al., 2002), és a dir, es forma un sistema on l'activitat d'una PKC ve regulada per una altra.

A sindecà-4 també se li atribueixen funcions relacionades amb l'adhesió cel·lular (sindecà-4 és l'únic membre dels sindecans que s'ha identificat en els contactes focals) i el citoesquelet en diversos tipus cel·lulars (Tkachenko et al., 2005).

#### **I.1.6.6. Els sindecans en la inflamació**

Degut a moltes de les seves característiques, els sindecans poden regular l'activitat de factors generats durant la coagulació i la trombosi influenciant així en els processos que desencadenen d'un dany tissular agut.

Una característica de la inflamació és el ràpid reclutament de leucòcits de la circulació a la zona on hi ha la lesió tissular (Muller, 2003; Parish, 2006; Zen and Parkos, 2003). El moviment dirigit dels leucòcits és un procés que consta de molts passos i està mediat primerament per L-selectina, P-selectina, E-selectina i els seus lligands (Lowe, 2002; Patel et al., 2002; Vestweber and Blanks, 1999). El primer pas és l'activació de l'endoteli per factors pro-inflamatoris generats al lloc de la lesió (per exemple TNF $\alpha$  i IL-1 $\beta$ ). Després, els leucòcits s'ancoren de manera dèbil i roden (procés anomenat *rolling*) per sobre de l'endoteli activat utilitzant les interaccions de PSGL-1 amb la P-selectina i la L-selectina amb Sialyl Lewis X (Norgard-Sumnicht et al., 1993) (Fig.I.5.). La funció més rellevant dels HSPGs en el *rolling* leucocitari és regular la L-selectina i possiblement també la P-selectina. Els HS s'uneixen a les L- i P- selectines, i inhibeixen l'adhesió dels leucòcits a les cèl·lules endotelials estimulades. A més a més, el tractament amb heparinasa de les cèl·lules endotelials inhibeix l'adhesió de monòcits dependent de L-selectina a les cèl·lules endotelials activades (Giuffre et al., 1997). De manera també important, la inactivació de l'enzim NDST-1 (enzim necessari per la síntesi d'HS) en cèl·lules endotelials i leucòcits, perjudica la infiltració de neutròfils en diversos models d'inflamació en ratolins degut a una reducció de la velocitat de *rolling* i a una unió més dèbil de la L-selectina a les cèl·lules endotelials (Wang et al., 2005).



**Figura I.5. Passos clau del moviment dirigit leucocitari regulat pels sindecans.**

Els sindecans regulen la L-selectina, i possiblement la P-selectina, en la unió inicial i el *rolling* dels leucòcits. Els sindecans modulen l'activació leucocitària i la seva adhesió ferma a través de la regulació de la funció de varies quimiocines. En la migració transendotelial, els sindecans modulen les activitats de molècules d'adhesió cel·lular i són capaços de generar un gradient de quimiocines al llarg de l'epiteli. (Bartlett et al., 2007)

Curiosament, però, tot i que aquestes dades suggereixen que els HSPGs són pro-inflamatoris, els ratolins deficients en sindecà-1 i els deficients en sindecà-4 presenten respostes inflamatòries exagerades en diversos models de dany tissular i inflamació (Gotte et al., 2002; Ishiguro et al., 2001; Xu et al., 2005). Si certs HSPGs promouen, considerant que d'altres inhibeixen, les interaccions leucòcits-endoteli, és una qüestió que encara ha de ser investigada.

En el segon pas en el moviment dirigit dels leucòcits, les quimiocines activen les integrines dels leucòcits i les unions a les cèl·lules endotelials activades i faciliten la seva adhesió a l'endoteli (Rot and von Andrian, 2004). Totes les quimiocines estudiades s'uneixen als HSPGs a través d'un domini específic que conté una sèrie d'aminoàcids carregats positivament, i els HSPGs de la superfície cel·lular localitzen les quimiocines a la superfície cel·lular endotelial generant un gradient que facilita la migració dirigida

dels leucòcits (Handel et al., 2005; Lortat-Jacob et al., 2002; Parish, 2006) (Fig.I.5). Es coneixen algunes interaccions entre sindecans i quimiocines: el sindecà-1 s'uneix a eotaxina, MARCH-1, TARC (Xu et al., 2005), RANTES (Slimani et al., 2003) i KC (Li et al., 2002); el sindecà-2 s'uneix a IL-8 (Halden et al., 2004); i el sindecà-4 s'uneix a RANTES (Slimani et al., 2003) i a SDF-1 (Sutton et al., 2007). Els HSPGs indueixen la oligomerització de certes quimiocines (Hoogewerf et al., 1997; Johnson et al., 2004; Proudfoot et al., 2003), la qual cosa pot potenciar les activitats de les quimiocines. Per altra banda els HSPGs també protegeixen les quimiocines de la degradació (Sadir et al., 2004). Els ectodominis escindits dels HSPGs, però, també s'uneixen a elles i bloquegen les funcions de les quimiocines (Kuschert et al., 1999; Xu et al., 2005). Així doncs, la direcció en la qual els HSPGs regulen les funcions de les quimiocines està condicionada pel seu patró d'expressió espaciotemporal i també per la concentració local de HSPGs.

Un cop establerta una adhesió ferma a l'endoteli, els leucòcits transmigren a través de la capa endotelial cap a l'espai perivascular. Aquest procés involucra una sèrie de molècules endotelials i leucocitàries. Els HSPGs influeixen en la migració transendotelial regulant alguns d'aquests factors (Bartlett et al., 2007) (Fig.I.5).

Segons on estigui localitzada la lesió, els leucòcits poden migrar a través de l'espai perivascular cap al lumen epitelial. La migració transepitelial es dona de manera polaritzada de la membrana basolateral a la membrana apical de l'epiteli. Els mecanismes de la migració transepitelial són semblants als de la migració transendotelial però difereixen en alguns aspectes.

Després d'eliminar els factors endògens o exògens causants de la lesió tissular amb la resposta inflamatòria, diverses cèl·lules i molècules es coordinen una resposta de reparació per recuperar l'estructura i funció normals del teixit danyat. Les cèl·lules epitelials i mesenquimals proliferen i migren en resposta a factors de creixement i citocines per tancar la ferida. Els factors angiogènics, com VEGF i FGF2, indueixen la formació de nous vasos sanguinis a partir de vasos preexistents, i citocines fibrogèniques com el TGF $\beta$  indueixen la síntesi de components de la matriu. Els sindecans -1, -2, -3 i -4 s'uneixen i regulen factors angiogènics tals com FGF2, TGF $\beta$  i VEGF (Chen et al., 2004a).

S'ha descrit que, a més a més, els sindecans presents en els leucòcits i en les cèl·lules endotelials poden desenvolupar un paper important en la patogènesi de l'HIV (Gallay, 2004). A part del CD4, els HSPGs són també importants per la infecció de l'hoste amb

l'HIV, doncs, la degradació enzimàtica de HS així com l'addició de cadenes HS solubles comporta una disminució en l'habilitat d'infecció del virus. Tots els membres de la família dels sindecans poden unir-se a l'HIV-1 i aquesta interacció està mediada per la unió entre la proteïna gp120 i les cadenes HS. El bloqueig de la interacció gp120-sindecans en macròfags, que expressen nivells baixos de CD4, redueix l'accés de l'HIV-1, però aquest tractament no té cap efecte en cèl·lules T que expressen nivells elevats de CD4 (Saphire et al., 2001). El model proposat descriu que en cèl·lules que tenen una expressió baixa de CD4, els sindecans capturen el virus i l'ajuden a escanejar la superfície cel·lular fins a trobar els receptors de CD4 o de quimiocines. Els sindecans de l'endoteli poden actuar també com a receptors del virus *in trans*, facilitant així la seva presentació a les cèl·lules T (Bobardt et al., 2003). La replicació del virus en les cèl·lules T és major quan el virus ha estat ancorat a les cèl·lules endotelials. Els nòduls limfàtics representen el major lloc de replicació *in vivo* del HIV-1, aleshores el virus que ha estat capturat per l'endoteli limfàtic pot incrementar l'eficiència en la replicació viral (Bobardt et al., 2003; Gallay, 2004).

## **I.2. Sindecà-2**

El sindecà-2, també anomenat fibroglicà, es va caracteritzar inicialment com una de les proteïnes de la superfície cel·lular de fibroblasts de pulmó que presenta un major contingut en glucosaminoglicans del tipus heparà sulfat (Marynen et al., 1989). El sindecà-2 s'ha involucrat en la participació de diversos processos biològics.

### **I.2.1. Expressió**

Els primers treballs van focalitzar les funcions de sindecà-2 en adhesió cel·lular i senyalització (Tkachenko et al., 2005). Recentment, el sindecà-2 també ha estat implicat en la progressió del càncer (Beauvais and Rapraeger, 2004; Han et al., 2004). A més a més, experiments en peix zebra han demostrat el requeriment del sindecà-2 durant l'angiogènesi embrionària (Chen et al., 2004a).

S'han fet estudis en *Xenopus* que demostren que sindecà-2 es fosforila en dues serines en la regió V de la cua citoplasmàtica en resposta a l'activació de la PKC $\gamma$  (Kramer et al., 2002). La fosforilació comporta la modulació de la resposta de Vg1, un membre dels TGF $\beta$ , família de molècules de senyalització cèl·lula-cèl·lula que s'uneix directament al sindecà-2. En *Xenopus*, es va demostrar que el sindecà-2 és el mediador de decisions tempranes durant el desenvolupament de l'asimetria de l'eix dreta-esquerra (Kramer and Yost, 2002).

Durant el desenvolupament en peix zebra i en ratolí, el sindecà-2 és expressat en la capa de cèl·lules mesenquimals que envolten els vasos sanguinis axials, suggerint un possible paper en la coordinació i organització del desenvolupament vascular (Chen et al., 2004a).

L'expressió de sindecà-2 també s'ha descrit en cèl·lules neuronals (Ethell and Yamaguchi, 1999). L'oligomerització i el reclutament de sindecà-2 també s'ha observat després de l'activació del receptor tirosina cinasa EphB2 durant la maduració de les espines dendrítiques, una estructura de la membrana post-sinàptica altament especialitzada (Ethell et al., 2001).

Finalment, en estudis realitzats en càncer de pulmó Lewis, càncer de colon i en cèl·lules de mesotelioma, han demostrat que sindecà-2 està regulat positivament en aquestes cèl·lules en comparació amb els teixits normals (Gulyas and Hjerpe, 2003).



### I.2.2. Funció biològica

Algunes de les funcions biològiques més importants de sindecà-2 com la seva participació en la simetria dels òrgans (*Xenopus*) i la seva implicació en l'angiogènesi (peix zebra) s'han comentat en la secció I.2.1. Encara no s'ha generat el ratolí *knockout* de sindecà-2 i per això es desconeixen moltes de les seves funcions en mamífers.

El sindecà-2 i els sindecans en general poden acoblar interaccions cel·lulars amb la matriu extracel·lular a la formació de complexos a la membrana cel·lular i organitzar la F-actina cortical. La família de sindecans regula l'adhesió cèl·lula/substrat d'adhesió en part per unió directa amb molècules de la matriu extracel·lular com la fibronectina (Beauvais and Rapraeger, 2004).

La petita cua citoplasmàtica del sindecà-2 interacciona amb múltiples proteïnes que serveixen per acoblar les interaccions amb la matriu extracel·lular amb les respostes cel·lulars. Els quatre aminoàcids (EFYA) en la regió C2 uneixen proteïnes amb domini PDZ del tipus II, incloent la sinbindina, la sinectina, CASK/LIN-2 i la sintenina, que juguen diversos papers biològics en el transport de vesícules, la transmissió sinàptica, la migració axonal i la metastasi del càncer (Beauvais and Rapraeger, 2004). El domini C1 de la regió citoplasmàtica de sindecà-2 interacciona amb proteïnes de la família ERM (ezrina, radixina i moesina) que estan implicades en l'organització del citoesquelet d'actina cortical i en l'activació de cinases d'adhesió focals (Granes et al., 2000). Aquesta interacció permet que el sindecà-2 formi un punt d'unió entre el citoesquelet d'actina i la membrana extracel·lular tant en les cèl·lules migratòries com en les que estan altament especialitzades. En les cèl·lules migratòries l'expressió forçada de sindecà-2 en cultiu cel·lular induïx l'extensió de filopodis, com a conseqüència hi ha una co-localització amb la F-actina (Granes et al., 1999).

En altres estudis s'ha vist la participació de sindecà-2 amb la integrina  $\alpha 5 \beta 1$  en la formació de fibres d'estrès en cèl·lules derivades del carcinoma de pulmó Lewis (Kusano et al., 2000). Uns nivells incrementats de sindecà-2 en cèl·lules de càncer de pulmó i de colon comporten un fenotip menys adherent i una pèrdua de la inhibició per contacte (Park et al., 2002), implicant per tant el sindecà-2 en la modulació de la tumorogènesi i els comportaments invasius de les cèl·lules cancerígenes.

Com s'ha citat anteriorment, en contrast amb el paper en cèl·lules migratòries i en cèl·lules transformades, el sindecà-2 també és un component important en neurones de l'hipocamp on participa en la formació de les espines dendrítiques durant el seu desenvolupament (Ethell and Yamaguchi, 1999).

A més a més del seu paper en adhesió i migració, el sindecà-2 interacciona amb molècules de senyalització cèl·lula-cèl·lula com FGF2, EGF, VEGF i membres de la superfamília TGF $\beta$  (Clasper et al., 1999; Chen et al., 2004a; Kramer and Yost, 2002).

És aquesta implicació en l'adhesió i la migració el que fa que el sindecà-2 tingui un fort potencial pel desenvolupament com a diana terapèutica en el tractament del càncer i altres processos vasculo-dependents. El sindecà-2 pot funcionar en el càncer de pulmó i de colon per dos mecanismes diferents. Primer, que l'increment de l'expressió de sindecà-2 estigui directament relacionada amb la pèrdua d'interaccions entre cèl·lula i substrat i de la inhibició per contacte i contribuir així en el potencial tumorogènic i metastàtic de les cèl·lules cancerígenes. Segon, que el sindecà-2 sigui necessari per l'angiogènesi tumoral que facilita el creixement del tumor i la metastasi. El sindecà-2 pot exercir aquesta darrera funció actuant com a correceptor de molècules senyalitzadores importants per l'angiogènesi com VEGF, EphB2 o FGF2 (Essner et al., 2006).

També s'ha demostrat la participació de sindecà-2 en fenòmens de proliferació, possiblement en relació a la seva capacitat d'unir factors de creixement (Oh and Couchman, 2004). La sobreexpressió de sindecà-2 en fibroblasts Swiss-3T3 promou la seva proliferació en presència de sèrum o FGF (Villena et al., 2003), de la mateixa manera que en cèl·lules de carcinoma de colon (Park et al., 2002). La seva inhibició indueix l'aturada del cicle cel·lular en G0/G1 i disminueix la taxa de proliferació (Kim et al., 2003; Park et al., 2002).

El sindecà-2 però, també pot actuar com a supressor de tumors estimulant la mort cel·lular programada com s'ha demostrat en cèl·lules d'osteosarcoma MG63 que sobreexpressen sindecà-2 (Modrowski et al., 2005). També en fibroblasts 3T3 que sobreexpressen sindecà-2 s'indueix la mort cel·lular en privació de sèrum (Villena et al., 2006).

### **I.2.3. Antecedents al laboratori del treball amb sindecans**

La investigació dels sindecans en el nostre laboratori s'inicia en uns estudis realitzats amb la lipoproteïna lipasa (Reina et al., 1987; Vilaro et al., 1986; Vilaro et al., 1990). De manera paral·lela, aquests HSPGs adquireixen importància com a molècules capaces d'unir diferents lligands extracel·lulars, de la matriu extracel·lular i d'interaccionar amb components del citoesquelet. En el moment en què es va demostrar la interacció del sindecà-2 amb el citoesquelet d'actina en fibroblasts (Fernandez-Borja et al., 1995; Martinho et al., 1996) s'inicia un projecte per determinar la relació del sindecà-2 amb el citoesquelet. Es va demostrar la inducció de filopodis en COS-1 quan expressaven sindecà-2 (Granes et al., 1999) i es va observar també la seva interacció amb ezrina (Granes et al., 2000).

L'experiència en l'estudi de sindecà-2 va permetre al laboratori intensificar l'estudi d'aquest sindecà en altres sistemes cel·lulars. Així es va poder demostrar que sindecà-2 en cèl·lules epitelials HT-29 indueix un fenotip migrador (Contreras et al., 2001), que en fibroblasts Swiss 3T3 indueix l'adhesió i la proliferació (Villena et al., 2003) i indueix també l'apoptosi (Villena et al., 2006). És a dir, era una molècula implicada en processos importants del fenotip tumoral.

El grup de treball també es va interessar per l'estudi de la transició epiteli-mesènquima que es dona en hepatòcits (Pagan et al., 1999), i en cèl·lules epitelials de la retina (Casaroli-Marano et al., 1999). S'inicien també uns estudis del paper de sindecà-2 en la formació d'estructures capil·lars o angiogènesi (Castel et al., 2000; Montanez et al., 2002). Darrerament s'ha estudiat la implicació dels sindecans, en cèl·lules d'origen humà, en el procés de la neovascularització (Noguer et al., 2009).

Així doncs, en el nostre laboratori s'han estudiat les funcions de sindecà-2 en diversos tipus cel·lulars principalment adherents. I és obvia la seva possible participació en processos tumorigènics.

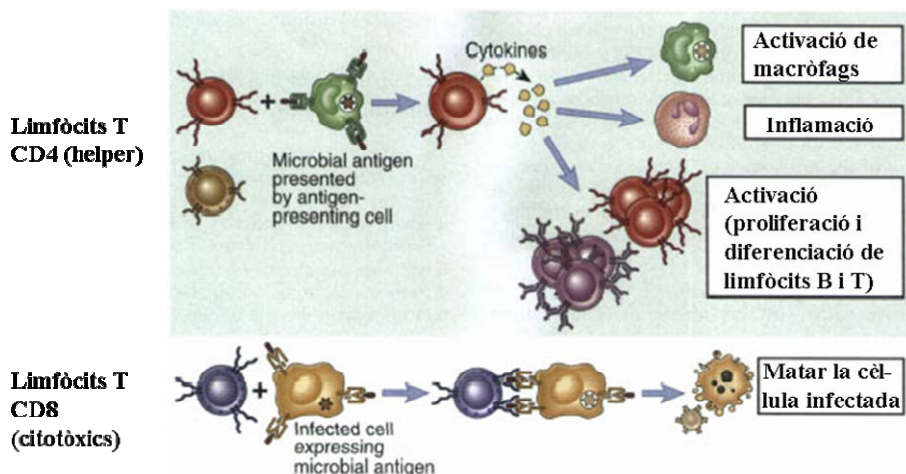
En aquest projecte, ens hem interessat pel paper que possiblement desenvolupen els sindecans en la inflamació, ja que és un altre procés fisiològic molt important per al qual els sindecans podrien representar una diana terapèutica.

### I.3. Els limfòcits

Els limfòcits són les cèl·lules responsables de les respostes immunitàries adaptatives o específiques. Es desenvolupen a partir de progenitors immadurs i es divideixen en dos grans grups, limfòcits B i T, segons si aquests progenitors immadurs maduren a la medul·la òssia (B) o en el tim (T) respectivament. Els limfòcits són responsables de les respostes immunitàries específiques a través de receptors de superfície, altament especialitzats en el reconeixement d'antigens i clonotípicament diferents, amb la qual cosa cada limfòcit reconeix un únic antigen diferent.

Els limfòcits T verges o *naive* (limfòcits T madurs que encara no han trobat el seu antigen específic) són activats quan el receptor clonotípic de la cèl·lula T (TCR) reconeix un pèptid específic unit a una molècula altament polimòrfica codificada pel sistema major d'histocompatibilitat (MHC) que es troba a la superfície de les cèl·lules presentadores d'antigen (APC) i que acostuma a ser una cèl·lula dendrítica.

Una vegada activats els limfòcits, aquests produiran citocines o factors citotòxics, segons es tracti de limfòcits T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>. D'aquesta manera es desenvoluparà la resposta immunitària. Els limfòcits T CD4<sup>+</sup> col·laboraran en la posterior activació d'altres cèl·lules tal com NKs, T CD8<sup>+</sup>, limfòcits B o macròfags. Així com els limfòcits T CD8<sup>+</sup>, després de la seva activació, exerciran la seva funció citotòxica destruint les cèl·lules diana (Fig. I.6.).



**Figura I.6. Classes de limfòcits T.** Els limfòcits T *helpers* o CD4 reconeixen antigens de la superfície de les APC i segreguen citocines que desencadenaran diferents mecanismes de la immunitat i la inflamació. Els limfòcits T citotòxics

reconeixen antigens en les cèl·lules infectades i les eliminen. Esquema adaptat de (Abbas, 2007).

---

### **I.3.1. El receptor antigènic de la cèl·lula T (TCR/CD3)**

El receptor d'antigen de les cèl·lules T (TCR/CD3) s'encarrega del reconeixement específic dels antigens (TCR) i de la transducció de senyals activadores a l'interior cel·lular (CD3). Mentre que el CD3 és el mòdul invariant del complex, el receptor TCR és polimòrfic i en ell es dona la variació clonotípica que permetrà el reconeixement d'una gran varietat d'antigens diferents.

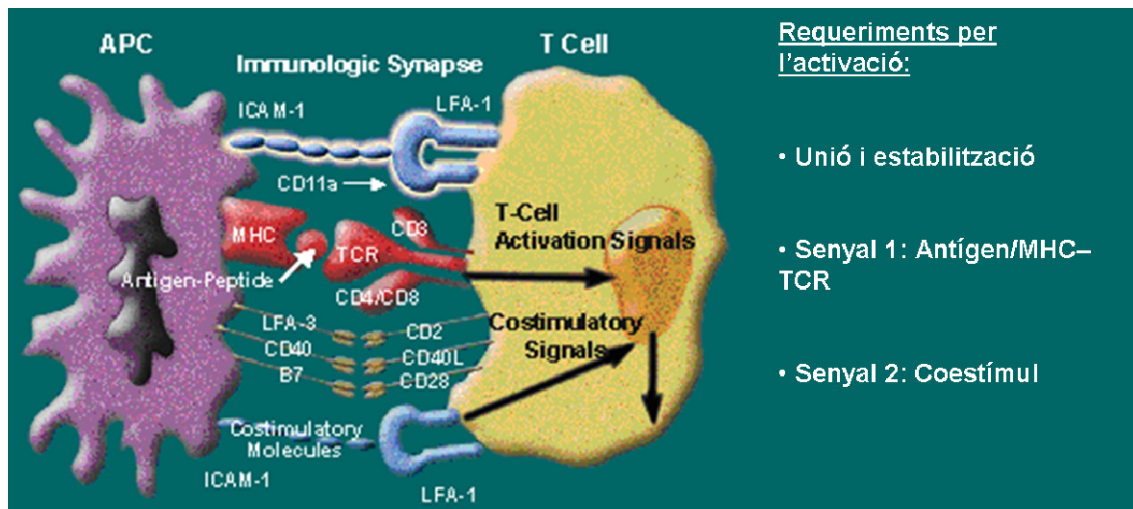
El TCR és un complex transmembrana heterodimèric format per dues cadenes ( $\alpha$  i  $\beta$  en la majoria i,  $\gamma$  i  $\delta$  en algunes cèl·lules T) unides mitjançant un pont disulfur. Aquestes cadenes pertanyen a la superfamília de les immunoglobulines i estan formades per un domini aminoterminal variable (V) que reconeix el complex MHC-peptid i per un domini carboxiterminal constant (C). La transducció de senyals a l'interior de la cèl·lula després del reconeixement MHC és iniciat per les cadenes del complex CD3 i les cadenes  $\zeta$ . Les propietats de transducció de senyals d'aquestes cadenes es deu a la presència dels seus dominis citoplasmàtics que contenen seqüències ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) que permet el reclutament de tirosina-cinases citoplasmàtiques (Chan and Shaw, 1996). Se sap que l'inici de la transducció de senyals es dona gràcies a la fosforilació d'aquestes seqüències ITAM per part de les tirosina-cinases (Call and Wucherpfennig, 2005).

### **I.3.2. Fenòmens d'interacció cel·lular**

En molts casos la unió de l'antigen amb el TCR no és suficient per donar lloc a una resposta immune eficaç. Per a que aquesta resposta es dugui a terme es requereix la participació d'una sèrie de molècules conegudes globalment com accessòries, i la funció de les quals és precisament la de contribuir al desenvolupament d'una resposta immune efectiva facilitant la interacció entre les diferents cèl·lules. Es forma doncs, la denominada sinapsi entre limfòcit T i cèl·lula presentadora d'antigen.

Les principals molècules implicades en aquest fenomen de reconeixement són: CD4, CD8, CD2, CD45 i CD28 i els seus respectius lligands (Fig I.7.). Totes aquestes

molècules juguen un paper important en la transducció de senyals i activació de la cèl·lula T.



**Figura I.7. Molècules que participen en la sinapsi entre el limfòcit T i la cèl·lula presentadora d'antigen.** Esquema adaptat de (Janeway, 2002).

### I.3.2.1. Molècules CD4 i CD8

Les molècules CD4 i CD8 són glicoproteïnes que tenen com a lligands naturals les molècules del MHC de classe II i de classe I respectivament. Encara que presenten estructures diferents, CD4 i CD8 pertanyen a la superfamília de les immunoglobulines. Les interaccions d'aquestes molècules amb l'MHC juguen un paper fonamental en la maduració tímica dels limfòcits. De fet, el fenotip CD4/CD8 d'un determinat limfòcit T determina la seva funció efectora. Així, mentre el CD4 s'expressa en la majoria de limfòcits T cooperadors o helpers, el CD8 es presenta principalment en els limfòcits T citotòxics. És lògic que les cèl·lules T CD8 reconeixin antigens en el context de la molècula MHC de classe I, ja que aquestes tenen una distribució tissular universal, i es pugui d'aquesta manera realitzar la funció citotòxica, reconeixement i lisi de qualsevol cèl·lula de l'organisme que estigui infectada per virus.

### **I.3.2.2. Molècules CD2**

Les molècules CD2 junt amb el LFA-1 (CD11a/CD18) són les molècules d'adhesió primària que contribueixen a potenciar la unió del limfòcit T a la cèl·lula presentadora. Els seus lligands naturals són el LFA-3 (CD58) i el ICAM-1 (CD54) respectivament que s'expressen en la superfície de totes les cèl·lules que realitzin la funció de cèl·lules presentadores d'antigen. La molècula CD2 és la primera que s'expressa en el llinatge T durant la seva diferenciació i es troba en tots els timòcits i cèl·lules T madures. A més del seu paper en la interacció entre cèl·lules, està implicat en una via alternativa d'activació T independent d'antigen.

### **I.3.2.3. Molècules CD28**

Les molècules CD28 són d'especial importància en els mecanismes d'adhesió cel·lular. El CD28 s'expressa en tots els limfòcits T CD4 i els seus lligands naturals pertanyen a la família B7. CD28 a més del seu paper en el procés d'adhesió, també participa en el mecanisme de transducció de senyals i activació de la cèl·lula T ja que el CD28 indueix la denominada segona senyal d'activació cel·lular (la primera està generada per TCR/CD3). En absència d'aquesta segona senyal, els limfòcits T poden entrar en anergia per la primera senyal d'activació dependent de TCR/CD3. Aquesta segona senyal pot ser regulada negativament per CTLA-4 (Greenwald et al., 2005).

### **I.3.3. Diferenciació i maduració dels limfòcits T**

Les cèl·lules T madures abandonen el tim per via sanguínia i colonitzen els òrgans limfoides secundaris. Durant el procés de maduració intratímic, els timòcits adquireixen una sèrie de molècules noves en la seva superfície que van apareixent de manera seqüencial en els diferents estadis de maduració intratímica. Aquestes molècules de superfície s'anomenen marcadors de diferenciació i individualment es designen amb les sigles CD (*cluster of differentiation*) seguit d'un número ordinal. Les cèl·lules precursoras no expressen en la seva superfície cap dels marcadors característics dels limfòcits T, però ja en el tim, maduren i comencen a distingir alguns marcadors. En els timòcits més immadurs apareixen els marcadors CD7 i CD2 i posteriorment el CD1. Els timòcits més immadurs no expressen CD3, CD4 ni CD8 per la qual cosa es coneixen

com cèl·lules triple negatives. A mesura que van madurant, en aquestes cèl·lules es produeix la reorganització del TCR, l'expressió del complex CD3 (cèl·lules doble negatives, DN, CD4-CD8-) i l'expressió de les molècules CD4 i CD8 conjuntament (cèl·lules doble positives, DP, CD4+CD8+). La fase DN pot dividir-se en quatre segons l'expressió de les molècules CD44 i CD25. Durant la fase DP, els timòcits expressen CD4 i CD8. Durant aquesta fase, els timòcits poden reconèixer pèptids endògens expressats per cèl·lules estromals del tim i poden experimentar tres processos diferents de selecció: selecció positiva, selecció negativa i mort per abandonament. La majoria de timòcits immadurs DP mor per abandonament ja que el seu TCR és incapaç de reconèixer els complexos MHC-pèptid propis (Werlen et al., 2003). Per altra banda, aquells timòcits DP que sí expressen un TCR que interacciona amb el complex MHC-pèptid propi, patiran un procés de selecció tímica que es realitza en dues fases (selecció positiva i negativa) i que està condicionat pel grau d'afinitat del TCR amb el complex MHC-pèptid de les cèl·lules epitelials del tim. En la selecció positiva, només aquelles cèl·lules que tinguin TCR capaços de reconèixer amb baixa afinitat els complexos MHC-pèptid propi es diferenciaran i creixeran, mentre la resta moriran. Pel contrari, en la selecció negativa es destrueixen els timòcits que posseeixin la capacitat de reconèixer amb alta afinitat els complexos MHC-pèptid propis (Werlen et al., 2003). Aquest tipus de selecció és especialment important ja que elimina aquells clons cel·lulars que al reconèixer el que és propi (MHC-pèptid propi) poden tenir capacitat autoreactiva una vegada hagin madurat (Jameson et al., 1995; Robey and Fowlkes, 1994; Sebзда et al., 1999). Al final, aquests limfòcits seleccionats per reconèixer antigens estranys en el context de l'MHC es diferenciaran en CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> simples positius (SP), que abandonaran el tim i entraran en sang i en el sistema limfàtic. La subpoblació de timòcits madurs que expressa en la seva superfície el marcador CD4 serà la precursora immediata dels limfòcits T col·laboradors (T *helper*, Th) que apareixen en sang perifèrica. Mentre que la que expressa en la superfície el marcador CD8 donarà lloc als limfòcits T citotòxics circulants (Tc). Quan el TCR del timòcit reconeix molècules del MHC de classe I, les cèl·lules que es desenvolupen principalment són limfòcits Tc (CD8<sup>+</sup>) i quan el que reconeix el TCR són molècules MHC de classe II, les cèl·lules que essencialment es desenvolupen són limfòcits Th (CD4<sup>+</sup>).

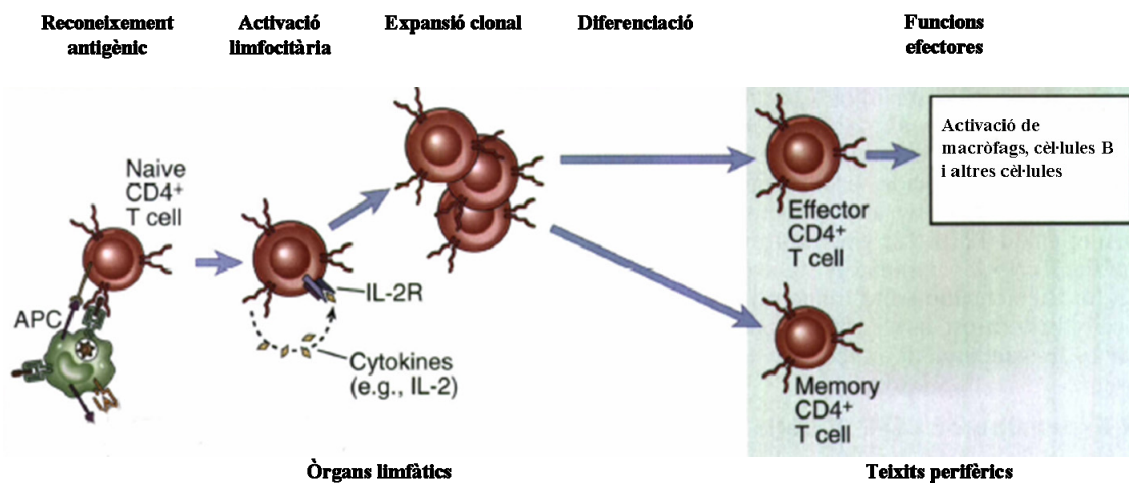


### I.3.4. Activació dels limfòcits TCD4<sup>+</sup>

La diferenciació dels limfòcits T CD4<sup>+</sup> verges a cèl·lules efectores de la immunitat mediada per cèl·lules requereix el reconeixement antigènic i la coestimulació. La iniciació de la resposta immune cel·lular requereix que les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> verges i el seu antigen específic coincideixin en el mateix teixit limfàtic en el mateix temps. Això es duu a terme gràcies a la recircularització de les cèl·lules T verges i al transport dels antigens als òrgans limfàtics. Les cèl·lules T verges migren de la sang al òrgan limfàtic, d'un òrgan limfàtic a un altre, i tornen a la sang, fins que troben l'antigen pel qual expressen receptors específics. Les cèl·lules dendrítiques juguen un paper important recollint antigens dels llocs d'infecció i migrant pels vasos limfàtics per drenar els nòduls limfàtics. Una vegada en el nòdul limfàtic, les cèl·lules dendrítiques presenten pèptids derivats de les proteïnes antigèniques endocitades associats amb molècules MHC de classe II, als limfòcits T CD4<sup>+</sup> verges. A més a més de presentar antigens, les cèl·lules dendrítiques responen a les estructures microbianes, expressant alts nivells de coestimuladors, com les proteïnes B7-1 i B7-2, les quals generen la segona senyal per l'activació de les cèl·lules T.

Generalment els limfòcits TCD4<sup>+</sup> verges presenten un marcador a la membrana anomenat CD45RA que un cop activades perden. Les cèl·lules efectores i memòria són negatives per CD45RA, però presenten una isoforma diferent de CD45 anomenada RO. La proliferació de la cèl·lula T inicialment és per via autocrina i el principal factor de creixement és la IL-2. El resultat de la proliferació de les cèl·lules T verges és l'expansió clonal, que a partir d'un petit nombre de limfòcits antigen-específics genera el gran nombre de cèl·lules que és necessari per eliminar l'antigen.

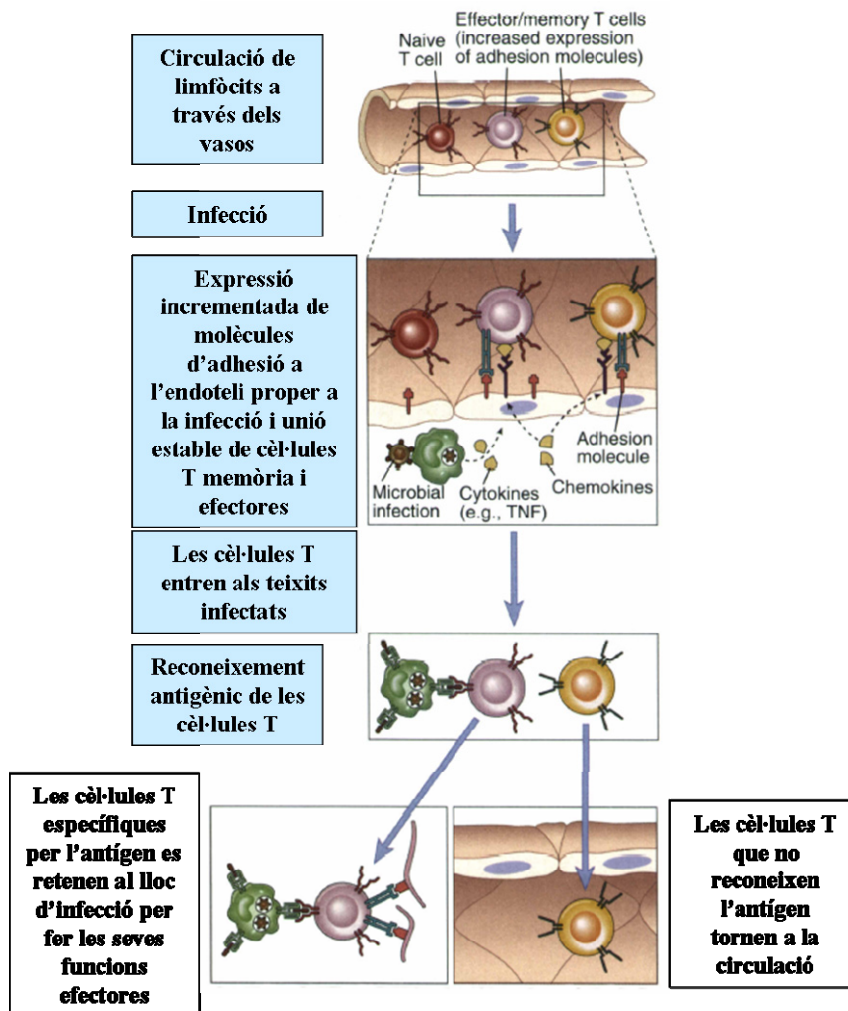
A mesura que els antigens són eliminats, moltes de les cèl·lules T activades moren per apoptosi, de manera que s'estableix un mecanisme homeostàtic que retorna el sistema immune al seu estat basal de repòs després d'haver acabat amb la infecció. Algunes d'aquestes cèl·lules T que han proliferat i que s'han diferenciat en cèl·lules efectores es diferencien en cèl·lules T memòria, que tenen una vida mitja més llarga i posseeixen la capacitat de resposta ràpida vers l'antigen (Fig.I.8.).



**Figura I.8. Fases de la resposta T CD4<sup>+</sup>.** El reconeixement de l'antigen per part de la cèl·lula T induïx la secreció de citocines (com la IL-2), la proliferació cel·lular induïda per la IL-2 dona com a resultat l'expansió clonal i finalment es dona la diferenciació en cèl·lules T efectores o cèl·lules memòria. En la fase efectora de la resposta, els T CD4<sup>+</sup> efectores responen a l'antigen amb la producció de citocines que tenen diferents accions, com l'activació de macròfags i de limfòcits B. Esquema adaptat de (Abbas, 2007).

La migració dirigida dels limfòcits T efectores cap als llocs d'infecció és inicialment dependent de la resposta immune innata. La resposta innata consta d'una reacció inflamatòria caracteritzada per la secreció de citocines, com el TNF i la IL-1, per part dels macròfags. Aquestes citocines induïxen l'expressió de selectines endotelials i integrines que lliguen receptors d'aquest moviment dirigit (*homing*) de les cèl·lules T efectores. Durant la diferenciació a partir de precursors verges, algunes cèl·lules T (T<sub>H</sub>1) adquireixen la capacitat de produir lligands funcionals que s'uneixen a E- i P- selectina. L'expressió selectiva de lligands de selectina i de receptors de certes citocines assegura la migració eficient de les cèl·lules T cap a les zones inflamades. Per tant, aquest procés de migració té com a resultat el reclutament de cèl·lules T efectores circulants als llocs d'inflamació, assegurant que el màxim nombre de cèl·lules T prèviament activades tinguin la oportunitat de localitzar l'antigen i eradicar la infecció. Algunes cèl·lules memòria també migren als teixits perifèrics. Una cop estan en els teixits, les cèl·lules T troben els antigens presentats pels macròfags i altres cèl·lules presentadores d'antigen. Les cèl·lules T que reconeixen específicament els antigens, reben senyals a través dels seus receptors antigènics i incrementen l'afinitat de les integrines pels seus lligands.

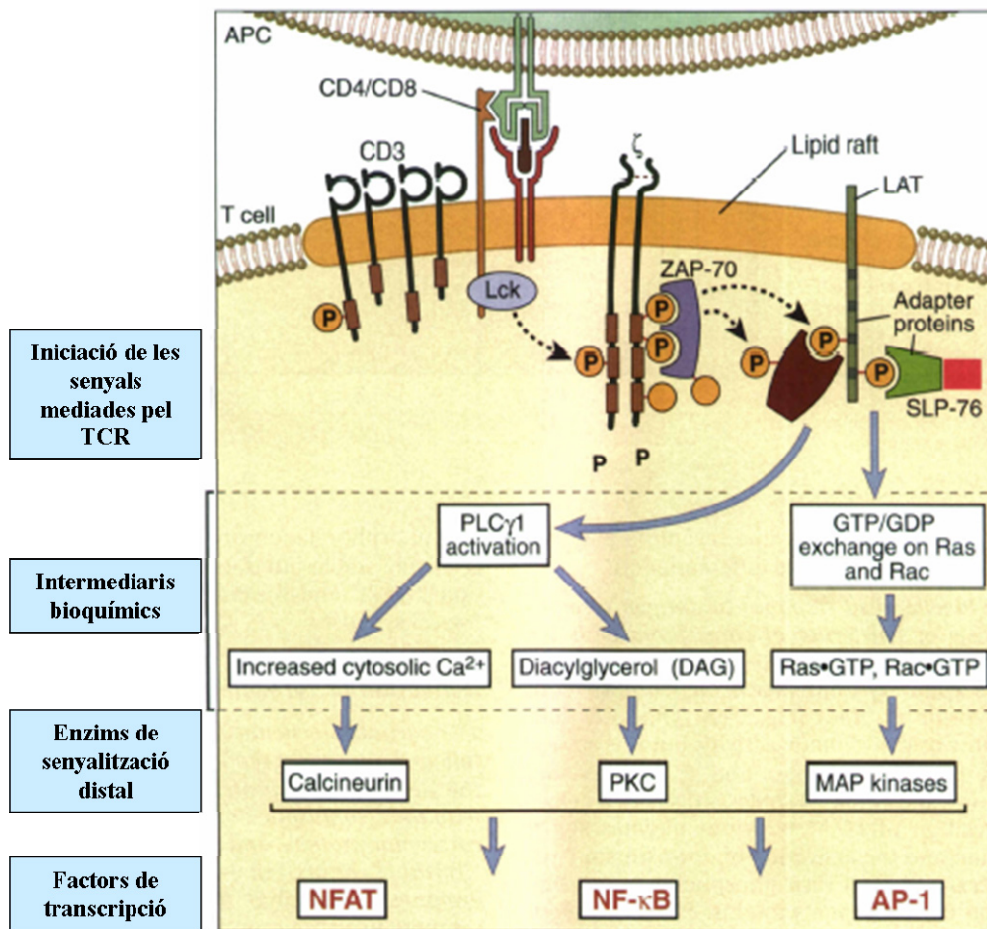
Com a resultat, les cèl·lules T efectores específiques per l'antigen i les cèl·lules T memòria que troben l'antigen són retingudes preferentment a la zona extravascular on és l'antigen. Les cèl·lules T no específiques per l'antigen tornaran a la circulació pels vasos limfàtics (Fig. I.9.) (Per referències veure (Abbas, 2007)).



**Figura I.9. Migració i retenció de les cèl·lules T efectores i memòria a les zones d'infecció.** Les cèl·lules T efectores i memòria prèviament activades, però no les T verges, migren a través de l'endoteli que és alhora activat per citocines produïdes al lloc d'infecció. En el teixit extravascular, les cèl·lules T que reconeixen específicament l'antigen són activades i retingudes, mentre que les cèl·lules T que no troben el seu antigen específic tornen a la circulació a través dels vasos limfàtics. Esquema adaptat de (Abbas, 2007).

### **I.3.5. Vies de senyalització intracel·lular induïdes pel complex TCR/CD3**

El reconeixement entre el TCR amb el complex MHC unit a un pèptid antigènic, inicia una sèrie de senyals bioquímiques per traduir la unió extracel·lular en una resposta intracel·lular que comporta l'activació de la cèl·lula T. La cascada de senyals és fortament dependent de la fosforilació proteica i, per tant, està regulada per tirosina cinases i fosfatases. Per aquest motiu, les proteïnes tirosina cinasa (PTKs) que hi ha per sota del TCR estan ben estudiades, incloent una PTK que interacciona directament amb el complex TCR, la proteïna de 70 KDa associada a les cadenes  $\zeta$ , anomenada ZAP-70. Quan l'heterodímer  $\alpha\beta$  del TCR interacciona amb l'MHC lligat a un pèptid antigènic, els heterodímers associats no covalentment de CD3 i l'homodímer  $\zeta$  del TCR, transmeten la unió extracel·lular al citoplasma mitjançant els ITAMs presents en el CD3 i en les cadenes  $\zeta$  citoplasmàtiques. Les dues tirosines de la seqüència ITAM són fosforilades per un membre de la família de cinases Src, Lck o Fyn, que són activades com a conseqüència de la interacció entre TCR i el complex MHC-antigen. Aquesta fosforilació de tirosines inicial comporta el reclutament de ZAP-70 a través dels seus dominis SH2 cap als ITAMs doblement fosforilats. La unió de ZAP-70 als ITAMs fosforilats, serveix per localitzar ZAP-70 al TCR, on ZAP-70 pot ser estimulada per fosforilació. La ZAP-70 activa, fosforila alhora dues proteïnes adaptadores importants, LAT i SLP-76. Les proteïnes LAT i SLP-76 fosforilades serveixen per reclutar altres molècules de senyalització que inicien processos bioquímics que poden comportar respostes secretores o canvis transcripcionals que finalment condueixen a la producció de limfocines, proliferació de les cèl·lules T i diferenciació (Au-Yeung et al., 2009) (Fig.I.10).



**Figura I.10. Processos de senyalització intracel·lular durant l'activació de la cèl·lula T.** La unió del TCR i els coreceptors al complex MHC-antigen en les APC inicia processos de senyalització proximals, que comporten la fosforilació de la cadena ζ, la unió i activació de ZAP-70, la fosforilació de proteïnes adaptadores, i l'activació de diversos enzims cel·lulars. Aquests enzims aleshores activen factors de transcripció que estimulen l'expressió de diversos gens implicats en la resposta de les cèl·lules T. Esquema adaptat de (Abbas, 2007).

La proteïna LAT fosforilada funciona com a adaptadora per reclutar molècules senyalitzadores com la PLCγ, Grb-2, SLP-76, les cinases Itk/Tec o Vav-1 (Jordan et al., 2003). La proteïna PLCγ promou la mobilització de calci i l'activació de cascades de cinases que regulen la transcripció gènica, mentre que Vav-1 activa les GTPases Rac i Cdc42 intensificant la polimerització del citoesquelet d'actina. La família de cinases Tec funciona com a moduladora de la senyalització del TCR i regula la PLCγ i la mobilització de calci de la mateixa manera que remodela el citoesquelet d'actina (Gomez-Rodriguez et al., 2007). Després del reconeixement antigènic per part del TCR, PLCγ es fosforila en tirosines i s'activa induint la hidròlisi del seu substrat específic, el

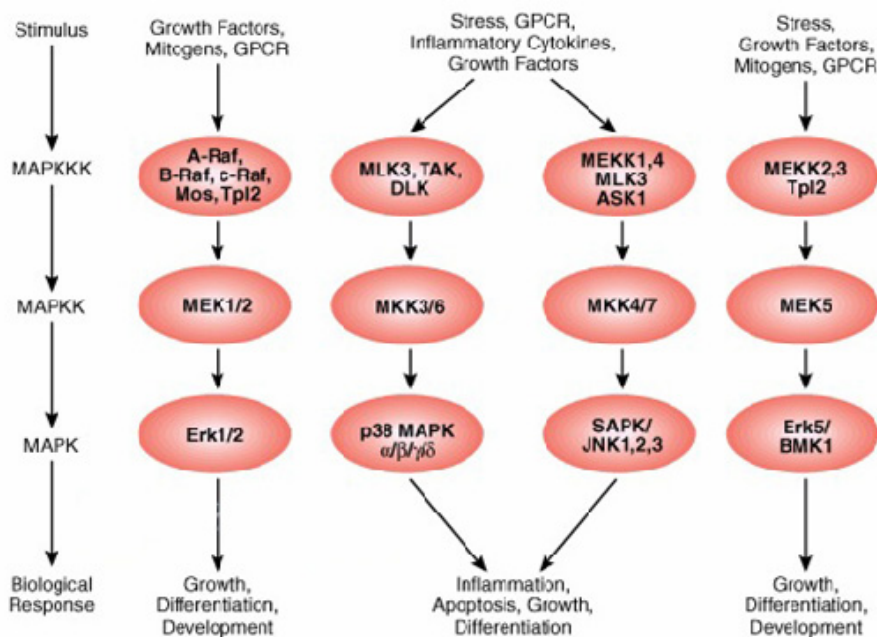
PIP2, de manera que es generen els metabòlits IP3 i DAG (Mustelin et al., 1990; Nishibe et al., 1990). El DAG és cofactor per a algunes isoformes de PKC, i també activa la via Ras/MAPK. L'IP3 s'uneix al seu receptor específic en el reticle endoplàsmic facilitant així l'alliberament de calci i incrementant la concentració de calci intracel·lular (Berridge and Irvine, 1984). El calci intracel·lular pot unir-se a la calmodulina, que pot activar a la fosfatasa calcineurina. La calcineurina defosforila el factor de transcripció NFAT i permet la seva translocació al nucli. A part de l'activació del sistema calmodulina/calcineurina, els alts nivells de calci intracel·lular també participen en l'activació d'altres cinases com són alguns isoenzims de la PKC.

### **I.3.6. La via de les MAPK**

La via de transducció de senyals de les MAPK és un d'entre els mecanismes més extensos de la regulació cel·lular eucariota. Totes les cèl·lules eucariotes posseeixen vies de MAPK que són activades per diversos estímuls, i permeten que la cèl·lula respongui de manera coordinada a múltiples i diferents *inputs*. Les MAPK de mamífers poden ser activades per una varietat d'estímuls on s'inclouen hormones (per exemple, la insulina), factors de creixement (per exemple, PDGF, EGF, FGF), citocines inflammatòries de la família del TNF i estrès ambiental com la radiació, el shock osmòtic o lesió isquèmica. L'activació de les vies de les MAPK coordinen diverses activitats cel·lulars com l'expressió de gens, la maquinària del cicle cel·lular, el metabolisme cel·lular, la motilitat, supervivència, apoptosi i diferenciació. S'han caracteritzat sis grups de MAPKs en mamífers: ERK1/2 (*extracellular regulated kinase*), JNK1/2/3 (*Jun NH<sub>2</sub> terminal kinases*), p38 (p38 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$ ), ERK7/8, ERK3/4 i ERK5. Hi ha variants per *splicing* de varies proteïnes MAPK que incrementa la diversitat de la cascada. Els grups més estudiats són les cinases ERK1/2, JNK i p38. ERK5, també anomenada BMK1 (*Big MAP kinase 1*), és activada per MEK5 i és activada davant estrès oxidatiu, hiperosmolaritat i factors de creixement. No hi ha encara molta informació disponible sobre ERK7/8, ERK3/4 i ERK5.

Encara que cada MAPK és única, comparteixen algunes característiques comuns i per això han estat agrupades en una mateixa família. És típic en aquestes vies el mòdul central de senyalització basat en tres graons. Consisteix en l'acció seqüencial de cinases: una MAPK, una MAPKK (*MAPK kinase*) i una MAPKKK (*MAPK kinase kinase*). Les MAPKKK, conegudes també com MAP3K, són Ser/Thr cinases que són

activades via fosforilació i/o mitjançant la seva interacció amb proteïnes GTP petites de la família Ras/Rho en resposta a un estímul extracel·lular. L'activació de les MAP3K comporta la fosforilació i activació de les MAPKK, que és una cinasa dual que pot fosforilar MAPK en threonines i tirosines d'un motiu conservat Thr-X-Tyr, per activar-les. Una vegada activades, les MAPKs fosforilen els seus substrats diana que poden ser factors de transcripció, altres cinases o proteïnes com les proteïnes del citoesquelet (Fig.I.11).



**Figura I.11. Esquema de la cascada de senyalització de les principals MAPKs**  
(Adaptat de Cell Signaling Technology, Inc.)

### I.3.6.1. La via d'ERK1/2

ERK va ser la primera MAPK que va ser identificada i és la via de MAPKs més ben estudiada en mamífers. La cascada ERK és activada per un gran nombre d'estímuls extracel·lulars i intracel·lulars. És fortament activada per factors de creixement, sèrum, èsters de forbol i en menor grau, per lligands de GPCRs, citocines, estrès osmòtic i la desorganització de microtúbuls (Lewis et al., 1998). Es coneixen dues isoformes, ERK1 i ERK2. Després de l'estimulació, bona part d'ERK s'acumula en el nucli (Chen et al., 1992; Lenormand et al., 1993). S'ha demostrat que ERK1/2 activada fosforila un gran nombre de substrats en tots els compartiments cel·lulars, incloent varies proteïnes de



membrana i citosòliques (PLA2, CD120a, Syk i calnexina), substrats nuclears (SRC-1, Pax6, NFAT, Elk-1, MEF-2, c-fos, c-jun, c-myc i STAT3) i proteïnes del citoesquelet (neurofilaments i paxilina) (Yoon and Seger, 2006).

La via ERK1/2 s'ha posicionat com un regulador central de la proliferació cel·lular ja que controla tant el creixement cel·lular com la progressió del cycle cel·lular.

Tot i que la via d'ERK és atribuïda a la supervivència en la majoria de tipus cel·lulars, la seva activació també contribueix a l'apoptosi. La via d'ERK sovint està relacionada amb l'oncogènesi (Ras es troba mutat i així permanentment activat en molts càncers humans), i la magnitud de l'activitat d'ERK influeix en la supervivència de les cèl·lules de carcinoma. Activitats d'ERK elevades redueixen la taxa d'apoptosi en les cèl·lules de carcinoma de colon i indueixen l'aturada del cycle cel·lular per la regulació positiva dels inhibidors de CDK, p21 i p27 (Mirza et al., 2004; Sewing et al., 1997). Alguns efectes antiapoptòtics d'ERK poden ser explicats en termes d'accions de suport pel creixement. Tanmateix hi ha dianes d'ERK directament involucrades en l'apoptosi, com les caspases citosòliques (Erhardt et al., 1999) o la proteïna Bad (Yang et al., 1995).

### **I.3.6.2. La via de JNK**

JNK rep aquest nom per emfatitzar el seu paper en la fosforilació i activació del factor de transcripció c-jun. Les cinases JNK són fortament activades en resposta a citocines, radiacions UV, privació de factors de creixement, agents de dany del DNA, i en menor grau, per estimulació d'alguns GPCRs, sèrum i factors de creixement (Behrens et al., 2000; Behrens et al., 1999; Leppa and Bohmann, 1999).

Les JNKs de mamífer estan codificades per tres gens diferents (JNK1, JNK2 i JNK3). Mentre que JNK1 i JNK2 s'expressen de manera ubiqa, JNK3 està restringida al cervell, cor i als testicles.

Com fa ERK1/2, JNK també es pot relocalitzar del citoplasma al nucli després de l'estimulació (Mizukami et al., 1997) però no amb les mateixes proporcions que ERK. S'ha demostrat que un ampli ventall de proteïnes nuclears, predominantment factors de transcripció i receptors nuclears d'hormones, són substrats de JNK. Però el substrat nuclear de JNK més important i més estudiat és c-jun que, quan és fosforilat, comporta un increment de l'activitat transcripcional d'AP-1. També s'inclouen com a substrats de JNK a proteïnes de la família jun com junD i junB, la família ATF, la família fos, Elk-1,



c-myc, p53, la família NFAT, STAT-1 i -3 i la família de proteïnes Pax (Bogoyevitch and Kobe, 2006).

S'ha establert un rol per JNK en l'apoptosi (Kanda and Miura, 2004), tanmateix aquest mecanisme genera controvèrsia i sembla ser específic d'estímul i de teixit (Liu and Lin, 2005). Però també s'ha observat la contribució de JNK en la supervivència. Aquests efectes oposats poden dependre en part de la duració o magnitud de l'activació de la via i en part de l'activació d'altres vies que afavoreixin la supervivència. Una activació prolongada de JNK condueix a l'apoptosi, mentre una activació transitòria promou la supervivència cel·lular (Ventura et al., 2006).

### **I.3.6.3. La via de p38**

La MAPK p38 s'ha vist implicada en osmoregulació, resposta a estímuls d'estrès extracel·lular i processos de cicle cel·lular (Brewster et al., 1993; Shiozaki and Russell, 1995). Les p38 en mamífers són activades per estrès ambiental, citocines inflammatòries, insulina i factors de creixement (Freshney et al., 1994; Han et al., 1994).

Hi ha quatre isoformes de p38 ( $\alpha, \beta, \gamma$  i  $\delta$ ) i entre elles la p38 $\alpha$  ha estat la més estudiada. S'ha observat que p38 és present en el nucli i el citoplasma de cèl·lules quiescents. Algunes evidències suggereixen que després de l'activació, p38 es transloca del citoplasma al nucli (Ben-Levy et al., 1998), però també hi ha dades que indiquen que p38 activada també és present en el citoplasma en cèl·lules estimulades (Raingeaud et al., 1995). Ha estat estudiat el rol de p38 en el sistema immune (Cook et al., 2007; Dodeller and Schulze-Koops, 2006). Participa en les respostes de macròfags i neutròfils, quimiotaxis, exocitosi granular, adherència, i apoptosi i també intervé en la diferenciació i apoptosi de la cèl·lula T regulant la producció d'IFN- $\gamma$  (Dong et al., 2002; Merritt et al., 2000; Rincon et al., 1998).

Sembla, doncs, que el paper de p38 en la funció immune és crític. L'activació de p38 és important en la resposta inflammatòria, en la producció d'interleucines induïda per LPS, en la producció de citocines induïda per TNF (Wysk et al., 1999) i en la resposta inflammatòria mediada per IL-12 (Zhang and Kaplan, 2000). L'activació de la via de p38 juga un paper essencial en la producció de citocines pro-inflamatòries (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  i IL-6), en la inducció d'enzims com COX-2 i iNOS i en la inducció de VCAM-1 i altres proteïnes adherents (Pietersma et al., 1997).

#### **I.3.6.4. La via d'ERK5**

ERK5 és una MAPK peculiar ja que conté un llarg domini C-terminal addicional al domini MAPK (Coulombe and Meloche, 2007; Nishimoto and Nishida, 2006; Wang and Tournier, 2006). No està clar quin és precisament el rol del domini C-terminal, tot i això, s'ha demostrat la seva participació en la regulació de la localització subcel·lular de ERK5 (Kondoh et al., 2006). També s'ha suggerit l'acció del domini C-terminal com a co-activador transcripcional dels factors de transcripció MEF2 (Kasler et al., 2000). ERK5 és activada en resposta a factors de creixement específics incloent EGF, de la mateixa manera que és activada per estrès generat per exemple per sorbitol i peròxid d'hidrogen (Abe et al., 1996; Kato et al., 1998b). Com altres MAPK, ERK5 és activada per fosforilació del seu motiu TXY i la cinasa responsable de la seva activació és MEK5. ERK5 s'expressa en la majoria de tipus cel·lulars i, encara que no es coneixen completament les seves funcions, s'ha relacionat ERK5 amb la vasculogènesi i amb el manteniment de la integritat vascular, ja que el ratolí *knockout* de ERK5 mor per defectes en l'angiogènesi i en el desenvolupament cardíac (Garaude et al., 2005). S'ha demostrat que ERK5 promou la proliferació i supervivència de diverses línies cel·lulars (Kato et al., 1998b; Wang et al., 2006).

Diverses línies d'investigació suggereixen que ERK5 pot tenir un rol funcional en les cèl·lules T. En relació amb altres teixits, ERK5 és altament expressada en el tim i la melsa (Yan et al., 2003). Almenys tres estudis han demostrat que ERK5 pot ser activat en cèl·lules T a causa de la senyalització iniciada pel TCR (Garaude et al., 2006; Garaude et al., 2005; Sohn et al., 2005). S'ha proposat que ERK5 podria controlar l'expressió de gens immediats (IE) en cèl·lules T mitjançant la regulació de l'activitat dels factors de transcripció MEF2, entre ells el factor MEF2D que és la isoforma predominant en cèl·lules T (Kasler et al., 2000). En cèl·lules T, la cascada MEK5-ERK5-MEF2D promou la transcripció de dos gens IE, *nur77* i *Klf2* (Kasler et al., 2000; Sohn et al., 2005). S'ha suggerit que *nur77* regula l'apoptosi en cèl·lules T (Calnan et al., 1995). També s'ha descrit que mentre *Klf2* no és essencial pel desenvolupament de les cèl·lules T CD4 o CD8 SP en el tim, si que és necessària per mantenir les poblacions de cèl·lules T perifèriques a la melsa i als nòduls limfàtics. Per altra banda, també s'ha descrit en humans que ERK5 és activada per l'estimulació de CD3 (però no per PMA) i que aquesta estimulació selectiva del mòdul ERK5 comporta la producció de IL-2

(Garaude et al., 2005). La funció de ERK5 en cèl·lules T, però, és controvertida ja que els limfòcits T sense ERK5 no presenten canvis en la funció (Ananieva et al., 2008).

S'ha descrit un *splicing* alternatiu de l'mRNA de ERK5 (Yan et al., 2001). L'anàlisi de bases de dades revela l'existència de dos tràncrits rars d'ERK5 murina (mERK5) que presenten *splicing* diferencial dels introns 1 i 2. En ambdós casos, la inclusió de l'intró introdueix un codó stop prematur per sota de la regió que codifica pel domini cinasa, i la traducció torna a començar en un ATG en pauta de lectura que està més cap a 3'. La ERK5 truncada per l'extrem N-terminal traduïda a partir d'un missatger que ha patit un *splicing* alternatiu, perd el domini cinasa i és capaç d'inhibir l'activitat cinasa de la ERK5 *full length*. Sembla, doncs, que els processos d'*splicing* participen en la regulació d'ERK5.

Però també s'ha descrit l'existència d'un altre variant per *splicing* d'ERK5, ERK5-T (*ERK5-Truncated*) (McCaw et al., 2005) que s'origina per *splicing* alternatiu a través de l'intró 4 que té com a conseqüència la introducció d'un codó stop que elimina el domini de translocació nuclear i el domini ric en prolines de la proteïna. Observacions experimentals en ratolí han confirmat que mERK5-T és capaç d'oligomeritzar amb ERK5 tant en estat actiu com inactiu. A més a més, mERK5-T es manté al citoplasma rera l'activació i és capaç de retardar la translocació nuclear de l'mERK5 activat de manera dependent de concentració (McCaw et al., 2005).

### **I.3.7. Factors de transcripció**

Després de l'activació de les cèl·lules T es transcriuen un gran nombre de gens i la seva activació es duu a terme de manera seqüencial i així, alguns en transcriuen immediatament després del reconeixement antigènic i altres s'activen fins i tot dies després. Per aquest motiu es poden classificar en gens immediats (la seva transcripció succeeix entre 10 i 30 minuts després de l'activació), temprans (transcrits entre els 30 minuts i dos dies després de l'activació) i els tardans (transcrits entre dos dies i fins a dues setmanes després de l'activació). Entre els primers tenim els c-fos, c-jun, c-myc, etc, entre els segons estan la majoria de les interleucines produïdes per la cèl·lula T així com algun dels seus receptors i entre els tercers podem destacar molècules com CTLA-4 i els gens VLA (*very late genes*). En general, la transcripció de gens immediats es dona en absència de síntesi de *novo* de proteïnes, la qual cosa indica que aquests gens són activats per factors de transcripció preexistents en la cèl·lula. Aquests factors

després de la cascada d'activació de cinases i fosfatases originada pel reconeixement antigènic, són fosforilats o defosforilats i d'aquesta manera, activats. En aquest estat d'activació s'uneixen a regions reguladores de la transcripció situades generalment en els promotors de determinats gens i permeten la seva transcripció o, a vegades, la seva repressió.

Així la primera etapa de la resposta cel·lular culmina amb l'expressió en el nucli de proteïnes trans-activadores que regulen la transcripció d'una sèrie de gens involucrats en els processos de proliferació, diferenciació i adquisició de les funcions en els limfòcits T.

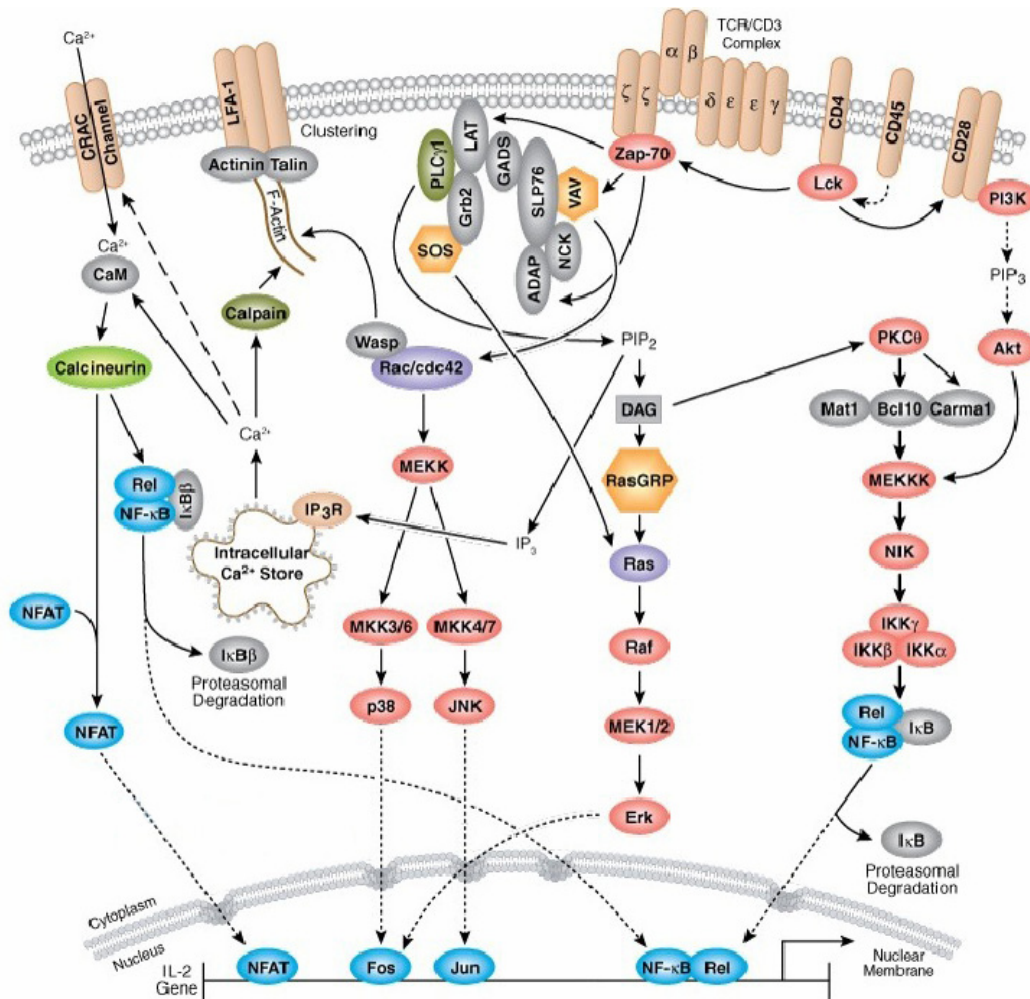
Tres dels molts factors que són activats en les cèl·lules T rera el reconeixement antigènic semblen ser crítics en la resposta de les cèl·lules T: NFAT, AP-1 i NF- $\kappa$ B.

NFAT és un factor de transcripció necessari per l'expressió de IL-2, IL-4, TNF i altres citocines. És activat per la fosfatasa dependent de calci-calmodulina, anomenada calcineurina. NFAT es sol unir a les regions reguladores dels gens de citocines com IL-2 i IL-4 en associació amb altres factors de transcripció com AP-1.

El factor AP-1 més ben caracteritzat es compon de les proteïnes Fos i Jun. La transcripció i la síntesi de Fos es veu incrementada per la via d'ERK i també per PKC. Jun és fosforilada per JNK.

NF- $\kappa$ B és essencial per la síntesi de citocines. En cèl·lules T en repòs, NF- $\kappa$ B es troba en el citoplasma acompanyat amb les proteïnes inhibidores de  $\kappa$ B (I $\kappa$ B), les quals bloquegen l'entrada de NF- $\kappa$ B al nucli. Les senyals del TCR causen la fosforilació de I $\kappa$ B, i posteriorment la seva ubiquitinització i la seva degradació, quedant NF- $\kappa$ B lliure per entrar al nucli.

Tota la cascada que causa l'activació de la cèl·lula T és molt complexa i culmina en l'activació i translocació al nucli de diversos factors de transcripció que regularan la producció de citocines, la supervivència cel·lular, la proliferació i la diferenciació (Fig.I.12.).



**Figura I.12. Representació esquemàtica de la cascada de senyalització que deriva de l'activació del TCR.** (Adaptat de Cell Signaling Technology, Inc.)

### I.3.8. Cèl·lules T reguladores i anèrgia

Les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> es poden dividir en base a la seva funció en cèl·lules T reguladores (Treg) i les cèl·lules T col·laboradores convencionals (Th). Les cèl·lules Th controlen la immunitat adaptativa contra patògens i el càncer mitjançant l'activació d'altres cèl·lules efectores del sistema immune. Les cèl·lules Treg es defineixen com a cèl·lules T CD4<sup>+</sup> encarregades de suprimir activitats potencialment perjudicials de les cèl·lules Th. Entre les funcions suggerides per les cèl·lules Treg hi ha: la prevenció de la malaltia autoimmune per manteniment de la tolerància a un mateix; la supressió de l'al·lèrgia, asma i immunopatologies induïdes per patògens i tolerància feto-maternal. La

identificació de les cèl·lules Treg és problemàtica ja que molts dels marcadors de Treg actualment utilitzats (CD25, CTLA-4, GITR, LAG-3, CD127 i Foxp3) representen marcadors generals de l'activació de les cèl·lules T, en comptes de ser realment marcadors específics de Treg. L'activitat supressiva de les cèl·lules Treg és dependent d'antigen. La classificació de les Treg com a un llinatge separat genera controvèrsia perquè l'habilitat de supressió no és exclusiva de les Treg. Les activitats de supressió de les Treg poden ser, en última instància, exercides per poblacions de Th convencionals. Informes recents han demostrat que les cèl·lules Treg positives per Foxp3 poden diferenciar-se *in vivo* en cèl·lules Th efectores convencionals (per referències veure (Corthay, 2009)).

Les cèl·lules Treg són capaces de reconèixer antigens propis i no propis d'una manera dependent d'antigen. Però les cèl·lules Th convencionals també tenen la capacitat de distingir entre el que és propi i no propi, i d'aquesta manera, per prevenir l'autoimmunitat, les cèl·lules T que reaccionen contra antigens propis són eliminades per esgotament (Kappler et al., 1987) o bé per inactivació funcional o anèrgia (Blackman et al., 1990).

La pèrdua o la falta de la coestimulació T comporta un estat d'insensibilitat anomenat anèrgia. Quan les senyals coestimuladores són presents, les cèl·lules T proliferen i procedeixen a produir una resposta immune total. Però en absència de coestímul, la cèl·lula T esdevé anèrgica i per tant, és insensible a una segona estimulació encara que aquesta inclogui ambdues senyals, el TCR i el coestímul. Aleshores la coestimulació proporciona no només una segona senyal que és necessària per la proliferació de la cèl·lula T, sinó que també proporciona senyals que la previnguin de la inducció d'anèrgia (Macian et al., 2004). Un increment de la concentració de calci intracel·lular, activa la fosfatasa calcineurina que és capaç d'activar el factor de transcripció NFAT (Macian, 2005). En absència de l'activació completa d'un altre factor de transcripció com AP-1, les proteïnes NFAT comporten l'expressió de gens inductors d'anèrgia (Bandyopadhyay et al., 2007; Heissmeyer et al., 2005; Macian et al., 2002). El fenotip d'anèrgia es pot revertir estimulants les cèl·lules T en presència de IL-2. La senyalització a través del receptor de IL-2 sembla prevenir i revertir l'anèrgia (Boussiotis et al., 1994; Schwartz, 2003). S'ha descrit que mTOR és també una diana de la senyalització del receptor de IL-2, i la seva activació sembla jugar un paper clau en la integració de senyals que determinen la decisió de la cèl·lula T per esdevenir anèrgica o per ser activada (Mondino and Mueller, 2007; Zheng et al., 2007).

## **II. HIPÒTESI I OBJECTIUS**





## **II.1. HIPÒTESI**

Els limfòcits T CD4<sup>+</sup> juguen un paper central en la resposta immune adaptativa. El nostre grup de treball està interessat en l'estudi de sindecans i en la funció dels limfòcits T CD4<sup>+</sup>. Els anàlisis més inicials van evidenciar la presència de sindecà-2 i sindecà-4 en limfòcits T CD4<sup>+</sup> humans durant la seva activació, fet que no s'havia descrit prèviament.

La nostra hipòtesi és que l'expressió de sindecà-2 i sindecà-4 i la cascada de senyals intracel·lulars que poden iniciar a la membrana en limfòcits T CD4<sup>+</sup> podria tenir una funció reguladora important durant l'activació de les cèl·lules T.

## **II.2. OBJECTIUS**

### **Objectius generals:**

Caracteritzar l'expressió de sindecà-2 i sindecà-4 en limfòcits T CD4<sup>+</sup> i estudiar-ne la seva funció.

### **Objectius concrets:**

#### **1. Caracterització de l'expressió de sindecà-2 i sindecà-4 en limfòcits T CD4<sup>+</sup>**

- a. Produir anticossos monoclonals contra sindecà-2 per tal de poder realitzar un bon estudi de la molècula.
- b. Analitzar l'expressió de sindecà-2 i sindecà-4 en limfòcits T CD4<sup>+</sup> durant la seva activació, tant a nivell de proteïna com a nivell d'mRNA.

#### **2. Caracterització funcional de sindecà-2 i sindecà-4 en limfòcits T CD4<sup>+</sup>**

- a. Determinar la funció de sindecà-2 i sindecà-4 en la proliferació de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> i la producció de citocines durant l'activació.
- b. Determinar la funció de sindecà-2 en la progressió del cicle cel·lular.

- c.** Determinar la implicació de les MAPK en el control de l'expressió de sindecà-2 utilitzant inhibidors farmacològics.
- d.** Determinar la senyalització induïda per sindecà-2 en cèl·lules T CD4<sup>+</sup> analitzant el patró de fosforilació de MAPKs.
- e.** Generar transfectants estables de sindecà-2 en el model T Jurkat per l'estudi de la senyalització i funció .

### **III. MATERIAL I MÈTODES**



## III. MATERIAL I MÈTODES

### III.1. Anticossos i Reactius

- Els inhibidors SB203580, PD098059 i SP600125 (tots tres de ToCris, Madrid) van ser dissolts en DMSO a 20, 60 o 100 mM respectivament i es van conservar a -20°C.
- L'anticòs anti-sindecà-2 B4 és un anticòs policlonal de conill dirigit contra la cua citoplasmàtica de sindecà-2 que va ser generat prèviament en el nostre laboratori (Granes et al., 1999).
- Els anticossos monoclonals anti-sindecà-2 SD2.1.186.CL.C i SD2.1.51.CL.C van dirigits contra la part extracel·lular i es van generar en el nostre laboratori en col·laboració amb el Dr. Pablo Engel (Hospital Clínic, Barcelona).
- L'anticòs monoclonal anti-sindecà-4 és de Santa Cruz Biotechnology (ref. sc-12766).
- L'anti-CD3 és un anticòs monoclonal de ratolí, d'isotip IgG<sub>2A</sub> (33-2A3 workshop II) i s'ha utilitzat purificat o com a sobrenedant d'hibridoma a una dilució 1:1000, la qual es va observar que produïa una secreció màxima de TNF $\alpha$  en cèl·lules Jurkat. Aquest anticòs ha estat cedit pel Dr. Ramón Vilella (Servei d'Immunologia, Hospital Clínic, Barcelona).
- L'anti-CD28 és un anticòs monoclonal de ratolí de tipus IgM (CK243) cedit pel Dr. Pedro Romero (Ludwig Institute for Cancer Research, Lausanne Branch, Suïssa). L'anti-CD28 s'ha utilitzat com a sobrenedant d'hibridoma a una dilució 1:12, la qual va ser prèviament optimitzada per titració per produir una secreció màxima de TNF $\alpha$  en combinació amb anti-CD3 en cèl·lules Jurkat.
- L'anti-CD4 és un anticòs monoclonal de ratolí d'isotip IgG<sub>2A</sub> (72-5A4 workshop II) i l'anti-CD45RA és un anticòs monoclonal també de ratolí amb isotip IgG<sub>1</sub> (111-1C5 workshop III), ambdós anticossos van ser cedits també pel Dr. Ramón Vilella (Servei d'Immunologia, Hospital Clínic, Barcelona).
- L'anticòs anti-HA és un anticòs policlonal de conill i és de Zymed Laboratories (ref. 71-5500).
- S'han utilitzat dos anticossos monoclonals anti-FLAG, un de GenScript (ref. A00013) i un de Sigma (ref. F-9291).

- Els secundaris conjugats a HRP utilitzats són de DakoCytomation.
- El secundari anti-IgG de ratolí conjugat a PE és de Jackson ImmunoResearch (ref. 115-116-071). I els secundaris conjugats a Alexa-488 i Alexa-633 són de Molecular Probes (Invitrogen).
- L'anti-fosfotirosina conjugat a HRP és de Millipore (ref. 16-105).
- La IgG de ratolí usada com a control és de Sigma (ref. M8642).
- L'anticòs anti-ERK5, anti-ERK1/2 i anti-fosfo-ERK1/2 són de Cell Signaling (ref. 3372, 9102, 9101 respectivament).
- L'anti-actina és un anticòs monoclonal de Sigma (ref. A-4700).

## **III.2. Cèl·lules i cultius cel·lulars**

Materials:

- DMEM (Cambrex ref. BE12-707F)
- RPMI 1640 (Cambrex ref. BE12-702F)
- FCS (PAA Laboratoris GMBH ref. A15-043)
- L-glutamina (Cambrex ref. BE17-605E)
- Penicil·lina / Estreptomina (Cambrex ref. DE17-602E)
- $\beta$ -mercaptoetanol (Sigma ref. M-7522)
- Incubador a 37°C i 5% CO<sub>2</sub> (IGO-150 CellLife Jouan)
- M199 (Gibco ref. 11043023)
- MCDB-131 (Gibco ref. 10372019)

### **III.2.1. Limfòcits TCD4**

Per aïllar limfòcits T les mostres de sang es van obtenir de donants sans de l'Hospital Clínic de Barcelona i de l'Hospital de la Vall d'Hebrón. Els limfòcits es van activar mitjançant l'addició d'anticòsos anti-CD3 i anti-CD28. Les cèl·lules T aïllades es van mantenir en cultiu en medi DMEM complementat amb el 10%FCS, L-glutamina, penicil·lina i estreptomina.

### **III.2.2. Cèl·lules 300.19**

La línia cel·lular 300.19 obtinguda del laboratori del Dr. Pablo Engel (Grup d'Immunoreceptors del Sistema Innat i Adaptatiu, Hospital Clínic, Barcelona) es va cultivar en medi RPMI 1640 complementat amb el 10%FCS, L-glutamina, penicil·lina,

estreptomicina i 50 $\mu$ M de  $\beta$ -mercaptoetanol en un incubador humidificat a 37°C i al 5% de CO<sub>2</sub>.

### **III.2.3. Cèl·lules Jurkat**

Les cèl·lules Jurkat (línia immortalitzada de limfòcits T) cedides pel Dr O. De La Calle (Hospital de Sant Pau, Barcelona) es van cultivar en medi DMEM complementat amb el 10%FCS, L-gln i P/S.

### **III.2.4. Cèl·lules COS**

Les cèl·lules COS (fibroblasts de ximpanzé) es van obtenir del laboratori del Dr. Pablo Engel (Grup d'Immunoreceptors del Sistema Innat i Adaptatiu, Hospital Clínic, Barcelona) i es van mantenir en DMEM complementat amb el 10%FCS, L-gln i P/S.

### **III.2.5. Cèl·lules Huvec**

Les cèl·lules Huvec són un cultiu primari de cèl·lules aïllades directament dels vasos sanguinis principals de cordons umbilicals humans, seguint un protocol de digestió amb col·lagenasa. S'utilitzen les cèl·lules fins a la sisena generació, ja que com a cultiu primari, envelleix ràpidament i perd algunes de les seves característiques. Aquestes cèl·lules es cultiven en medi M199 complementat amb 20%FCS, 1% Hepes, L-gln, P/S i per al seu creixement s'addiciona heparina (100 $\mu$ M) i ECGS (30 $\mu$ g/mL).

### **III.2.6. Cèl·lules HMEC**

Les cèl·lules HMEC són una línia cel·lular establerta a partir de cèl·lules endotelials primàries de la microvasculatura de la dermis cedides pel Dr. Eddi Ades (Ades et al., 1992). Aquestes cèl·lules es cultiven en medi MCDB-131 complementat amb el 10%FCS, L-gln, P/S i per al seu creixement s'addiciona hidro cortisona (10mg/mL) i EGF (20ng/mL).

Tant les cèl·lules Huvec com les HMEC es cultiven en flascons recoberts de gelatina 1% per garantir una bona adherència. Per desadherir-les del flascó es fa un tractament amb tripsina.

### **III.3. Producció d'anticossos monoclonals anti-sindecà-2**

Per tal d'obtenir anticossos monoclonals contra sindecà-2 es van immunitzar ratolins amb una línia cel·lular (300.19) que expressava sindecà-2 humà. D'aquesta manera els ratolins detectarien el sindecà-2 humà com a antigen i combatrien el tumor generant anticossos contra sindecà-2 humà.

#### **III.3.1. Transfecció estable de cèl·lules 300.19 amb el gen de sindecà-2**

Materials:

- Cubetes BTX estèrils
- Medi de cultiu per 300.19
- DMEM
- G418 (Geneticina, Invitrogen ref. 11811-023)

Es parteix de cèl·lules 300.19 (leucèmia B de Balb/c) que estan a una concentració de  $8 \times 10^6$  cèl·lules / 0,2mL i es volen cotransfectar amb el plasmidi 5-8N96 (generat pel nostre grup, que és un vector pRK5 que conté insertat el gen de sindecà-2 humà amb una cua d'hemaglutinina a la regió citoplasmàtica) i amb el plasmidi pcDNA3.1 circular (Invitrogen) que conté la resistència a Geneticina. Es barregen 4µg de 5-8N96 amb 4µg de pcDNA3.1 i s'afegeixen als 200µL de cèl·lules (resuspeses en DMEM). S'utilitza l'electroporador BTX i les condicions establertes són les següents:

- 0,125KV (125V)
- 1700µF
- 500V Capacitància / Resistència
- 72 ohm (R4)

Al cap de 5min a temperatura ambient després de l'electroporació, es recullen les cèl·lules i es dilueixen en un tub amb 11mL de medi de cultiu. A partir d'aquesta solució mare es fan les següents dilucions:

- A. 3mL solució mare + 8mL medi de cultiu
- B. 1mL solució mare + 10mL medi de cultiu



- C. 0,5mL solució mare + 10,5mL medi de cultiu
- D. 0,25mL solució mare + 10,75mL medi de cultiu
- E. 0,1mL solució mare + 10,9mL medi de cultiu

Es generen 5 plaques de cultiu de 96 pous i es rotulen com A, B, C, D i E. Cadascuna d'elles es sembren amb 100µL per pou de la dilució corresponent, reservant-se 4 pous de la placa A per cèl·lules control no electroporades. S'incuben a 37°C o/n i al dia següent s'afegeix l'antibiòtic per seleccionar els clons transfectats, en aquest cas la geneticina (G418). Es seleccionen i s'expandeixen els clons positius (on hi ha clons resistents a G418) a plaques de 24 pous.

### **III.3.1.1. Anàlisi dels clons transfectats**

#### **III.3.1.1.1. Lisat cel·lular**

S'obté un lisat cel·lular de cadascun dels clons seleccionats. El tampó de lisi que s'utilitza conté Hepes 25mM, NaCl 300mM, EDTA 0,2mM, TX-100 0,1%, *Protease Inhibitor Cocktail Set III* (ref. 539134 Calbiochem), 0,1mM Ortovanadat de sodi i 1mM PMSF. Per un milió de cèl·lules s'afegeixen 150µL de tampó de lisi, es pipeteja per homogenitzar la solució i es centrifuga a 12000rpm durant 20min a 4°C. Es recupera el sobrenedant on tenim el lisat cel·lular. Per quantificar la proteïna de cada lisat s'utilitza l'equip *BCA Protein Assay Kit* (Pierce ref. 23227).

#### **III.3.1.1.2. Dot-Blot**

Materials:

- TBS (NaCl 154mM, Tris 20mM)
- Membrana de nitrocel·lulosa (Protran Schleicher & Schuell)
- Papers 3MM
- Anticòs anti-HA de conill (Zymed ref. 71-5500)
- Anticòs secundari contra conill conjugat a HRP (Dako ref. F0205)
- ECL (Biological Industries 20-500-120)

S'utilitzen 3 quantitats diferents (5µg, 1µg i 0,1µg) de proteïna del lisat per duplicat de cada clon. Com a control s'utilitza extracte proteic de cèl·lules 300.19 no transfectades. Es submergeix la membrana de nitrocel·lulosa i el paper 3MM en TBS durant almenys 10min. Es munta l'aparell i es connecta a la bomba de buit. Seguidament ja es pot

introduir la mostra, diluïda també en TBS, i s'aplica el buit de nou. Es deixa assecar la membrana i posteriorment es fa el marcatge de la mateixa.

Es fan 5 rentats de la membrana amb TBS-Tween20 (1mL/L) i es bloqueja amb TBS-Mòlic 5% durant 1h a temperatura ambient. Es fan 2 rentats amb TBS-Tween20 i s'incuba amb l'anticòs primari anti-HA diluït en solució de bloqueig o/n a 4°C. Es renta durant 20min amb TBS-Tween20 i s'incuba amb l'anticòs secundari conjugat a HRP durant 1h a TA. Després d'uns rentats amb TBS-Tween20 primer i TBS després, es pot revelar.

#### **III.3.1.1.3. Immunocitoquímica dels clons seleccionats**

Materials:

- Anticòs primari de conill anti-HA (Zymed ref. 71-5500)
- Anticòs secundari contra conill conjugat a Alexa488 (Invitrogen ref. A11008)

Al ser cèl·lules en suspensió tot el marcatge es du a terme en tubs eppendorf seguint el mateix protocol que per citometria de flux (veure secció III.5.). Només al final es munta la preparació sobre un portaobjectes amb medi de muntatge i s'observa al microscopi de fluorescència.

#### **III.3.1.1.4. RT-qPCR dels clons seleccionats (veure secció III.14.)**

#### **III.3.1.1.5. Citometria dels clons seleccionats (veure secció III.5.)**

Materials:

- Anticòs primari de conill anti-HA (Zymed ref. 71-5500)
- Anticòs secundari contra conill conjugat a Alexa 488 (Invitrogen ref. A11008)

#### **III.3.2. Immunització**

Es van immunitzar 3 femelles de ratolí de la soca Balb/c amb cèl·lules 300.19 (leucèmia B de Balb/c) transfectades amb el gen de sindecà-2 (clon D13; veure secció IV). Es van realitzar 3 injeccions intraperitoneals en intervals de 15 dies. Abans d'injectar-se, les

cèl·lules es van rentar 3 vegades amb tampó fosfat (PBS) i es van injectar aproximadament  $20 \times 10^6$  cèl·lules per ratolí i immunització.

### III.3.3. Fusió cel·lular

L'objectiu de la fusió d'un limfòcit B productor d'anticossos amb una cèl·lula de mieloma de ratolí Balb/c és generar un hibridoma, és a dir, una cèl·lula immortal amb capacitat il·limitada de produir un anticòs monoclonal específic per un antigen determinat. La fusió cel·lular es va realitzar 3 dies després de la última immunització, utilitzant una modificació de la tècnica original de Köhler i Milstein (Kohler and Milstein, 1975).

Materials:

- Polietilenglicol al 50% (PEG) (Sigma ref. P-7181)
- HAT (50X) (Hipoxantina, aminopterina i timidina) (Sigma ref. H0262)
- HT (50X) (Sigma ref. H0137)
- Medi de cultiu selectiu HAT: RPMI 1640 + 20% FCS (Fetalclone I HyClone, USA) + glutamina + penicil·lina + HAT (100 $\mu$ M d'hipoxantina, 400nM d'aminopterina i 16 $\mu$ M de Timidina)
- Plaques de cultiu de 96 pous
- Material quirúrgic
- Cèl·lules *feeders* procedents del rentat peritoneal de 3 ratolins

#### III.3.3.1. Obtenció i preparació de les cèl·lules *feeders*

Les cèl·lules *feeders* són principalment macròfags que provenen del rentat intraperitoneal i que segreguen una sèrie de citocines (entre elles IL-6) que afavoreixen el creixement dels hibridomes.

Materials:

- Ratolí Balb/c de 9 setmanes
- Xeringues de 5mL amb agulla de 19G precarregada amb RPMI
- Material quirúrgic

Es sacrifica el ratolí per desnucació i es ruixa amb etanol al 70% per evitar contaminacions. Es separa la pell del peritoneu i s'injecten 5mL de medi RPMI pel costat esquerre del peritoneu i seguidament s'extreu el volum injectat (es solen extreure 3-4 mL dels 5mL injectats). Es dilueix la suspensió cel·lular extreta en medi de cultiu (per la fusió, medi HAT) i es plaquegen les cèl·lules a raó de 100 $\mu$ L per pou (per placa de 96 pous). Aproximadament es necessita un ratolí per cada 6 plaques de 96 pous.

### **III.3.3.2. Obtenció dels esplenòcits**

Es sacrifica el ratolí immunitzat per desnucació i es ruixa en etanol 70% per evitar contaminacions. S'extreu la melsa del costat esquerre del ratolí i es col·loca en una placa de petri amb 10mL de medi RPMI. Amb l'ajuda de dues xeringues torçades de 25G, s'extreuen els esplenòcits i es recullen en un tub de 50mL. S'esperen uns 2min a que sedimentin els agregats al fons del tub i es transfereixen a un tub net les cèl·lules i s'intenten acabar de disgregar amb una pipeta de 10mL pipetejant-les amb cura unes 20 vegades. Es renten els esplenòcits 3 vegades amb RPMI sense FCS mitjançant centrifugació (1500rpm, 5min, temperatura ambient). Finalment es conta el número d'esplenòcits, aproximadament s'obtenen entre 100 i 150 milions.

### **III.3.3.3. Obtenció de les cèl·lules del mieloma (NS-1)**

Es descongelen una setmana abans de la fusió. El dia abans de la fusió se'ls hi afegeix el doble de medi de cultiu perquè es trobin en fase exponencial. La proporció de cèl·lules per la fusió ha de ser de 4 esplenòcits per cada cèl·lula NS-1.

Abans de la fusió es renten les cèl·lules amb RPMI sense FCS (1500rpm, 5min, temperatura ambient).

### **III.3.3.4. Fusió**

Es ressuspenen en 20mL de medi i en el mateix tub les cèl·lules del mieloma i els esplenòcits en proporció 1:4. Es barregen i es centrifuguen en condicions suaus (1000rpm, 10min, TA). Es descarta el sobrenedant fins la última gota, es col·loca el tub en un bany a 37°C i es realitza la fusió utilitzant polietilenglicol al 50% tot seguint la següent seqüència:

- Afegir 1mL PEG gota a gota durant 1 minut en agitació
- Incubar 1min agitant
- Afegir 1mL RPMI gota a gota durant 1 minut en agitació
- Afegir 2mL RPMI gota a gota durant 1 minut en agitació
- Afegir 5mL RPMI gota a gota durant 1 minut en agitació
- Afegir 10mL RPMI gota a gota durant 1 minut en agitació
- Completar amb RPMI fins a un volum final de 50mL

Es centrifuguen les cèl·lules fusionades (1000rpm, 10min, TA) i es ressuspenen en medi selectiu i es distribueixen en 8-10 plaques de cultiu de 96 pous amb medi de cultiu selectiu HAT enriquit amb cèl·lules *feeders*. Aquest cultiu es manté durant 10-15 dies i es passa a testar els sobrenedants dels diferents pous on han crescut clons. En aquest cas els sobrenedants es van testar per citometria de flux.

#### **III.3.4. Selecció en medi HAT**

Les cèl·lules NS1 poden créixer en medi de cultiu normal però no en medi de selecció HAT (Hipoxantina-Aminopterina-Timidina) degut a una mutació en la via de síntesi de nucleòtids (són deficients en l'activitat enzimàtica HGPRT). La fusió dels esplenòcits amb aquesta línia de mieloma mutada li proporciona els gens necessaris pel creixement en medi de selecció HAT. Al mateix temps, els gens proporcionats per la línia NS-1 fa als híbridomes immortals.

Existeixen dues vies de síntesi de nucleòtids: la via de *novo* i la via de salvament. L'aminopterina inhibeix la via de *novo* de la síntesi de nucleòtids. Els esplenòcits tractats amb aminopterina poden utilitzar la via de salvament ja que tenen l'enzim HGPRT (Hipoxantina-guanosina fosforribosiltransferasa), però són cèl·lules de capacitat proliferativa limitada i acabaran morint en cultiu. Les cèl·lules NS-1 que careixen de l'enzim HGPRT no poden sintetitzar nucleòtids en presència d'aminopterina per tant no poden viure en medi HAT, però tenen una capacitat proliferativa il·limitada en un medi de cultiu normal. La fusió dels esplenòcits amb les cèl·lules NS-1 aportarà l'enzim HGPRT perquè les cèl·lules híbrides puguin viure en medi HAT i a més a més seran cèl·lules immortals. Per aquestes característiques, en medi HAT només es seleccionaran les cèl·lules híbrides.

#### **III.3.5. Selecció dels híbridomes d'interès**

La selecció dels híbridomes secretors d'anticossos reactius contra sindecà-2 es va realitzar mitjançant citometria de flux, marcant cèl·lules 300.19 transfectades amb sindecà-2 (D13) i els que van donar positiu es van analitzar en front a cèl·lules 300.19 no transfectades. Es van seleccionar els clons que van donar positiu per les D13 i negatiu per les 300.19.

Per demostrar que els sobrenedants dels clons seleccionats eren capaços de reconèixer sindecà-2 en una cèl·lula diferent de la de ratolí (300.19) es van analitzar, també per citometria, marcant cèl·lules COS transfectades transitòriament amb sindecà-2 (plasmidi 5-8N96).

Es va determinar l'isotip dels sobrenedants dels hibridomes d'interès amb l'equip Mouse Isotyping Kit Isostrip (Roche, Applied Biosystems ref.11493027001).

### III.3.5.1. Citometria de flux en selecció d'hibridomes

Materials:

- Anticòs secundari de cabra anti-IgG de ratolí conjugat a PE (Jackson immunoresearch ref. 115116071)
- Tampó de rentat: PBS 1X, 2%FCS, 0,01% azida sòdica. Mantenir a 4°C.
- Tampó de fenotipat: tampó de rentat al qual se li afegeix el 5-15% de sèrum de conill prèviament inactivat per calor (30min a 56°C)
- Citòmetre de flux (FACSCalibur, Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San José, CA. Equipat amb el programa CellQuest™)

Es renten les cèl·lules una vegada amb aproximadament 15mL de tampó de rentat (5min a 1500rpm). Es ressuspenen les cèl·lules amb tampó de fenotipat a raó d'aproximadament 500.000 cèl·lules / 50µL. S'addicionen 50µL del sobrenedant de l'hibridoma a testar als 50µL de cèl·lules i s'incuben durant 25min a 4°C. Es renten les cèl·lules amb 3mL de tampó de rentat, es centrifuguen a 1500rpm 5min a 4°C i es passa a incubar les cèl·lules amb 100ul de tampó de fenotipat, que conté una dilució final de 1:200 d'anticòs de cabra contra IgG de ratolí conjugat a PE, durant 20min a 4°C i protegit de la llum. Es renten les cèl·lules amb 3mL de tampó de rentat i es centrifuguen a 1500rpm 5min a 4°C. Es ressuspenen les cèl·lules amb 0,5mL de tampó de rentat i s'analitzen mitjançant el citòmetre de flux.

### III.3.5.2. Transfecció transitòria de cèl·lules COS

Material:

- Cultiu de cèl·lules COS
- Plasmidi 5-8N96 (pRK5 que conté el gen de sindecà-2 humà amb una cua HA a la regió citoplasmàtica)
- Cell Line Nucleofector Kit V Solution Box ( AMAXA Biosystems ref. VCA-1003)

A partir del cultiu de cèl·lules COS, es fa un rentat amb PBS i s'afegeix tripsina que es deixa actuar durant 2min a 37°C. S'afegeix DMEM-10%FCS i es recull tot en un tub. Es centrifuguen les cèl·lules 5min a 1500rpm, s'afegeix medi sense FCS i en torna a centrifugar (1500rpm 5min). Traiem tot el medi per decantació i recollim el pellet de cèl·lules que mesquem amb el DNA (4µg) (cal tenir el DNA força concentrat, a 1-2µg/µL per minimitzar el volum). Barregem els 15µL (màxim) de cèl·lules + DNA amb 90µL de Nucleofector seguint les indicacions del fabricant. Electroporem la barreja amb el programa A-24 de l'electroporador AMAXA, es recullen les cèl·lules i es sembren en un flascó petit amb DMEM-10%FCS. Al dia següent es poden fenotipar per citometria de flux (veure secció III.3.5.1).

### **III.3.6. Cultiu secundari**

Les cèl·lules dels pous seleccionats van ser transferides a plaques de 24 pous en medi complementat amb HT (100µg/mL d'hipoxantina i 16µg/mL de timidina) durant 2-3 setmanes.

*NOTA: Si algun dels hibridomes d'interès presenta problemes per créixer, es pot tornar a enriquir el medi amb cèl·lules feeders (veure punt III.3.3.1).*

### **III.3.7. Subclonatge dels hibridomes mitjançant dilució límit**

Les cèl·lules de l'hibridoma a subclonar es reparteixen en 2 plaques de 96 pous. Es divideix cada placa per la meitat i a cada meitat es sembren les cèl·lules a una concentració de 8, 4, 2 i 1 cèl·lules per cada pou (100µL/pou) respectivament. En aquest cas també s'enriqueix el medi amb 100µL de cèl·lules feeders.

Després d'un període de 10-15 dies es testen els sobrenedants dels pous en els que hi ha hagut creixement cel·lular (s'escull per testar aquella dilució on ha crescut un clon cada 4-5 pous). Es considera clonat un hibridoma quan tots els sobrenedants testats són positius. De no ser així, es realitza un altre subclonatge escollint un dels clons positius.

### **III.3.8. Expansió dels hibridomes**

Una vegada subclonat l'hibridoma d'interès es pot procedir a la seva expansió, primer en plaques de 24 pous i quan tinguin un bon creixement en flascons de 25cm<sup>2</sup> o de

mides més grans. Progressivament es pot eliminar el suplement d'HT i es pot anar baixant el percentatge de FCS del 20% arribant fins a un mínim del 10%.

Per tal d'obtenir sobrenedants amb altes concentracions d'anticòs es van utilitzar flascons de cultiu d'alt rendiment (INTEGRA CELLline-1000, Cultek ref.90005).

### **III.3.9. Congelació dels hibridomes**

Els hibridomes d'interès s'han d'anar congelant a cada punt del procés. Això ens permetrà recuperar de nou l'hibridoma si sorgís algun problema.

Les cèl·lules a congelar es ressuspenen en una solució de FCS i a continuació s'afegeix FCS que conté el 20% de DMSO gota a gota fins arribar a una solució final de FCS-10%DMSO. Es distribueixen les cèl·lules en els criovials i després d'una nit al congelador de -80°C, s'introdueixen en un tanc de nitrogen líquid. És important realitzar tot el procés en fred.

### **III.3.10. Purificació d'anticossos**

La purificació d'anticossos es va realitzar mitjançant cromatografia d'afinitat a partir de sobrenedants de cultius d'alt rendiment establerta en medi RPMI complementat amb el 15% FCS. Per la purificació dels anticossos es sol utilitzar proteïna A o G aïllades d'*Staphylococ*s A o *Streptococ*s G. Ambdues proteïnes s'uneixen de manera no covalent a la regió Fc dels anticossos. El grau d'afinitat de la proteïna A o G per la regió Fc dels anticossos varia segons l'isotip de l'anticòs i l'espècie en la qual han estat produïts.

Materials:

- Kit de purificació d'anticossos monoclonals Affi-Gel Protein-A MAPS II (Monoclonal Antibody Purification System), (BioRad ref. 153-6159)
- Membrana de diàlisi (Sigma ref. D-9277)
- 4 Litres de PBS per la diàlisi

Es purifiquen els anticossos desitjats seguint les instruccions del Kit Affi-Gel Protein-A MAPS II. Els anticossos es purifiquen per cromatografia d'afinitat utilitzant una tècnica modificada per la purificació d'IgG amb proteïna A. Seguidament es dialitza la proteïna per tal d'eliminar les sals que puguin interferir en el nostre estudi, la diàlisi es realitza amb dos canvis de PBS 1X, a 4°C durant 24-48 hores, en constant agitació. Un cop



dialitzat es mesuren els nivells de proteïna amb un espectrofotòmetre a una longitud d'ona de 280nm. Per calcular la concentració de proteïna, la relació entre densitat òptica (O.D.) i la concentració de proteïna (mg proteïna/mL) és de 1,35 / (1mg/mL). A continuació s'analitza el grau de purificació per electroforesi i s'aliqota l'anticòs. Es manté l'anticòs a -20°C.

*NOTA: Els anticossos que es vagin a utilitzar per realitzar estudis funcionals, s'ha d'assegurar que siguin lliures d'endotoxines (com LPS). En aquest cas, es treballarà durant tot el procés de purificació en condicions estèrils (sota campana de flux laminar), es filtraran totes les solucions i tampons i el PBS utilitzat a la diàlisi s'autoclavarà. Els anticossos que es vagin a utilitzar per fenotipar, cal afegir-los azida sòdica (0,01%) per evitar la seva contaminació.*

### **III.3.11. Biotinilació d'anticossos**

El marcatge dels anticossos amb biotina permet la utilització d'avidines/streptavidines conjugades a enzims o fluorocroms.

Materials:

- Solució 1M de Carbonat sòdic, pH 9,5 [ $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$  (1M/1M)] (per preparar 100mL: 0,84g de  $\text{NaHCO}_3$  més 0,356g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )
- Biotina (*Stock*: 2,5mg/mL dissolts en DMSO) (Sigma ref. B-2643)
- La concentració òptima dels anticossos que es vulguin biotinar ha de ser entre 1-0,5mg/mL en PBS

En un tub es barregen 1mg d'anticòs, 50µL de la solució 1M de carbonat sòdic i 100µg de biotina per cada mg d'anticòs. S'incuba el tub en una noria en agitació rotatòria durant 4h a temperatura ambient. Es dialitza en front a 2 litres de PBS durant tota la nit a temperatura ambient i es dialitza una segona vegada en 2 litres de PBS a 4°C durant una nit.

### **III.4. Preparació de limfòcits T humans**

Materials:

- Ficoll Histopaque Lymphoprep (1,007g/dL) ( Axis-Shield, Reactiva, ref. 1114545)
- DMEM
- DMEM suplementat amb el 10%FCS, penicilina, estreptomina i L-glutamina
- Xeringa i agulla 19G

Els concentrats de capa leucocitària es van rebre en una bossa de sang de donants sans de l'Hospital Clínic i de l'Hospital de la Vall d'Hebrón. S'agita la bossa i s'esterilitza (amb etanol 70% o amb flama) la zona on s'introdueix l'agulla per extreure la sang. S'introdueix l'agulla (de 1,1mm de diàmetre) i es va extreure la sang poc a poc. Posteriorment es prepara un tub de 50mL que contingui 20mL de Ficoll i damunt es va afegint, a poc a poc i sense que es barregin, 25mL de sang. Es centrifuga a 2000rpm durant 20min sense fre i a TA.

Després de la centrifugació es recupera la capa de cèl·lules mononuclears en un tub net, es fan un parell de rentats de les cèl·lules amb medi DMEM i es fa un contacte cel·lular. Es ressuspenen les cèl·lules en medi DMEM complementat amb el 10%FCS, P/S i L-gln a una concentració de  $10-12 \times 10^6$  cèl·lules/mL. Es sembren en un flascó de  $75\text{cm}^2$  i s'incuben durant almenys 20min a  $37^\circ\text{C}$ . D'aquesta manera es descarten la majoria de monòcits ja que queden adherits al plàstic. Es recull el sobrenedant on són els limfòcits, es fa un contacte cel·lular i es cultiven en DMEM-0,5%FCS (o en DMEM-5% plasma autòleg), P/S i L-gln durant una nit a una concentració de  $1-2 \times 10^6$  cèl·lules/mL abans de ser estimulats. Els limfòcits T van ser estimulats amb anticossos anti-CD3 i anti-CD28.

*NOTA: En els casos on s'ha incubat els limfòcits T en presència del plasma del propi donant, un cop separat, ha estat de complementat durant 30min a  $56^\circ\text{C}$ .*

### **III.5. Citometria de flux**

#### Materials

- Tampó de rentat: PBS 1X + 2% FCS
- Tampó de permeabilització: PBS 1X + 2% FCS + 0,2% Saponina
- Tampó de fixació: PBS 1X + 1%  $\text{CH}_2\text{O}$

Per un marcatge d'un antigen de membrana cel·lular es preparen les cèl·lules en un eppendorf (preferentment unes 500.000 cèl·lules) i es renten amb 1mL de tampó de rentat (microcentrífuga 2200rpm, 2min). Es ressuspenen amb tampó de rentat que conté l'anticòs primari i es deixa incubar, generalment a  $4^\circ\text{C}$  (a no ser que l'anticòs especifiqui el contrari), durant uns 20 minuts. Es fa un rentat amb 1mL de tampó de rentat (microcentrífuga 2200rpm, 2min) i s'incuba amb l'anticòs secundari conjugat a un fluorocrom tapat de la llum durant uns 25min a  $4^\circ\text{C}$ . Es renta una vegada més i es

ressuspen amb 0,5mL de tampó de rentat. La mostra ja és a punt per l'anàlisi amb citometria de flux.

Per un marcatge intracel·lular es preparen les cèl·lules en un eppendorf i es renten amb 1mL de tampó de rentat (microcentrífuga 2200rpm, 2min). Es fixen les cèl·lules en 100µL de tampó de fixació i es deixen 10min a 37°C o 30min en gel. Es fa un altre rentat. Es permeabilitzen les cèl·lules amb uns 200µL de tampó de permeabilització i es deixa incubar durant 15min a 4°C. Es renta amb 1mL de tampó de permeabilització i s'afegeix l'anticòs primari dirigit contra un antigen intracel·lular diluït en tampó de permeabilització. S'incuba uns 30min a 4°C i es renta amb 1mL de tampó de permeabilització. Es ressuspenen les cèl·lules amb l'anticòs secundari diluït també en tampó de permeabilització i s'incuba durant uns 25min a 4°C i protegit de la llum. Es renta una vegada més i es ressuspen amb 0,5mL de tampó de rentat. La mostra ja és a punt per l'anàlisi amb citometria de flux.

Els anàlisis per citometria de flux s'han dut a terme a la unitat de citometria dels Serveis Científicotècnics de la UB (Campus Diagonal) on disposen d'un citòmetre analitzador FC500-MPL (Beckman Coulter) i un citòmetre analitzador Coulter XL.

### **III.6. Separació cel·lular (FACS)**

Es preparen els limfòcits T humans (veure secció III.4.) i s'incuben amb l'anticòs primari, per exemple anti-CD4 i anti-CD45RA, durant 20min a 4°C. Es centrifuga a 2200rpm 2min i es ressuspenen en tampó de rentat (PBS + 2% FCS) que conté la dilució corresponent d'anticòs secundari prèviament esterilitzat per filtració, en aquest cas anti-ratolí IgG<sub>2A</sub>-Alexa633 i anti-ratolí IgG<sub>1</sub>-Alexa488. Prèviament s'han optimitzat les concentracions d'anticòs per obtenir una relació màxima senyal/soroll de fons i evitar creuaments dels secundaris. S'incuba amb el secundari uns 20min a 4°C tapat de la llum, es centrifuguen a la microcentrífuga 2200rpm 2min, i es ressuspenen en FCS 100%. La mostra és separada per FACS en la unitat de citometria dels Serveis Científicotècnics de la UB utilitzant un citòmetre de flux separador d'alta velocitat MoFlo equipat amb el programa Cytomation. Les cèl·lules classificades es recuperen en PBS estèril i es centrifuguen a 1500rpm 7min. Es ressuspenen les cèl·lules seleccionades en el medi adient (DMEM-10%FCS, P/S i L-gln) a una densitat de  $1-2 \times 10^6$  cèl·lules/mL i s'incuben a 37°C i al 5% de CO<sub>2</sub>.

*NOTA: Les mostres activades s'obtenen addicionant anticossos anti-CD3 i anti-CD28. Per altra banda les mostres a les que se'ls aplica l'acció d'inhibidors són tractades amb el reactiu (PD098059, SB203580, SP600125) a una concentració final 1µM, s'incuba durant 45min a 37°C i posteriorment s'afegeix el FCS i els anticossos anti-CD3 i anti-CD28.*

*NOTA: Els assaigs on es purifiquen TCD4<sup>+</sup> només es realitza el marcatge contra CD4. Les mostres FLAG+ que també han estat separades s'han marcat amb un anticòs anti-FLAG i un secundari conjugat a Alexa488.*

### **III.7. Separació cel·lular per Columnes de Cromatografia d'afinitat**

Per seleccionar els limfòcits T CD4<sup>+</sup> després de la preparació de limfòcits T humans (veure secció III.4.), en diversos casos s'han utilitzat columnes de cromatografia d'afinitat específiques per separar selectivament els limfòcits TCD4 (Human CD4 Cell - CL110- Recovery Column Kit, Cedarlane, Tebu-bio). Les columnes TCD4 de Cedarlane són una eina d'enriquiment de TCD4 humans per cromatografia d'afinitat per selecció negativa. Per tal de comprovar que les columnes ens donaven una purificació tant bona com el FACS, es van marcar amb anticòs anti-CD4 una mostra de cèl·lules acabades de purificar mitjançant la columna. Més d'un 90% de la població era TCD4<sup>+</sup> per tant les columnes ens estaven donant un bon rendiment. La separació cel·lular per columnes es va fer seguint les indicacions del fabricant.

### **III.8. Reacció limfocitària mixta**

Els PBLs d'un donant, per ser usats com a cèl·lules estimuladores, van ser irradiats amb 2500rad i posteriorment ressuspesos en DMEM-10%FCS, P/S i L-gln a una concentració de  $5 \times 10^6$  cèl·lules/mL. L'equivalent a  $5 \times 10^5$  cèl·lules irradiades, és a dir 100µL, es van dispensar a cada pou d'una placa de 96 pous amb el fons en forma de U; i es van incubar amb 10µL de medi que contenia anticòs anti-sindecà-2 (SD2.1.186.CL.C 10µg/mL), anti-sindecà-4 (10µg/mL), una mescla d'ambdós anti-sindecà-2 i anti-sindecà-4, o DMEM-10%FCS sol. Després de 15min, es van afegir 50µL de cèl·lules resposta ( $10^5$  cèl·lules a cada pou). Les cèl·lules es van incubar durant 6 dies en un incubador humidificat a 37°C i amb el 5% de CO<sub>2</sub>. Al quart dia, quan l'expressió de

sindecans és al seu màxim nivell, es van tornar a afegir els anticossos de nou. Les plaques es van tractar amb Timidina-<sup>3</sup>H (0,5μCi [0,0185 MBq]/pou; GE healthcare). Les cèl·lules es van recollir 20h després del tractament, i la quantitat de radioactivitat incorporada es va determinar al comptador de centelleig (TopCount; PerkinElmer). Els resultats estan presentats com a percentatge dels comptes per minut (cpm) del pou control (cèl·lules estimuladores i donadores de resposta incubades amb DMEM-10%FCS) i com a mitjana de cultius triplicats.

### **III.9. Activació de limfòcits en plaques recobertes**

Materials:

- Tampó de recobriment: Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,1M pH 9,4

Es van sembrar PBLs i cèl·lules TCD4 (a una concentració de  $2 \times 10^5$  cèl·lules /mL) en plaques de 96 pous de fons pla, les quals havien estat recobertes amb anticòs anti-CD3, amb IgG de ratolí o amb combinacions d'anticossos anti-CD3 + anti-sindecans, respectivament. Per preparar els pous recoberts d'anticòs s'incubaven amb una quantitat suficient de tampó de recobriment que contenia anticòs anti-CD3 (10μg/mL) o bé anti-sindecans (40μg/mL) o tots dos. Es van deixar incubar un mínim d'1h a 37°C o bé una nit a 4°C. Abans d'incubar les cèl·lules en els pous es feien 2 ó 3 rentats del pou amb DMEM per evitar que quedés anticòs soluble.

Les cèl·lules s'incubaven en els pous recoberts d'anticòs el temps determinat per cada tipus d'experiment i després es recollien i es passava al seu anàlisi.

En els experiments on l'entrecruament de l'anticòs anti-sindecà és a nivell d'un secundari contra ratolí (Fig. IV.11.D) les cèl·lules TCD4 es van sembrar en plaques de 96 pous recobertes amb anticòs anti-CD3 i incubades durant 15min a temperatura ambient amb anticossos anti-sindecans solubles o amb la IgG de ratolí control (10μg/mL). Els anticossos solubles van ser entrecruats amb un anticòs secundari contra les IgG de ratolí (10μg/mL).

En els pous de control d'activació, els limfòcits van ser estimulats amb PMA (5ng/mL) i amb ionòfor de calci (Ionomicina, 250ng/mL) o amb PHA (10μg/mL) i anti-CD28.

En els experiments de proliferació (Fig. IV.11.) després de 4 dies d'incubació en presència d'anticossos entrecreuat, es va recollir el sobrenedant (0,1mL) i es va determinar la secreció de TNF $\alpha$  mitjançant un ELISA en sandvitx (Becton Dickinson, ref.555212). Es va afegir la Timidina<sup>3</sup>H (2,5 $\mu$ Ci/mL) reemplaçant el volum extret de sobrenedant i es va mantenir en cultiu 20h més. Un cop recollides les cèl·lules, es va determinar la incorporació de timidina en un comptador de centelleig (TopCount; PerkinElmer). Els resultats estan presentats com a percentatge dels comptes per minut (cpm) del pou control (cèl·lules estimuladores i donadores de resposta incubades amb DMEM-10%FCS) i com a mitjana de cultius triplicats.

### **III.10. Activació de limfòcits amb anticossos biotinats i boles de StreptAvidina-Sepharosa**

Materials:

- StAvidin-agarose (Sigma ref. S-1638)

Les cèl·lules (TCD4 o Jurkat) es renten un parell de vegades en DMEM i es ressuspenen a una concentració de  $4 \times 10^6$  cèl·lules/mL. Es separen 0,25mL per punt experimental en tubs eppendorf i s'afegeixen els anticossos biotinats (veure III.3.11) anti-CD3-biotina (5 $\mu$ g/mL), anti-sindecà-2-biotina SD2.1.186.CL.C i SD2.1.51.CL.C (20 $\mu$ g/mL) i mIgG-biotina (20 $\mu$ g/mL). S'incuba amb els anticossos 10min a 0°C i s'afegeix la StreptAvidina-agarosa. Es centrifuga a 3000rpm 10s i s'incuba a 37°C durant els temps adequats en cada experiment. Es centrifuga a 6000rpm 20s, es descarta el sobrenedant i es lisa el pellet amb tampó de càrrega d' SDS (veure III.12). S'incuba a 95°C 30min i ja es pot carregar en el gel d'acrilamida per fer l'electroforesi.

### **III.11. Lisi cel·lular i digestió amb Heparinasa i Chondroitinasa**

En la lisi cel·lular s'han utilitzat dos tipus de tampons. Per obtenir extractes proteics totals s'ha utilitzat el tampó de càrrega que conté 1% SDS, 1%  $\beta$ -mercaptoetanol, 25mM Tris-HCl (pH6,8), 10% glicerol i 0,001% Blau de bromofenol. Després de lisar amb aquest tampó la mostra s'incuba 30min a 95°C abans de ser carregada en el gel d'acrilamida.

Per obtenir lisis del material citoplasmàtic separant els nuclis s'ha utilitzat un tampó suau. El tampó de lisi que s'utilitza conté Hepes 25mM, NaCl 300mM, EDTA 0,2mM, TX-100 0,1%, *Protease Inhibitor Cocktail Set III* (ref. 539134 Calbiochem), 0,1mM Ortovanadat de sodi i 1mM PMSF. Posteriorment a aquesta lisi es pot quantificar la proteïna amb l'equip *BCA Protein Assay Kit* (Pierce ref. 23227). Les mostres digerides amb Heparinasa i Chondroitinasa es van lisar amb aquest tampó i es van incubar a 37°C durant una nit amb 20mM Tris-HCl i 2mM CaCl<sub>2</sub> que contenia solució d'heparinasa (0,01 U/mL) i chondroitinasa ABC (0,1 U/mL). Per carregar en gel d'acrilamida una quantitat d'aquest lisat es barreja amb tampó de càrrega i s'incuba 5min a 95°C.

### **III.12. Electroforesi de proteïnes i detecció per *Western Blot***

Materials:

- Tampó d'electroforesi: per preparar 1L de solució 10X (30g Tris Base, 144g de Glicina i 10g de SDS)
- Tampó de càrrega (1X): 1% SDS, 1% β-mercaptoetanol, 25mM Tris-HCl (pH6,8), 10% glicerol i 0,001% Blau de bromofenol. *NOTA: Les mostres pot interessar reduir-les o no. El β-mercaptoetanol és l'agent reductor, si no es volen utilitzar condicions reductores, no addicionar al tampó de càrrega. NOTA: Les mostres lisades completament amb tampó de càrrega s'incuben durant 30min a 95°C.*
- Marcador de pesos moleculars (Invitrogen ref. LC5625).
- Els gels es van preparar en làmina per electroforesi vertical de tipus discontinu (gel concentrador i gel separador). La mida del gel ha estat variable segons els requeriments experimentals, habitualment es van utilitzar plaques de 10 x 8 cm (ample x alt) i amb un gruix de 1,5mm.
- Tot el material de vidres i pintes es van rentar amb aigua i etanol. S'ha utilitzat el sistema d'electroforesi Mini Protean III de BioRad.
- Preparació de gels:

	Gel Separador 10%	Gel Concentrador 4%
Acrilamida 37%	1,9mL	0,32mL
Tampó Tris-HCl 1,5M pH 8,8	1,75mL	-
Tampó Tris-HCl 0,5M pH 6,8	-	0,73mL
H <sub>2</sub> O	3,2mL	1,86mL
SDS 10%	140μL	60μL
APS 20%	35μL	15μL
TEMED	10μL	5μL

*NOTA: Segons el percentatge del gel que vulguem, variarem el volum de poliacrilamida i aigua.*

- Tampó de Transferència: per preparar 2 litres de tampó: 6g Trizma, 28,84g Glicina, 1g SDS, 400mL Metanol.
- TBS: per preparar 500mL de solució 10X: 50mL Tris-HCl 1M pH 7,4, 150mL NaCl 5M i 300mL H<sub>2</sub>O.
- TBS-Tween20: TBS + 0,1% Tween20.

- Tampó de bloqueig: TBS-Tween20 + 5% llet descremada.
- Tampó d'*stripping* (Re-Blot Plus, Western Blot Recycling Kit, Chemicon ref. 2500-S)
- Kit de quimioluminiscència ECL (Pierce ref. 34080)
- Casset per a revelat
- Pel·lícules Kodak Medical X-ray Film ref. 8143059.
- Solució reveladora (AGFA, ref. G150) i Fixadora (AGFA, ref. G354).

Es prepara el gel separador i s'introdueix entre les plaques de vidre, es deixa reposar en posició vertical fins que polimeritzi. Per tal que polimeritzi adequadament s'afegeix suaument aigua a la superfície del gel que després serà retirada. Després es prepara el gel concentrador, s'introdueix la pinta i es deixa polimeritzar. Es retira la pinta i es netegen els pous amb tampó d'electroforesi. Es carreguen les mostres prèviament preparades i s'inicia l'electroforesi a 120V constants. Un cop acabada l'electroforesi s'inicia la transferència preparant en primer lloc el sandvitx. Es col·loca sempre humitejat en tampó de transferència, una espongeta, 3 papers Whatman 3MM, el gel, la membrana de nitrocel·lulosa (cal que no quedin bombolles entre el gel i la membrana), 3 papers Whatman 3MM i una espongeta. El sandvitx es col·loca en el suport de l'aparell i es duu a terme la transferència que habitualment s'ha fet a 80V durant 2h15min. Acabada la transferència, es recupera la membrana i es fa un rentat de 5min en TBS i després s'incuba amb tampó de bloqueig durant 1h a TA i en constant agitació. Es fan 3 rentats de 5min amb TBS-Tween20 i s'incuba amb l'anticòs primari diluït en tampó de bloqueig, generalment durant una nit a 4°C. Es fan 4 rentats de 5min amb TBS-Tween20 i s'incuba amb l'anticòs secundari conjugat a HRP en solució de bloqueig durant 1h 30min a TA en agitació. Es fan 4 rentats de 5min amb TBS-Tween20 i 3 rentats més amb TBS. S'incuba la membrana durant 1min amb l'ECL i ja es pot exposar i revelar el film.

En alguns casos es van reutilitzar les membranes seguint les instruccions del kit de Chemicon Re-Blot Plus (ref. 2500-S).

### **III.13. Immunofluorescència**

Les cèl·lules TCD4 ( $5 \times 10^5$ ) s'incuben durant 15min a 0°C amb anticòs anti-sindecà-2 o anti-sindecà-4 (10µg/mL). Després de rentar (amb PBS-2%FCS), s'afegeix l'anticòs secundari contra ratolí conjugat a FITC i s'incuba durant 30min a 0°C. Seguidament es



fan dos rentats amb PBS fred. Es fixen les cèl·lules durant 10min amb paraformaldehid al 2% (pes/volum en PBS). Després d'un últim rentat amb PBS, s'afegeixen 10µL de medi de muntatge (Dako Cytomation Mounting Medium, ref. S3023) i es munta la preparació microscòpica. Les imatges digitalitzades van ser generades utilitzant un microscopi confocal (TS NT, Leica).

### **III.14. PCR quantitativa a temps real**

Les cèl·lules després de ser estimulades tal i com s'indica a les figures, van ser lisades i es va aïllar el seu RNA seguint les instruccions del kit PureLink Micro-to-Midi Total RNA Purification System (Invitrogen, ref. 12183-018). Es va afegir un RNA-GFP (una seqüència transcrita in vitro que codifica per GFP) al lisat cel·lular abans de l'extracció d'RNA com a control intern exògen per a normalitzar, de manera similar al mètode descrit en (Gilsbach et al., 2006). Aquest RNA-GFP es va obtenir a partir d'un plasmidi pST-1 blue que contenia el promotor T7 al cantó del gen GFP (per duplicat). Es va linearitzar aquest plasmidi i es va fer una reacció de transcripció amb el kit Durascribe T7 d'Epicentre de manera que l'RNA que es va obtenir era menys sensible a degradació. Sempre s'ha afegit una quantitat constant de RNA-GFP de 4µL de RNA-GFP ( $6 \times 10^9$  molècules RNA-GFP/µL) per cada milió de cèl·lules per tal d'utilitzar-lo com a gen de referència. En alguns experiments s'han utilitzat com a referència oligonucleòtids per l'rRNA del 18S (RRN18S, TATAABiocenter, Biotools).

L'RNA va ser retro-transcrit (SuperScript III, ref. 11752-050) i es va dur a terme la PCR quantitativa a temps real.

Per detectar l'mRNA de sindecà-2 es van utilitzar encebadors TaqMan (Hs00299807, Applied Biosystems) i es va utilitzar el sistema Lux (Invitrogen) (Nazarenko et al., 2002) per la GFP utilitzant els encebadors mostrats a la taula III.1. Els diversos oligonucleòtids es van dissenyar utilitzant el programa Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) (Steve Rozen & Helen J. Skaletsky). La mescla de reacció per la PCR que es va utilitzar va ser Platinum SuperMix quantitative PCR (Invitrogen ref. 11743-100) i es va utilitzar l'aparell de PCR d'Applied Biosystems 7700.

Part dels l'mRNAs de sindecà-2, l'anàlisi d'altres sindecans, l'antigen citotòxic associat a limfòcits-4 (CTLA-4) i les citocines TNF, TGFβ, IL-2 i IL-10, es van dur a terme

utilitzant el sistema SybrGreen (SybrGreenER qPCR SuperMix, Invitrogen, ref. 11761-500), i es van córrer en un aparell iCycler (BioRad) o en un aparell StepOne (Applied Biosystems) amb els encebadors indicats a la taula III.1.

Es va preparar una sèrie de dilucions ( $10^0$ - $10^{-3}$ ) del producte específic de PCR d'interès per determinar la corba estàndard (quantificació relativa). Les mostres (per triplicat) es van amplificar segons el següent protocol: 10min a 95°C, 42 cicles: 15s a 95°C, 15s a la temperatura d'hibridació (veure taula III.1), 30s a 72°C. Per tal de controlar l'especificitat de la reacció es van realitzar anàlisis de les corbes de fusió en el cas de SybrGreen i Lux. Els nivells d'RNA de GFP exògen es van utilitzar com a control de normalització i es van calcular els nivells relatius d'mRNA amb la següent equació:

$$\text{Nivell relatiu d'mRNA} = E_{\text{sdc2}}^{(Ct\ c-CT\ s)} / E_{\text{gfp}}^{(Ct\ c-CT\ s)}$$

On E és l'eficiència de la PCR, Ct és el cicle lliandar, s és la mostra estimulada i c és la mostra control no estimulada (Pfaffl, 2001).

**Taula III.1. Encebadors utilitzats.**

			T. d'hibridació (°C)
sindecà-1	<i>Forward</i>	GCTCTGGGGATGACTCTGAC	63,6
	<i>Reverse</i>	CTGGCAGGACTACAGCCTCT	
sindecà-2	<i>Forward</i>	TCGGCGGAGTCGGAGCAGAG	61,3
	<i>Reverse</i>	CAGAAGCGTAGTCATCGTCATCA	
sindecà-3	<i>Forward</i>	GAGCCTGACATCCCTGAGAG	60,0
	<i>Reverse</i>	CCCACAGCTACCACCTCATT	
sindecà-4	<i>Forward</i>	CCACCGAACCCAAGAACTA	59,5
	<i>Reverse</i>	TGGGGGCTTTCTTGTAGATG	
CTLA-4	<i>Forward</i>	TAGCTTTCTCCTCACAGCTGT	55,0
	<i>Reverse</i>	TTTTCACATTCTGGCTCTGTT	
GFP(Lux)	<i>Forward</i>	cgggtGACGGCAACTACAAGACCc(FAM)G	60,0
	<i>Reverse</i>	CTTCAGCTCGATGCGGTTTAC	
TNF	<i>Forward</i>	CAGAGGGAAGAGTTCCCCAG	60,0
	<i>Reverse</i>	CCTTGGTCTGGTAGGAGACG	
TGFβ	<i>Forward</i>	GAGCCTGAGGCCGACTACTA	59,0
	<i>Reverse</i>	CGGAGCTCTGATGTGTTGAA	
IL-10	<i>Forward</i>	AATAAGGTTTCTCAAGGGCT	58,0
	<i>Reverse</i>	AGAACCAAGACCCAGACATCAA	
IL-2	<i>Forward</i>	AACTCACCAGGATGCTCACA	60,0
	<i>Reverse</i>	GCACTTCCTCCAGAGGTTTG	

### **III.15. Anàlisi de cicle cel·lular**

Les cèl·lules TCD4 aïllades per columnes específiques es van cultivar una nit en DMEM-5% plasma autòleg abans de l'activació. Per activar-les es van sembrar ( $5 \times 10^5$  cèl·lules) en plaques de 24 pous recobertes (veure secció III.9) amb anticòs anti-CD3 i anti-sindecà-2. Es van cultivar durant 3, 4 i 5 dies. La progressió del cicle cel·lular de les cèl·lules TCD4 es va analitzar mesurant el contingut de DNA amb iodur de propidi. El iodur de propidi és una molècula fluorescent capaç d'unir-se al DNA ja que s'intercala entre els parells de bases i aleshores fluoresceix més. El cicle cel·lular pot ser determinat amb la mesura de la fluorescència de les cèl·lules exposades al iodur de propidi. Així, les cèl·lules que no han replicat el DNA estaran en fase G0/G1, les cèl·lules que hagin replicat el DNA (tindran doble quantitat de DNA que les que no l'han replicat) estaran en fase G2/M, i les cèl·lules amb una quantitat intermèdia de DNA estaran en fase S.

Per marcar-les amb iodur de propidi, les cèl·lules es centrifuguen i es fixen amb PBS que conté l'1% de paraformaldehid durant 10min a 37°C. Es centrifuguen les cèl·lules (microcentrífuga 2200rpm 2min) i es ressuspenen en solució de marcatge (20µg/mL iodur de propidi, 0,2mg/mL RNAsa A, 0,1% Tritó X-100 en PBS). La RNAsa s'afegeix per assegurar que només es tenyeix el DNA, ja que el iodur de propidi també s'uneix a l'RNA. Després de 20min d'incubació a 37°C, les cèl·lules s'analitzen per citometria de flux.

### **III.16. Biotinilació de proteïnes de membrana i Immunoprecipitació**

Materials:

- NHS-Biotin (Sigma ref.B2643)
- Tampó A : 150mM NaCl, 20mM TrisHCl pH 7,4, 10% (v/v) glicerol, 1mM DTT, 1mM EDTA.
- Tampó de lisi: 9,55mL de tampó A, 0,45mL 20% Tritó-X100, 5µL Inhibidors de proteases, 20µL PMSF.

Pes biotinar les proteïnes de superfície cel·lular, primerament els cultius cel·lulars es renten 2 vegades amb PBS i es ressuspenen en 1mL de PBS afegint 0,4mg NHS-Biotin a la solució. S'incuba durant 20min a TA i es fan tres rentats amb PBS.

Un cop biotinades les proteïnes de membrana de les cèl·lules, es passa a la immunoprecipitació. Es centrifuguen les cèl·lules i s'afegeix el tampó de lisi, es pipeteja i s'incuba 15min en gel. Es fa una centrifugació de 5min a 2700rpm (microcentrífuga) per eliminar els nuclis. Es recull el sobrenedant i es mesura la quantitat de proteïna del lisat mesurant la densitat òptica a 280nm (1 O.D.<sub>280</sub> correspon aproximadament a 1mg/mL de proteïna). En el lisat cel·lular s'afegeixen les boles de proteïna-G i l'anticòs específic, es deixa una nit incubant a 4°C en rotació orbital. Es centrifuga a 3000rpm 1min (microcentrífuga) i es fan varis rentats del pellet que finalment es ressuspen en tampó de càrrega de SDS i s'incuba 5min a 95°C. La mostra està preparada per fer una electroforesi.

### **III.17. Construcció de Plasmidis**

S'han produït diferents construccions per tal de poder desenvolupar i abordar els experiments oportuns que en la secció de resultats es presenten. A continuació es mostren les construccions amb els oligonucleòtids i plasmidis generats.

- Sindecà-2 *full length* (79B): el cDNA motlle és el sindecà-2 humà salvatge clonat en un vector pRK5. Els oligonucleòtids utilitzats per obtenir l'insert de sindecà-2 lligat a FLAG han estat:

*Sense:* 5'gactacaaggacgatgacgacaaggagtcgagagcagagctgac3'

*Antisense:* 5'cttgctgcatcgtccttgtagtccgccgacacgcagccaccaag3'

La temperatura d'anellament d'aquests oligonucleòtids és de 64°C.

- Delecció del domini citoplasmàtic de sindecà-2 (79E): el cDNA motlle és el sindecà-2 salvatge lligat a FLAG clonat a un vector pcDNA3. Els oligonucleòtids per obtenir l'insert de sindecà-2 lligat a FLAG amb una delecció de la part citoplasmàtica han estat:

*Sense:* 5'gttGGTGTATCGCATGAGA taa aactccaacttagtgc3'

*Antisense:* 5'gacactaagtggagtttaTCTCATGCGATACACCaac3'

La temperatura d'anellament d'aquests oligonucleòtids és de 59°C.

Per tal de generar aquesta construcció es va introduir un codó STOP just després de la regió transmembrana.

Per cada construcció es fa la PCR pertinent utilitzant 5x tampó HF + dNTPs (10mM) + encebadors (0,5µM cadascún) + DNA + polimerasa Phusion (ref. 530S Finnzymes) +

H<sub>2</sub>O. Es fa un precicle de 30s a 98°C, després es fan 10 cicles de 10s a 98°C, 30s a la temperatura d'anellament, 2,5min a 72°C i 8 cicles més de 10s a 98°C i 3min a 72°C. Posteriorment es fa una digestió amb DpnI que elimina el DNA motlle original (està metilat), però no el generat per la polimerasa (Invitrogen ref. 15242019), i finalment es transformen bacteris competents (E.Coli DH5α). Es creix en plaques amb resistència a Ampicil·lina i de les colònies que creixen, se'ls obté el plasmidi mitjançant el kit PureLink HiPure Plasmid Miniprep (Invitrogen ref. K2100-03). S'analitza el DNA plasmídic per seqüenciació per comprovar que la construcció final sigui correcta.

Aquestes construccions s'han fet utilitzant un vector pcDNA3 que conté la resistència a Geneticina (G418).

### **III.18. Silenciament d'ERK5**

Per dur a terme el silenciament de la proteïna erk5 s'ha treballat amb shRNA que s'han introduït a les cèl·lules insertats en un vector de DNA sota control d'un promotor de RNA pol III. Els shRNA són fragments de RNA complementaris amb una petita regió no complementaria entremig que genera un *hairpin*. Dins la cèl·lula aquest dsRNA és reconegut per DICER que és una ribonucleasa que trenca els dsRNA en fragments de 20-25 parells de bases (siRNA). És aleshores quan els siRNAs són reconeguts pel complex RISC (*RNA induced silencing complex*) i la cadena complementaria al siRNA en el mRNA s'integra en aquest complex i quan es forma el dímer, el complex RISC actua com una RNAsa i/o impedeix la traducció.

Per inhibir la traducció d'erk5 s'han obtingut els següents shRNA de Sigma:

- 1- NM\_139034.x-312
- 2- NM\_139034.x-186
- 3- NM\_139034.x-1470
- 4- NM\_139034.x-1297

Aquests 4 plasmidis tenen resistència a Puomicina i s'han transfectat en cèl·lules 79B (Jurkat estables que expressen sindecà-2 lligat a FLAG) que alhora tenen resistència a G418, per tant les cèl·lules transfectades amb aquests shRNA han estat cultivades amb G418 i Puomicina en el medi.

## **III.19. Sistemes de transfecció**

### **III.19.1. Transfectants transitòris**

Es tracta d'aconseguir que les cèl·lules incorporin el vector d'interès i a les 24-72h ja es pot fer l'assaig cel·lular.

El protocol seguit per obtenir transfectats transitòris per electroporació és el mateix que l'exposat a continuació en el punt III.19.2., però en aquest, després de la transfecció es cultiven totes les cèl·lules juntes i es fa l'anàlisi a les 24-72 hores.

### **III.19.2. Transfectants estables**

S'han generat línies Jurkat transfectades de manera estable. Pel tal d'aconseguir que integrin el DNA plasmídic al seu DNA genòmic de manera estable, s'ha usat l'electroporador Multiporator<sup>®</sup>. S'han fet diverses línies estables: 79B (el sindecà-2 *full length*-FLAG), el 79E (sindecà-2-FLAG amb una delecció de la part citoplasmàtica), i el 79B+(erk5-) (cèl·lules 79B+ amb shRNA per erk5). Com a control, s'han transfectat Jurkat només amb el vector pcDNA<sub>3</sub> (cDNA<sub>3</sub>).

*NOTA: S'han fet diverses transfeccions per tal d'obtenir les línies estables.*

Es fa un rentat de les cèl·lules amb DMEM (1500rpm 5min) i es ressuspenen amb tampó hipoosmolar (Eppendorf ref. 4308 070.501) que s'incuba 15min a TA. S'afegeix el DNA plasmídic i es transfereix a la cubeta d'electroporació. S'electropora a 630V, 40µs i es manté la cubeta 5min a TA. L'electroporador utilitzat és un Multiporator<sup>®</sup>. Es transfereixen les cèl·lules a un tub i es centrifuga (microcentrífuga 2200rpm 2min). Les cèl·lules ja es poden ressuspendre amb el seu medi de cultiu. Al cap de 24h s'afegeix al cultiu l'antibiòtic de resistència.

Cap a les 2 setmanes ja comencen a créixer els clons. L'anàlisi es fa per citometria marcant les cèl·lules amb un anticòs contra el tag FLAG i un secundari conjugat a Alexa-488. S'ha treballat amb poblacions policlonals i algunes d'elles s'han enriquit en funció del grau d'expressió de la proteïna en pauta amb el FLAG mitjançant FACS.

*NOTA: Les poblacions enriquides en funció del grau d'expressió de FLAG s'expressen amb un símbol positiu (+), per exemple, la població 79B+ correspon a la població 79B que és més positiva per FLAG i ha estat separada per FACS.*

### **III.20. Anàlisi de l'apoptosi mitjançant la unió d'Annexina V**

Materials:

- Annexina V-FITC (Pharmigen)
- Tampó d'unió d'Annexina V: 10mM HEPES-NaOH pH 7,4, 140mM NaCl, 5mM CaCl<sub>2</sub>
- Iodur de propidi (50µg/mL en PBS)

La detecció de l'apoptosi cel·lular es va realitzar mitjançant l'anàlisi de l'expressió d'Annexina V, una proteïna de 25 kDa que s'uneix a la fosfatidil serina de la membrana plasmàtica. Per l'anàlisi, es va partir d'una suspensió de  $2 \times 10^5$  cèl·lules per punt. Les cèl·lules es van rentar i es van incubar amb 0,25µg/0,1mL d'Annexina V-FITC ressuspesa en tampó d'unió durant 15min tapat de la llum. Les cèl·lules es van rentar i es van ressuspindre amb 400µL de tampó d'unió. Per detectar la necrosi, abans de l'anàlisi per citometria de flux es van afegir 0,1µg de Iodur de propidi a cada mostra.





## **IV. RESULTATS**



## IV.RESULTATS

### **IV.1. Producció d'anticossos monoclonals anti-sindecà-2**

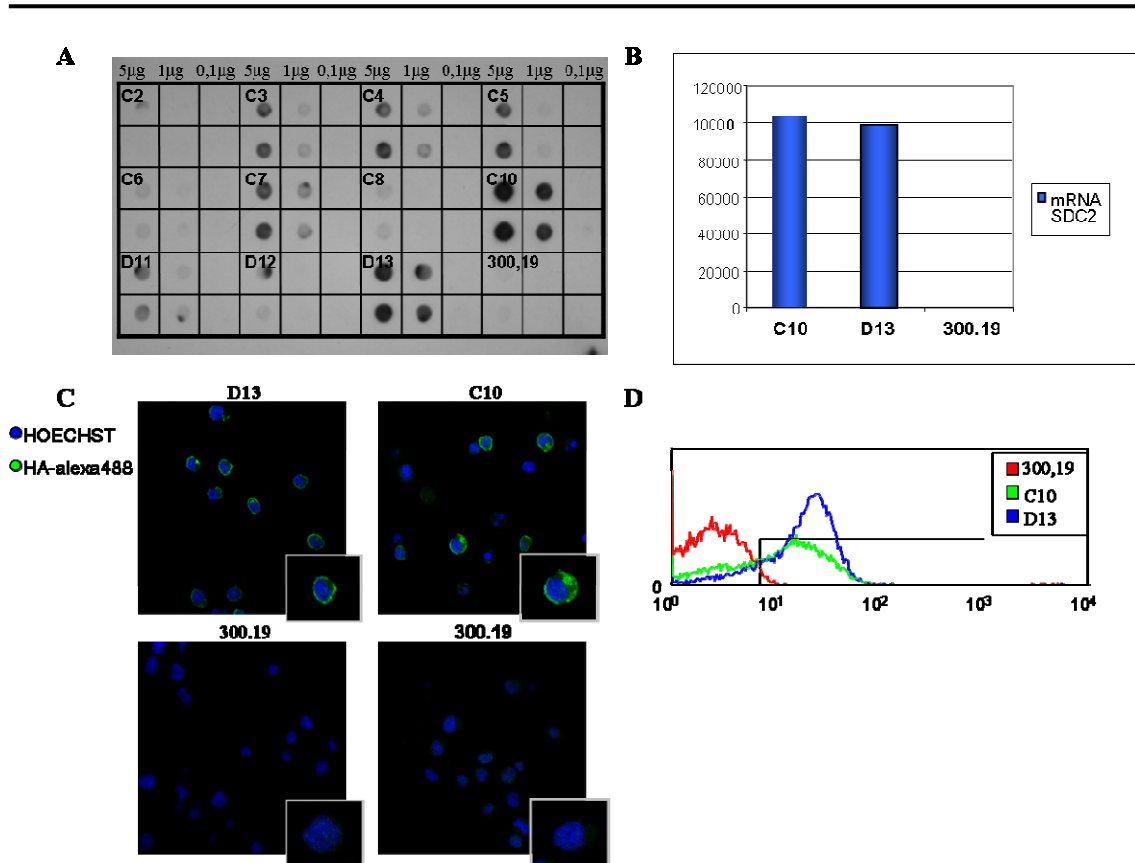
En aquest estudi era de gran importància disposar d'un bon anticòs contra sindecà-2. En el nostre laboratori s'havia generat un anticòs policlonal contra un epitop citoplasmàtic de sindecà-2 (Granes et al., 1999) però es va esgotar i davant la mala qualitat dels anticossos anti-sindecà-2 comercials es va optar per la producció d'un anticòs monoclonal anti-sindecà-2. Aquest procés es va dur a terme al laboratori del Dr. Pablo Engel (Grup d'immunoreceptors del sistema innat i adaptatiu, Hospital clínic, Barcelona).

L'estratègia a seguir va ser la següent: que una cèl·lula tumoral de ratolí expressés a la seva membrana grans quantitats de sindecà-2 humà i immunitzar ratolins singènics amb aquestes cèl·lules. L'únic antigen que detectaria el ratolí com a no propi seria el sindecà-2 i gràcies a la resposta immunitària del ratolí contra sindecà-2, acabaria amb el tumor. Aquesta seria la millor manera d'obtenir anticossos contra la part extracel·lular de sindecà-2.

#### **IV.1.1 Transfecció estable de cèl·lules 300.19 amb el gen de sindecà-2**

Es van utilitzar les cèl·lules 300.19 (leucèmia B de Balb/c) i es van transfectar amb un vector pRK5 que contenia el gen de sindecà-2 amb una cua d'hemaglutinina (HA) a la seva part citoplasmàtica (plasmidi 5-8N96) i amb un vector pcDNA3.1 que contenia la resistència a genèticina i que ens serviria per seleccionar els clons transfectats. Es van seleccionar els clons resistents a l'antibiòtic i inicialment es va analitzar l'expressió de la proteïna mitjançant *Dot-blot*, incubant la membrana de nitrocel·lulosa amb un anticòs anti-hemaglutinina (Fig.IV.1A). Els clons que expressaven més HA eren els denominats D13 i C10, i es va analitzar el seu contingut en mRNA de sindecà-2 mitjançant RT-qPCR (Fig.IV.1B). Es va observar que l'expressió de sindecà-2 era realment elevada i bastant similar entre ambdós clons. Però era necessari que aquesta expressió de sindecà-2 fos a nivell de membrana, per aquest motiu es va realitzar una immunocitoquímica permeabilitzant les cèl·lules i marcant-les amb anticòs anti-HA (Fig.IV.1C). L'expressió de sindecà-2 era a nivell de membrana en els dos clons però apareixien algunes cèl·lules

sense marcar segurament perquè devien estar en apoptosi (es van veure nuclis fragmentats). De totes maneres, per comprovar si ambdós clons eren una població homogènia que expressava sindecà-2 es van analitzar per citometria de flux (utilitzant l'anticòs anti-HA) (Fig.IV.1D) i es va concloure que el clon D13 era el millor per immunitzar els ratolins ja que la població de cèl·lules era homogènia en quant l'expressió de sindecà-2.



**Figura IV.1. Transfecció estable de cèl·lules 300.19 amb el gen de sindecà-2.** (A) *Dot-blot* dels clons seleccionats amb resistència a G418. De cadascun d'ells es van transferir a la membrana de nitrocel·lulosa 5µg, 1µg i 0.1µg de proteïna, per duplicat. La membrana es va marcar utilitzant un anticòs de conill anti-HA i es va utilitzar un anticòs contra conill conjugat a HRP com a secundari. (B) RT-qPCR dels clons seleccionats en el *Dot-blot* com a més positius quant la seva expressió de sindecà-2. Es van utilitzar encebadors específics de sindecà-2 mitjançant el sistema TaqMan. (C) Immunocitofluorescència dels clons seleccionats C10 i D13, permeabilitzant les cèl·lules i marcant-les amb anticòs anti-HA i un secundari conjugat a Alexa488. Secció de microscopia confocal. (D) Anàlisi per citometria de flux dels dos clons seleccionats permeabilitzant les cèl·lules i marcant-les amb anticòs anti-HA i un secundari conjugat a Alexa488.

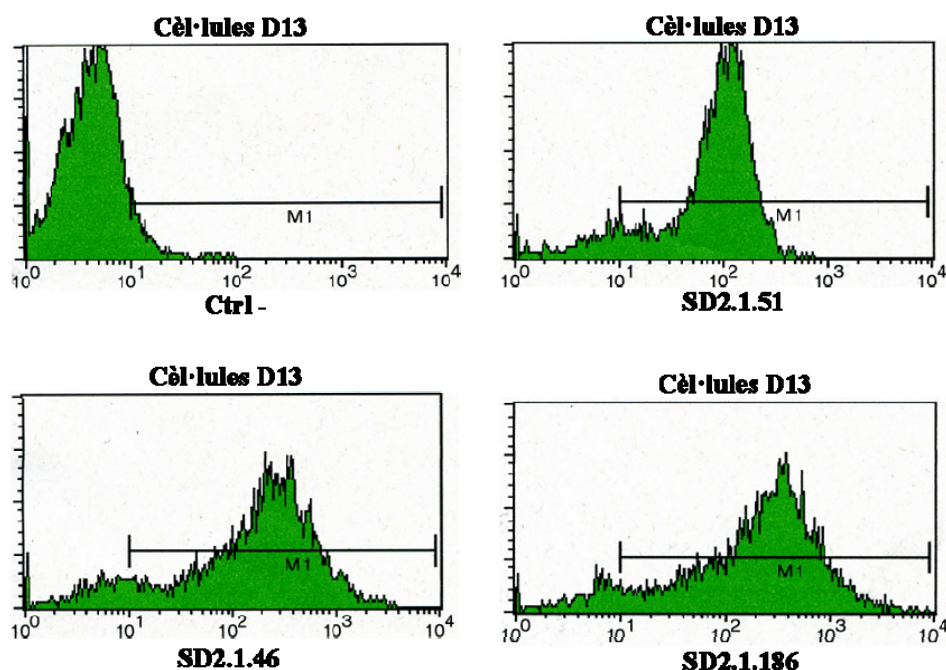
#### IV.1.2 Obtenció d'anticossos monoclonals dirigits contra sindecà-2

Després d'immunitzar 3 ratolins amb cèl·lules D13 (300.19 transfectades amb sindecà-2), es va realitzar una fusió amb mieloma (veure Materials i Mètodes) i es van analitzar més de 300 hibridomes obtenint-se 3 hibridomes secretors d'anticossos reactius contra les cèl·lules D13 i alhora no reactius contra les cèl·lules 300.19 sense transfectar. Es va determinar l'isotip dels 3 hibridomes (Taula IV.1) però només dos d'ells van ser subclonats amb èxit.

**Taula IV.1. Hibridomes obtinguts amb els isotips dels anticossos secretats corresponents**

<i>Hibridoma</i>	<i>Isotip</i>
SD2.1.46	IgG <sub>1</sub> , κ
SD2.1.51	IgG <sub>3</sub> , κ
SD2.1.186	IgG <sub>1</sub> , κ

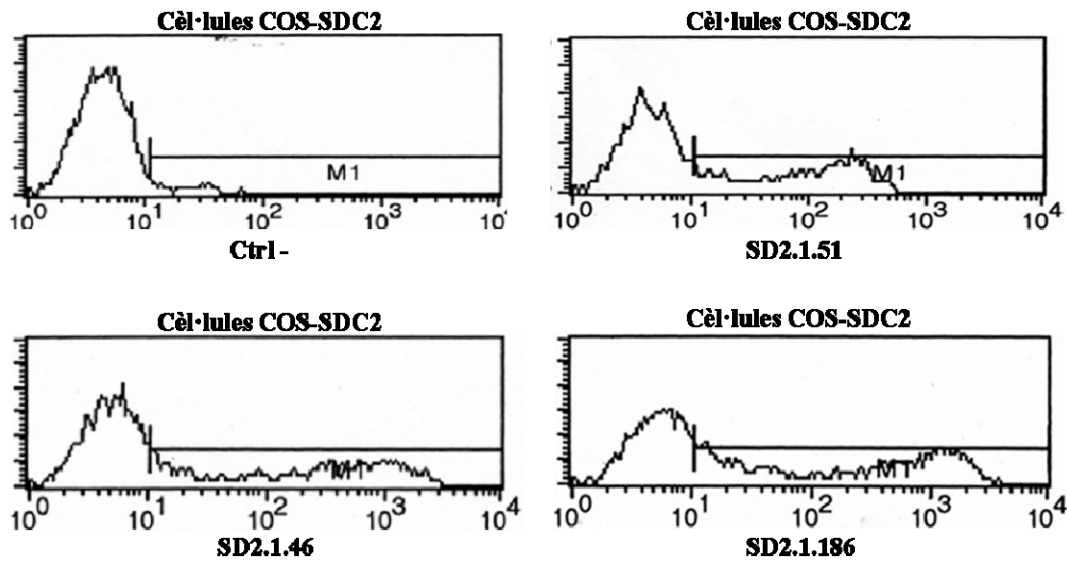
Es va fer una pre-caracterització dels anticossos obtinguts mitjançant citometria de flux, inicialment utilitzant cèl·lules D13, i el patró que s'observava per cadascun dels anticossos era clarament positiu (Fig.IV.2).



**Figura IV.2. Citometria de flux dels sobredants dels 3 hibridomes obtinguts sobre cèl·lules D13. Es van marcar cèl·lules D13 amb els sobredants concentrats**

dels 3 hibridomes SD2.1.51, SD2.1.46 i SD2.1.186; es va fer servir un secundari contra ratolí conjugat a PE en tots tres casos.

Per acabar de confirmar que aquests tres anticossos estaven reconeixent sindecà-2, es va transfectar transitòriament el plasmidi que contenia el gen de sindecà-2 en cèl·lules COS i al marcar-les amb els 3 anticossos, vam observar que els 3 anticossos estaven reconeixent sindecà-2 (Fig.IV.3).



**Figura IV.3. Citometria de flux dels sobrenedant dels 3 hibridomes obtinguts sobre cèl·lules COS transfectades amb el gen de sindecà-2.** Es van transfectar transitòriament cèl·lules COS amb el gen de sindecà-2 i es va fer un marcatge per citometria de flux amb cadascun dels sobrenedants concentrats dels 3 hibridomes obtinguts i un anticòs contra ratolí conjugat a PE com a secundari per tots ells.

Posteriorment es va procedir al subclonatge dels hibridomes i es van obtenir els següents subclons (Taula IV.2) :

**Taula IV.2. Subclons obtinguts a partir dels hibridomes.**

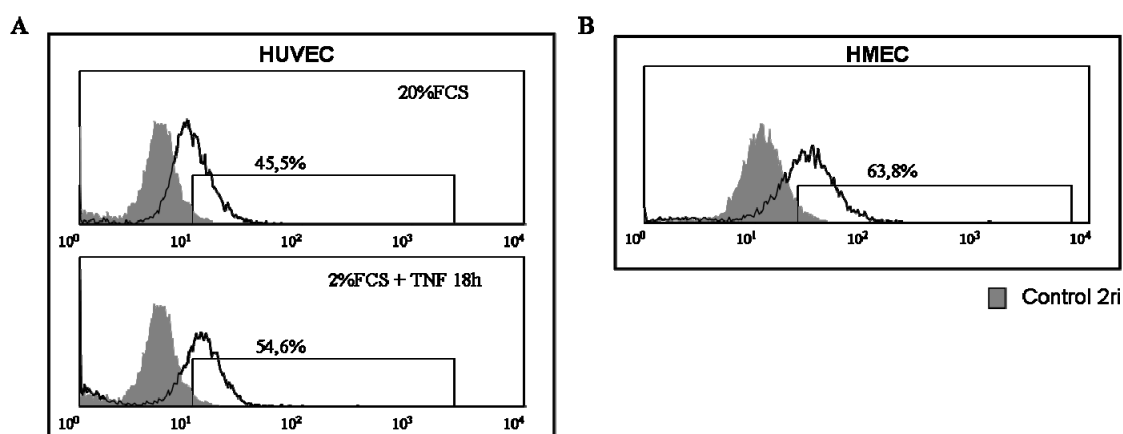
<i>Hibridoma</i>	<i>Subclons</i>
SD2.1.46	-
SD2.1.51	SD2.1.51.CL.C
SD2.1.186	SD2.1.186.CL.B SD2.1.186.CL.C

En primer lloc es va amplificar, purificar, biotinar i utilitzar l'anticòs SD2.1.186.CL.C, el qual està més ben caracteritzat. Posteriorment es va amplificar, purificar, biotinar i utilitzar l'anticòs SD2.1.51.CL.C.

### IV.1.3 Caracterització de l'anticòs SD2.1.186.CL.C

#### IV.1.3.1 Anàlisi per citometria de flux

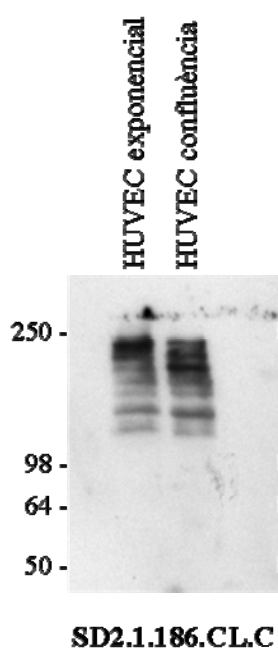
Per comprovar que l'anticòs era capaç de reconèixer sindecà-2 en cèl·lules humanes es van marcar dos tipus cel·lulars humans que expressen sindecà-2 en membrana, les cèl·lules HUVEC i les cèl·lules HMEC. Les cèl·lules HUVEC es van tractar amb altes quantitats de FCS o bé amb TNF perquè expressessin al màxim el sindecà-2 (Fig.IV.4A); les HMEC es van marcar sense cap tractament (Fig.IV.4B). Es va fer un marcatge permeabilitzant les cèl·lules amb saponina i es va observar un clar marcatge de l'anticòs en ambdós tipus cel·lulars. També es van fer marcatges extracel·lulars (dada no mostrada) però el resultat va ser molt més discret.



**Figura IV.4. L'anticòs SD2.1.186.CL.C reconeix sindecà-2 en cèl·lules HUVEC i HMEC. (A)** Les cèl·lules Huvec es van incubar en condicions normals (20%FCS) o bé en baixa concentració de sèrum (2%) però afegint TNF (5ng/mL) durant 18h. Un cop activades les Huvec es van permeabilitzar i marcar amb l'anticòs SD2.1.186.CL.C i amb un secundari contra ratolí conjugat a PE. **(B)** Les cèl·lules HMEC es van permeabilitzar i marcar per citometria de flux amb l'anticòs SD2.1.186.CL.C i amb un secundari contra ratolí conjugat a PE.

### IV.1.3.2 Anàlisi per WB i IP

Per analitzar la funcionalitat de l'anticòs per WB vam utilitzar un extracte cel·lular total de cèl·lules HUVEC, tant en fase exponencial com en confluència (Fig.IV.5). Es va observar el patró de bandes típic de sindecà-2 glicosilat, d'entre 100 i 210KDa (Renne et al., 2000).



**Figura IV.5. L'anticòs SD2.1.186.CL.C reconeix sindecà-2 en WB.** Es va obtenir un lisat cel·lular de Huvec en estat exponencial i de confluència i es va fer un assaig de WB marcant la membrana amb l'anticòs SD2.1.186.CL.C i un secundari contra ratolí conjugat a HRP.

---

Es va provar d'immunoprecipitar sindecà-2 amb aquest anticòs però no es va obtenir cap resultat positiu.

### IV.1.4 Caracterització de l'anticòs SD2.1.51.CL.C

#### IV.1.4.1 Anàlisi per IP

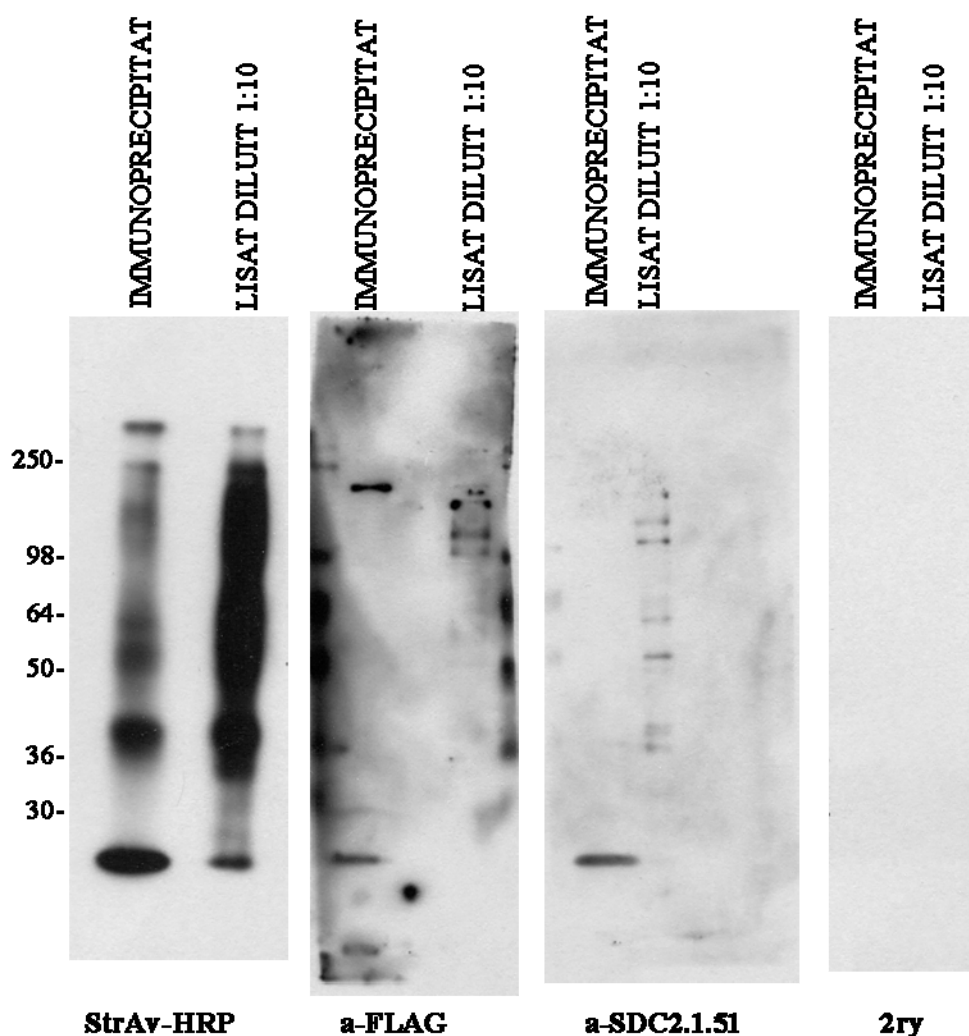
Per veure si l'anticòs era capaç d'immunoprecipitar sindecà-2 es van utilitzar les cèl·lules 79B, una línia estable de cèl·lules Jurkat transfectades amb el gen de sindecà-2 unit a FLAG en la seva part extracel·lular.

Les cèl·lules 79B es van biotinar, incubar amb l'anticòs anti-sindecà-2 SD2.1.51.CL.C, lisar i es va immunoprecipitar l'extracte amb proteïna G.



Amb l'immunoprecipitat es van fer uns anàlisis per WB que es van marcar amb Streptavidina conjugada a HRP, anti-FLAG i amb anti-sindecà-2 SD2.1.51.CL.C (Fig.IV.6).

Els WB d'anti-FLAG i d'anti-sindecà-2 mostraven una mateixa banda, la qual cosa suggeria que l'anticòs SD2.1.51.CL.C era capaç d'immunoprecipitar específicament sindecà-2. El WB d'anti-FLAG també indicava que sindecà-2 expressat en Jurkat transfectedes agafa dues formes: una glicosilada amb alt pes molecular i la monomèrica no glicosilada. En la membrana marcada amb Streptavidina-HRP també vam veure que una proteïna de membrana d'uns 40KDa immunoprecipita amb sindecà-2. Es va marcar una membrana amb anticòs secundari com a control negatiu.



**Figura IV.6.** L'anticòs SD2.1.51.CL.C és capaç d'immunoprecipitar sindecà-2. Després de biotinar les proteïnes de membrana de les cèl·lules 79B i incubar-les amb l'anticòs SD2.1.51.CL.C es va obtenir un extracte proteic i aquest es va immunoprecipitar amb proteïna G. Amb el resultat de la immunoprecipitació es van fer diferents WB que es van marcar amb StreptAvidina conjugada a HRP (per

veure totes les proteïnes biotinades), amb anticòs anti-FLAG, i amb anticòs SD2.1.51.CL.C, aquests dos últims van ser incubats addicionalment amb un secundari conjugat a HRP. També es va fer un control negatiu incubant la membrana només amb anticòs secundari per si quedaven fragments d'IgG de la immunoprecipitació.

---

## **IV.2.Expressió dels sindecans en cèl·lules TCD4 humanes**

En un intent de caracteritzar el perfil de proteoglicans heparà sulfat transmembrana en limfòcits de sang perifèrica, s'ha estudiat l'expressió de tots els membres de la família de sindecans en cèl·lules TCD4 humanes, tant en repòs com activades. Per tal d'examinar-ho, els PBL van ser aïllats i estimulats.

Degut que el compromís entre el TCR i el CD28 juga un rol clau per a la iniciació de la resposta T (Lenschow et al., 1996), es va determinar l'activació via aquests receptors amb anticossos anti-CD3 i anti-CD28, la qual cosa a més a més comporta una regulació positiva de sindecans com es veurà més avall.

Per tal d'analitzar els mRNAs dels sindecans en cèl·lules TCD4, aquesta població va ser purificada mitjançant FACS a partir de PBL estimulats, i l'RNA va ser extret i analitzat per PCR quantitativa a temps real.

L'expressió dels sindecans 1 i 3 va ser difícilment detectable per qPCR, i els seus amplicons específics van ser evidents sobre el cicle (Ct) 37,3 (Taula IV.3). Tanmateix, els mRNAs dels sindecans 2 i 4 eren presents en cèl·lules TCD4 i es veien incrementats durant l'activació de les cèl·lules T.

**Taula IV.3. Ct de detecció dels mRNAs dels sindecans.**

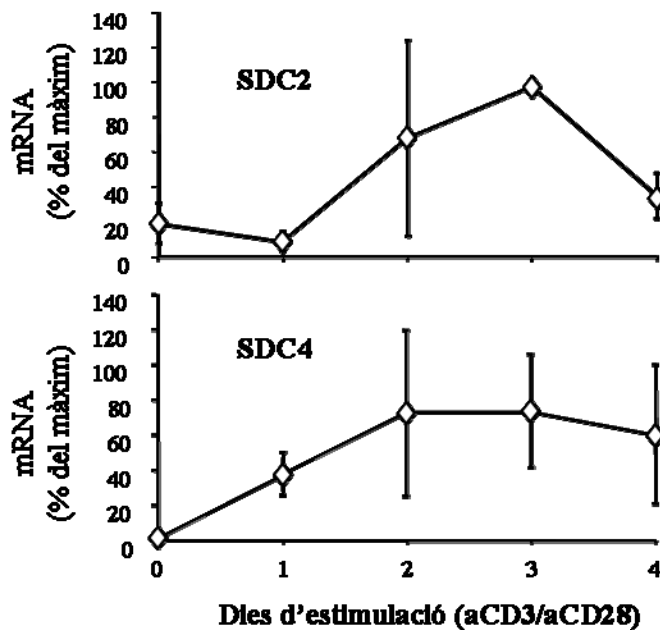
Ct(SDC) – ΔCt(GFP)	SDC1	SDC2	SDC3	SDC4
Control dia 1	39,1 ± 3,5	34,2 ± 1,5	40,7 ± 0,8	29,7 ± 1,0
αCD3/αCD28 dia1	38,5 ± 2,3	35,6 ± 2,4	37,3 ± 2,1	24,2 ± 0,9
αCD3/αCD28 dia2	37,3 ± 0,7	33,2 ± 4,7	37,3 ± 1,6	23,6 ± 2,3
αCD3/αCD28 dia3	37,3 ± 0,4	31,5 ± 1,6	37,7 ± 1,1	24,1 ± 2,3
αCD3/αCD28 dia4	38,8 ± 1,9	33,2 ± 1,4	39,3 ± 1,0	23,8 ± 1,9

L'expressió de sindecans va ser analitzada per RT-qPCR en cèl·lules TCD4 purificades, a partir de PBLs, per FACS. S'indica el Ct al qual els sindecans són detectats en les cèl·lules (en un cDNA que equival aproximadament a  $40 \times 10^3$  cèl·lules). Les dades són de com a mínim tres experiments independents fets amb tres donants. Una quantitat fixada de RNA de GFP va ser afegida a cada mostra abans de l'aïllament de l'RNA i va ser utilitzada com a control de normalització. Els resultats estan expressats com a Ct (sindecà) – ΔCt (GFP) ± SD.

#### **IV.2.1 Sindecà-2 i sindecà-4 s'expressen en limfòcits TCD4 humans durant l'activació cel·lular**

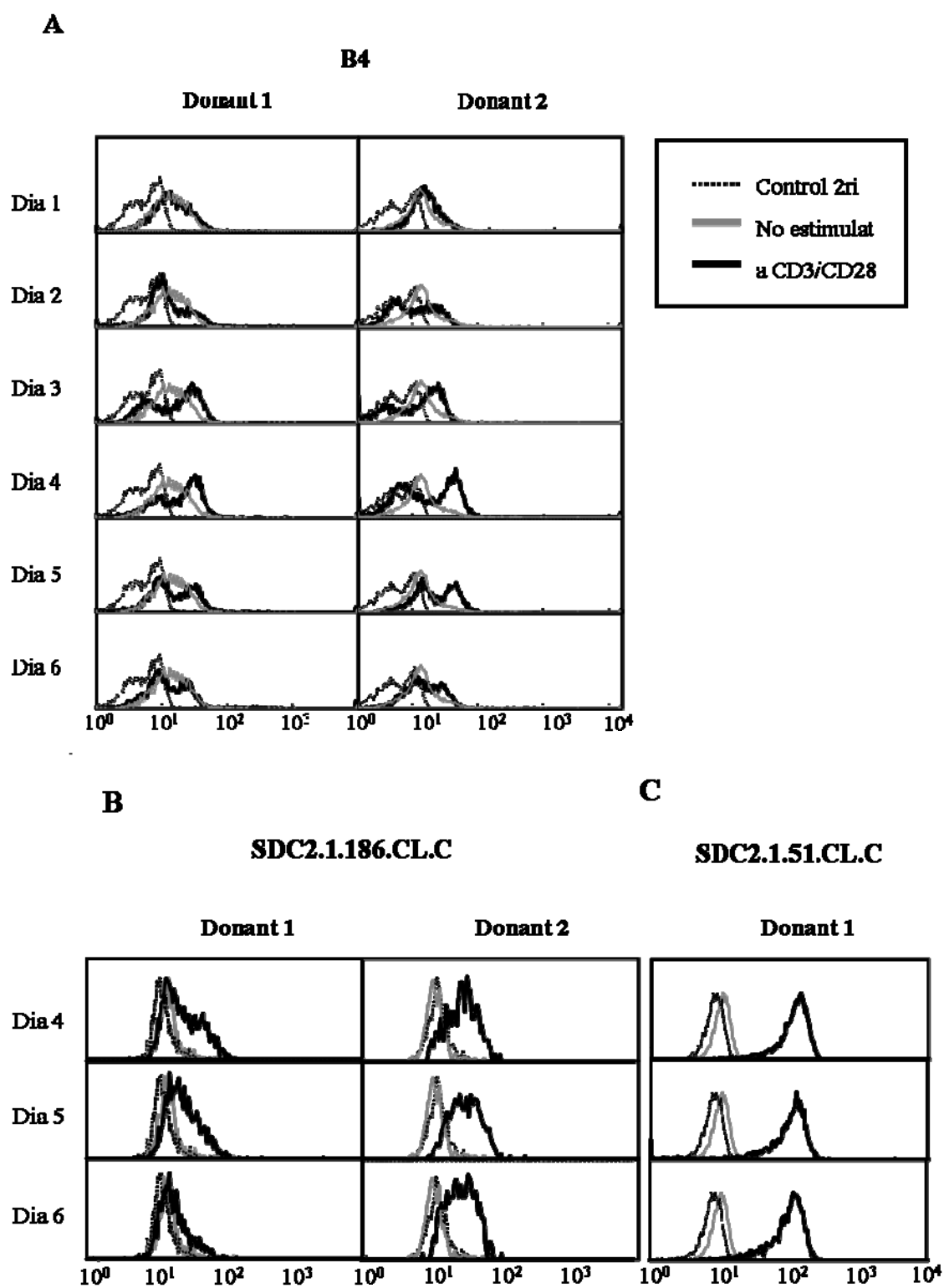
L'mRNA de sindecà-2 decreixia inicialment durant el dia 1 per després incrementar, assolint el seu màxim a dia 2 ó 3 (depenent del donant) després de l'activació cel·lular, i finalment disminuïa a dia 4.

L'mRNA de sindecà-4 mostrava un increment més ràpid i notable (d'unes 70 vegades) en l'estimulació de cèl·lules T que el sindecà-2, i continuava alt durant varis dies, encara que es va observar un grau més elevat de variacions entre donants que per sindecà-2 (Fig.IV.7).



**Figura IV.7. Els mRNAs de sindecà-2 i -4 estan regulats positivament en cèl·lules TCD4 estimulades.** Es van preparar PBLs a partir de concentrats de capa leucocitària i van ser estimulats durant els dies indicats amb anticòs anti-CD3 i anticòs anti-CD28. Es va analitzar l'expressió de sindecà-2 i sindecà-4 per RT-qPCR en les cèl·lules TCD4 que van ser purificades a partir dels PBLs mitjançant FACS. Les dades són resultat d'almenys tres experiments independents fets amb tres donants, excepte pels dies 0 i 3 on les dades provenen de 6 donants. En el cas de sindecà-2, en el dia 2, l'mRNA d'un dels donants no mostrava encara activació de sindecà-2, però els altres 2 donants tenien el seu màxim d'activació. Aquest fet explica la gran desviació estàndard observada en aquest punt. Els nivells de mRNA dels sindecans de cada mostra van ser normalitzats amb el contingut d'RNA de GFP, que va ser afegit a priori de manera equitativa a cada mostra just abans de la purificació d'RNA. Els resultats estan expressats com a relació dels mRNA sindecans/GFP  $\pm$  SD.

Com que l'increment de l'mRNA de sindecà-2 era modest (d'unes 5 vegades) es va analitzar si també era evident a nivell de proteïna (Fig.IV.8). Es van dur a terme anàlisis per citometria de flux utilitzant 3 anticossos independents contra sindecà-2. Un anticòs policlonal dirigit contra un epítip citoplasmàtic de sindecà-2 (Granes et al., 1999) va demostrar que, en estimulació, sindecà-2 incrementa durant els dies 3 a 4 exhibint una cinètica retardada respecte el seu mRNA. Més tard, a dia 6, l'expressió de sindecà-2 es reduïa (Fig.IV.8A).



**Figura IV.8.** El sindecà-2 està regulat positivament també a nivell de proteïna en cèl·lules TCD4. Limfòcits de sang perifèrica van ser preparats a partir de preparats de capa leucocitària i van ser estimulats amb anticossos anti-CD3 i anti-CD28 durant els dies indicats. L'expressió de sindecà-2 en la població de TCD4 es va analitzar per citometria de flux, utilitzant (A) un anticòs policlonal anti-sindecà-2 anomenat B4 (dirigit contra un epítop de la cua citoplasmàtica (Granes et al.,

1999)), **(B)** un anticòs monoclonal anti-sindecà-2 anomenat SD2.1.186.CL.C (dirigit contra la part extracel·lular) i **(C)** un anticòs monoclonal anti-sindecà-2 anomenat SD2.1.51.CL.C (dirigit contra la part extracel·lular). Es mostren resultats de dos donants diferents en **(A)**, dos donants en **(B)** i un donant en **(C)**. En tots tres casos es va marcar l'expressió de sindecà-2 total en les cèl·lules permeabilitzant la seva membrana amb saponina.

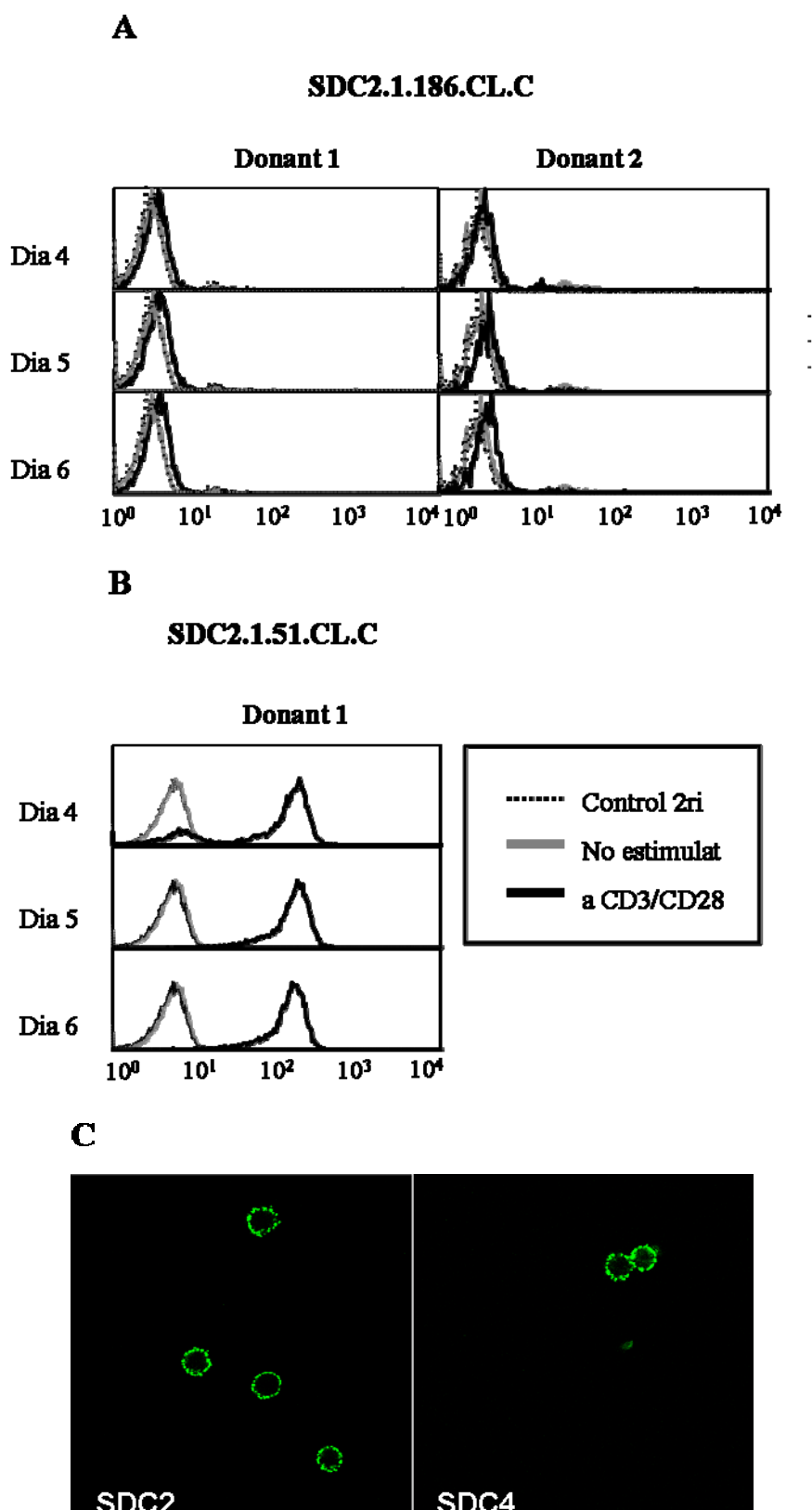
---

Es van preparar dos anticossos monoclonals dirigits contra la regió extracel·lular del sindecà-2 humà (veure secció IV.1). Ambdós anticossos (SD2.1.186.CL.C i SD2.1.51.CL.C) van confirmar el patró d'inducció de sindecà-2 total (Fig.IV.8B-C).

L'anàlisi per citometria de flux que es va fer amb l'anticòs monoclonal SD2.1.186.CL.C es va dur a terme en cèl·lules T activades, la membrana de les quals va ser permeabilitzada amb saponina. Aquesta reactivitat es veia considerablement reduïda quan les cèl·lules eren marcades en absència de saponina, suggerint que la majoria de sindecà-2 està localitzat al citoplasma, però que és present a nivells baixos a la superfície de les cèl·lules T (Fig.IV.9A). Això ens feia pensar que o bé el domini extracel·lular de sindecà-2 era ràpidament escindit per mecanismes propis de la cèl·lula (*shedding*) (Fitzgerald et al., 2000) o bé que aquests dos donants presenten poc sindecà-2 a la seva part extracel·lular. Cal dir que vam poder observar, en diferents experiments, la variabilitat intrínseca de cada donant.

Posteriorment, amb el marcatge de l'anticòs SD2.1.51.CL.C es va veure l'increment de sindecà-2 també a nivell extracel·lular (Fig.IV.9B). Segurament la causa d'aquest bon marcatge extracel·lular era deguda a aquest donant en particular, ja que com hem vist a les figures IV.2 i IV.3, no sembla que l'anticòs SD2.1.51.CL.C tingui una major sensibilitat que el SD2.1.186.CL.C.

Addicionalment es va confirmar la localització extracel·lular de sindecà-2 i -4 per immunofluorescència (Fig.IV.9C).



**Figura IV.9.** Part del sindecà-2 que s'expressa en cèl·lules TCD4 ho fa a la membrana. El sindecà-4 també s'expressa a la superfície cel·lular. (A-B) Es van preparar limfòcits de sang perifèrica a partir de concentrats de capa leucocitària i es van estimular durant els dies indicats amb anticossos anti-CD3 i anti-CD28. L'expressió de sindecà-2 en la població TCD4 es va analitzar per citometria de flux

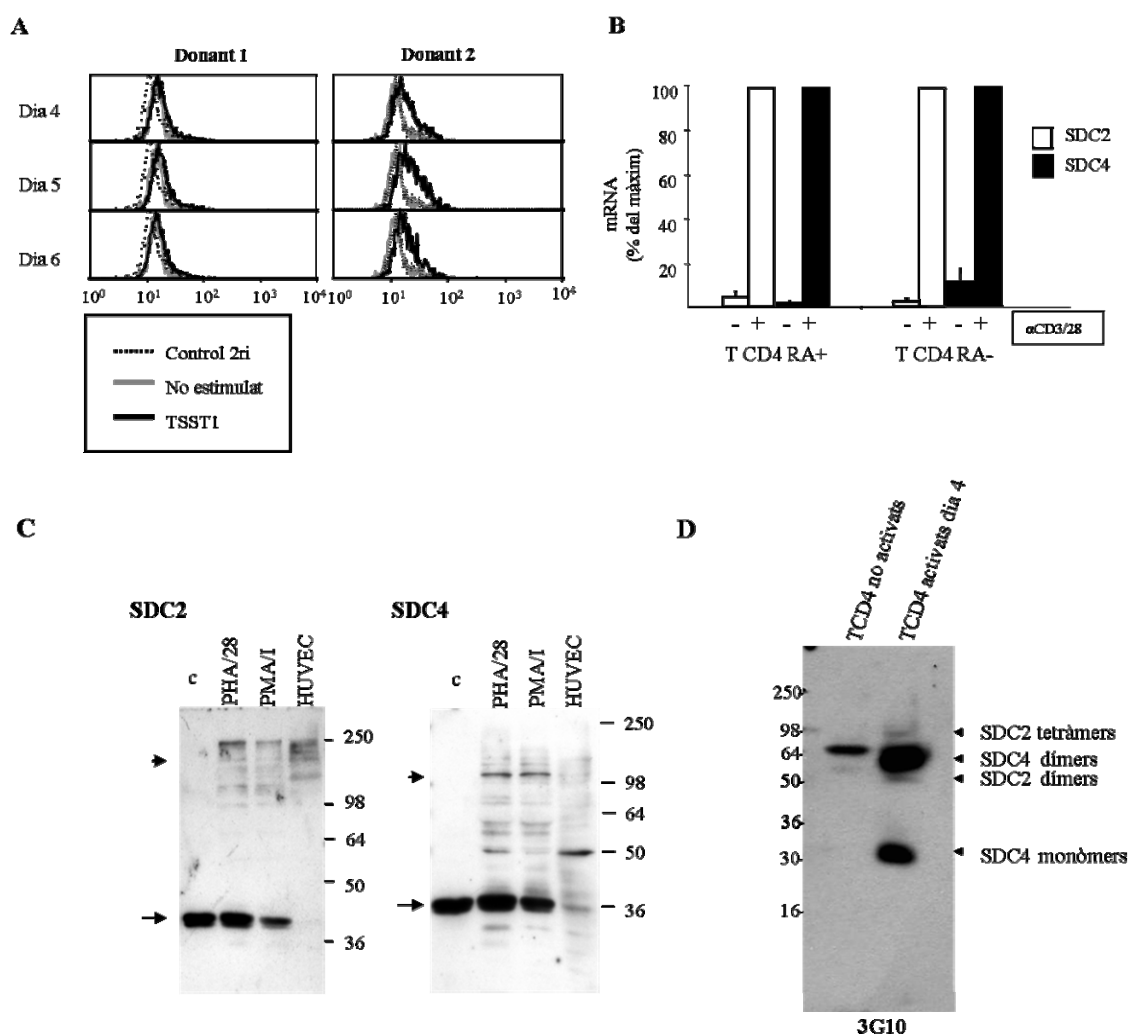
utilitzant els dos anticossos dirigits contra la part extracel·lular SD2.1.186.CL.C **(A)** i SD2.1.51.CL.C **(B)**. Es mostra únicament l'expressió extracel·lular de sindecà-2. Es van realitzar experiments amb dos donants diferents per SD2.1.186.CL.C **(A)** i amb un donant per SD2.1.51.CL.C **(B)**. **(C)** Les cèl·lules TCD4 van ser purificades per selecció negativa amb columnes específiques (veure secció III) i es van deixar en repòs durant una nit en DMEM-0,5%FCS. Posteriorment es van tractar amb anticòs anti-sindecà-2 (SD2.1.186.CL.C) o anti-sindecà-4 i amb un anticòs secundari conjugat a FITC i es va analitzar per microscòpia confocal.

---

Es van obtenir resultats similars estimulant les cèl·lules T amb la toxina del síndrome del shock tòxic (TSST) 1, la qual cosa indicava que els resultats no eren a conseqüència de l'ús d'anticossos monoclonals anti-CD3 i anti-CD28 com a agents senyalitzadors del TCR/CD3 i CD28 respectivament. Tal i com era d'esperar, l'increment de sindecà-2 observat va ser menor, ja que el TSST-1 estimula només una fracció de cèl·lules T (Fig.IV.10A). Això ens indica que la iniciació de l'expressió de sindecà-2 en cèl·lules T mediada per CD3 i CD28 no és una característica de l'anticòs monoclonal utilitzat però pot ser induït estimulant el TCR i el CD28 amb els seus lligands naturals.

L'estimulació de les cèl·lules T va ser controlada rutinàriament mesurant l'increment de l'mRNA de CTLA-4 durant el dia 3 d'estimulació.





**Figura IV.10. Expressió de sindecà-2 i -4 en TCD4 estimulats.** (A) Es van preparar limfòcits de sang perifèrica a partir de concentrats de capa leucocitària i es van estimular durant els dies indicats utilitzant el superantigen TSST-1 (100ng/mL). L'expressió de sindecà-2 en la població de cèl·lules TCD4 va ser analitzada mitjançant citometria de flux utilitzant l'anticòs anti-sindecà-2 SD2.1.186.CL.C (dirigit contra la part extracel·lular). Es mostra l'expressió total de sindecà-2 en les cèl·lules TCD4. Els resultats són de dos donants diferents. (B) El sindecà-2 és induït en les subpoblacions de cèl·lules TCD4 verges i memòria. Les cèl·lules TCD4 CD45RA<sup>+</sup> i TCD4 CD45RA<sup>-</sup> es van seleccionar per FACS i es van estimular durant tres dies amb anticossos anti-CD3 i anti-CD28. Es mostra la mitjana de quatre experiments independents duts a terme amb 4 donants diferents. Els nivells de mRNA de sindecans a cada mostra es va normalitzar amb el contingut de RNA de GFP, que va ser afegit equitativament a cada mostra abans de la purificació de l'RNA (veure secció III). Els resultats estan expressats com a relació d'mRNA sindecà/GFP  $\pm$  SD. (C) Anàlisi per WB de sindecà-2 i -4 en cèl·lules TCD4 estimulades i HUVEC. Les cèl·lules TCD4 es van purificar com en (A) i van ser estimulades amb PMA (5ng/mL) i ionomicina (250ng/mL) o bé amb PHA (10 $\mu$ g/mL) i anti-CD28 durant quatre dies. S'indiquen les posicions de les proteïnes estàndard, amb una fletxa els sindecans hipoglicosilats i amb una punta de fletxa les isoformes glicosilades dels sindecans. (D) Les cèl·lules TCD4 es van purificar com en (A) i van ser estimulades amb PHA (10 $\mu$ g/mL) i anti-CD28 durant quatre dies. Els lisats cel·lulars es van digerir amb Heparinasa III i Chondritinasa i

es va fer un anàlisi per WB marcant-lo amb anticòs anti-HSPG 3G10 (que reconeix un nou epítot fruit de la digestió amb heparinasa i chondroitinasa) i amb un secundari conjugat a HRP. S'indiquen diferents formes de monòmers, dímers i tetràmers de sindecà-2 i -4.

---

Amb l'anàlisi per WB de l'expressió de sindecà-2 i -4 en cèl·lules T CD4 estimulades es va veure que la regulació positiva d'aquests sindecans era a nivell de les isoformes glicosilades. Curiosament, apareixien constitutivament les formes hipoglicosilades de sindecà-2 i -4. Contràriament, el sindecà-2 expressat en cèl·lules endotelials (HUVEC) era glicosilat i amb un pes molecular aparent d'entre 120 i 250 KDa (Fig.IV.10C).

Aquesta expressió de sindecà-2 i -4 en cèl·lules TCD4 estimulades es va confirmar per WB digerint el lisat cel·lular amb heparinasa III i chondroitinasa per tal d'eliminar les cadenes glicosídiques (i d'aquesta manera disminuir l'heterogeneïtat de bandes en el gel d' SDS). Aquesta digestió genera un nou epítot amb el qual reacciona l'anticòs anti-HSPG 3G10 (Fig.IV.10D). Com es pot observar, amb l'estimulació augmenta molt l'expressió de SDC4 i també en menor quantitat la de sindecà-2. Amb aquest resultat es va concloure la presència incrementada de sindecà-2 i -4 en limfòcits TCD4 humans estimulats.

#### **IV.2.2 Sindecà-2 i sindecà-4 s'expressen en cèl·lules TCD4 verges i memòria**

Per tal d'establir si els canvis observats en l'expressió de sindecans era en una particular subpoblació de cèl·lules TCD4, aquestes es van fraccionar segons l'expressió de CD45RA. L'expressió de CD45RA en cèl·lules TCD4 s'atribueix normalment a les cèl·lules verges les quals perden aquest marcador quan són estimulades per un antigen (Akbar et al., 1988; Picker et al., 1993). Els limfòcits de sang perifèrica van ser fraccionats en verges (CD45RA<sup>+</sup>) i memòria (CD45RA<sup>-</sup>) per FACS, i es van estimular amb anticòs anti-CD3 i anti-CD28. L'anàlisi per RT-qPCR dels mRNAs de sindecà-2 i -4 en aquestes poblacions va demostrar que tant les cèl·lules TCD4 verges com memòria incrementaven l'expressió de sindecà-2 i -4 durant l'activació i no hi havia diferències qualitatives entre els dos tipus cel·lulars (Fig.IV.10B). Els nivells d'expressió de sindecà-2 i -4 eren fortament dependents de donant. Així doncs, els increments observats de sindecà-2 en cèl·lules TCD4 verges i memòria eren majors que en PBL totals.

### **IV.3. Els sindecans aturen l'activació de la cèl·lula T**

#### **IV.3.1. La lligació de sindecà-2 i -4 comporta la inhibició de l'activació i proliferació de la cèl·lula T**

Els sindecans, com altres molècules accessòries, poden contribuir positivament o negativament a l'estimulació antigènica de la cèl·lula T, i estudis recents en cèl·lules T de ratolí indiquen un rol inhibitori de sindecà-4 (Chung et al., 2007). Per la qual cosa, vam examinar seguidament si anticossos anti-sindecà podien bloquejar les respostes al·logèniques que requerien interaccions cèl·lula-cèl·lula. Es van incubar cèl·lules estimuladores i cèl·lules receptores (veure text en peu de Fig.VI.11.) en una MLR amb anticossos anti-sindecà-2 i anti-sindecà-4 (Fig.IV.11A). La incubació de l'MLR amb 20µg/mL d'anticòs anti-sindecà-4 inhibia parcialment la proliferació. La combinació dels dos anticossos anti-sindecà-2 i anti-sindecà-4, però, no augmenta la inhibició ja observada amb l'anticòs anti-sindecà-4 sol. Aquests resultats proporcionen la primera evidència de que sindecà-4 pot tenir una funció inhibidòria durant l'activació cel·lular de limfòcits T primaris humans, tot i que això s'hagi divulgat recentment per limfòcits de ratolí (Chung et al., 2007). Aquests resultats també suggereixen que el lligand de sindecà-4 (DC-HIL (Chung et al., 2007)) en monòcits humans i limfòcits B (les cèl·lules presentadores d'antigen en l'MLR) pot estar en baixa proporció i l'anticòs anti-sindecà-4 afegit externament augmentaria l'efecte inhibitori d'aquest lligand.

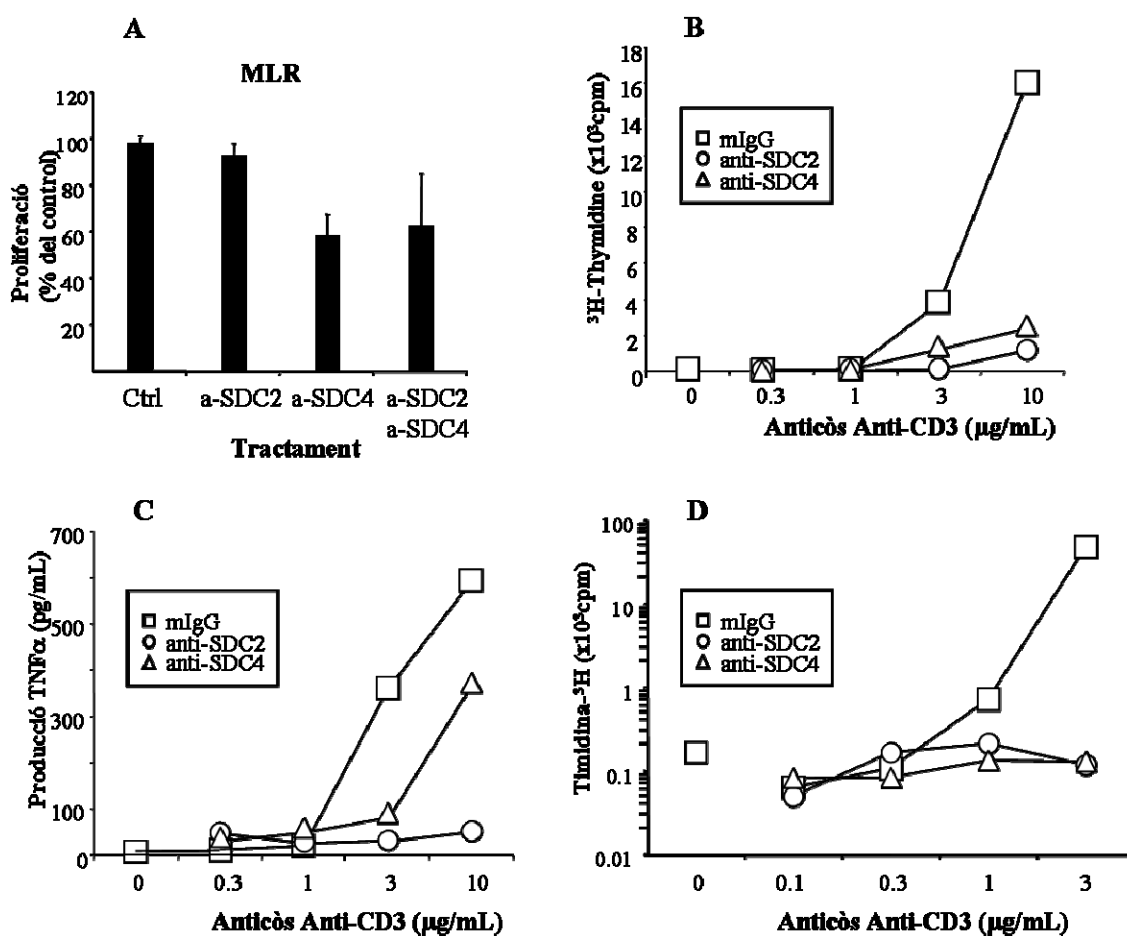
La inhibició de la MLR en presència d'anticòs anti-sindecà-4 suggereix que el sindecà-4 juga un paper important durant l'estimulació de la cèl·lules T. Tanmateix, l'efecte de l'anticòs anti-sindecà-4 pot ser indirecte, ja que les cèl·lules B i els monòcits expressen sindecans (Clasper et al., 1999).

Estudis posteriors van demostrar que la inhibició de la proliferació de les cèl·lules T per entrecreuament amb sindecà-4 era independent de cèl·lules accessòries. El mateix fenomen observat amb PBL totals va ser observat quan cèl·lules TCD4 purificades es van cultivar en plaques recobertes d'anticòs anti-CD3 i anticossos anti-sindecans. Es van sembrar cèl·lules TCD4 en plaques recobertes amb concentracions ascendents d'anticòs anti-CD3. Quan les plaques eren recobertes a més a més amb anticossos específics contra sindecans (però no amb IgG control), l'activitat proliferativa es veia bloquejada (Fig.IV.11B).

En general, els limfòcits primaris, necessiten els dos estímuls (TCR + coestímul) per activar-se bé. Però si l'estímul és suficientment fort aleshores s'inicien processos d'activació anàlegs (però no iguals) a una estimulació ortodoxa: proliferació, producció de citocines, etc. Els anticossos dirigits contra el complex CD3 poden iniciar l'activació T, però la mera unió de l'anticòs al seu epítot no és suficient, calen senyals coactivadores. Aquestes senyals provenen de les APC i generen l'entrecreuament de l'anticòs unit a CD3. Aquesta funció de les cèl·lules accessòries pot ser substituïda per la unió de l'anticòs a una fase sòlida. Així, l'entrecreuament de l'anticòs anti-CD3 a la placa (o amb un anticòs secundari, o a boles de *sepharose*), per si sol, és suficient per induir un procés d'activació (Verwilghen et al., 1991).

Així, l'entrecreuament de sindecà-2 en cèl·lules T condueix a la inhibició de la proliferació en cèl·lules T estimulades amb anti-CD3. Això suggereix que és necessari que l'anticòs anti-sindecà-2 estigui entrecreuat més que no pas en forma soluble (MLR) per assolir la seva capacitat inhibidòria en cèl·lules T. De fet, quan les cèl·lules TCD4 van ser estimulades en placa recoberta amb anticòs anti-CD3 i en presència d'ambdós anticossos solubles anti-sindecà i un secundari contra ratolí per induir un entrecreuament extens, l'activitat proliferativa també es veia bloquejada (Fig.IV.11D). A més a més, l'entrecreuament de sindecà-2 inhibeix la producció de  $TNF\alpha$  de les cèl·lules T, induïda per anti-CD3, de manera dosi-dependent (Fig.IV.11C). De la mateixa manera, l'entrecreuament de sindecà-4 comporta la inhibició tant de la proliferació de les cèl·lules T com de la producció de  $TNF\alpha$ .

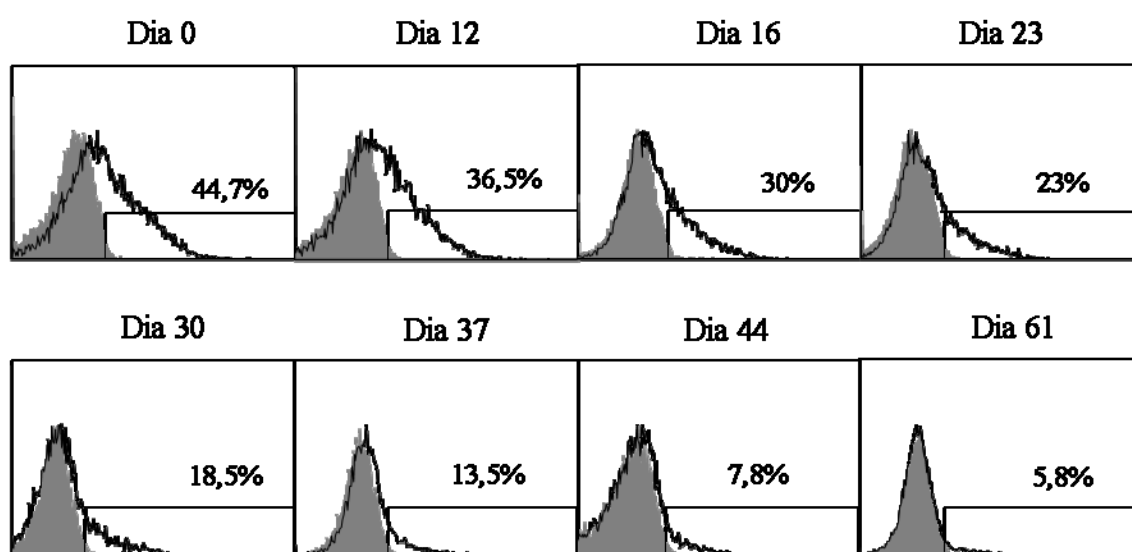
Aquests resultats suggereixen que tant sindecà-2 com sindecà-4 en cèl·lules T humanes probablement tenen una funció inhibidòria, de manera similar al que ha estat suggerit per sindecà-4 en cèl·lules T de ratolí (Chung et al., 2007). Però aquests resultats per primera vegada suggereixen un paper inhibitori de sindecà-2 en cèl·lules T humanes.



**Figura IV.11. Paper de sindecà-2 i -4 en la inhibició de les respostes d'anti-CD3 i MLR.** (A) L'anticòs anti-sindecà-4 redueix la proliferació en una MLR. Es van aïllar els PBLs de 2 donants adults sans i es van mantenir una nit en privació amb DMEM-0,5%FCS. Els PBLs d'un dels donants va servir de cèl·lules resposta i els PBLs de l'altre donant van ser irradiades i utilitzades com a cèl·lules estimuladores (veure secció III). Les cèl·lules van ser incubades amb medi que contenia anticòs anti-sindecà-2 (20µg/mL), anticòs anti-sindecà-4 (20µg/mL), anticòssos anti-sindecà-2 i anti-sindecà-4 o bé medi sol. Els cultius, per triplicat, van ser incubats 6 dies, i la proliferació es va determinar amb la quantitat de Timidina<sup>[3H]</sup> incorporada durant un pols de 20h (veure secció III). El tant per cent de proliferació es va determinar segons la següent fórmula ((cpm punt experimental / cpm del control) x 100). Cada barra representa la mitjana de 4 experiments ± SD. (B) Les cèl·lules TCD4 es van purificar per selecció negativa amb columnes específiques (veure secció III) i es van cultivar en privació amb DMEM-0,5%FCS durant una nit. Després van ser tractades amb dosis creixents d'anticòs anti-CD3 immobilitzat i una quantitat constant de IgG control, anti-sindecà-2 o anti-sindecà-4 (40µg/mL). La capacitat proliferativa de les cèl·lules T tractades es va mesurar amb la incorporació de Timidina<sup>[3H]</sup>. Els cultius per triplicat es van mantenir durant 4 dies afegint Timidina<sup>[3H]</sup> durant les últimes 20h de cultiu. (C) L'activació de les cèl·lules TCD4 es va mesurar amb la producció de TNFα. Els sobrenedants dels cultius cel·lulars preparats en (B) es van utilitzar per mesurar el contingut de TNFα per ELISA. (D) Les cèl·lules TCD4 es van preparar tal com s'indica a (B) i van ser privades una nit en DMEM-0,5%FCS, per després ser tractades amb dosis creixents d'anticòs anti-CD3 immobilitzat i una quantitat constant d'IgG control soluble, anti-sindecà-2 o anti-sindecà-4 (10µg/mL).

L'anticòs soluble es va entrecruar amb l'anticòs contra IgG de ratolí (10µg/mL). La capacitat proliferativa de les cèl·lules T tractades va ser mesurada amb la incorporació de Timidina<sup>[3H]</sup>. Els cultius per triplicat, es van mantenir durant 4 dies afegint la Timidina<sup>[3H]</sup> durant les últimes 20h de cultiu. Es van obtenir resultats similars en dos experiments independents amb dos donants diferents (B-D).

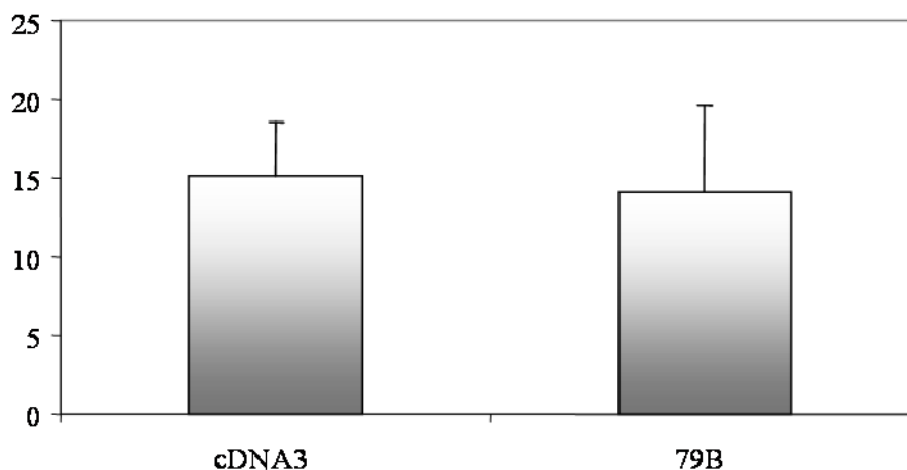
Aquest efecte inhibitori de la proliferació de sindecà-2 es va estudiar també en cèl·lules T Jurkat. Es van generar una població de línies estables transfectades amb el gen de sindecà-2 humà lligat a FLAG (línia 79B) (veure secció III) i es va analitzar l'expressió de sindecà-2 (mitjançant l'anàlisi de FLAG) al llarg del temps (Fig.IV.12). Es va poder observar que la població sindecà-2 positiva anava decreixent en el temps suggerint que la població cel·lular que expressa menys sindecà-2 creix més ràpidament que la que expressa més sindecà-2.



■ Control 2ri

**Figura IV.12. La població de Jurkat que sobre-expressa sindecà-2 es va perdent al llarg del temps.** Les cèl·lules Jurkat es van transfectar amb el gen de sindecà-2 lligat a FLAG (veure secció III) i es van mantenir en cultiu en condicions normals (DMEM-10%FCS) i en presència de l'antibiòtic de selecció G418. Es va analitzar periòdicament l'expressió de sindecà-2 utilitzant un anticòs anti-FLAG i un secundari conjugat a Alexa488 i es va analitzar per citometria de flux.

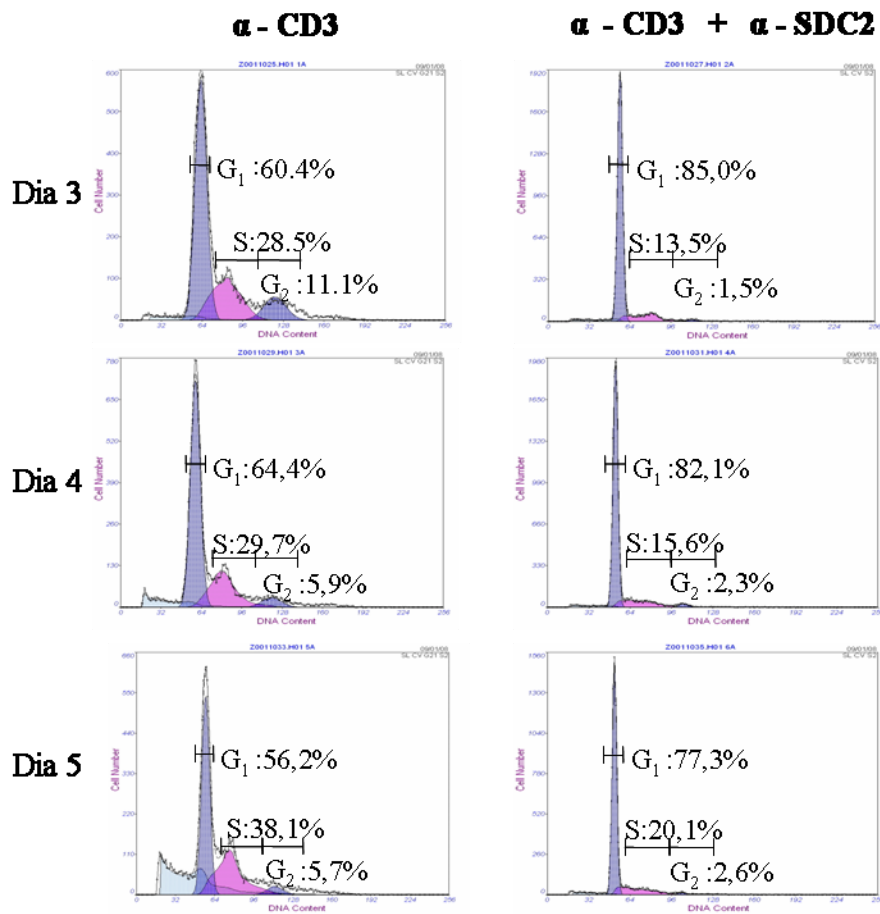
Es va analitzar si aquesta aturada de la proliferació era deguda a l'apoptosi però no es van veure diferències en la mort cel·lular entre les Jurkat expressant sindecà-2 i les Jurkat control (Fig. IV.13.).



**Fig.IV.13. L'aturada de la proliferació no es deu a un increment d'apoptosi.** Les cèl·lules Jurkat control (transfectades amb el vector) i la línia 79B (que sobreexpressa sindecà-2) es van mantenir en cultiu en condicions de selecció (DMEM-10%FCS, G418) i es va analitzar per citometria de flux el nivell d'apoptosi marcant la mostra amb AnnexinaV-FITC i IP. Els resultats exposats corresponen als percentatges positius per AnnexinaV i són la mitjana de 3 experiments.

### IV.3.2 Sindecà-2 atura el cicle cel·lular en cèl·lules T

Els experiments anteriors han mostrat que els limfòcits TCD4 humans estimulats en presència d'anticòs anti-sindecà-2 (SD2.1.186.CL.C) proliferen menys. Aquesta davallada en la proliferació suggeria que o bé les cèl·lules entraven en un procés d'apoptosi o bé hi havia una aturada en el cicle cel·lular. Així doncs, es va voler analitzar l'efecte de sindecà-2 a nivell de cicle cel·lular. Es van sembrar limfòcits TCD4 purificats mitjançant columnes de selecció negativa en plaques recobertes amb anticòs anti-CD3 i amb anticòs anti-sindecà-2 (SD2.1.186.CL.C). Es van recollir les cèl·lules i es va analitzar el seu contingut de DNA incubant-les amb iodur de propidi. Es va veure que efectivament, el sindecà-2 bloquejava la proliferació perquè era capaç d'aturar el cicle cel·lular (Fig.IV.14).



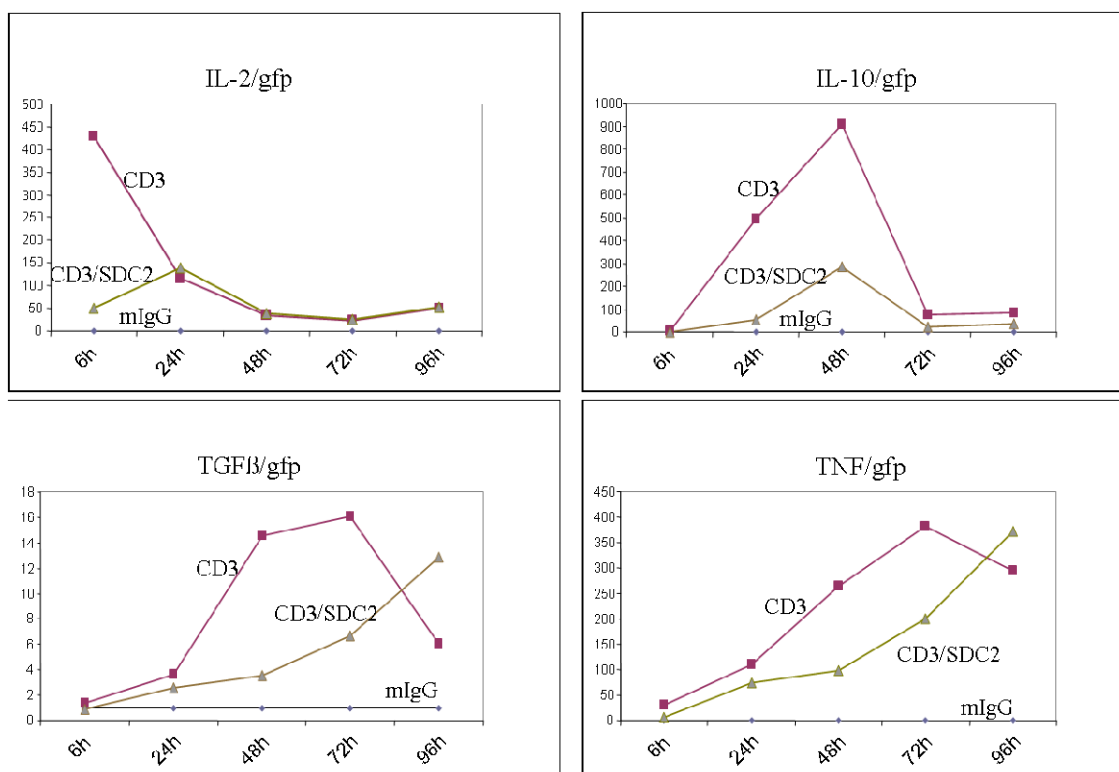
**Figura IV.14. Sindecà-2 atura el cycle cel·lular en cèl·lules T.** Els limfòcits de sang perifèrica es van obtenir a partir de preparats de capa leucocitària, i a partir dels PBL es van purificar els TCD4 per selecció negativa amb columnes específiques. Les cèl·lules TCD4 es van mantenir en repòs amb DMEM-5% plasma autòleg, durant una nit abans de ser activades en plaques recobertes d'anticòs anti-CD3 o anti-CD3 i anti-sindecà-2. Es va analitzar la progressió del cycle cel·lular per citometria de flux mesurant la quantitat de DNA amb Iodur de Propidi. Les dades numèriques corresponen a la mitjana de dos experiments independents realitzats amb donants diferents. En el gràfic només es representa el marcatge amb IP d'un dels donants.

### IV.3.3 Sindecà-2 inhibeix la producció de les citocines IL-2, IL-10, TNF i TGF $\beta$ en limfòcits TCD4 humans

L'activació de limfòcits TCD4 comporta la producció d'una sèrie de citocines per part de la cèl·lula. Degut al paper inhibitori que juga sindecà-2 es va analitzar la seva influència en la producció de citocines amb funcions importants en el creixement T, o en la regulació de la resposta T. Es van analitzar els nivells d'mRNA de IL-2, IL-10, TNF i TGF $\beta$  en limfòcits TCD4 purificats sembrats en presència d'anticòs anti-CD3



i anti-sindecà-2 (SD2.1.186.CL.C) (Fig.IV.15). L'acció de sindecà-2 atenuava la producció de citocines durant l'estimulació de la cèl·lula T. La producció d'mRNA de IL-2 es va veure quasi totalment inhibida en les primeres hores i també es va observar una disminució notable de l'mRNA de IL-10. També es va veure una baixada en l'mRNA de TNF i en TGF $\beta$  tot i que a temps d'incubació llargs es perdia la inhibició. Així doncs l'acció inhibidòria de sindecà-2 en cèl·lules T també és a nivell de producció de citocines.

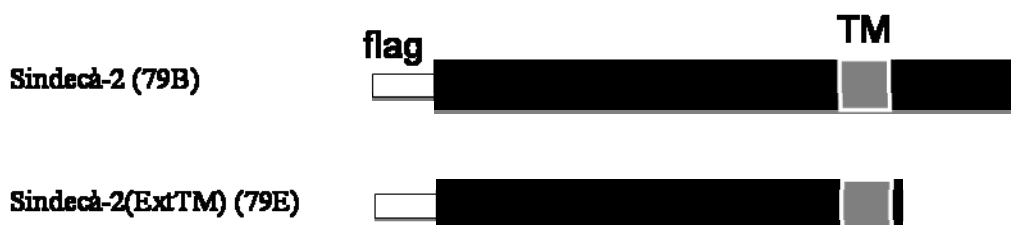


**Figura IV.15. Sindecà-2 inhibeix la producció de les citocines IL-2, IL-10, TNF i TGF $\beta$  en limfòcits TCD4 humans.** Es van preparar limfòcits de sang perifèrica a partir de concentrats de capa leucocitària i dels PBL es van aïllar els limfòcits TCD4 mitjançant selecció negativa amb columnes específiques. Els TCD4 es van incubar una nit en DMEM-5%FCS per després activar-los en plaques recobertes amb anticòs anti-CD3 o anticòs anti-CD3 i anti-sindecà-2 (SD2.1.186.CL.C). Es van mantenir en cultiu durant les hores indicades i es va analitzar la producció d'mRNA de IL-2, IL-10, TNF i TGF $\beta$  per RT-qPCR. Els nivells dels mRNAs estudiats a cada mostra es van normalitzar amb el contingut de RNA de GFP, que va ser afegit equitativament a cada mostra abans de la purificació de l'RNA (veure secció III). Els resultats mostrats són d'un experiment amb un donant. Un segon experiment independent amb un donant diferent, ens va mostrar una cinètica similar per les 4 citocines però l'activació de totes elles era més baixa (dada no mostrada)

Veient la cinètica de citocines que obteníem i sobretot observant una petita recuperació de TGF $\beta$ , es va analitzar si la conseqüència d'aquesta acció inhibidora de sindecà-2 era una entrada de la cèl·lula T en un estat d'anergia. Es va fer una aproximació experimental estimulants cèl·lules TCD4 4 dies, deixant-les en repòs 2 dies, tractant-les amb anticòs anti-sindecà-2 i tornant-les a estimular. Les mostres tractades amb anti-sindecà-2 no havien perdut la seva capacitat de produir IL-2 per tant no es va poder concloure que sindecà-2 portés la cèl·lula T a anergia.

#### IV.3.4 Sindecà-2 inhibeix la producció de la citocina IL-2 en Jurkat

També es va analitzar si aquest resultat es reproduïa en Jurkat transfectades amb sindecà-2 humà. Es van generar diferents línies estables de Jurkat transfectades amb sindecà-2 salvatge i amb mutacions i delecions del gen. Les dues línies de les quals s'han obtingut resultats sòlids són la transfectada amb un vector que conté el gen de sindecà-2 salvatge lligat a FLAG en el seu extrem extracel·lular (79B) i la línia transfectada amb sindecà-2 lligat a FLAG amb una delecció total de la part citoplasmàtica (79E) (Fig. IV.16). També es va generar una línia control transfectada només amb el vector (línia cDNA<sub>3</sub>).



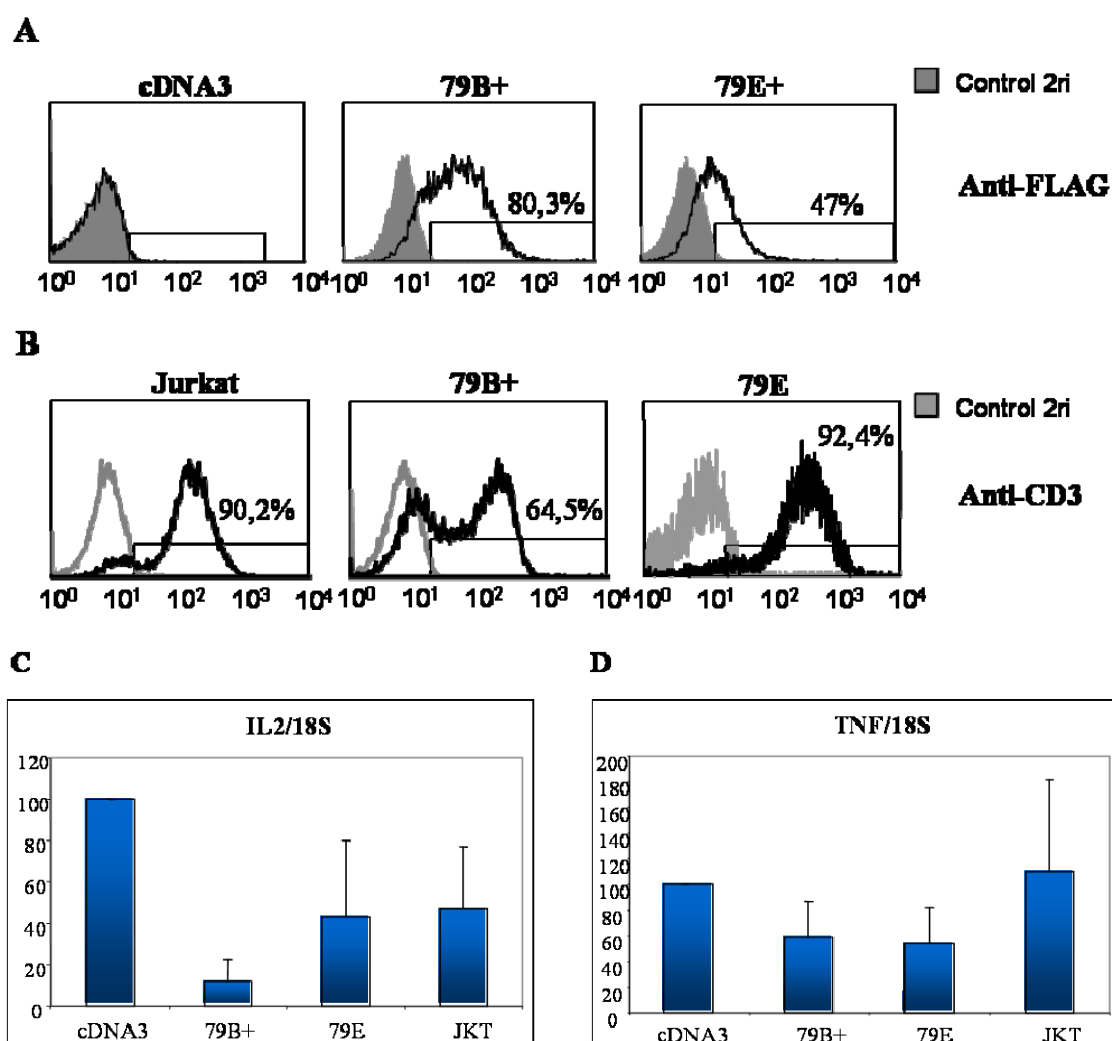
**Figura IV.16. Representació esquemàtica de l'insert de sindecà-2 lligat a FLAG transfectat en Jurkat per obtenir les línies estables 79B i 79E (TM: regió transmembrana).**

---

L'expressió de sindecà-2 va ser controlada en totes les línies mitjançant citometria de flux amb un anticòs anti-FLAG (Fig.IV.17A). L'expressió del receptor TCR es va controlar també en tots els clons (Fig.IV.17B). Es va analitzar per RT-qPCR la producció d'mRNA de IL-2 i TNF durant l'estimulació en placa recoberta d'anticòs anti-CD3 (Fig.IV.17C-D). Es va observar que sindecà-2 inhibeix l'expressió d'mRNA de IL-2. L'eliminació de la part citoplasmàtica de sindecà-2 provocava la recuperació de

l'estimulació amb anti-CD3 (Fig.IV.17C). Però aquesta recuperació no era total, suggerint que el domini citoplasmàtic conté probablement tant elements inhibidors com activadors i que el domini extracel·lular de sindecà-2 també té una certa acció inhibidora.

Pel que fa el TNF, es va observar una acció parcialment inhibidora de sindecà-2. La delecció del domini citoplasmàtic, sembla que no altera l'acció inhibidora de sindecà-2 sobre la producció de TNF (Fig.IV.17D).



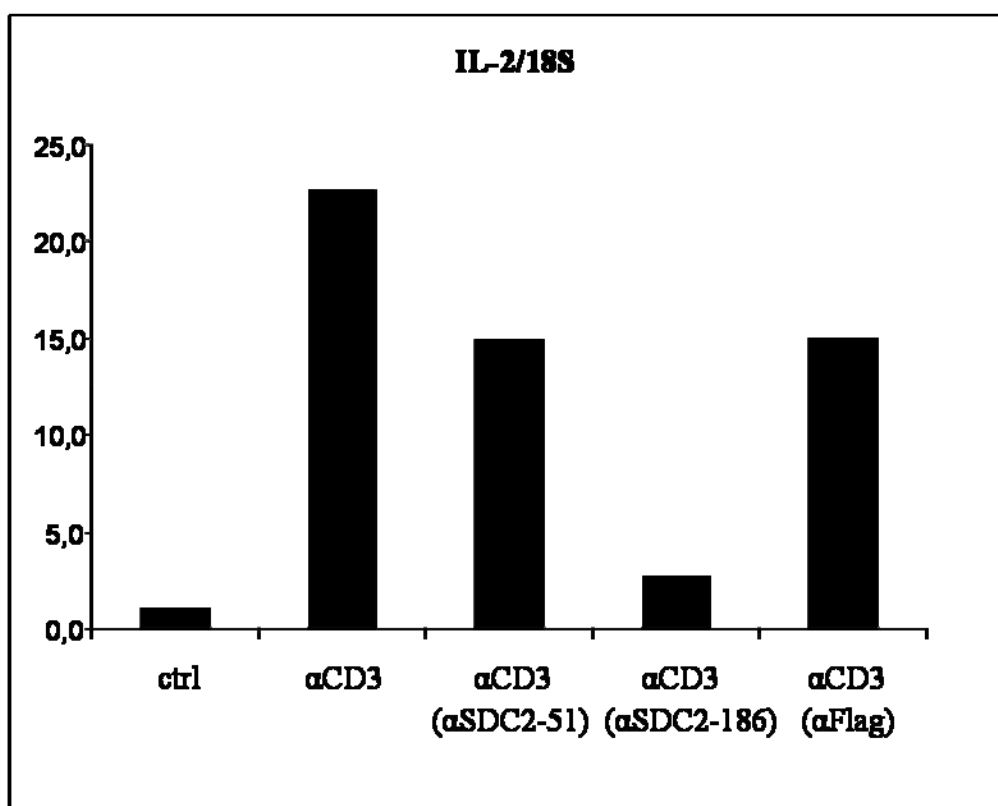
**Figura IV.17. Sindecà-2 inhibeix la producció de la citocina IL-2 en Jurkat.**

(A) Perfil d'expressió de sindecà-2 en els diferents clons estables que expressen variacions del gen de sindecà-2 estudiats. Les diferents poblacions cel·lulars que es mantenen en condicions de cultiu normals (DMEM-10%FCS-G418) es van marcar amb anticòs anti-FLAG i un secundari unit a Alexa488 i es van analitzar per citometria de flux. Les subpoblacions 79B+ i 79E+ provenen d'una separació cel·lular per FACS de les cèl·lules més positives per FLAG de les poblacions 79B i 79E respectivament. (B) Perfil d'expressió de CD3 en cèl·lules Jurkat i en les línies estables 79B i 79E. Les diferents poblacions cel·lulars que es mantenen en

condicions de cultiu normals es van marcar amb anticòs anti-CD3 i un secundari unit a Alexa633 i es van analitzar per citometria de flux. **(C-D)** Els diferents clons es van mantenir en condicions de privació DMEM-1%FCS durant una nit i van ser activats en plaques recobertes amb anticòs anti-CD3 i es va analitzar la producció d'mRNA de IL-2 i TNF per RT-qPCR. Els nivells dels mRNAs estudiats a cada mostra es van normalitzar amb el contingut d'RNA de 18S (veure secció III). Els resultats es mostren en tants per cent respecte el control (100%).

Posteriorment es va fer una transfecció transitòria en cèl·lules Jurkat del vector que contenia el gen de sindecà-2 lligat a FLAG i un vector contenint el gen GFP. Es va separar per FACS la població transfectada (GFP positiva) i es va analitzar la producció d'mRNA de IL-2 quan les cèl·lules eren activades amb anticòs anti-CD3 i tractades amb anticòs anti-sindecà-2 (SD2.1.186.CL.C i SD2.1.51.CL.C) (Fig.IV.18). Els resultats indiquen que al entrecreuar sindecà-2 amb un anticòs específic, es reduïa la producció de IL-2 parcialment en el cas SD2.1.51.CL.C i gairebé totalment en el cas de SD2.1.186.CL.C.

El fet de tractar les cèl·lules amb anticòs anti-FLAG donava una inhibició parcial.



**Figura IV.18.** En jurkat transfectades transitoriament amb el gen de sindecà-2 lligat a FLAG s'inhibeix la producció d'mRNA de IL-2. Es van transfectar transitoriament cèl·lules jurkat amb el plasmidi 79B (que conté el gen de sindecà-2 lligat a FLAG) i GFP. Les cèl·lules GFP positives es van purificar. Les cèl·lules es

van mantenir en repòs DMEM-0%FCS durant una nit i després es van activar amb anticòs anti-CD3 amb i sense anticòs anti-sindecà-2 (SD2.1.186.CL.C i SD2.1.51.CL.C) i anti-FLAG (tots ells units a placa) durant 6h. Es va analitzar la producció d'mRNA de IL-2 per RT-qPCR. Els nivells de mRNA de IL-2 es van normalitzar amb el contingut d'RNA de 18S (veure secció III).

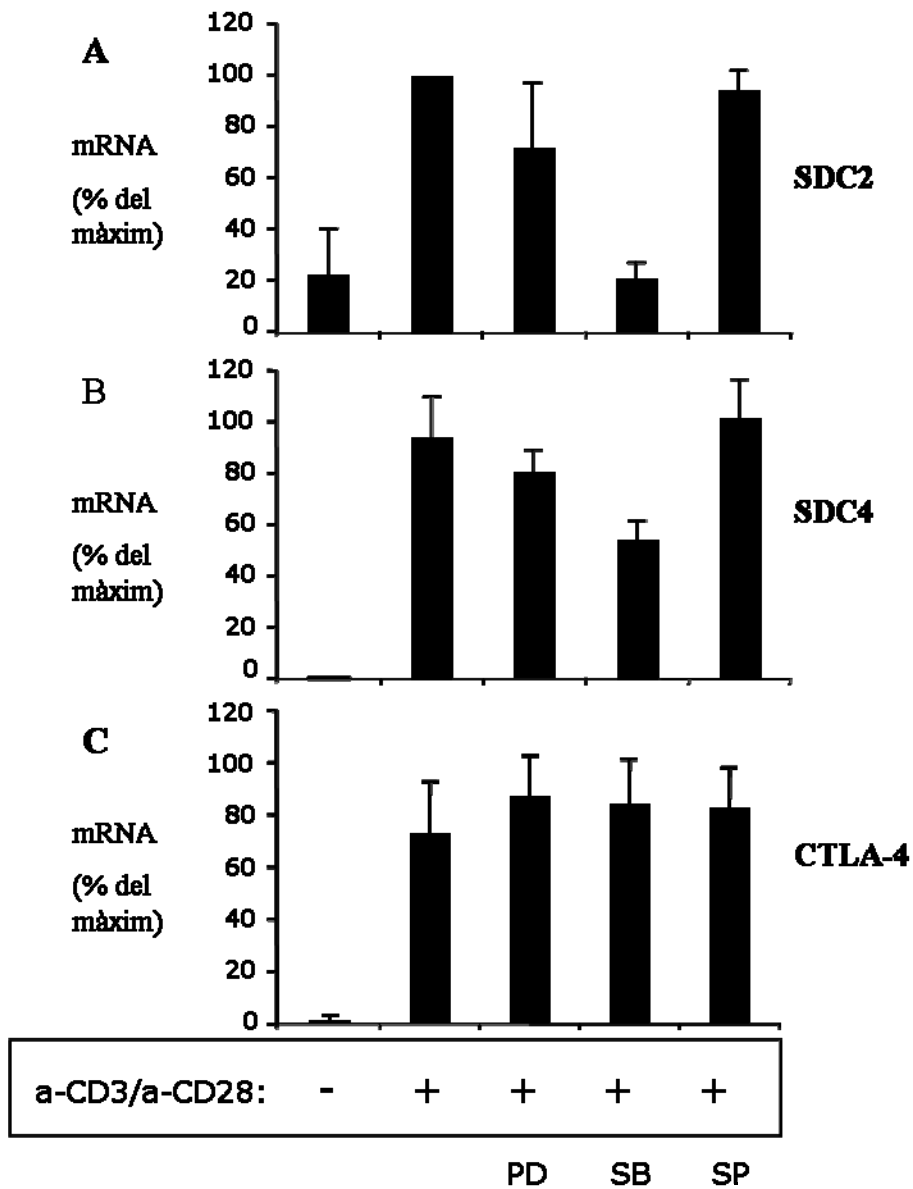
---

Aquest resultat ens confirmava que en Jurkat, sindecà-2 també inhibeix la producció d'mRNA de IL-2.

#### **IV.4. La inhibició de la MAPK p38 bloqueja l'expressió de sindecà-2**

Per estudiar les vies de senyalització involucrades en la regulació de l'mRNA de sindecà-2 i sindecà-4, es van utilitzar inhibidors específics: PD098059 per bloquejar MEK 1 i 2 (i per tant la senyalització d'ERK1/2 (Dudley et al., 1995)); SB203580 per la via p38 MAPK  $\alpha/\beta$  (Cuenda et al., 1995), i SP600125 per JNK (Han et al., 2001). Els PBL van ser tractats amb els inhibidors (1 $\mu$ M de cada) i estimulats via CD3 i CD28 durant 3 dies, abans de la purificació dels TCD4 per FACS i del posterior anàlisi de mRNA (Fig.IV.19). L'inhibidor de MEK 1 i 2 PD098059 va reduir lleument l'mRNA de sindecà-2 i -4 en cèl·lules estimulades, deixant entreveure la implicació de les MAP cinases en aquesta activació. L'inhibidor de p38 MAPK reduïa l'mRNA de sindecà-4 al 50% i bloquejava completament l'mRNA de sindecà-2. Així doncs, en cèl·lules T primàries, p38 $\alpha$  i  $\beta$  són necessaris per la inducció de sindecà-2, i un bloqueig de la seva activitat impedeix la producció d'mRNA de sindecà-2. La producció de sindecà-4 és parcialment dependent de cadascuna de les dues vies, ERK i p38 MAP cinasa.

Els efectes inhibitoris observats van ser específics de l'mRNA dels sindecans i l'expressió d'altres mRNAs no es va veure alterada (per exemple la de CTLA-4). En contraposició als inhibidors de p38 i MEK, l'inhibidor de JNK SP600125 no va tenir cap efecte en l'activació de sindecans induïda pel TCR. Així doncs, la producció de sindecà-2 i -4 no era dependent de la via de JNK.



**Figura IV.19. Efecte dels inhibidors de ERK, p38 i JNK en l'expressió de l'mRNA de sindecà-2 i -4 en cèl·lules TCD4.** Els limfòcits de sang perifèrica es van cultivar en privació DMEM-0,5%FCS durant una nit per, després, ser tractats durant 45min amb 1µM dels inhibidors d'ERK (PD98059), de p38 (SB203580), de JNK (SP600125) o amb el vehicle (DMSO). Les cèl·lules T dels PBL van ser posteriorment activades durant 72h amb anticòs anti-CD3 i anti-CD28 (en presència de DMEM-10%FCS). Les cèl·lules TCD4 van ser seleccionades per FACS i l'RNA cel·lular va ser purificat i es van analitzar els mRNAs de sindecà-2 (A), sindecà-4 (B) i CTLA-4 (C), els quals van ser quantificats per RT-qPCR. Les dades mostrades són mitjanes ± SD de tres experiments independents duts a terme amb tres donants diferents. Està representat el percentatge respecte el màxim. Els resultats expressats en el gràfic són la relació dels mRNAs sindecans/GFP i CTLA-4/GFP ± SD.

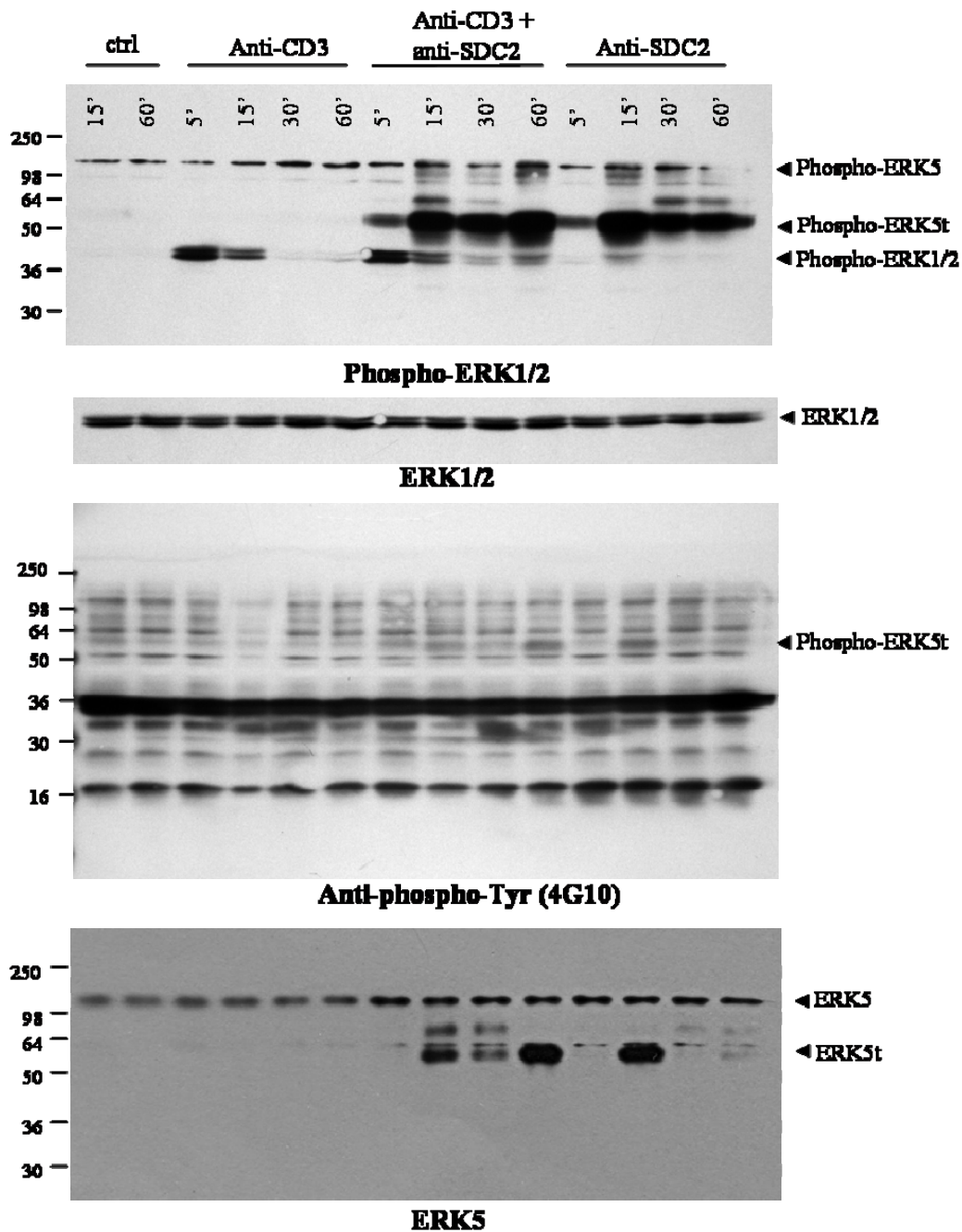
## **IV.5. Senyalització induïda per sindecà-2**

### **IV.5.1 Sindecà-2 induïx la fosforilació d'una proteïna que té el mateix motiu de fosforilació que ERK1/2 en T CD4 i en Jurkat**

L'acció inhibidòria de sindecà-2 en limfòcits TCD4 humans recau sobre almenys dos processos molt importants de la cèl·lula com són la proliferació i la producció de citocines, la qual cosa suggereix que estiguin alterades algunes vies de senyalització importants de la cèl·lula T. D'aquesta manera es va estudiar quina era l'acció de sindecà-2 en la fosforilació i conseqüent activació de ERK1/2 (Fig.IV.20). Es va observar que el patró de ERK1/2 canviava lleugerament al activar les cèl·lules amb anticòs anti-CD3 i anti-sindecà-2. Però sorprenentment en el WB marcat amb anti-ERK1/2-fosforilada, apareixien una banda predominant d'uns 60KDa i unes bandes al voltant de 100KDa que no corresponien a ERK1/2 i que curiosament només apareixien en les mostres que havien estat tractades amb anticòs anti-sindecà-2 (SD2.1.186.CL.C). Es va analitzar el patró de tirosines fosforilades també en aquestes mostres i no es veien canvis exceptuant aquesta banda de 60KDa que també era aparent, per tant es tractava d'una proteïna fosforilada a nivell de tirosines i que era reconeguda per l'anticòs anti-ERK1/2-fosforilada.

Està descrit que l'anticòs anti-ERK1/2-fosforilada és capaç de reconèixer el motiu TEY (Thr-Glu-Tyr) fosforilat d'ERK1 i d'ERK2 que és un motiu molt similar al que presenta la proteïna ERK5 i que també és susceptible a fosforilació (Nishimoto and Nishida, 2006). Tal i com indica la fitxa tècnica de l'anticòs anti-ERK5-fosforilada (Cell Signaling ref. 3371), l'anticòs anti-ERK5-fosforilada pot reconèixer també ERK1/2 fosforilada, per tant, també és possible que l'anticòs anti-ERK1/2-fosforilada reconegui ERK5-fosforilada tal com han descrit d'altres (Garaude et al., 2005; Gilley et al., 2009). ERK5 té un pes molecular de 115KDa, i s'ha descrit una isoforma d'ERK5 (ERK5t) que té un pes molecular aproximat d'uns 60KDa (McCaw et al., 2005). Hi havia aleshores una proteïna candidata, la fosforilació de la qual es veia incrementada per acció de sindecà-2. De les mateixes mostres activades amb anticòs anti-CD3 i anti-sindecà-2 (SD2.1.186.CL.C) es va fer un WB que es va marcar amb anticòs anti-ERK5, i el resultat obtingut suggereix que les bandes que es fosforilaven en presència de

sindecà-2 i que tenien un pes aparent de 60 i 115KDa corresponen efectivament a ERK5.

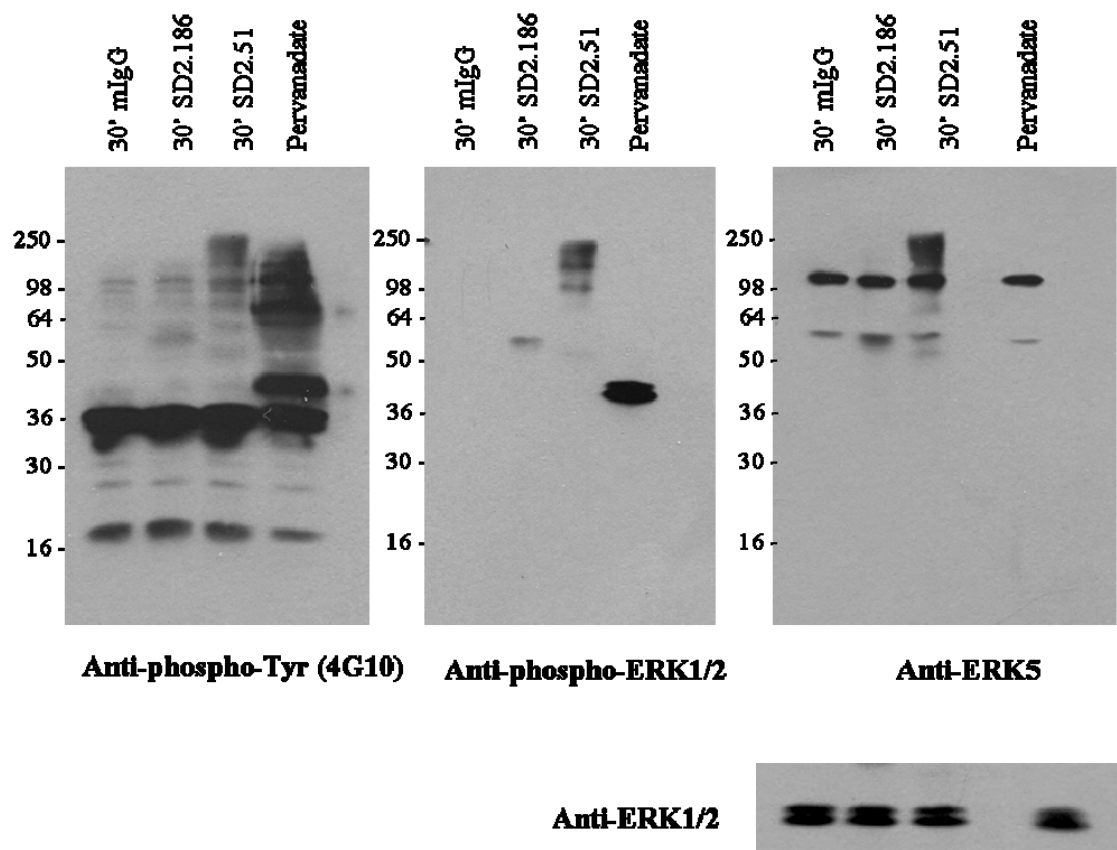


**Figura IV.20. Senyalització induïda per sindecà-2 en cèl·lules TCD4.** Es van preparar PBL a partir de concentrats de capa leucocitària i a partir dels PBLs es van aïllar els TCD4 per selecció negativa amb columnes específiques. Les cèl·lules TCD4 van ser activades amb PHA (10µg/mL) i anti-CD28 durant 3 dies i posteriorment es van privar les cèl·lules perquè entressin en repòs amb DMEM-1% plasma autòleg durant 2 dies. Les cèl·lules es van marcar amb anticossos biotinats anti-CD3, anti-sindecà-2 (SD2.1.186.CL.C) o la IgG control i es van afegir boles



de *sepharose* conjugades amb Streptavidina. Es van incubar a 37°C durant els minuts indicats i es va obtenir l'extracte cel·lular total. Mitjançant la tècnica del WB es va analitzar el contingut d'ERK1/2 fosforilada, d'ERK1/2, de tirosines fosforilades i d'ERK5 utilitzant anticossos específics. En els casos convenients es va utilitzar un secundari conjugat a HRP. El resultat representat és d'un experiment d'un total de tres experiments independents realitzats.

Es va fer el mateix anàlisi en cèl·lules Jurkat per veure si es reproduïa aquest efecte de sindecà-2 (Fig.IV.21) i el resultat permet concloure que en Jurkat, sindecà-2 també afavoreix la fosforilació d'ERK5 i l'aparició d'aquesta isoforma fosforilada d'ERK5 de 60KDa. Curiosament en Jurkat es va observar que l'anticòs SD2.1.186.CL.C i l'anticòs SD2.1.51.CL.C induïen diferents bandes d'ERK5 fosforilada.



**Figura IV.21. Senyalització induïda per sindecà-2 en cèl·lules jurkat.** Les cèl·lules jurkat es van marcar amb anticossos biotinats anti-sindecà-2 (SD2.1.186.CL.C i SD2.1.51.CL.C) i una IgG control i es van afegir boles de *Sepharose* conjugades a Streptavidina. Es van incubar a 37°C durant 30min i es va obtenir l'extracte proteic. Les cèl·lules tractades amb pervanadat de sodi van seguir un tractament de 10min a 37°C abans de ser lisades. Mitjançant la tècnica del WB

es va analitzar el contingut de tirosines fosforilades, d'ERK1/2 fosforilada, d'ERK5 i d'ERK1/2 utilitzant els anticossos específics. En els casos necessaris es va utilitzar un secundari conjugat a HRP.

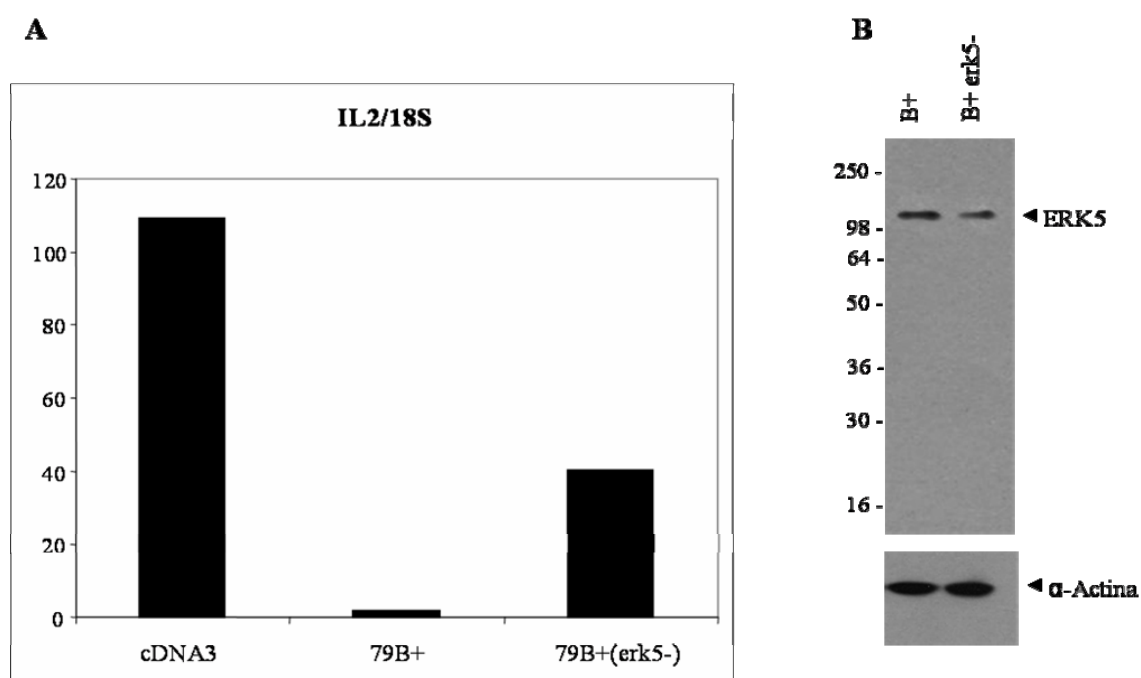
---

Es van fer varis intents de fraccionament mitjançant gels de 2 dimensions per tal de caracteritzar aquesta proteïna que apareixia a 60KDa, però no es va aconseguir obtenir gels suficientment resolutius.

#### **IV.5.2 El bloqueig d'ERK5 en Jurkat reverteix la inhibició de IL-2**

Per tal d'esbrinar si la fosforilació de la proteïna ERK5 estava relacionada amb la inhibició de IL-2 que causava el lligament de sindecà-2, es van transfectar la població 79B+ (població de Jurkat transfectades amb el gen de sindecà-2 lligat a FLAG) amb un shRNA específic de ERK5 per tal d'inhibir l'expressió de la proteïna ERK5.

Aquestes cèl·lules transfectades es van activar en presència d'anticòs anti-CD3. Es va extreure i purificar l'RNA i es va analitzar la producció d'mRNA de IL-2 mitjançant RT-qPCR (Fig.IV.22A). Els resultats obtinguts ens demostren que sí existeix una relació entre ERK5 i IL-2 ja que al bloquejar ERK5 l'efecte inhibitori de sindecà-2 vers IL-2 és revertit. Es va controlar que el bloqueig d'ERK5 amb l'shRNA fos efectiu mitjançant WB (Fig.IV.22B).



**Figura IV.22. El bloqueig d'ERK5 en Jurkat reverteix la inhibició de IL-2.** (A) Les cèl·lules 79B+ es van transfectar de manera estable amb una mescla de 4 shRNAs d'ERK5, es van privar amb DMEM-1%FCS durant una nit i posteriorment van ser activades durant 6h amb anticòs anti-CD3 immobilitzat. L'mRNA de IL-2 va ser analitzat per RT-qPCR. Els nivells de mRNA de IL-2 es van normalitzar amb el contingut d'RNA de 18S. (B) Es va obtenir un extracte proteic de les cèl·lules 79B+(ERK5-) i per tal d'analitzar el seu contingut en ERK5 es va fer un WB que es va marcar amb anticòs anti-ERK5 i un secundari conjugat a HRP. El control de càrrega es va fer amb un marcatge d'actina del mateix WB.



## **V. DISCUSSIÓ**



## V. DISCUSSIÓ

Els resultats presentats en aquesta tesi identifiquen per primera vegada l'expressió de sindecà-2 i sindecà-4 en limfòcits T CD4<sup>+</sup> humans durant la seva activació i posen de manifest la funció d'aquestes molècules en el procés d'activació T.

La molècula sindecà-2 ha estat molt ben caracteritzada en fibroblasts, cèl·lules endotelials, en cèl·lules tumorals, en cèl·lules neuronals i és important en processos com l'angiogènesi i en alguns processos de desenvolupament estudiats en peix zebra i *Xenopus*. El sindecà-4, expressat en molts tipus cel·lulars, sembla tenir funcions importants en la inflamació, s'ha implicat en la modulació de la senyalització d'FGF2, en la regulació de la migració cel·lular conjuntament amb l'acció de la integrina  $\beta 1$ , i en el control de l'adhesió a través de modificacions del citoesquelet. També s'ha estudiat extensament la seva habilitat d'activació de PKC $\alpha$  en absència de Ca<sup>+</sup> mitjançant la seva interacció amb PIP2.

Hi ha nombrosos treballs on es descriu el patró d'expressió i funció d'ambdós sindecans en aquests diversos teixits. Tanmateix, hi ha poc descrit sobre la seva funció i expressió en cèl·lules del sistema immune.

La obtenció d'anticossos monoclonals dirigits contra sindecà-2 ens ha permès identificar aquesta molècula en la membrana i en el citoplasma de limfòcits T CD4<sup>+</sup> durant la seva activació i ens ha permès realitzar diversos estudis funcionals.

### **V.1. Estudi de l'expressió de sindecà-2 i -4 en limfòcits T CD4<sup>+</sup> humans**

Les cadenes d'HS dels HSPGs poden presentar una diversitat estructural extraordinària. L'especificitat de la unió HS implica que les cèl·lules i els teixits, modificant l'estructura de les cadenes d'HS que expressen, poden canviar la seva capacitat per interaccionar amb diferents proteïnes d'unió a HS. Així doncs, és raonable el fet que els sindecans tinguin la capacitat d'expressar-se en diversos teixits i exercir diferents funcions. Centrant-nos en el procés inflamatori, que comprèn diferents passos: l'ancoratge inicial i el rodament de leucòcits per l'endoteli inflammat, l'activació de leucòcits mitjançant quimiocines, l'adherència estable dels leucòcits activats a

l'endoteli inflammat, la degradació de la membrana basal subendotelial i la migració de leucòcits, a través de gradients de quimiocines, al teixit diana, s'ha observat la participació d'alguns sindecans en alguns passos d'aquest procés (Parish, 2006). A més a més, se sap que varies citocines proinflamatòries poden regular positivament l'expressió a la superfície cel·lular d'alguns HSPGs, com sindecà-1, en cèl·lules endotelials (Muller, 2003). Els leucòcits tenen una diversitat d'expressió d'HSPGs semblant a la de les cèl·lules endotelials, tanmateix els limfòcits de sang perifèrica, els monòcits i els neutròfils expressen només petites quantitats de HS a la superfície cel·lular, predominantment sindecà-4 (Clasper et al., 1999; Jones et al., 2005; Kaneider et al., 2001; Kaneider et al., 2002; Saphire et al., 2001).

Només s'observa un increment de l'expressió d'HSPGs després de l'activació dels leucòcits per diverses citocines o rera la inducció de la seva proliferació i diferenciació. Per exemple, els monòcits humans exposats a IL-1 expressen ràpidament i específicament sindecà-2 (Clasper et al., 1999), mentre que la diferenciació de monòcits a macròfags provoca una alta expressió de sindecà-1, -2 i -4 (Saphire et al., 2001). De manera similar, després de l'activació induïda per antigen, els limfòcits T CD4<sup>+</sup> regulen positivament la seva expressió de sindecans i glipicans (Jones et al., 2005). Per altra banda, les cèl·lules B, quan es diferencien en cèl·lules plasmàtiques, produeixen selectivament alts nivells de sindecà-1 (Kim et al., 1994; Sanderson and Borset, 2002).

En aquest treball s'ha demostrat que l'estimulació de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> primàries humanes regula positivament l'expressió de sindecà-2 i -4 i que aquests sindecà-2 i -4 poden regular la proliferació de la cèl·lula T i la producció de citocines. Per tant, aquest estudi indica que probablement sindecà-2 i -4 tinguin un paper important en la limitació i així en la regulació de l'activació de les cèl·lules T. S'havia descrit un paper potencialment antiinflamatori per sindecà-4 en ratolins deficientes en sindecà-4. Aquests ratolins presentaven una alta mortalitat deguda a la injecció d'LPS suggerint que el sindecà-4 podia tenir una funció inhibidora també en cèl·lules mieloides (Ishiguro et al., 2001). Encara que l'estudi d'aquesta tesi s'ha centrat en cèl·lules T CD4, les cèl·lules T CD8 de ratolí també expressen nivells similars de sindecà-4 però nivells més baixos dels altres sindecans (Chung et al., 2007a). S'ha divulgat que només l'expressió de sindecà-4 es veu positivament regulada en l'activació T (Chung et al., 2007a). Tot i això en el present treball s'ha demostrat que les cèl·lules T CD4 humanes regulen positivament ambdós sindecans -2 i -4 rera l'activació T. L'anàlisi per citometria de flux



revela que la majoria de sindecà-2 en les cèl·lules T és intracel·lular. La qual cosa no és del tot sorprenent ja que s'ha descrit la presència intracel·lular dels sindecans en altres tipus cel·lulars (Beiting et al., 2006; Brockstedt et al., 2002). Tanmateix el seu paper en el citoplasma o fins i tot en el nucli (en el cas de sindecà-1 (Brockstedt et al., 2002)) es desconeix.

### **V.1.1. L'expressió de sindecà-2 i -4 té un paper en la regulació de la resposta immune.**

Els resultats d'aquesta tesi suggereixen que l'augment d'expressió de sindecà-2 i -4 durant l'activació de les cèl·lules T, té un paper en la regulació immune. En un article publicat durant la realització d'aquesta tesi es va confirmar la funció de sindecà-4 com a inhibidor en la cèl·lula T (Chung et al., 2007a), però aquests resultats per primera vegada suggereixen un paper inhibitori de sindecà-2 en cèl·lules T humanes. En l'article en qüestió, s'identifica DC-HIL com el lligand de sindecà-4 en cèl·lules dendrítiques amb una acció inhibidora en cèl·lules T (Chung et al., 2007a). Curiosament, sindecà-4 és l'únic HSPG immunoprecipitat per DC-HIL a partir d'extractes de cèl·lules T de ratolí activades (Chung et al., 2007a). A més a més, el bloqueig de sindecà-4 amb anticossos aboleix completament la unió de DC-HIL a les cèl·lules T activades, suggerint que DC-HIL no s'uneix a sindecà-2 o bé que sindecà-2 no s'expressa en T CD4 de ratolí (Chung et al., 2007a). És possible que sindecà-2 i -4 siguin reconeguts per lligands diferents, i per tant, responguin a diferents estímuls.

És interessant que en cèl·lules T en repòs, sindecà-2 i -4 apareixen com a formes monomèriques hipoglicosilades, mentre que durant l'estimulació de les cèl·lules T apareixen isoformes glicosilades addicionals, suggerint que el nucli proteic i les isoformes heparà sulfat glicosilades deuen unir-se a diferents lligands o fins i tot, els ectodominis del nucli proteic poden ser no funcionals. Tanmateix, dades publicades demostren que els sindecans poden enganxar-se directament en interaccions proteïna-proteïna a través dels ectodominis del seu nucli proteic (McFall and Rapraeger, 1997). Els ectodominis del nucli proteic de sindecà-1 i sindecà-4 poden promoure l'adhesió cel·lular de manera dependent d'integrines (Beauvais et al., 2004; McQuade et al., 2006; Whiteford and Couchman, 2006). Cal que estudis futurs clarifiquin les funcions de les formes hipoglicosilades de sindecà-2 i -4 en cèl·lules T.

En cèl·lules B s'ha identificat un lligand específic (TACI) per sindecà-2 i -4 (Bischof et al., 2006). El receptor TACI és un homòleg del TNFR que és essencial per la producció d'anticossos TI-2 (T-independents del tipus 2) (von Bulow et al., 2001). També s'ha suggerit que TACI bloqueja la proliferació o supervivència de les cèl·lules B (von Bulow et al., 2001; Yan et al., 2001). A més a més, un altre lligand de TACI, anomenat APRIL, requereix l'oligomerització a través de proteoglicans per ser capaç d'activar TACI (Ingold et al., 2005). Per tant, l'expressió de sindecà-2 i -4 per part de les cèl·lules T podria contribuir al control de la funció de les cèl·lules B. S'han identificat lligands addicionals per sindecà-2, entre ells, FGF2 (Ornitz et al., 1992; Yayon et al., 1991), GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) (Modrowski et al., 2000) i TGF $\beta$  (Chen et al., 2004b). Amb la qual cosa, l'expressió tardana de sindecà-2 en cèl·lules T activades podria mediar el rol immunosupressor del TGF $\beta$ .

#### **V.1.2. L'expressió de sindecà-2 en limfòcits T pot afavorir la infecció de certs virus.**

Addicionalment al significat de l'expressió de sindecans en la biologia de les cèl·lules T, aquesta molècula podria adquirir una major rellevància en la fisiopatologia de l'HIV i l'HTLV-1. La presència d'HSPGs en les cèl·lules T contribueix en la infecció per HTLV-1 (Jones et al., 2005) i la sobreexpressió de sindecà-2 i -4 en cèl·lules T incrementa la internalització de HTLV-1 (Jones et al., 2006). De manera suplementària, l'HIV utilitza els sindecans com a receptors *in cis* per infectar macròfags i com a receptors *in trans* (presentes en les cèl·lules endotelials) per infectar limfòcits T (Bobardt et al., 2003). Els sindecans -2 i -4 són els majors contribuïdors en la unió de l'HIV i són capaços d'infectar *in trans* cèl·lules permissives (Bobardt et al., 2003). Estudis previs han evidenciat la participació d'HSPGs de la superfície cel·lular en l'ancoratge de l'HIV a la cèl·lula i l'entrada del virus en línies de cèl·lules T (Patel et al., 1993). Els sindecans expressats en les cèl·lules T activades podrien interaccionar amb la proteïna GP120 de l'HIV i d'aquesta manera facilitaria la infecció de les cèl·lules *in cis*, contribuint a la disseminació de l'HIV.

Hi ha un nombre creixent d'evidències que suggereixen que molts patògens poden utilitzar els HSPGs, com els sindecans, per facilitar la colonització de l'hoste. Entre ells hi ha el virus de l'herpes simple, el papillomavirus, el virus dengue, el virus de l'hepatitis C, l'HIV, l'HTLV-1 i també hi ha bacteris com *Chlamydia trachomatis*,

*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae* i *Neisseria meningitidis* (Bernfield et al., 1999; Esko and Lindahl, 2001; Freissler et al., 2000; Pinon et al., 2003; Shafti-Keramat et al., 2003; Ugolini et al., 1999). La majoria dels patògens, com l'HIV, utilitzen els sindecans com a receptors d'ancoratge que faciliten la seva entrada a les cèl·lules de l'hoste o la seva resistència en l'ambient de l'hoste. Tanmateix, alguns bacteris utilitzen els sindecans d'una altra manera més sofisticada. Concretament, ni *S. aureus* ni *P. aeruginosa* s'uneixen als sindecans i per tant, no els utilitzen com a receptors d'ancoratge (Park et al., 2004; Park et al., 2001). És més, els dos patògens desencadenen l'escissió dels ectodominis dels sindecans. Els ectodominis dels sindecans escindits, a través de les seves cadenes d'HS, s'uneixen fortament a pèptids antimicrobians catiónics, a l'elastasa de neutròfils i a la catepsina G i inhibeixen les seves activitats anti-bacterianes (Park et al., 2001). Així doncs, *S. aureus* i *P. aeruginosa* utilitzen la maquinària d'escissió de l'hoste per alliberar els sindecans de la superfície cel·lular per tal de neutralitzar les defenses de l'hoste i d'aquesta manera augmentar la seva virulència.

## **V.2. Estudi del bloqueig de l'activació T causat per l'expressió de sindecà-2 i -4**

Els resultats obtinguts demostren que l'expressió de sindecà-2 i -4 en cèl·lules T permet el bloqueig de l'activació d'aquestes cèl·lules. Aquesta aturada es dona tant a nivell de proliferació com a nivell de producció de citocines.

### **V.2.1. La unió de sindecà-2 i -4 mitjançant anticossos bloqueja la proliferació. Sindecà-2 és capaç d'aturar el cicle cel·lular.**

En aquest estudi s'ha demostrat una certa implicació de sindecà-2 i -4 en la resposta immunitària ja que són capaços de frenar l'activació T. S'ha observat que la unió de sindecà-2 i -4 mitjançant anticossos atura la proliferació de cèl·lules T després de l'activació d'aquestes. Com s'ha mencionat anteriorment s'ha proposat un regulador negatiu de l'activació de limfòcits T anomenat DC-HIL (Chung et al., 2007b), que és un receptor present en les APCs, el lligand del qual en cèl·lules T és induït per l'activació. La unió de DC-HIL a les cèl·lules atenua la resposta d'activació per anticossos anti-CD3, retallant la producció de IL-2, i prevenint l'entrada de les cèl·lules al cicle cel·lular (Chung et al., 2007b). Posteriorment es va descriure que el lligand de DC-HIL en

limfòcits T era sindecà-4, i mitjançant aquest sindecà, DC-HIL duia a terme la seva funció reguladora (Chung et al., 2007a). Recentment, el mateix grup (que havia estat treballant en ratolins) ha demostrat que la unió DC-HIL/sindecà-4 també comporta una funció inhibidora en cèl·lules T humanes, reduint la secreció de citocines pro-inflamatòries i bloquejant l'entrada de les cèl·lules a la fase S del cicle cel·lular (Chung et al., 2009). Van veure que la unió de DC-HIL fosforila residus tirosina i serina intracel·lulars de sindecà-4 i també van observar que l'addició d'anticossos anti-sindecà-4 era capaç de mimetitzar l'acció de DC-HIL i atenuar la resposta de l'anti-CD3 d'una manera potent (Chung et al., 2009). En aquesta tesi s'ha corroborat també l'acció inhibidora de sindecà-4, a més a més, s'ha demostrat l'expressió de sindecà-2 en cèl·lules T activades i s'ha descrit també un paper inhibidor, ja que sindecà-2 és capaç d'aturar la proliferació i bloquejar el cicle cel·lular de les cèl·lules T. Però és necessària la lligació de sindecà-2 perquè es dugui a terme aquesta acció inhibidora. Com es descriu en l'apartat de resultats, al tractar cèl·lules T activades amb anticòs anti-sindecà-2, cal que aquest estigui entrecreuat a una fase sòlida per tal que sindecà-2 aturi la proliferació de la cèl·lula (Fig.IV.11). Podem pensar que sindecà-2 pot estar actuant com a regulador a través d'un mecanisme semblant a sindecà-4 responent a un determinat receptor (diferent de DC-HIL) i per tant respondre a un determinat estímul.

També s'atribueix al sindecà-2 una funció inhibidora de l'activació en cèl·lules B, on s'ha descrit que sindecà-2 és un lligand de TACI i s'ha postulat que TACI és capaç de suprimir la proliferació o supervivència de les cèl·lules B (Bischof et al., 2006).

A més a més, s'ha descrit la participació de sindecà-2 i -4 en la regulació de la proliferació en diversos tipus cel·lulars fora del sistema immune. Hi ha experiments *in vitro* que suggereixen que els sindecans poden regular la proliferació. Les cèl·lules Swiss 3T3 que sobreexpressen sindecà-2 proliferen més ràpidament en presència de sèrum o d'FGF2 (Villena et al., 2003). L'expressió de sindecà-2 en la superfície cel·lular es veu incrementada en línies cel·lulars de cèl·lules de carcinoma de colon i aquesta expressió incrementada de sindecà-2 regula la proliferació juntament amb l'activitat tumorigènica en cèl·lules de carcinoma de colon (Park et al., 2002). Tant el fet de bloquejar la funció de sindecà-2 (Park et al., 2002) com de reduir la seva expressió amb *trichostatin A* (Kim et al., 2003) indueix l'aturada del cicle cel·lular en G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> o la reducció de la taxa de proliferació. De manera semblant, el sindecà-4 també està involucrat en la regulació de la proliferació. La disrupció de les interaccions entre

fibronectina i sindecà-4 per part de la *tenascin-C* causa l'aturada del cicle cel·lular i la inactivació de cdk2 (Orend et al., 2003). La inhibició de la inducció de sindecà-4 amb oligonucleòtids antisentit bloquegen la proliferació en cèl·lules 3T3-F442A (Landry et al., 2001). En adipòcits diferenciats, que es caracteritzen per la pèrdua de la capacitat proliferativa, la inducció de sindecà-4 per part del sèrum està reprimida, de manera que s'emfatitza el vincle que hi ha entre la inducció de sindecà-4 en les cèl·lules 3T3-F442A i la proliferació cel·lular.

Per tant, el sindecà-2 i el -4 poden regular la proliferació cel·lular en diferents tipus cel·lulars, però no s'ha descrit cap línia cel·lular on ambdós tinguin el mateix efecte.

En el present treball s'ha analitzat l'efecte de sindecà-2 en la línia cel·lular Jurkat i també s'ha observat una disminució de la proliferació, ja que al sobreexpressar sindecà-2 en Jurkat, la població positiva per sindecà-2 es va perdent en el temps. Aquest bloqueig de la proliferació no es deu a un augment en l'apoptosi, suggerint que, com s'ha observat en limfòcits T CD4<sup>+</sup>, la davallada en la proliferació induïda per sindecà-2 és deguda a l'aturada del cicle cel·lular.

### **V.2.2. L'expressió de sindecà-2 inhibeix la producció de citocines en cèl·lules T.**

En aquest treball s'ha estudiat la conseqüència de l'expressió de sindecà-2 en la producció de quatre citocines en els limfòcits T CD4<sup>+</sup>. Hi ha un ventall molt ampli de citocines implicades en el procés inflamatori que són segregades pels macròfags, monòcits, limfòcits T, etc. Entre elles es poden distingir citocines essencialment pro-inflamatòries que són les principals responsables d'iniciar la resposta T i les citocines anti-inflamatòries, encarregades de finalitzar la resposta. Hi ha citocines que comparteixen funcions o tenen funcions redundants, n'hi ha que tenen funcions sinèrgiques i n'hi ha que tenen funcions diferents. Hem analitzat l'efecte de sindecà-2 sobre quatre citocines: IL-2, IL-10, TGFβ i TNF. La IL-2 és un potent inductor de la proliferació de les cèl·lules T induint la seva expansió clonal, però també s'ha donat importància al paper que desenvolupa la IL-2 en el control del sistema immune. És per això que la IL-2 és crítica en ambdós processos, la inducció i la resolució de la resposta immune inflamatòria (veure referències (Hoyer et al., 2008)). La IL-10 és una citocina amb una gran activitat anti-inflamatòria i immunosupressora. La IL-10 és un potent inhibidor de la presentació d'antigen i inhibeix la producció de citocines pro-

inflamatòries i mediadors per part de macròfags i cèl·lules dendrítiques (veure referències (Mosser and Zhang, 2008)). El TGF $\beta$  és una proteïna expressada en quasi tots els tipus cel·lulars i que té activitats biològiques múltiples, diverses i a vegades contradictòries entre les quals hi ha la regulació de la funció cel·lular, la proliferació, la diferenciació i la migració. També té un paper important en la modulació de la inflamació, la reparació tissular, la homeòtasi i la tolerància immunològica. S'ha demostrat que el TGF $\beta$  suprimeix de manera potent la proliferació limfocitària i és produït pels limfòcits activats (veure referències (Taylor, 2009)). El TGF $\beta$  indueix la diferenciació de T CD4 reguladors (efecte tolerogènic o immunosupressor), però si es presenta conjuntament amb IL-6, aleshores té un efecte contrari, és pro-inflamatori sobre el T CD4 conduint a la diferenciació de TH17. El TNF inclou una superfamília de molècules la principal funció de les quals recau en la regulació de la supervivència cel·lular. La interacció del TNF amb el seu receptor regula positivament la resposta T i modula la comunicació entre les cèl·lules T i altres tipus cel·lulars (veure referències (Croft, 2009)).

Els resultats d'aquesta tesi indiquen que, en limfòcits T CD4<sup>+</sup>, l'expressió de sindecà-2 bloqueja la producció de IL-2, IL-10, TGF $\beta$  i TNF. Per TGF $\beta$  i TNF, aquesta inhibició es fa més feble al llarg del temps. Pel que fa sindecà-4, també s'ha observat una certa inhibició de la secreció de TNF. Aquests resultats recolzen la hipòtesi que el sindecà-2 i -4 expressats en cèl·lules T tenen un paper inhibidor de l'activació, ja que la seva expressió implica tant el bloqueig de la proliferació com el bloqueig de la producció de citocines.

S'han proposat diverses funcions dels heparà sulfats (HS) en relació a les citocines i quimiocines. La interacció de components del microambient cel·lular com els HS, amb diversos lligands, causen l'activació dels macròfags al causar la producció de citocines i prostaglandina E2 (PGE2). La producció de IL-6 induïda per HS es dona per activació de tirosina-cinases i amb l'activació de NF- $\kappa$ B, mentre la producció de PGE2 té a veure amb l'activació de PKC i l'augment de calci intracel·lular (Wrenshall et al., 1995). En macròfags peritoneals, els HS poden regular positivament ICAM-1 i ICAM-1A, i causar l'alliberament de IL-1, IL-6, TNF, IL-12, TGF $\beta$  i PGE2. Els HS poden unir-se i modificar l'acció de varies citocines i dels seus receptors. La unió de HS a IL-2 regula la homeòstasi de les cèl·lules T (Wrenshall and Platt, 1999) i la unió d'HS a IL-10 i IL-5 modula les seves respectives activitats (Lipscombe et al., 1998; Salek-Ardakani et al.,

2000). La unió de IL-8 als HSPGs de la superfície cel·lular és molt important pel reclutament de neutròfils a una zona d'inflamació. S'ha demostrat que la unió de IL-8 a heparina o a HS comporta una estabilització estructural, la qual cosa permet un efecte biològic prolongat de IL-8. Les quimiocines tenen una funció important en el reclutament de leucòcits cap a la inflamació. Quan queden immobilitzades en un endoteli, les quimiocines dirigeixen el rodament (*rolling*) de leucòcits fins que s'adhereixen fortament a l'endoteli. Els gradients de quimiocines tant solubles com immobilitzades semblen ser importants per la extravassació cap al teixit. S'ha descrit que els HS són mediadors responsables de la oligomerització de quimiocines a la superfície cel·lular (Hoogewerf et al., 1997).

Amb les línies de cèl·lules Jurkat que sobreexpressen sindecà-2 salvatge o sense la part citoplasmàtica, generades en aquest treball, s'ha observat que sindecà-2 també inhibeix la producció de IL-2 i parcialment la de TNF. Al eliminar la part citoplasmàtica de sindecà-2, la inhibició de la IL-2 es veu afectada, és a dir, hi ha una recuperació parcial de la producció de IL-2. Mentre, la inhibició parcial de TNF no sembla afectada per la delecció de la part citoplasmàtica de sindecà-2 (Fig.IV.17). Aquests resultats suggereixen que possiblement l'ectodomini de sindecà-2 té efectes inhibidors o bé que la part citoplasmàtica desencadena funcions tant inhibidores com activadores.

La capacitat de sindecà-2 per tenir accions tant diferents es pot relacionar amb les característiques d'unió i els patrons de sulfatació de les cadenes d'HS, amb el nivell d'oligomerització de sindecà-2 induïts per la senyalització de tirosina cinases, i amb la formació d'ambients a la membrana que afavoreixin la interacció amb molècules citoplasmàtiques (Essner et al., 2006). La cua citoplasmàtica de sindecà-2 interacciona amb una gran varietat de proteïnes a través dels seus dominis (C1, V i C2), la qual cosa permet lligar les interaccions amb la ECM a la resposta cel·lular (Essner et al., 2006). S'ha descrit la importància de la regió C2 després d'observar que la delecció del domini C2 i part de V té com a resultat un dominant negatiu o una proteïna amorfa, ja que en *Xenopus* s'ha descrit que l'assimetria dreta-esquerra es veu compromesa per l'expressió d'un mutant de sindecà-2 truncat a través de la regió V, i també s'ha descrit la importància del domini citoplasmàtic de sindecà-2 en la regulació dels nivells de receptors de TGF $\beta$  i en l'associació de sindecà-2 amb el betaglicà (Chen et al., 2004a; Klass et al., 2000; Kramer and Yost, 2002). A més a més, s'ha observat que la pèrdua

de 14 aminoàcids de la part C-terminal del domini citoplasmàtic de sindecà-2 en cèl·lules CHO, comporta una pèrdua de formació de la ECM ja que hi ha una manca de la capacitat de la cèl·lula per ordenar els substrats de laminina i fibronectina (Klass et al., 2000).

Amb l'obtenció de diverses línies Jurkat que presentin diverses deleccions parcials o mutacions de la cua citoplasmàtica de sindecà-2 podrem esbrinar quins dominis intracel·lulars són inhibidors i quins són activadors de la producció de IL-2 en aquest sistema.

### **V.3. La inhibició de la MAPK p38 bloqueja l'expressió de sindecà-2**

Els resultats obtinguts en aquesta tesi indiquen que la MAPK p38 té un paper clau en l'expressió de sindecà-2 en cèl·lules T humanes. La producció de sindecà-2 i -4 implica diferents graus de contribució de les cinases ERK i p38, a jutjar pels efectes diferencials de PD098059 i SB203580. Tant en les cèl·lules verge com en les memòria, p38 $\alpha$  i p38 $\beta$  són activades en resposta a la senyalització del TCR, que alhora es veu incrementada per una coestimulació de la cèl·lula T (Zhang et al., 1999). El paper de la MAPK p38 en cèl·lules T primàries humanes encara no s'entén completament. Considerant que en cèl·lules T de ratolí, p38 és necessària per la diferenciació Th1, en cèl·lules T humanes, p38 podria mediar l'expressió de citocines Th2 tant en cèl·lules verge com memòria (Dodeller et al., 2005). S'ha observat que l'increment de l'mRNA de sindecà-2 és completament dependent de l'activitat de la MAPK p38, suggerint que sindecà-2 podria dur a terme o contribuir en alguna de les funcions controlades per aquesta cinasa. Contràriament al sindecà-2, el sindecà-4 només és parcialment reprimat per inhibidors de p38 i ERK. Les activitats d'ERK i p38 també són necessàries per l'activació d'un *enhancer* de sindecà-1 en queratinòcits durant la reparació tissular (Jaakkola et al., 1998). Tanmateix, la via de senyalització de la MAPK p38, no és necessària per l'activació del mateix *enhancer* de sindecà-1 en fibroblasts, indicant que vies de senyalització alternatives convergeixen en el mateix promotor (Pursiheimo et al., 2002). La p38 controla l'activitat de diversos factors de transcripció en cèl·lules T (Dodeller et al., 2005). Calen encara, però, estudis d'unió al DNA per identificar els factors de transcripció activats per p38 que controlen el promotor de sindecà-2.



#### **V.4. Estudi de la senyalització induïda per sindecà-2**

En el present treball s'ha estudiat el possible paper de sindecà-2 en algunes vies de senyalització intracel·lular. S'ha demostrat que sindecà-2 modifica el patró d'activació d'ERK1/2 de manera molt lleugera ja que en algun donant s'ha detectat una fosforilació una mica més prolongada en el temps d'aquesta proteïna quan s'estava entrecreuant sindecà-2. En altres donants, però, aquest canvi ha estat molt subtil, poc apreciable. No s'han observat diferències en el patró de tirosines fosforilades al entrecreuar sindecà-2 amb un anticòs, amb l'excepció d'una banda d'uns 60KDa que es fosforila en tirosines i que curiosament és reconeguda també per l'anticòs contra ERK1/2 fosforilada, és a dir, comparteix el motiu de fosforilació amb ERK1/2. Aquesta proteïna que es fosforila únicament per acció del sindecà-2 presumptament és ERK5.

L'estudi en Jurkat mostra que l'entrecreuament amb l'anticòs SD2.1.186.CL.C genera també la mateixa banda fosforilada de 60KDa d'ERK5, de la mateixa manera que succeeix en limfòcits T. Però en aquesta línia cel·lular també s'ha estudiat l'acció de l'anticòs SD2.1.51.CL.C, que, en canvi, genera bandes fosforilades d'ERK5 de major pes molecular. S'evidencia doncs, un rol diferent dels dos anticossos anti-sindecà-2. El fet de relacionar aquests resultats amb els observats en la Fig.IV.18, on es veu una menor inhibició de IL-2 per part de l'anticòs SD2.1.51.CL.C, suggereix que la fosforilació diferencial de les isoformes d'ERK5 per part dels dos anticossos podria actuar de diferents maneres vers la inhibició de IL-2. Així, l'anticòs SD2.1.186.CL.C genera la fosforilació d'una forma d'ERK5 majoritària de 60KDa i l'efecte d'aquest anticòs és un fort bloqueig de la producció de IL-2, i en canvi, l'anticòs SD2.1.51.CL.C genera la fosforilació d'isoformes d'ERK5 de més alt pes molecular i només produeix una inhibició parcial de la producció de IL-2.

S'ha descrit que anticossos anti-CD3 indueixen la fosforilació de ERK5 en Thr218 i Tyr220 i que aquesta fosforilació és lleugerament augmentada per la coestimulació de CD28 (Garaude et al., 2005). De manera similar, la lligació del TCR també activa fortament ERK1/2 (Su et al., 1994). A més a més, la família de factors de transcripció MEF2 és el major substrat nuclear d'ERK5 i p38 (Barsyte-Lovejoy et al., 2004). L'activació selectiva d'ERK5 no és capaç d'activar CD69, un marcador de l'activació T. Però, per altra banda, ERK5 modula el promotor de IL-2 en condicions de repòs i

d'estimulació (Garaude et al., 2005). Hi ha tres factors de transcripció induïbles que són essencials per l'activació de IL-2: NFAT, AP-1 i NF- $\kappa$ B. Encara cal estudiar, però, el rol de sindecà-2 i també d'ERK5 en l'activació d'aquests factors de transcripció. En els experiments més recents d'aquesta tesi s'ha demostrat la relació funcional d'ERK5 amb IL-2 ja que al inhibir ERK5 en cèl·lules Jurkat que sobreexpressen sindecà-2 (on IL-2 està bloquejada després de l'activació T) es recupera parcialment la producció de IL-2.

Els resultats obtinguts poden fer pensar que la isoforma de 60KDa fosforilada que apareix per lligació de sindecà-2 amb l'anticòs SD2.1.186.CL.C és la mateixa que la isoforma truncada d'ERK5 de ratolí descrita en (McCaw et al., 2005). De ser així, tal i com s'exposa en l'article, la isoforma truncada d'ERK5 actua com a inhibidor de la funció d'ERK5 ja que és capaç de formar heterodímers amb la forma salvatge d'ERK5 impedit la seva translocació al nucli. El fet d'inhibir la funció d'ERK5 podria explicar la baixada de l'expressió de IL-2 i també l'aturada del cicle cel·lular ja que s'ha demostrat que ERK5 activa l'expressió de la ciclina D1 que té un paper central en el cicle cel·lular (Mulloy et al., 2003).

Però en cèl·lules Jurkat que sobreexpressen sindecà-2, al introduir shRNAs d'ERK5 i per tant disminuir ERK5 veiem una recuperació en la producció de IL-2. Si assumim que aquesta isoforma d'ERK5 és equivalent a la descrita en ratolí, aquesta aparent paradoxa es pot explicar ja que és possible que els shRNAs d'ERK5 que s'introdueixen estiguin bloquejant la isoforma truncada d'ERK5 també, que al ser majoritària pot ser bloquejada més fàcilment, la qual cosa comportaria l'activació indirecta de la forma salvatge d'ERK5 i per tant activaria la producció de IL-2.

Però per confirmar aquesta hipòtesi caldria investigar com és aquesta isoforma fosforilada d'ERK5 i quines funcions desencadena.

El que sí es pot concloure amb els resultats exposats és que l'expressió i entrecreuament de sindecà-2 amb SD2.1.186.CL.C en cèl·lules T CD4<sup>+</sup> activades i en Jurkat activades, genera la fosforilació d'una isoforma d'uns 60KDa d'ERK5 que comporta una inhibició de l'expressió de IL-2. I que el fet de disminuir l'expressió d'ERK5 amb l'ús de shRNAs redueix aquesta inhibició i com a resultats s'observa una recuperació de l'expressió de IL-2.

## **VI. CONCLUSIONS**



## VI. CONCLUSIONS

1. Sindecà-2 i sindecà-4 s'expressen en limfòcits T CD4<sup>+</sup> humans activats tant a nivell d'mRNA com a nivell de proteïna essent l'expressió de sindecà-4 més notable i més duradora. Sindecà-2 presenta un màxim d'expressió a dia 3 ó 4 d'activació T per després reduir-se. L'expressió de sindecà-2 s'observa a nivell de membrana i a nivell intracel·lular.
2. L'activació de les cèl·lules T comporta l'aparició de formes glicosilades de sindecà-2 i -4. Ambdós sindecans són induïts tant en cèl·lules T CD4<sup>+</sup> verges com en memòria durant l'activació.
3. Sindecà-2 i -4 inhibeixen la proliferació de la cèl·lula T activada. Ambdós requereixen estar entrecruats per dur a terme aquesta acció inhibidora. Sindecà-2 i -4 també inhibeixen la producció de TNF en la cèl·lula T activada.
4. En cèl·lules Jurkat, la sobreexpressió de sindecà-2 fa que la població es vagi perdent al llarg del temps (aquesta pèrdua no es deu a un increment de l'apoptosi) i inhibeix la producció de IL-2 i parcialment de TNF.
5. La lligació de Sindecà-2 amb anticossos atura el cicle cel·lular en cèl·lules T CD4<sup>+</sup> activades i inhibeix la producció de IL-2, IL-10, TNF i TGFβ. Així doncs, sindecà-2 sembla tenir un paper inhibidor en l'activació de la cèl·lula T.
6. La inhibició de la MAPK p38 en limfòcits T CD4 activats, bloqueja l'expressió de sindecà-2 i parcialment la de sindecà-4.
7. La lligació de Sindecà-2 amb anticossos indueix la fosforilació d'una proteïna que té el mateix motiu de fosforilació que ERK1/2 en T CD4<sup>+</sup> i en Jurkat. Una isoforma d'ERK5 és la major candidata a ser aquesta proteïna.
8. El bloqueig de ERK5 amb shRNAs indueix parcialment la recuperació de IL-2 inhibida per la sobreexpressió de sindecà-2 en Jurkat.

## *Conclusions*

9. Els anticossos monoclonals SD2.1.186.CL.C i SD2.1.51.CL.C no tenen exactament el mateix efecte sobre sindecà-2. Ambdós anticossos indueixen la fosforilació d'isoformes diferents d'ERK5 i impliquen diferents graus d'inhibició de IL-2.

## **VII. BIBLIOGRAFIA**





## VII. BIBLIOGRAFIA

- Abbas A. K., Litchman, Andrew H., Pillai, Shiv. (2007) *Cellular and molecular immunology*. 6/E, Philadelphia.
- Abe J., Kusuhara M., Ulevitch R. J., Berk B. C. and Lee J. D. (1996) Big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) is a redox-sensitive kinase. *J Biol Chem* **271**, 16586-90.
- Ades E. W., Candal F. J., Swerlick R. A., George V. G., Summers S., Bosse D. C. and Lawley T. J. (1992) HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *J Invest Dermatol* **99**, 683-90.
- Akbar A. N., Terry L., Timms A., Beverley P. C. and Janossy G. (1988) Loss of CD45R and gain of UCHL1 reactivity is a feature of primed T cells. *J Immunol* **140**, 2171-8.
- Alexander C. M., Reichsman F., Hinkes M. T., Lincecum J., Becker K. A., Cumberledge S. and Bernfield M. (2000) Syndecan-1 is required for Wnt-1-induced mammary tumorigenesis in mice. *Nat Genet* **25**, 329-32.
- Ananieva O., Macdonald A., Wang X., McCoy C. E., McIlrath J., Tournier C. and Arthur J. S. (2008) ERK5 regulation in naive T-cell activation and survival. *Eur J Immunol* **38**, 2534-47.
- Arribas J. and Borroto A. (2002) Protein ectodomain shedding. *Chem Rev* **102**, 4627-38.
- Asundi V. K., Erdman R., Stahl R. C. and Carey D. J. (2003) Matrix metalloproteinase-dependent shedding of syndecan-3, a transmembrane heparan sulfate proteoglycan, in Schwann cells. *J Neurosci Res* **73**, 593-602.
- Au-Yeung B. B., Deindl S., Hsu L. Y., Palacios E. H., Levin S. E., Kuriyan J. and Weiss A. (2009) The structure, regulation, and function of ZAP-70. *Immunol Rev* **228**, 41-57.
- Bandyopadhyay S., Soto-Nieves N. and Macian F. (2007) Transcriptional regulation of T cell tolerance. *Semin Immunol* **19**, 180-7.
- Barsyte-Lovejoy D., Galanis A., Clancy A. and Sharrocks A. D. (2004) ERK5 is targeted to myocyte enhancer factor 2A (MEF2A) through a MAPK docking motif. *Biochem J* **381**, 693-9.
- Bartlett A. H., Hayashida K. and Park P. W. (2007) Molecular and cellular mechanisms of syndecans in tissue injury and inflammation. *Mol Cells* **24**, 153-66.
- Beauvais D. M., Burbach B. J. and Rapraeger A. C. (2004) The syndecan-1 ectodomain regulates alphavbeta3 integrin activity in human mammary carcinoma cells. *J Cell Biol* **167**, 171-81.
- Beauvais D. M. and Rapraeger A. C. (2004) Syndecans in tumor cell adhesion and signaling. *Reprod Biol Endocrinol* **2**, 3.
- Behrens A., Jochum W., Sibilina M. and Wagner E. F. (2000) Oncogenic transformation by ras and fos is mediated by c-Jun N-terminal phosphorylation. *Oncogene* **19**, 2657-63.
- Behrens A., Sibilina M. and Wagner E. F. (1999) Amino-terminal phosphorylation of c-Jun regulates stress-induced apoptosis and cellular proliferation. *Nat Genet* **21**, 326-9.
- Beiting D. P., Park P. W. and Appleton J. A. (2006) Synthesis of syndecan-1 by skeletal muscle cells is an early response to infection with *Trichinella spiralis* but is not essential for nurse cell development. *Infect Immun* **74**, 1941-3.

- Ben-Levy R., Hooper S., Wilson R., Paterson H. F. and Marshall C. J. (1998) Nuclear export of the stress-activated protein kinase p38 mediated by its substrate MAPKAP kinase-2. *Curr Biol* **8**, 1049-57.
- Bernfield M., Gotte M., Park P. W., Reizes O., Fitzgerald M. L., Lincecum J. and Zako M. (1999) Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem* **68**, 729-77.
- Bernfield M., Kokenyesi R., Kato M., Hinkes M. T., Spring J., Gallo R. L. and Lose E. J. (1992) Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Cell Biol* **8**, 365-93.
- Berridge M. J. and Irvine R. F. (1984) Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* **312**, 315-21.
- Bischof D., Elswa S. F., Mantchev G., Yoon J., Michels G. E., Nilson A., Sutor S. L., Platt J. L., Ansell S. M., von Bulow G. and Bram R. J. (2006) Selective activation of TAC1 by syndecan-2. *Blood* **107**, 3235-42.
- Blackman M. A., Burgert H. G., Woodland D. L., Palmer E., Kappler J. W. and Marrack P. (1990) A role for clonal inactivation in T cell tolerance to Mls-1a. *Nature* **345**, 540-2.
- Blobel C. P. (2002) Functional and biochemical characterization of ADAMs and their predicted role in protein ectodomain shedding. *Inflamm Res* **51**, 83-4.
- Bobardt M. D., Saphire A. C., Hung H. C., Yu X., Van der Schueren B., Zhang Z., David G. and Gallay P. A. (2003) Syndecan captures, protects, and transmits HIV to T lymphocytes. *Immunity* **18**, 27-39.
- Bogoyevitch M. A. and Kobe B. (2006) Uses for JNK: the many and varied substrates of the c-Jun N-terminal kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**, 1061-95.
- Bourdon M. A. and Ruoslahti E. (1989) Tenascin mediates cell attachment through an RGD-dependent receptor. *J Cell Biol* **108**, 1149-55.
- Boussiotis V. A., Barber D. L., Nakarai T., Freeman G. J., Gribben J. G., Bernstein G. M., D'Andrea A. D., Ritz J. and Nadler L. M. (1994) Prevention of T cell anergy by signaling through the gamma c chain of the IL-2 receptor. *Science* **266**, 1039-42.
- Brewster J. L., de Valoir T., Dwyer N. D., Winter E. and Gustin M. C. (1993) An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science* **259**, 1760-3.
- Brockstedt U., Dobra K., Nurminen M. and Hjerpe A. (2002) Immunoreactivity to cell surface syndecans in cytoplasm and nucleus: tubulin-dependent rearrangements. *Exp Cell Res* **274**, 235-45.
- Calnan B. J., Szychowski S., Chan F. K., Cado D. and Winoto A. (1995) A role for the orphan steroid receptor Nur77 in apoptosis accompanying antigen-induced negative selection. *Immunity* **3**, 273-82.
- Call M. E. and Wucherpfennig K. W. (2005) The T cell receptor: critical role of the membrane environment in receptor assembly and function. *Annu Rev Immunol* **23**, 101-25.
- Carey D. J. (1997) Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors. *Biochem J* **327** (Pt 1), 1-16.
- Casaroli-Marano R. P., Pagan R. and Vilaro S. (1999) Epithelial-mesenchymal transition in proliferative vitreoretinopathy: intermediate filament protein expression in retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **40**, 2062-72.
- Castel S., Pagan R., Garcia R., Casaroli-Marano R. P., Reina M., Mitjans F., Piulats J. and Vilaro S. (2000) Alpha v integrin antagonists induce the disassembly of focal contacts in melanoma cells. *Eur J Cell Biol* **79**, 502-12.

- Cizmeci-Smith G., Langan E., Youkey J., Showalter L. J. and Carey D. J. (1997) Syndecan-4 is a primary-response gene induced by basic fibroblast growth factor and arterial injury in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**, 172-80.
- Clasper S., Vekemans S., Fiore M., Plebanski M., Wordsworth P., David G. and Jackson D. G. (1999) Inducible expression of the cell surface heparan sulfate proteoglycan syndecan-2 (fibroglycan) on human activated macrophages can regulate fibroblast growth factor action. *J Biol Chem* **274**, 24113-23.
- Contreras H. R., Fabre M., Granes F., Casaroli-Marano R., Rocamora N., Herreros A. G., Reina M. and Vilaro S. (2001) Syndecan-2 expression in colorectal cancer-derived HT-29 M6 epithelial cells induces a migratory phenotype. *Biochem Biophys Res Commun* **286**, 742-51.
- Cook R., Wu C. C., Kang Y. J. and Han J. (2007) The role of the p38 pathway in adaptive immunity. *Cell Mol Immunol* **4**, 253-9.
- Corthay A. (2009) How do regulatory T cells work? *Scand J Immunol* **70**, 326-36.
- Couchman J. R. (2003) Syndecans: proteoglycan regulators of cell-surface microdomains? *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 926-37.
- Couchman J. R., Chen L. and Woods A. (2001) Syndecans and cell adhesion. *Int Rev Cytol* **207**, 113-50.
- Coulombe P. and Meloche S. (2007) Atypical mitogen-activated protein kinases: structure, regulation and functions. *Biochim Biophys Acta* **1773**, 1376-87.
- Croft M. (2009) The role of TNF superfamily members in T-cell function and diseases. *Nat Rev Immunol* **9**, 271-85.
- Cuenda A., Rouse J., Doza Y. N., Meier R., Cohen P., Gallagher T. F., Young P. R. and Lee J. C. (1995) SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1. *FEBS Lett* **364**, 229-33.
- Chacko G. W., Duchemin A. M., Coggeshall K. M., Osborne J. M., Brandt J. T. and Anderson C. L. (1994) Clustering of the platelet Fc gamma receptor induces noncovalent association with the tyrosine kinase p72syk. *J Biol Chem* **269**, 32435-40.
- Chakravarti R. and Adams J. C. (2006) Comparative genomics of the syndecans defines an ancestral genomic context associated with matrilins in vertebrates. *BMC Genomics* **7**, 83.
- Chan A. C. and Shaw A. S. (1996) Regulation of antigen receptor signal transduction by protein tyrosine kinases. *Curr Opin Immunol* **8**, 394-401.
- Chen E., Hermanson S. and Ekker S. C. (2004a) Syndecan-2 is essential for angiogenic sprouting during zebrafish development. *Blood* **103**, 1710-9.
- Chen L., Klass C. and Woods A. (2004b) Syndecan-2 regulates transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem* **279**, 15715-8.
- Chen R. H., Sarnecki C. and Blenis J. (1992) Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases. *Mol Cell Biol* **12**, 915-27.
- Chung J. S., Bonkobara M., Tomihari M., Cruz P. D., Jr. and Ariizumi K. (2009) The DC-HIL/syndecan-4 pathway inhibits human allogeneic T-cell responses. *Eur J Immunol* **39**, 965-74.
- Chung J. S., Dougherty I., Cruz P. D., Jr. and Ariizumi K. (2007a) Syndecan-4 mediates the coinhibitory function of DC-HIL on T cell activation. *J Immunol* **179**, 5778-84.
- Chung J. S., Sato K., Dougherty, II, Cruz P. D., Jr. and Ariizumi K. (2007b) DC-HIL is a negative regulator of T lymphocyte activation. *Blood* **109**, 4320-7.

- David G. (1993) Integral membrane heparan sulfate proteoglycans. *Faseb J* **7**, 1023-30.
- Dobra K., Nurminen M. and Hjerpe A. (2003) Growth factors regulate the expression profile of their syndecan co-receptors and the differentiation of mesothelioma cells. *Anticancer Res* **23**, 2435-44.
- Dodeller F. and Schulze-Koops H. (2006) The p38 mitogen-activated protein kinase signaling cascade in CD4 T cells. *Arthritis Res Ther* **8**, 205.
- Dodeller F., Skapenko A., Kalden J. R., Lipsky P. E. and Schulze-Koops H. (2005) The p38 mitogen-activated protein kinase regulates effector functions of primary human CD4 T cells. *Eur J Immunol* **35**, 3631-42.
- Dong C., Davis R. J. and Flavell R. A. (2002) MAP kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol* **20**, 55-72.
- Dudley D. T., Pang L., Decker S. J., Bridges A. J. and Saltiel A. R. (1995) A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 7686-9.
- Echtermeyer F., Streit M., Wilcox-Adelman S., Saoncella S., Denhez F., Detmar M. and Goetinck P. (2001) Delayed wound repair and impaired angiogenesis in mice lacking syndecan-4. *J Clin Invest* **107**, R9-R14.
- Elenius V., Gotte M., Reizes O., Elenius K. and Bernfield M. (2004) Inhibition by the soluble syndecan-1 ectodomains delays wound repair in mice overexpressing syndecan-1. *J Biol Chem* **279**, 41928-35.
- Erhardt P., Schremser E. J. and Cooper G. M. (1999) B-Raf inhibits programmed cell death downstream of cytochrome c release from mitochondria by activating the MEK/Erk pathway. *Mol Cell Biol* **19**, 5308-15.
- Esko J. D. and Lindahl U. (2001) Molecular diversity of heparan sulfate. *J Clin Invest* **108**, 169-73.
- Esko J. D. and Zhang L. (1996) Influence of core protein sequence on glycosaminoglycan assembly. *Curr Opin Struct Biol* **6**, 663-70.
- Essner J. J., Chen E. and Ekker S. C. (2006) Syndecan-2. *Int J Biochem Cell Biol* **38**, 152-6.
- Ethell I. M., Hagihara K., Miura Y., Irie F. and Yamaguchi Y. (2000) Synbindin, A novel syndecan-2-binding protein in neuronal dendritic spines. *J Cell Biol* **151**, 53-68.
- Ethell I. M., Irie F., Kalo M. S., Couchman J. R., Pasquale E. B. and Yamaguchi Y. (2001) EphB/syndecan-2 signaling in dendritic spine morphogenesis. *Neuron* **31**, 1001-13.
- Ethell I. M. and Yamaguchi Y. (1999) Cell surface heparan sulfate proteoglycan syndecan-2 induces the maturation of dendritic spines in rat hippocampal neurons. *J Cell Biol* **144**, 575-86.
- Fears C. Y., Gladson C. L. and Woods A. (2006) Syndecan-2 is expressed in the microvasculature of gliomas and regulates angiogenic processes in microvascular endothelial cells. *J Biol Chem* **281**, 14533-6.
- Fernandez-Borja M., Bellido D., Makiya R., David G., Olivecrona G., Reina M. and Vilaro S. (1995) Actin cytoskeleton of fibroblasts organizes surface proteoglycans that bind basic fibroblast growth factor and lipoprotein lipase. *Cell Motil Cytoskeleton* **30**, 89-107.
- Fitzgerald M. L., Wang Z., Park P. W., Murphy G. and Bernfield M. (2000) Shedding of syndecan-1 and -4 ectodomains is regulated by multiple signaling pathways and mediated by a TIMP-3-sensitive metalloproteinase. *J Cell Biol* **148**, 811-24.

- Freissler E., Meyer auf der Heyde A., David G., Meyer T. F. and Dehio C. (2000) Syndecan-1 and syndecan-4 can mediate the invasion of OpaHSPG-expressing *Neisseria gonorrhoeae* into epithelial cells. *Cell Microbiol* **2**, 69-82.
- Freshney N. W., Rawlinson L., Guesdon F., Jones E., Cowley S., Hsuan J. and Saklatvala J. (1994) Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. *Cell* **78**, 1039-49.
- Fuentealba L., Carey D. J. and Brandan E. (1999) Antisense inhibition of syndecan-3 expression during skeletal muscle differentiation accelerates myogenesis through a basic fibroblast growth factor-dependent mechanism. *J Biol Chem* **274**, 37876-84.
- Gallay P. (2004) Syndecans and HIV-1 pathogenesis. *Microbes Infect* **6**, 617-22.
- Gallo R., Kim C., Kokenyesi R., Adzick N. S. and Bernfield M. (1996) Syndecans-1 and -4 are induced during wound repair of neonatal but not fetal skin. *J Invest Dermatol* **107**, 676-83.
- Gao Y., Li M., Chen W. and Simons M. (2000) Synectin, syndecan-4 cytoplasmic domain binding PDZ protein, inhibits cell migration. *J Cell Physiol* **184**, 373-9.
- Garaude J., Cherni S., Kaminski S., Delepine E., Chable-Bessia C., Benkirane M., Borges J., Pandiella A., Iniguez M. A., Fresno M., Hipskind R. A. and Villalba M. (2006) ERK5 activates NF-kappaB in leukemic T cells and is essential for their growth in vivo. *J Immunol* **177**, 7607-17.
- Garaude J., Kaminski S., Cherni S., Hipskind R. A. and Villalba M. (2005) The role of ERK5 in T-cell signalling. *Scand J Immunol* **62**, 515-20.
- Garton K. J., Gough P. J. and Raines E. W. (2006) Emerging roles for ectodomain shedding in the regulation of inflammatory responses. *J Leukoc Biol* **79**, 1105-16.
- Geary R. L., Koyama N., Wang T. W., Vergel S. and Clowes A. W. (1995) Failure of heparin to inhibit intimal hyperplasia in injured baboon arteries. The role of heparin-sensitive and -insensitive pathways in the stimulation of smooth muscle cell migration and proliferation. *Circulation* **91**, 2972-81.
- Gerety S. S., Wang H. U., Chen Z. F. and Anderson D. J. (1999) Symmetrical mutant phenotypes of the receptor EphB4 and its specific transmembrane ligand ephrin-B2 in cardiovascular development. *Mol Cell* **4**, 403-14.
- Gilsbach R., Kouta M., Bonisch H. and Bruss M. (2006) Comparison of in vitro and in vivo reference genes for internal standardization of real-time PCR data. *Biotechniques* **40**, 173-7.
- Gilley R., March H. N. and Cook S. J. (2009) ERK1/2, but not ERK5, is necessary and sufficient for phosphorylation and activation of c-Fos. *Cell Signal* **21**, 969-77.
- Giuffre L., Cordey A. S., Monai N., Tardy Y., Schapira M. and Spertini O. (1997) Monocyte adhesion to activated aortic endothelium: role of L-selectin and heparan sulfate proteoglycans. *J Cell Biol* **136**, 945-56.
- Gomez-Rodriguez J., Readinger J. A., Viorritto I. C., Mueller K. L., Houghtling R. A. and Schwartzberg P. L. (2007) Tec kinases, actin, and cell adhesion. *Immunol Rev* **218**, 45-64.
- Gotte M. (2003) Syndecans in inflammation. *Faseb J* **17**, 575-91.
- Gotte M., Jousseaume A. M., Klein C., Andre P., Wagner D. D., Hinkes M. T., Kirchhof B., Adamis A. P. and Bernfield M. (2002) Role of syndecan-1 in leukocyte-endothelial interactions in the ocular vasculature. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**, 1135-41.

- Granes F., Berndt C., Roy C., Mangeat P., Reina M. and Vilaro S. (2003) Identification of a novel Ezrin-binding site in syndecan-2 cytoplasmic domain. *FEBS Lett* **547**, 212-6.
- Granes F., Garcia R., Casaroli-Marano R. P., Castel S., Rocamora N., Reina M., Urena J. M. and Vilaro S. (1999) Syndecan-2 induces filopodia by active cdc42Hs. *Exp Cell Res* **248**, 439-56.
- Granes F., Urena J. M., Rocamora N. and Vilaro S. (2000) Ezrin links syndecan-2 to the cytoskeleton. *J Cell Sci* **113 ( Pt 7)**, 1267-76.
- Greenwald R. J., Freeman G. J. and Sharpe A. H. (2005) The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol* **23**, 515-48.
- Gulyas M. and Hjerpe A. (2003) Proteoglycans and WT1 as markers for distinguishing adenocarcinoma, epithelioid mesothelioma, and benign mesothelium. *J Pathol* **199**, 479-87.
- Halden Y., Rek A., Atzenhofer W., Szilak L., Wabnig A. and Kungl A. J. (2004) Interleukin-8 binds to syndecan-2 on human endothelial cells. *Biochem J* **377**, 533-8.
- Han I., Park H. and Oh E. S. (2004) New insights into syndecan-2 expression and tumourigenic activity in colon carcinoma cells. *J Mol Histol* **35**, 319-26.
- Han J., Lee J. D., Bibbs L. and Ulevitch R. J. (1994) A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* **265**, 808-11.
- Han Z., Boyle D. L., Chang L., Bennett B., Karin M., Yang L., Manning A. M. and Firestein G. S. (2001) c-Jun N-terminal kinase is required for metalloproteinase expression and joint destruction in inflammatory arthritis. *J Clin Invest* **108**, 73-81.
- Handel T. M., Johnson Z., Crown S. E., Lau E. K. and Proudfoot A. E. (2005) Regulation of protein function by glycosaminoglycans--as exemplified by chemokines. *Annu Rev Biochem* **74**, 385-410.
- Harada K., Masuda S., Hirano M. and Nakanuma Y. (2003) Reduced expression of syndecan-1 correlates with histologic dedifferentiation, lymph node metastasis, and poor prognosis in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hum Pathol* **34**, 857-63.
- Heissmeyer V., Macian F., Varma R., Im S. H., Garcia-Cozar F., Horton H. F., Byrne M. C., Feske S., Venuprasad K., Gu H., Liu Y. C., Dustin M. L. and Rao A. (2005) A molecular dissection of lymphocyte unresponsiveness induced by sustained calcium signalling. *Novartis Found Symp* **267**, 165-74; discussion 174-9.
- Heldin C. H. (1995) Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* **80**, 213-23.
- Hoogewerf A. J., Kuschert G. S., Proudfoot A. E., Borlat F., Clark-Lewis I., Power C. A. and Wells T. N. (1997) Glycosaminoglycans mediate cell surface oligomerization of chemokines. *Biochemistry* **36**, 13570-8.
- Horowitz A. and Simons M. (1998) Phosphorylation of the cytoplasmic tail of syndecan-4 regulates activation of protein kinase Calpha. *J Biol Chem* **273**, 25548-51.
- Horowitz A., Tkachenko E. and Simons M. (2002) Fibroblast growth factor-specific modulation of cellular response by syndecan-4. *J Cell Biol* **157**, 715-25.
- Hoyer K. K., Dooms H., Barron L. and Abbas A. K. (2008) Interleukin-2 in the development and control of inflammatory disease. *Immunol Rev* **226**, 19-28.
- Ingold K., Zumsteg A., Tardivel A., Huard B., Steiner Q. G., Cachero T. G., Qiang F., Gorelik L., Kalled S. L., Acha-Orbea H., Rennert P. D., Tschopp J. and

- Schneider P. (2005) Identification of proteoglycans as the APRIL-specific binding partners. *J Exp Med* **201**, 1375-83.
- Iozzo R. V. (1998) Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem* **67**, 609-52.
- Iozzo R. V. (2000) *Proteoglycans: structure, biology and molecular interactions.*, New York, USA.
- Iozzo R. V. (2001) Heparan sulfate proteoglycans: intricate molecules with intriguing functions. *J Clin Invest* **108**, 165-7.
- Iozzo R. V. and San Antonio J. D. (2001) Heparan sulfate proteoglycans: heavy hitters in the angiogenesis arena. *J Clin Invest* **108**, 349-55.
- Irie F. and Yamaguchi Y. (2004) EPHB receptor signaling in dendritic spine development. *Front Biosci* **9**, 1365-73.
- Ishiguro K., Kadomatsu K., Kojima T., Muramatsu H., Iwase M., Yoshikai Y., Yanada M., Yamamoto K., Matsushita T., Nishimura M., Kusugami K., Saito H. and Muramatsu T. (2001) Syndecan-4 deficiency leads to high mortality of lipopolysaccharide-injected mice. *J Biol Chem* **276**, 47483-8.
- Ishiguro K., Kadomatsu K., Kojima T., Muramatsu H., Nakamura E., Ito M., Nagasaka T., Kobayashi H., Kusugami K., Saito H. and Muramatsu T. (2000) Syndecan-4 deficiency impairs the fetal vessels in the placental labyrinth. *Dev Dyn* **219**, 539-44.
- Ishiguro K., Kojima T. and Muramatsu T. (2002) Syndecan-4 as a molecule involved in defense mechanisms. *Glycoconj J* **19**, 315-8.
- Jaakkola P., Kontusaari S., Kauppi T., Maata A. and Jalkanen M. (1998) Wound reepithelialization activates a growth factor-responsive enhancer in migrating keratinocytes. *Faseb J* **12**, 959-69.
- Jalkanen M., Rapraeger A., Saunders S. and Bernfield M. (1987) Cell surface proteoglycan of mouse mammary epithelial cells is shed by cleavage of its matrix-binding ectodomain from its membrane-associated domain. *J Cell Biol* **105**, 3087-96.
- Jameson S. C., Hogquist K. A. and Bevan M. J. (1995) Positive selection of thymocytes. *Annu Rev Immunol* **13**, 93-126.
- Janeway C. A., et al. (2002) *Immunobiology: the immune system in health and disease.* Garland Pub.
- Johnson Z., Kosco-Vilbois M. H., Herren S., Cirillo R., Muzio V., Zarin P., Carbonatto M., Mack M., Smailbegovic A., Rose M., Lever R., Page C., Wells T. N. and Proudfoot A. E. (2004) Interference with heparin binding and oligomerization creates a novel anti-inflammatory strategy targeting the chemokine system. *J Immunol* **173**, 5776-85.
- Jones K. S., Fugo K., Petrow-Sadowski C., Huang Y., Bertolette D. C., Lisinski I., Cushman S. W., Jacobson S. and Ruscetti F. W. (2006) Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2 use different receptor complexes to enter T cells. *J Virol* **80**, 8291-302.
- Jones K. S., Petrow-Sadowski C., Bertolette D. C., Huang Y. and Ruscetti F. W. (2005) Heparan sulfate proteoglycans mediate attachment and entry of human T-cell leukemia virus type 1 virions into CD4+ T cells. *J Virol* **79**, 12692-702.
- Jordan M. S., Singer A. L. and Koretzky G. A. (2003) Adaptors as central mediators of signal transduction in immune cells. *Nat Immunol* **4**, 110-6.
- Kanda H. and Miura M. (2004) Regulatory roles of JNK in programmed cell death. *J Biochem* **136**, 1-6.

- Kaneider N. C., Egger P., Dunzendorfer S. and Wiedermann C. J. (2001) Syndecan-4 as antithrombin receptor of human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* **287**, 42-6.
- Kaneider N. C., Reinisch C. M., Dunzendorfer S., Romisch J. and Wiedermann C. J. (2002) Syndecan-4 mediates antithrombin-induced chemotaxis of human peripheral blood lymphocytes and monocytes. *J Cell Sci* **115**, 227-36.
- Kappler J. W., Roehm N. and Marrack P. (1987) T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell* **49**, 273-80.
- Kasler H. G., Victoria J., Duramad O. and Winoto A. (2000) ERK5 is a novel type of mitogen-activated protein kinase containing a transcriptional activation domain. *Mol Cell Biol* **20**, 8382-9.
- Kato M., Wang H., Kainulainen V., Fitzgerald M. L., Ledbetter S., Ornitz D. M. and Bernfield M. (1998a) Physiological degradation converts the soluble syndecan-1 ectodomain from an inhibitor to a potent activator of FGF-2. *Nat Med* **4**, 691-7.
- Kato Y., Tapping R. I., Huang S., Watson M. H., Ulevitch R. J. and Lee J. D. (1998b) Bmk1/Erk5 is required for cell proliferation induced by epidermal growth factor. *Nature* **395**, 713-6.
- Kemp B. E. and Pearson R. B. (1990) Protein kinase recognition sequence motifs. *Trends Biochem Sci* **15**, 342-6.
- Kim C. W., Goldberger O. A., Gallo R. L. and Bernfield M. (1994) Members of the syndecan family of heparan sulfate proteoglycans are expressed in distinct cell-, tissue-, and development-specific patterns. *Mol Biol Cell* **5**, 797-805.
- Kim Y., Park H., Lim Y., Han I., Kwon H. J., Woods A. and Oh E. S. (2003) Decreased syndecan-2 expression correlates with trichostatin-A induced-morphological changes and reduced tumorigenic activity in colon carcinoma cells. *Oncogene* **22**, 826-30.
- Klass C. M., Couchman J. R. and Woods A. (2000) Control of extracellular matrix assembly by syndecan-2 proteoglycan. *J Cell Sci* **113 ( Pt 3)**, 493-506.
- Klemm J. D., Schreiber S. L. and Crabtree G. R. (1998) Dimerization as a regulatory mechanism in signal transduction. *Annu Rev Immunol* **16**, 569-92.
- Kohler G. and Milstein C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**, 495-7.
- Kokenyesi R. and Bernfield M. (1994) Core protein structure and sequence determine the site and presence of heparan sulfate and chondroitin sulfate on syndecan-1. *J Biol Chem* **269**, 12304-9.
- Kondoh K., Terasawa K., Morimoto H. and Nishida E. (2006) Regulation of nuclear translocation of extracellular signal-regulated kinase 5 by active nuclear import and export mechanisms. *Mol Cell Biol* **26**, 1679-90.
- Kramer K. L., Barnette J. E. and Yost H. J. (2002) PKCgamma regulates syndecan-2 inside-out signaling during xenopus left-right development. *Cell* **111**, 981-90.
- Kramer K. L. and Yost H. J. (2002) Ectodermal syndecan-2 mediates left-right axis formation in migrating mesoderm as a cell-nonautonomous Vg1 cofactor. *Dev Cell* **2**, 115-24.
- Kusano Y., Oguri K., Nagayasu Y., Munesue S., Ishihara M., Saiki I., Yonekura H., Yamamoto H. and Okayama M. (2000) Participation of syndecan 2 in the induction of stress fiber formation in cooperation with integrin alpha5beta1: structural characteristics of heparan sulfate chains with avidity to COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *Exp Cell Res* **256**, 434-44.
- Kuschert G. S., Coulin F., Power C. A., Proudfoot A. E., Hubbard R. E., Hoogewerf A. J. and Wells T. N. (1999) Glycosaminoglycans interact selectively with



- chemokines and modulate receptor binding and cellular responses. *Biochemistry* **38**, 12959-68.
- Lander A. D. and Selleck S. B. (2000) The elusive functions of proteoglycans: in vivo veritas. *J Cell Biol* **148**, 227-32.
- Landry R., Rioux V. and Bensadoun A. (2001) Characterization of syndecan-4 expression in 3T3-F442A mouse adipocytes: link between syndecan-4 induction and cell proliferation. *Cell Growth Differ* **12**, 497-504.
- Lenormand P., Sardet C., Pages G., L'Allemain G., Brunet A. and Pouyssegur J. (1993) Growth factors induce nuclear translocation of MAP kinases (p42mapk and p44mapk) but not of their activator MAP kinase kinase (p45mapkk) in fibroblasts. *J Cell Biol* **122**, 1079-88.
- Lenschow D. J., Walunas T. L. and Bluestone J. A. (1996) CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* **14**, 233-58.
- Leppa S. and Bohmann D. (1999) Diverse functions of JNK signaling and c-Jun in stress response and apoptosis. *Oncogene* **18**, 6158-62.
- Letourneur F. and Klausner R. D. (1992) Activation of T cells by a tyrosine kinase activation domain in the cytoplasmic tail of CD3 epsilon. *Science* **255**, 79-82.
- Lewis T. S., Shapiro P. S. and Ahn N. G. (1998) Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res* **74**, 49-139.
- Li J., Brown L. F., Laham R. J., Volk R. and Simons M. (1997) Macrophage-dependent regulation of syndecan gene expression. *Circ Res* **81**, 785-96.
- Li L. and Chaikof E. L. (2002) Mechanical stress regulates syndecan-4 expression and redistribution in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**, 61-8.
- Li Q., Park P. W., Wilson C. L. and Parks W. C. (2002) Matrilysin shedding of syndecan-1 regulates chemokine mobilization and transepithelial efflux of neutrophils in acute lung injury. *Cell* **111**, 635-46.
- Lindahl U., Kusche-Gullberg M. and Kjellen L. (1998) Regulated diversity of heparan sulfate. *J Biol Chem* **273**, 24979-82.
- Lipscombe R. J., Nakhoul A. M., Sanderson C. J. and Coombe D. R. (1998) Interleukin-5 binds to heparin/heparan sulfate. A model for an interaction with extracellular matrix. *J Leukoc Biol* **63**, 342-50.
- Liu J. and Lin A. (2005) Role of JNK activation in apoptosis: a double-edged sword. *Cell Res* **15**, 36-42.
- Lopes C. C., Dietrich C. P. and Nader H. B. (2006) Specific structural features of syndecans and heparan sulfate chains are needed for cell signaling. *Braz J Med Biol Res* **39**, 157-67.
- Lortat-Jacob H., Grosdidier A. and Imberty A. (2002) Structural diversity of heparan sulfate binding domains in chemokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 1229-34.
- Lowe J. B. (2002) Glycosylation in the control of selectin counter-receptor structure and function. *Immunol Rev* **186**, 19-36.
- Macian F. (2005) NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat Rev Immunol* **5**, 472-84.
- Macian F., Garcia-Cozar F., Im S. H., Horton H. F., Byrne M. C. and Rao A. (2002) Transcriptional mechanisms underlying lymphocyte tolerance. *Cell* **109**, 719-31.
- Macian F., Im S. H., Garcia-Cozar F. J. and Rao A. (2004) T-cell anergy. *Curr Opin Immunol* **16**, 209-16.
- Maday S., Anderson E., Chang H. C., Shorter J., Satoh A., Sfakianos J., Folsch H., Anderson J. M., Walther Z. and Mellman I. (2008) A PDZ-binding motif

- controls basolateral targeting of syndecan-1 along the biosynthetic pathway in polarized epithelial cells. *Traffic* **9**, 1915-24.
- Mali M., Elenius K., Miettinen H. M. and Jalkanen M. (1993) Inhibition of basic fibroblast growth factor-induced growth promotion by overexpression of syndecan-1. *J Biol Chem* **268**, 24215-22.
- Marshall L. J., Ramdin L. S., Brooks T., PC D. P. and Shute J. K. (2003) Plasminogen activator inhibitor-1 supports IL-8-mediated neutrophil transendothelial migration by inhibition of the constitutive shedding of endothelial IL-8/heparan sulfate/syndecan-1 complexes. *J Immunol* **171**, 2057-65.
- Martinho R. G., Castel S., Urena J., Fernandez-Borja M., Makiya R., Olivecrona G., Reina M., Alonso A. and Vilaro S. (1996) Ligand binding to heparan sulfate proteoglycans induces their aggregation and distribution along actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell* **7**, 1771-88.
- Marynen P., Zhang J., Cassiman J. J., Van den Berghe H. and David G. (1989) Partial primary structure of the 48- and 90-kilodalton core proteins of cell surface-associated heparan sulfate proteoglycans of lung fibroblasts. Prediction of an integral membrane domain and evidence for multiple distinct core proteins at the cell surface of human lung fibroblasts. *J Biol Chem* **264**, 7017-24.
- McCaw B. J., Chow S. Y., Wong E. S., Tan K. L., Guo H. and Guy G. R. (2005) Identification and characterization of mErk5-T, a novel Erk5/Bmk1 splice variant. *Gene* **345**, 183-90.
- McFall A. J. and Rapraeger A. C. (1997) Identification of an adhesion site within the syndecan-4 extracellular protein domain. *J Biol Chem* **272**, 12901-4.
- McQuade K. J., Beauvais D. M., Burbach B. J. and Rapraeger A. C. (2006) Syndecan-1 regulates alphavbeta5 integrin activity in B82L fibroblasts. *J Cell Sci* **119**, 2445-56.
- Merritt C., Enslen H., Diehl N., Conze D., Davis R. J. and Rincon M. (2000) Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in vivo selectively induces apoptosis of CD8(+) but not CD4(+) T cells. *Mol Cell Biol* **20**, 936-46.
- Mirza A. M., Gysin S., Malek N., Nakayama K., Roberts J. M. and McMahon M. (2004) Cooperative regulation of the cell division cycle by the protein kinases RAF and AKT. *Mol Cell Biol* **24**, 10868-81.
- Miyamoto S., Akiyama S. K. and Yamada K. M. (1995a) Synergistic roles for receptor occupancy and aggregation in integrin transmembrane function. *Science* **267**, 883-5.
- Miyamoto S., Teramoto H., Coso O. A., Gutkind J. S., Burbelo P. D., Akiyama S. K. and Yamada K. M. (1995b) Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules. *J Cell Biol* **131**, 791-805.
- Mizukami Y., Yoshioka K., Morimoto S. and Yoshida K. (1997) A novel mechanism of JNK1 activation. Nuclear translocation and activation of JNK1 during ischemia and reperfusion. *J Biol Chem* **272**, 16657-62.
- Modrowski D., Basle M., Lomri A. and Marie P. J. (2000) Syndecan-2 is involved in the mitogenic activity and signaling of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in osteoblasts. *J Biol Chem* **275**, 9178-85.
- Modrowski D., Orosco A., Thevenard J., Fromigue O. and Marie P. J. (2005) Syndecan-2 overexpression induces osteosarcoma cell apoptosis: Implication of syndecan-2 cytoplasmic domain and JNK signaling. *Bone* **37**, 180-9.
- Mondino A. and Mueller D. L. (2007) mTOR at the crossroads of T cell proliferation and tolerance. *Semin Immunol* **19**, 162-72.

- Montanez E., Casaroli-Marano R. P., Vilaro S. and Pagan R. (2002) Comparative study of tube assembly in three-dimensional collagen matrix and on Matrigel coats. *Angiogenesis* **5**, 167-72.
- Mosser D. M. and Zhang X. (2008) Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol Rev* **226**, 205-18.
- Muller W. A. (2003) Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunol* **24**, 327-34.
- Mulloy R., Salinas S., Philips A. and Hipskind R. A. (2003) Activation of cyclin D1 expression by the ERK5 cascade. *Oncogene* **22**, 5387-98.
- Murakami M., Horowitz A., Tang S., Ware J. A. and Simons M. (2002) Protein kinase C (PKC) delta regulates PKCalpha activity in a Syndecan-4-dependent manner. *J Biol Chem* **277**, 20367-71.
- Mustelin T., Coggeshall K. M., Isakov N. and Altman A. (1990) T cell antigen receptor-mediated activation of phospholipase C requires tyrosine phosphorylation. *Science* **247**, 1584-7.
- Nazarenko I., Lowe B., Darfler M., Ikononi P., Schuster D. and Rashtchian A. (2002) Multiplex quantitative PCR using self-quenched primers labeled with a single fluorophore. *Nucleic Acids Res* **30**, e37.
- Nishibe S., Wahl M. I., Hernandez-Sotomayor S. M., Tonks N. K., Rhee S. G. and Carpenter G. (1990) Increase of the catalytic activity of phospholipase C-gamma 1 by tyrosine phosphorylation. *Science* **250**, 1253-6.
- Nishimoto S. and Nishida E. (2006) MAPK signalling: ERK5 versus ERK1/2. *EMBO Rep* **7**, 782-6.
- Noguer O., Villena J., Lorita J., Vilaro S. and Reina M. (2009) Syndecan-2 downregulation impairs angiogenesis in human microvascular endothelial cells. *Exp Cell Res* **315**, 795-808.
- Norgard-Sumnicht K. E., Varki N. M. and Varki A. (1993) Calcium-dependent heparin-like ligands for L-selectin in nonlymphoid endothelial cells. *Science* **261**, 480-3.
- Oh E. S. and Couchman J. R. (2004) Syndecans-2 and -4; close cousins, but not identical twins. *Mol Cells* **17**, 181-7.
- Oh E. S., Woods A. and Couchman J. R. (1997a) Multimerization of the cytoplasmic domain of syndecan-4 is required for its ability to activate protein kinase C. *J Biol Chem* **272**, 11805-11.
- Oh E. S., Woods A. and Couchman J. R. (1997b) Syndecan-4 proteoglycan regulates the distribution and activity of protein kinase C. *J Biol Chem* **272**, 8133-6.
- Oh E. S., Woods A., Lim S. T., Theibert A. W. and Couchman J. R. (1998) Syndecan-4 proteoglycan cytoplasmic domain and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate coordinately regulate protein kinase C activity. *J Biol Chem* **273**, 10624-9.
- Oksala O., Salo T., Tammi R., Hakkinen L., Jalkanen M., Inki P. and Larjava H. (1995) Expression of proteoglycans and hyaluronan during wound healing. *J Histochem Cytochem* **43**, 125-35.
- Orend G., Huang W., Olayioye M. A., Hynes N. E. and Chiquet-Ehrismann R. (2003) Tenascin-C blocks cell-cycle progression of anchorage-dependent fibroblasts on fibronectin through inhibition of syndecan-4. *Oncogene* **22**, 3917-26.
- Ornitz D. M., Yayon A., Flanagan J. G., Svahn C. M., Levi E. and Leder P. (1992) Heparin is required for cell-free binding of basic fibroblast growth factor to a soluble receptor and for mitogenesis in whole cells. *Mol Cell Biol* **12**, 240-7.
- Pagan R., Sanchez A., Martin I., Llobera M., Fabregat I. and Vilaro S. (1999) Effects of growth and differentiation factors on the epithelial-mesenchymal transition in cultured neonatal rat hepatocytes. *J Hepatol* **31**, 895-904.

- Parish C. R. (2006) The role of heparan sulphate in inflammation. *Nat Rev Immunol* **6**, 633-43.
- Park H., Kim Y., Lim Y., Han I. and Oh E. S. (2002) Syndecan-2 mediates adhesion and proliferation of colon carcinoma cells. *J Biol Chem* **277**, 29730-6.
- Park P. W., Foster T. J., Nishi E., Duncan S. J., Klagsbrun M. and Chen Y. (2004) Activation of syndecan-1 ectodomain shedding by Staphylococcus aureus alpha-toxin and beta-toxin. *J Biol Chem* **279**, 251-8.
- Park P. W., Pier G. B., Hinkes M. T. and Bernfield M. (2001) Exploitation of syndecan-1 shedding by Pseudomonas aeruginosa enhances virulence. *Nature* **411**, 98-102.
- Patel K. D., Cuvelier S. L. and Wiehler S. (2002) Selectins: critical mediators of leukocyte recruitment. *Semin Immunol* **14**, 73-81.
- Patel M., Yanagishita M., Roderiquez G., Bou-Habib D. C., Oravec T., Hascall V. C. and Norcross M. A. (1993) Cell-surface heparan sulfate proteoglycan mediates HIV-1 infection of T-cell lines. *AIDS Res Hum Retroviruses* **9**, 167-74.
- Pawson T. (1995) Protein-tyrosine kinases. Getting down to specifics. *Nature* **373**, 477-8.
- Perrimon N. and Bernfield M. (2000) Specificities of heparan sulphate proteoglycans in developmental processes. *Nature* **404**, 725-8.
- Pfaffl M. W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**, e45.
- Picker L. J., Treer J. R., Ferguson-Darnell B., Collins P. A., Buck D. and Terstappen L. W. (1993) Control of lymphocyte recirculation in man. I. Differential regulation of the peripheral lymph node homing receptor L-selectin on T cells during the virgin to memory cell transition. *J Immunol* **150**, 1105-21.
- Pietersma A., Tilly B. C., Gaestel M., de Jong N., Lee J. C., Koster J. F. and Sluiter W. (1997) p38 mitogen activated protein kinase regulates endothelial VCAM-1 expression at the post-transcriptional level. *Biochem Biophys Res Commun* **230**, 44-8.
- Pinon J. D., Klasse P. J., Jassal S. R., Welson S., Weber J., Brighty D. W. and Sattentau Q. J. (2003) Human T-cell leukemia virus type 1 envelope glycoprotein gp46 interacts with cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J Virol* **77**, 9922-30.
- Proudfoot A. E., Handel T. M., Johnson Z., Lau E. K., LiWang P., Clark-Lewis I., Borlat F., Wells T. N. and Kosco-Vilbois M. H. (2003) Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 1885-90.
- Pursiheimo J. P., Saari J., Jalkanen M. and Salmivirta M. (2002) Cooperation of protein kinase A and Ras/ERK signaling pathways is required for AP-1-mediated activation of fibroblast growth factor-inducible response element (FiRE). *J Biol Chem* **277**, 25344-55.
- Raingaud J., Gupta S., Rogers J. S., Dickens M., Han J., Ulevitch R. J. and Davis R. J. (1995) Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem* **270**, 7420-6.
- Rapraeger A., Jalkanen M. and Bernfield M. (1986) Cell surface proteoglycan associates with the cytoskeleton at the basolateral cell surface of mouse mammary epithelial cells. *J Cell Biol* **103**, 2683-96.
- Rapraeger A., Jalkanen M., Endo E., Koda J. and Bernfield M. (1985) The cell surface proteoglycan from mouse mammary epithelial cells bears chondroitin sulfate and heparan sulfate glycosaminoglycans. *J Biol Chem* **260**, 11046-52.

- Rapraeger A. C. (2000) Syndecan-regulated receptor signaling. *J Cell Biol* **149**, 995-8.
- Rapraeger A. C. (2001) Molecular interactions of syndecans during development. *Semin Cell Dev Biol* **12**, 107-16.
- Reiland J., Sanderson R. D., Waguespack M., Barker S. A., Long R., Carson D. D. and Marchetti D. (2004) Heparanase degrades syndecan-1 and perlecan heparan sulfate: functional implications for tumor cell invasion. *J Biol Chem* **279**, 8047-55.
- Reina M., Vilaro S., Ramirez I. and Llobera M. (1987) Characterization of lipoprotein lipase activity in the newborn rat liver. *Biol Neonate* **51**, 45-52.
- Reizes O., Benoit S. C., Strader A. D., Clegg D. J., Akunuru S. and Seeley R. J. (2003) Syndecan-3 modulates food intake by interacting with the melanocortin/AgRP pathway. *Ann N Y Acad Sci* **994**, 66-73.
- Reizes O., Lincecum J., Wang Z., Goldberger O., Huang L., Kaksonen M., Ahima R., Hinkes M. T., Barsh G. S., Rauvala H. and Bernfield M. (2001) Transgenic expression of syndecan-1 uncovers a physiological control of feeding behavior by syndecan-3. *Cell* **106**, 105-16.
- Renne T., Dedio J., David G. and Muller-Esterl W. (2000) High molecular weight kininogen utilizes heparan sulfate proteoglycans for accumulation on endothelial cells. *J Biol Chem* **275**, 33688-96.
- Rincon M., Enslin H., Raingeaud J., Recht M., Zapton T., Su M. S., Penix L. A., Davis R. J. and Flavell R. A. (1998) Interferon-gamma expression by Th1 effector T cells mediated by the p38 MAP kinase signaling pathway. *Embo J* **17**, 2817-29.
- Robey E. and Fowlkes B. J. (1994) Selective events in T cell development. *Annu Rev Immunol* **12**, 675-705.
- Rosenberg R. D., Shworak N. W., Liu J., Schwartz J. J. and Zhang L. (1997) Heparan sulfate proteoglycans of the cardiovascular system. Specific structures emerge but how is synthesis regulated? *J Clin Invest* **99**, 2062-70.
- Rot A. and von Andrian U. H. (2004) Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokine grammar for immune cells. *Annu Rev Immunol* **22**, 891-928.
- Sadir R., Imberty A., Baleux F. and 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**, 43854-60.
- Salek-Ardakani S., Arrand J. R., Shaw D. and Mackett M. (2000) Heparin and heparan sulfate bind interleukin-10 and modulate its activity. *Blood* **96**, 1879-88.
- Sanderson R. D. and Borset M. (2002) Syndecan-1 in B lymphoid malignancies. *Ann Hematol* **81**, 125-35.
- Saphire A. C., Bobardt M. D., Zhang Z., David G. and Gallay P. A. (2001) Syndecans serve as attachment receptors for human immunodeficiency virus type 1 on macrophages. *J Virol* **75**, 9187-200.
- Saunders S., Jalkanen M., O'Farrell S. and Bernfield M. (1989) Molecular cloning of syndecan, an integral membrane proteoglycan. *J Cell Biol* **108**, 1547-56.
- Schwartz R. H. (2003) T cell anergy. *Annu Rev Immunol* **21**, 305-34.
- Sebzda E., Mariathasan S., Ohteki T., Jones R., Bachmann M. F. and Ohashi P. S. (1999) Selection of the T cell repertoire. *Annu Rev Immunol* **17**, 829-74.
- Selleck S. B. (2000) Proteoglycans and pattern formation: sugar biochemistry meets developmental genetics. *Trends Genet* **16**, 206-12.
- Sewing A., Wiseman B., Lloyd A. C. and Land H. (1997) High-intensity Raf signal causes cell cycle arrest mediated by p21Cip1. *Mol Cell Biol* **17**, 5588-97.

- Shafti-Keramat S., Handisurya A., Kriehuber E., Meneguzzi G., Slupetzky K. and Kirnbauer R. (2003) Different heparan sulfate proteoglycans serve as cellular receptors for human papillomaviruses. *J Virol* **77**, 13125-35.
- Shimo T., Gentili C., Iwamoto M., Wu C., Koyama E. and Pacifici M. (2004) Indian hedgehog and syndecans-3 coregulate chondrocyte proliferation and function during chick limb skeletogenesis. *Dev Dyn* **229**, 607-17.
- Shiozaki K. and Russell P. (1995) Cell-cycle control linked to extracellular environment by MAP kinase pathway in fission yeast. *Nature* **378**, 739-43.
- Shworak N. W., Shirakawa M., Mulligan R. C. and Rosenberg R. D. (1994) Characterization of ryudocan glycosaminoglycan acceptor sites. *J Biol Chem* **269**, 21204-14.
- Simons K. and Vaz W. L. (2004) Model systems, lipid rafts, and cell membranes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **33**, 269-95.
- Slimani H., Charnaux N., Mbemba E., Saffar L., Vassy R., Vita C. and Gattegno L. (2003) Binding of the CC-chemokine RANTES to syndecan-1 and syndecan-4 expressed on HeLa cells. *Glycobiology* **13**, 623-34.
- Sohn S. J., Li D., Lee L. K. and Winoto A. (2005) Transcriptional regulation of tissue-specific genes by the ERK5 mitogen-activated protein kinase. *Mol Cell Biol* **25**, 8553-66.
- Songyang Z., Carraway K. L., 3rd, Eck M. J., Harrison S. C., Feldman R. A., Mohammadi M., Schlessinger J., Hubbard S. R., Smith D. P., Eng C. and et al. (1995) Catalytic specificity of protein-tyrosine kinases is critical for selective signalling. *Nature* **373**, 536-9.
- Stapp M. A., Gibson H. E., Gala P. H., Iglesia D. D., Pajooohesh-Ganji A., Pal-Ghosh S., Brown M., Aquino C., Schwartz A. M., Goldberger O., Hinkes M. T. and Bernfield M. (2002) Defects in keratinocyte activation during wound healing in the syndecan-1-deficient mouse. *J Cell Sci* **115**, 4517-31.
- Su B., Jacinto E., Hibi M., Kallunki T., Karin M. and Ben-Neriah Y. (1994) JNK is involved in signal integration during costimulation of T lymphocytes. *Cell* **77**, 727-36.
- Subramanian S. V., Fitzgerald M. L. and Bernfield M. (1997) Regulated shedding of syndecan-1 and -4 ectodomains by thrombin and growth factor receptor activation. *J Biol Chem* **272**, 14713-20.
- Sutton A., Friand V., Brule-Donneger S., Chaigneau T., Ziol M., Sainte-Catherine O., Poire A., Saffar L., Kraemer M., Vassy J., Nahon P., Salzmann J. L., Gattegno L. and Charnaux N. (2007) Stromal cell-derived factor-1/chemokine (C-X-C motif) ligand 12 stimulates human hepatoma cell growth, migration, and invasion. *Mol Cancer Res* **5**, 21-33.
- Taylor A. W. (2009) Review of the activation of TGF-beta in immunity. *J Leukoc Biol* **85**, 29-33.
- Tkachenko E., Rhodes J. M. and Simons M. (2005) Syndecans: new kids on the signaling block. *Circ Res* **96**, 488-500.
- Ugolini S., Mondor I. and Sattentau Q. J. (1999) HIV-1 attachment: another look. *Trends Microbiol* **7**, 144-9.
- Ventura J. J., Hubner A., Zhang C., Flavell R. A., Shokat K. M. and Davis R. J. (2006) Chemical genetic analysis of the time course of signal transduction by JNK. *Mol Cell* **21**, 701-10.
- Verwilghen J., Baroja M. L., Van Vaeck F., Van Damme J. and Ceuppens J. L. (1991) Differences in the stimulating capacity of immobilized anti-CD3 monoclonal

- antibodies: variable dependence on interleukin-1 as a helper signal for T-cell activation. *Immunology* **72**, 269-76.
- Vestweber D. and Blanks J. E. (1999) Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol Rev* **79**, 181-213.
- Vilaro S., Reina M., Ramirez I. and Llobera M. (1986) Intralipid administration induces a lipoprotein lipase-like activity in the livers of starved adult rats. *Biochem J* **236**, 273-8.
- Vilaro S., Testar X., Ramirez I. and Llobera M. (1990) Lipoprotein lipase activity in the liver of starved pregnant rats. *Biol Neonate* **57**, 37-45.
- Villena J., Berndt C., Granes F., Reina M. and Vilaro S. (2003) Syndecan-2 expression enhances adhesion and proliferation of stably transfected Swiss 3T3 cells. *Cell Biol Int* **27**, 1005-10.
- Villena J., Mainez J., Noguer O., Contreras H., Granes F., Reina M., Fabregat I. and Vilaro S. (2006) Syndecan-2 expression increases serum-withdrawal-induced apoptosis, mediated by re-distribution of Fas into lipid rafts, in stably transfected Swiss 3T3 cells. *Apoptosis* **11**, 2065-75.
- Volk R., Schwartz J. J., Li J., Rosenberg R. D. and Simons M. (1999) The role of syndecan cytoplasmic domain in basic fibroblast growth factor-dependent signal transduction. *J Biol Chem* **274**, 24417-24.
- von Bulow G. U., van Deursen J. M. and Bram R. J. (2001) Regulation of the T-independent humoral response by TACI. *Immunity* **14**, 573-82.
- Wang H. U., Chen Z. F. and Anderson D. J. (1998) Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. *Cell* **93**, 741-53.
- Wang L., Fuster M., Sriramarao P. and Esko J. D. (2005) Endothelial heparan sulfate deficiency impairs L-selectin- and chemokine-mediated neutrophil trafficking during inflammatory responses. *Nat Immunol* **6**, 902-10.
- Wang X., Finegan K. G., Robinson A. C., Knowles L., Khosravi-Far R., Hinchliffe K. A., Boot-Handford R. P. and Tournier C. (2006) Activation of extracellular signal-regulated protein kinase 5 downregulates FasL upon osmotic stress. *Cell Death Differ* **13**, 2099-108.
- Wang X. and Tournier C. (2006) Regulation of cellular functions by the ERK5 signalling pathway. *Cell Signal* **18**, 753-60.
- Weiner O. H., Zoremba M. and Gressner A. M. (1996) Gene expression of syndecans and betaglycan in isolated rat liver cells. *Cell Tissue Res* **285**, 11-6.
- Werlen G., Hausmann B., Naeher D. and Palmer E. (2003) Signaling life and death in the thymus: timing is everything. *Science* **299**, 1859-63.
- Whiteford J. R. and Couchman J. R. (2006) A conserved NXIP motif is required for cell adhesion properties of the syndecan-4 ectodomain. *J Biol Chem* **281**, 32156-63.
- Woods A. and Couchman J. R. (1994) Syndecan 4 heparan sulfate proteoglycan is a selectively enriched and widespread focal adhesion component. *Mol Biol Cell* **5**, 183-92.
- Wrenshall L. E., Cerra F. B., Singh R. K. and Platt J. L. (1995) Heparan sulfate initiates signals in murine macrophages leading to divergent biologic outcomes. *J Immunol* **154**, 871-80.
- Wrenshall L. E. and Platt J. L. (1999) Regulation of T cell homeostasis by heparan sulfate-bound IL-2. *J Immunol* **163**, 3793-800.
- Wysk M., Yang D. D., Lu H. T., Flavell R. A. and Davis R. J. (1999) Requirement of mitogen-activated protein kinase kinase 3 (MKK3) for tumor necrosis factor-induced cytokine expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 3763-8.

- Xu J., Park P. W., Kheradmand F. and Corry D. B. (2005) Endogenous attenuation of allergic lung inflammation by syndecan-1. *J Immunol* **174**, 5758-65.
- Yan C., Luo H., Lee J. D., Abe J. and Berk B. C. (2001a) Molecular cloning of mouse ERK5/BMK1 splice variants and characterization of ERK5 functional domains. *J Biol Chem* **276**, 10870-8.
- Yan L., Carr J., Ashby P. R., Murry-Tait V., Thompson C. and Arthur J. S. (2003) Knockout of ERK5 causes multiple defects in placental and embryonic development. *BMC Dev Biol* **3**, 11.
- Yan M., Wang H., Chan B., Roose-Girma M., Erickson S., Baker T., Tumas D., Grewal I. S. and Dixit V. M. (2001b) Activation and accumulation of B cells in TACI-deficient mice. *Nat Immunol* **2**, 638-43.
- Yang E., Zha J., Jockel J., Boise L. H., Thompson C. B. and Korsmeyer S. J. (1995) Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* **80**, 285-91.
- Yang Y., Macleod V., Miao H. Q., Theus A., Zhan F., Shaughnessy J. D., Jr., Sawyer J., Li J. P., Zcharia E., Vlodaysky I. and Sanderson R. D. (2007) Heparanase enhances syndecan-1 shedding: a novel mechanism for stimulation of tumor growth and metastasis. *J Biol Chem* **282**, 13326-33.
- Yayon A., Klagsbrun M., Esko J. D., Leder P. and Ornitz D. M. (1991) Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell* **64**, 841-8.
- Yoon S. and Seger R. (2006) The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* **24**, 21-44.
- Yuan K., Hong T. M., Chen J. J., Tsai W. H. and Lin M. T. (2004) Syndecan-1 up-regulated by ephrinB2/EphB4 plays dual roles in inflammatory angiogenesis. *Blood* **104**, 1025-33.
- Zen K. and Parkos C. A. (2003) Leukocyte-epithelial interactions. *Curr Opin Cell Biol* **15**, 557-64.
- Zhang J., Salojin K. V., Gao J. X., Cameron M. J., Bergerot I. and Delovitch T. L. (1999) p38 mitogen-activated protein kinase mediates signal integration of TCR/CD28 costimulation in primary murine T cells. *J Immunol* **162**, 3819-29.
- Zhang S. and Kaplan M. H. (2000) The p38 mitogen-activated protein kinase is required for IL-12-induced IFN-gamma expression. *J Immunol* **165**, 1374-80.
- Zheng Y., Collins S. L., Lutz M. A., Allen A. N., Kole T. P., Zarek P. E. and Powell J. D. (2007) A role for mammalian target of rapamycin in regulating T cell activation versus anergy. *J Immunol* **178**, 2163-70.
- Zimmermann P. and David G. (1999) The syndecans, tuners of transmembrane signaling. *Faseb J* **13 Suppl**, S91-S100.



**ANNEX**

Teixe T., Nieto-Blanco P., Vilella R., Engel P., Reina M. and Espel E. (2008) Syndecan-2 and -4 expressed on activated primary human CD4<sup>+</sup> lymphocytes can regulate T cell activation. *Mol Immunol* **45**, 2905-19.