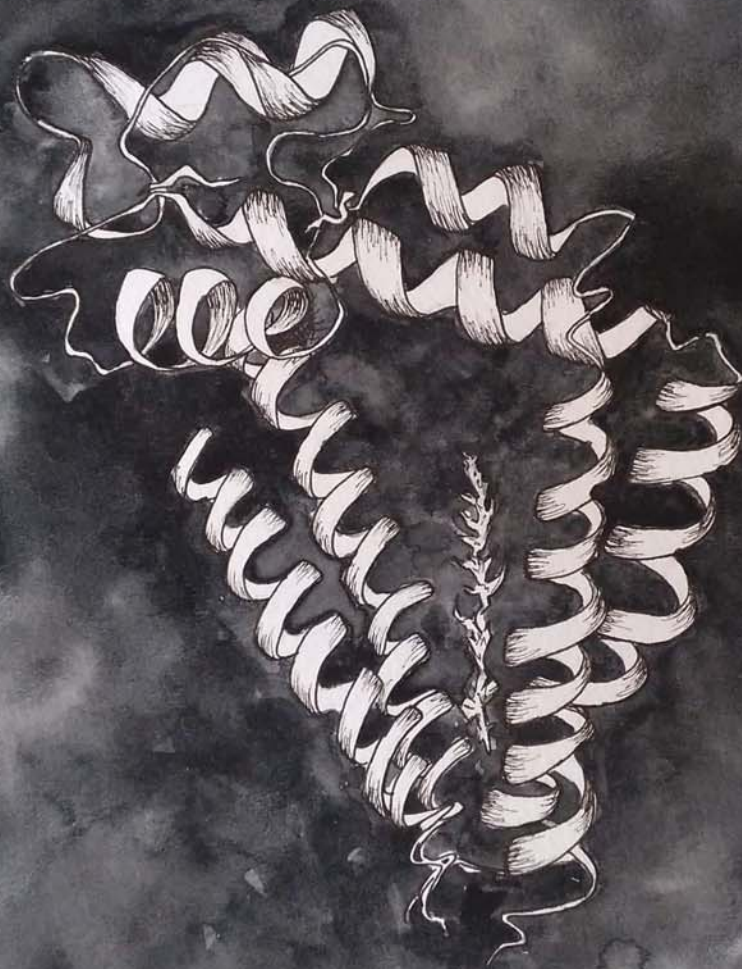


**Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular**

***Papel de las tetraspaninas en la internalización
y el tráfico de moléculas asociadas
en modelos tumorales y de infección viral***



**Henar Suárez Montero
Madrid, 2019**

Departamento de Biología Molecular
Facultad de Ciencias
Universidad Autónoma de Madrid

***Papel de las tetraspaninas en la
internalización y el tráfico de moléculas asociadas
en modelos tumorales y de infección viral***

Henar Suárez Montero
Licenciada en Bioquímica

Dirigido por:
María Yáñez Mó

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa

A mis padres,

Agradecimientos

Empecé escribiendo esta parte pensando que erais muy pocos, pero no lo es, es una lista muy larga y de verdad que está llena de gente maravillosa. Todos los que habéis participado en esta historia deciros que me alegro de haberla compartido con vosotros.

Comienzo dándote las gracias María porque has sido una jefa increíble. Todos los que estamos en el laboratorio hemos aprendido un montón porque sabes mucho, pero además de ser inteligente, lo mejor es que nos has enseñado cosas que van más allá de la ciencia. Te agradezco tu cercanía y sencillez. Nos has dado a todos la oportunidad de ser mejores y siempre has puesto de tu parte para que así sea, y eso no lo hace cualquiera. Gracias por confiar en mí.

Gracias Sory, por ser mi profesora, mi compañera y convertirte en mi amiga. Gracias por tu ayuda y por aguantar mis gruñidos. He disfrutado de verdad de trabajar contigo y sobretodo me he reído, un montón... te echaré de menos. Pero eh! no nos pongamos tristes, puedo bajar la calle para verte y seguir disfrutando de vinos en el parque, y ahora tú me hablarás del labo.

Gracias Vera, he aprendido muchísimo de ti. Me ayudaste a mejorar y a ser mejor científica. Gracias Susana, por sacar resultados de las 3 células que te llevaba cuando necesitabas 20, tus PCRs son mágicas.

Gracias Víctor, por dejarte enmarronar de vez en cuando y sobre todo por tu sonrisa, espero que la mantengas siempre, aunque los experimentos exploten. A Bea que nos hemos conocido poquito pero sé que hagas lo que hagas llegarás lejos, Muchas gracias por tu ayuda. Carla, aunque estés en Boston todavía permanecen tus frases inspiradoras y tus colores por el laboratorio. Espero que todo te vaya genial en tu aventura americana. Gracias Estefanía, por tu positivismo y tus historias bonitas. Espero que nos crucemos pronto.

Gracias al servicio de informática por la ayuda prestada, en especial a Ángel, por hacer brujería con los ordenadores, por intentar salvarle la vida a mi disco duro y por ser siempre tan divertido a pesar de estar viendo ceros y unos constantemente. Gracias a ti y a mi torpeza conozco la importancia de la nube.

No me olvido de la gente del Santa Cristina, aunque hace mucho ya que nos fuimos. Pero aun os echo de menos. Dani, Óscar, todavía tengo el instinto de meterme en laboratorio de al lado para escuchar alguna barbaridad que aquí no puedo mencionar. Me habéis hecho pasar momentos geniales. A Flori y a Esther y sus risas por en el laboratorio. A Ainara, Ángel e Inés hicisteis del Santa Cristina un sitio bonito.

VeigaLab... qué pena separarnos. Gracias Esteban por tus millones de historias, siempre nos sacaron una sonrisa a cualquier hora y por las paellas en la terraza a 50 grados. Tenemos que

repetir pronto. Gracias Arantxa por tu positivismo y energía, te admiro un montón. Moni siempre me acordaré de ti haciendo *buffys* en la cabina del Santa y mientras Raquel y Jesús con sus queridos linfocitos B, me ha encantado conoceros, sois gente buena de verdad.

A ti Guille te saco del párrafo anterior porque te has convertido en mi pequeña nueva familia. Gracias por las cervezas, por las risas en la terraza, por las pelis malas y por tu salero. Eres un solete. Te agradeceré siempre que me ofrecieras compartir tu casa en un momento difícil y porque sigas compartiendo tus cositas conmigo. Me has regalado un hogar.

Gracias Iria, por ser una compi genial y divertida. Me encanta pasar las tardes contigo hablando y riendo y gracias por dejar que te robe Estrella Galicia. Diego, gracias por tus post de Facebook, me hacen tremendamente feliz, también por tu sarcasmo y paciencia. A ti Eli, porque siempre te he admirado. Os echo de menos, publicad muchos *papers* en poco tiempo y volved ya, tenemos que irnos de cañas.

Gracias Francesc por tratarme tan bien cuando pasé por Badalona, qué grupo más majo tienes. Gracias Marta por prestarme tu casita, por la horchata, por cocinarme y sacarme de dansings. A ti Ana porque simplemente eres genial, fui tu pollito y lo disfruté un montón, Sergio siempre recordaré tus José Cuervo y aunque digas de mis expresiones madrileñas, las venezolanas son mucho mejores. Inés, sigo esperando que me invites a un vino. Ana Oliveira no me olvido de ti, gracias por ayudarme con los experimentos y por descubrirme que existen carreras de bomberos, aun sigo buscando una en Madrid.

A mis hermanas, Raquel, Lucía, Claudia, Cris, Irene os quiero. Sois mi familia, ni siquiera sé qué agradecereros aquí porque no cabe en este papel y ni siquiera sé cómo hacerlo palabras. Gracias por estar ahí y quererme. Por tener tanta paciencia conmigo. Por lo bueno y lo malo y por saber que estaréis ahí. Gracias flores. Gracias Claudia por la portada, ¡es preciosa!

A ti Fran, por hablarme de tus movidas de química-física extraña mirar mi cara de póker y resignarte. Por reírte cuando uso palillos chinos, por los yayos, por Lavapiés. Pero sobretodo gracias por tu paciencia, por hacer que me ría de las cosas que me parecen serias y por salvarme tantas veces. Te echo de menos Toli.

Y lo mejor para el final, gracias a mis padres, por hacer de mí lo que soy, que no sé si es bueno o malo, pero os lo debo a vosotros. Gracias por entenderme siempre y no cuestionarme nunca. Gracias por vuestro amor y por cuidarme como si aún fuera una niña. Gracias por estar ahí. Os quiero mucho aunque lo diga poco.

Abreviaturas	4
Resumen	7
Abstract	9
I. Introducción	11
1.1. Microdominios de membrana	13
1.1.1. Tetraspaninas	13
1.1.1.1. Estructura	14
1.1.1.2. Función de las tetraspaninas	15
1.2. Papel de los dominios ricos en tetraspaninas en la infección viral	15
1.2.1. Entrada viral	15
1.2.2. Los TEMs participan en la regulación de la dinámica del citoesqueleto cortical	17
1.2.3. Las tetraspaninas se localizan en las zonas de ensamblaje y en la envuelta de las nuevas partículas virales	17
1.2.4. Las tetraspaninas participan en vías alternativas de transmisión Del VIH-1	18
1.2.5. Las tetraspaninas también participan en las fases intracelulares De la infección	18
1.2.6. SAMHDI	19
1.2.6.1. Mecanismos de regulación de SAMHDI	19
1.3. El sistema de membranas endosomales	20
1.3.1. Conexiones entre el sistema endolisosomal, el aparato de Golgi y la mitocondria	21
1.3.2. Sistema endosomal y autofagia	22
1.3.3. Papel de las tetraspaninas en los compartimentos endosomales	23
1.3.3.1. Las tetraspaninas son componentes de vesículas extracelulares	24
1.4. Papel de los dominios ricos en tetraspaninas en invasión y metástasis	25
1.4.1. Metaloproteinasa de membrana tipo I: MT1-MMP	26
1.4.1.1. Mecanismos que regulan la actividad de MT1-MMP	26
1.4.2. ERM	28
2. Objetivos	31

3. Materiales y métodos	35
3.1. Cultivos celulares	37
3.2. Reactivos	37
3.3. Anticuerpos	39
3.4. Coimmunoprecipitación	40
3.5. Pull Down	40
3.6. Western blot.....	40
3.7. Transfección de ADN o siARN.....	40
3.8. Construcciones.....	41
3.9. Infección viral	43
3.10. Medida de la concentración de dNTPs intracelulares	45
3.11. Aislamiento de EVs mediante cromatografía de exclusión por tamaño	45
3.12. Aislamiento de EVs por ultracentrifugación	45
3.13. Citometría de flujo de EVs por acoplamiento a bolas de látex	46
3.14. Citometría de flujo y separación celular	46
3.15. Análisis de seguimiento de partículas (NTA)	46
3.16. Ensayos de degradación de matriz.....	47
3.17. Medida de la transferencia resonante de energía fõster (FRET) a través de la vida media de fluorescencia (FLIM)	47
3.18. Microscopía confocal de fluorescencia	48
3.19. Ensayos de ligación por proximidad.....	48
3.20. Microscopía electrónica	48
3.21. Proteómica	49
3.22. Internalización.....	50
3.23. Análisis estadístico.....	50
4. Resultados	51
4.1. Estudio de la importancia de la tetraspanina CD81 en la infección por VIH	53
4.1.1. CD81 interacciona con SAMHDI	53
4.1.2. CD81 es importante para el ciclo infectivo del virus VIH-I	55
4.1.3. CD81 regula la disponibilidad de dNTPs en la célula.....	59
4.1.4. CD81 regula la expresión de SAMHDI en la célula.....	61

4.2. Estudio del papel de CD9 en el sistema endosomal	64
4.2.1. La secreción de exosomas depende de CD9	64
4.2.2. Diseño de un método de detección de exosomas mediante citometría de flujo	65
4.2.3. El aumento de la concentración de exosomas al eliminar CD9 Fue detectado por citometría de flujo.....	69
4.2.4. CD9 controla el cargo de las EVs	70
4.2.5. CD9 interviene en la formación de vacuolas intracelulares.....	71
4.2.6. CD9 participa en autofagia.....	73
4.3. Papel de los TEMs en la regulación de MTI-MMP	79
4.3.1. MTI-MMP interacciona con ERMs a través de su región citoplasmática.....	79
4.3.2. La interacción con ERMs modula la localización subcelular de MTI-MMP....	80
4.3.3. La interacción con ERMs regula la actividad de MTI-MMP	81
4.3.4. La interacción con ERMs no afecta la inclusión de MTI-MMP enTEMs	82
4.3.5. Influencia de la tetraspanina CD151 sobre la actividad de MTI-MMP.....	84
4.3.6. Tanto la interacción con ERMs como la presencia de CD151 regulan la internalización de MTI-MMP.....	86
4.3.7. La interacción con ERMs afecta a la cantidad de MTI-MMP Inactiva incluida en exosomas	87
5. Discusión	89
5.1. CD81 controla la replicación del VIH-1 a través de SAMHDI	91
5.2. CD9 regula la secreción de exosomas	94
5.3. La estabilidad de MTI-MMP dentro de los TEMs controla su actividad.....	99
6. Conclusiones	105
7. Referencias.....	109
8. Anexos.....	125
8.1. Anexo 1: análisis proteómico	127
8.2. Anexo: 2 publicaciones	137

Abreviaturas

- ◆ **ADN** Ácido desoxirribonucleico
- ◆ **AG** Aparato de Golgi
- ◆ **ARN** Ácido ribonucleico
- ◆ **BCA** Bicinchoninic acid assay
- ◆ **BSA** Bovine serum albumin
- ◆ **CCR5** C-C quimiocina receptora de tipo 5
- ◆ **Cdc42** Cell division control protein 42
- ◆ **CLDNI** Claudina I
- ◆ **CLIC-I** Chloride intracelular channel protein I
- ◆ **CRISPR** Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
- ◆ **CXCR4** C-X-C quimiocina receptora de tipo 4
- ◆ **DAPI** 4',6-diamidino-2-fenilindol
- ◆ **DIC** Microscopía de contraste de interferencia diferencial
- ◆ **DMEM** Dulbecco's modified eagle medium
- ◆ **dNTPs** Deoxinucleósido trifosfato
- ◆ **DRMs** Detergent resistant membranes
- ◆ **EEA-I** Early endosome antigen I
- ◆ **EGFR** Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico
- ◆ **ERM** Ezrina, Radixina, Moesina
- ◆ **ESCRT** Endosome sorting complexes required for transport
- ◆ **EVs** Extracellular vesicles
- ◆ **FITC** Fluorescein isotiocyanate
- ◆ **FLIM** Fluorescence lifetime imaging technique
- ◆ **FRET** Förster resonance energy transfer

◆ GFP	Green fluorescent protein
◆ GPI	Glicosilfosfatidilinositol
◆ GST	Glutación S-transferasa
◆ HLTV-1	Virus linfotrópico humano tipo I
◆ HRP	Horseradish peroxidase
◆ HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells
◆ IL-2	Interleuquina 2
◆ LAMP1	Lysosomal-associated membrane protein I
◆ LIMP-2	Lysosome membrane protein 2
◆ LC3	Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3
◆ LEL	Large Extracellular Loop
◆ MFI	Intensidad media de fluorescencia
◆ ms	milisegundos
◆ MTI-MMP	Metaloproteinasa de matriz I
◆ MVB	Multivesicular bodies
◆ nm	Nanómetros
◆ NP-40	Nonidet p-40
◆ NTA	nanoparticle tracking analysis
◆ PBS	Phosphate buffered saline
◆ PCR	Polymerase chain reaction
◆ PE	Phosphatiletanolamine
◆ PFA	Paraformaldehído
◆ PHA	Phytohaemagglutinin
◆ PIP3	Fosfatidil inositol trifosfato

Abreviaturas

- ◆ **PLL** Poli-L-lisina
- ◆ **RE** Retículo endoplásmico
- ◆ **RFP** Red fluorescent protein
- ◆ **RPM** Revoluciones por minuto
- ◆ **RPMI** Roswell park memorial institute medium
- ◆ **SAMHDI** Sterile alpha motif and histidine-aspartate domain containing protein
- ◆ **SEC** Size exclusion chromatography
- ◆ **SEE** Staphylococcal enterotoxin E
- ◆ **SEL** Small extracelular loop
- ◆ **siARN** small interfering ARN
- ◆ **STF** Suero de ternera fetal
- ◆ **TBS** Tampón tris salino
- ◆ **TEMS** Tetraspanin enriched microdomains
- ◆ **V** Voltios
- ◆ **VIH-I** Virus de inmunodeficiencia humana- I
- ◆ **VPH** Virus del papilloma humano
- ◆ **HSV-I** Herpes simplex virus- I
- ◆ **μF** microfaradio

La superfamilia de las tetraspaninas engloba un ubicuo conjunto de proteínas implicadas en la formación de microdominios especializados en la membrana plasmática y membranas intracelulares. Estos microdominios son fundamentales en procesos de adhesión celular y fusión de membranas al regular tanto la concentración local de receptores de adhesión y enzimas transmembrana, como su tráfico intracelular. Esta tesis se ha centrado en caracterizar la interacción molecular previamente descrita en nuestro laboratorio entre la tetraspanina CD81 y la hidrolasa de dNTPs SAMHDI, que actúa como un factor de restricción de la infección por VIH. Hemos demostrado que CD81 puede regular la concentración de dNTPs en la célula y la retrotranscripción viral, al inhibir la degradación de SAMHDI por el proteasoma.

La delección del gen de CD81 no afecta la secreción de vesículas extracelulares pero sí tiene efectos en su composición. Por esta razón, estudiamos el papel de CD9 en este proceso ya que esta tetraspanina está especialmente enriquecida en exovesículas y se emplea como marcador de exosomas. Hemos demostrado que con el uso de péptidos bloqueantes del extremo carboxilo terminal la secreción no cambia y sin embargo aumenta drásticamente cuando se elimina el gen mediante el sistema CRISPR/Cas9. No obstante, el análisis proteómico sí mostró cambios similares en ambos casos, alterando la composición de las vesículas de manera que descendía la presencia de ciertas tetraspaninas, integrinas y marcadores exosomales, mientras que aumentaban moléculas del complemento y componentes de matriz extracelular, sugiriendo que el bloqueo de CD9 inhibe la secreción de una subpoblación específica de exosomas. La caracterización detallada de las células CRISPR/Cas9 CD9 reveló un aumento en el número de cuerpos multivesiculares y una disminución en la formación de anfisomas. Sin embargo, la función lisosomal era correcta mientras que la mitofagia estaba inhibida.

MT1-MMP es una metaloproteinasa incluida en exosomas. Esta forma de secreción de la proteasa juega un papel importante en la invasión tumoral. Resultados previos del grupo de la Dra. G. Arroyo revelaron que la región citosólica de MT1-MMP interacciona con proteínas ERM que sirven de unión con el citoesqueleto de actina. Las ERMs y las tetraspaninas son componentes típicos de exosomas por ello pensamos que el estudio de esta proteasa podría ser un modelo óptimo para determinar cuál de los dos mecanismos (conexión con ERMs o inclusión en TEMs) podría ser relevante en la inclusión en exosomas. El motivo RRH en la región citosólica de MT1-MMP, más próximo a la membrana, es crítico para la unión y colocalización con ERMs en estructuras protrusivas. La mutación de esta región altera el autoprosesamiento de MT1-MMP y aumenta su actividad gelatinolítica aunque sus niveles de expresión en la superficie sean menores. Tanto la asociación con ERMs como la expresión de CD151 regulan la internalización de MT1-MMP. Esta tesis revela el papel de las tetraspaninas en la regulación del destino final de diferentes componentes intracelulares a lo largo de las vías endocíticas, lisosomal y de autofagia.

Tetraspanins are a superfamily of ubiquitous transmembrane molecules that mediate the formation of specialized microdomains in the plasma and intracellular membranes. These microdomains play a role in cell adhesion and membrane fusion events by regulating local concentration of adhesion receptors and transmembrane enzymes, as well as their intracellular trafficking. This thesis first focused in the characterization of the molecular association previously observed in our group, between tetraspanin CD81 and the dNTP hydrolase SAMHD1 that acts as a restriction factor for HIV infection. We demonstrated, that CD81 could regulate intracellular dNTP content and thus viral retrotranscription by an inhibition of SAMHD1 proteasomal degradation.

CD81 gene deletion does not affect extracellular vesicle secretion but only mildly impacts on their composition. Thus, this thesis explored the role of CD9, another tetraspanin highly enriched in extracellular vesicles and commonly employed as exosome marker. We demonstrated that blocking peptides do not affect exosome secretion, while CRISPR/Cas9 deletion of CD9 gene results in an increase in extracellular vesicle secretion, however, in both cases, a similar profile was observed in proteomic analyses. These analyses revealed a decrease in tetraspanins, integrins and exosome markers while complement molecules and extracellular matrix components were increased, suggesting that CD9 blockade inhibits the secretion of a subpopulation among exosomes. Detailed characterization of CD9 KO cells revealed an increment in multivesicular bodies and a diminution of amphisomes, usually very prominent in melanoma cells. Lysosomal function was competent in these cells while they showed an impaired mitophagy.

MT1-MMP is sorted into exosomes and this form of secretion played a significant role in tumor invasion. Previous results from Dr Arroyo's group showed a direct interaction of MT1-MMP cytoplasmic domain with actin linkers from the ERM family. Since both ERM and tetraspanins are among the most abundant components of exosomes, we thought that this system could be optimal to study the involvement of both mechanisms in exosome component sorting. The RRH motif in the cytoplasmic domain of MT1-MMP is the most proximal to the juxtamembrane region, and it was shown to be important for its binding and colocalization with ERMs at protrusive cell structures. Mutation of this motif impaired MT1-MMP autoprocessing. As a result, enhanced gelatinolytic capacity even though expression levels at the plasma membrane were lower than with wild-type MT1-MMP. Both association to ERM, or CD151 expression regulated MT1-MMP internalization. In sum, this thesis reveal a fundamental role for tetraspanins in the regulation of the fate of the different intracellular compartments along the endocytic/lysosomal/autophagy pathway.

I.

Introducción

I.I. MICRODOMINIOS DE MEMBRANA

En 1972, Singer and Nicolson propusieron el modelo de mosaico fluido para explicar la estructura y funcionalidad de la membrana plasmática. La definieron como una bicapa lipídica donde las proteínas están embebidas, sin embargo se desconocía cómo la célula podría regular la distribución de las mismas (Singer and Nicolson, 1972). En 1988 se observó que las células epiteliales polarizadas, tenían una membrana apical muy diferente a la basal, estando la primera especialmente enriquecida en glicoesfingolípidos (Lingwood et al., 2009). Más tarde se demostró que el colesterol, dependiendo de si está acompañado de lípidos con mayor o menor cantidad de insaturaciones, puede crear regiones más fluidas o más compactas en la membrana. El concepto de balsa lipídica o DRMs (membranas resistentes a detergentes), surge al observar que existían zonas de la superficie celular, resistentes a su solubilización con Triton X-100 a bajas temperaturas y que además estaban enriquecidas en esfingolípidos, colesterol, proteínas ancladas a GPI y otros componentes típicos de las áreas menos fluidas. Este hallazgo puso de manifiesto que podría existir una especialización de zonas discretas de la membrana plasmática en función de los requerimientos celulares. Por otro lado, gracias al desarrollo de la microscopía electrónica, se identificaron regiones con unas cavidades, llamadas caveolas, enriquecidas en colesterol y caveolina, proteína encargada de estabilizar estas estructuras tan características (Parton and Simons, 2007). También se descubrieron los dominios ricos en clatrina cuya estructura es similar a la anterior, y que reciben su nombre del componente fundamental, la proteína clatrina, que forma oligómeros en la cara citosólica de la bicapa (Maib et al., 2017). Los últimos en reconocerse como dominios especializados fueron los dominios enriquecidos en tetraspaninas TEMs de sus siglas en inglés (*Tetraspanin Enriched Microdomains*), caracterizados por su estructuración centrada en proteínas de la superfamilia de las tetraspaninas. La existencia de todos estos dominios evidencia la necesidad de crear plataformas de señalización en la superficie celular, para controlar cómo una célula recibe la información del exterior, cómo la procesa y cómo la transmite al interior.

I.I.I. TETRASPANINAS

Bajo el nombre de tetraspaninas se agrupan un conjunto de proteínas caracterizadas por tener una estructura común, compuesta por cuatro fragmentos transmembrana y dos bucles extracelulares (Yanez-Mo et al., 2009). Se han identificado en varios organismos eucariotas: en la ameba *Dictyostelium discoideum* donde se han identificado al menos 5 miembros (Albers et al., 2016), 21 en *Caenorhabditis elegans* (Liu et al., 2015), 37 en *Drosophila melanogaster* (Charrin et al., 2014) en hongos (pero no en levaduras), en plantas, concretamente 17 en *Arabidopsis Thaliana* (Reimann et al., 2017), y 33 miembros en vertebrados (Charrin et al., 2014). Se les han atribuido funciones muy diferentes, ya que se expresan bien de forma ubicua, como es el caso de CD81,

CD82, CD9, o CD63, o de manera específica de célula o tejido, como por ejemplo CD37 o CD53 en células inmunes (Hemler, 2005; Saiz et al., 2018).

En esta tesis nos hemos centrado en explorar el papel de las tetraspaninas CD81 en la infección por el virus VIH, CD9 en el sistema endosomal y en la biogénesis de exosomas, y CD151 en la regulación de la metaloproteinasa MT1-MMP en células tumorales.

I.1.1.1. Estructura

La secuencia peptídica de las tetraspaninas no está conservada, pero sí su estructura secundaria y terciaria. Los cuatro fragmentos transmembrana son los que paseen mayor grado de homología (Yanez-Mo et al., 2009). Entre los dos primeros se forma el bucle extracelular pequeño, también llamado SEL (del inglés Small Extracellular Loop) o EC1, y entre los fragmentos tres y cuatro aparece el bucle extracelular grande, LEL (del inglés, Large Extracellular Loop) o EC2. Este dominio EC2 mantiene su estructura tridimensional gracias a la formación de entre 2 a 4 puentes disulfuro entre aminoácidos de cisteína. La región EC2 siempre ha sido de interés, ya que existen múltiples evidencias de que podría ser la encargada de controlar la afinidad de las tetraspaninas en las interacciones que establecen con diversas moléculas transmembrana (Homsí and Lang, 2017). Recientemente fue resuelta la estructura cristalina de CD81 y se observó que puede adoptar dos conformaciones diferentes en función de la presencia o no de colesterol, lo que serviría para controlar su afinidad por distintas parejas moleculares (Zimmerman et al., 2016). El EC2 posee dos subdominios, uno conservado dentro de la familia y otro variable. El variable varía en longitud y estructura secundaria, pero en todos los casos contiene un motivo CCG muy conservado y que define a la superfamilia (Seigneuret et al., 2001; Yanez-Mo et al., 2009). Se postula que el subdominio más conservado se encargaría de establecer aquellas interacciones más generalizadas como las de tipo homofílico, entre tetraspaninas o con integrinas, mientras que la región variable regularía las interacciones específicas de cada tetraspanina (Seigneuret et al., 2001).

Otra característica común en las tetraspaninas, es la existencia de varias cisteínas en la región citosólica que pueden ser palmitoiladas. Esta modificación post-traducciona consiste en la unión covalente y reversible de ácido palmítico a la cadena lateral de estos aminoácidos (Delandre et al., 2009). Experimentos que suprimen esta modificación consiguen alterar la localización de las tetraspaninas y su interacción con otras proteínas (Delandre et al., 2009; Yang et al., 2002), aunque la palmitoilación parece regular más la estabilidad de los TEMs a través de las interacciones homofílicas entre tetraspaninas que la especificidad de las interacciones con otras moléculas dentro de los microdominios (van Deventer et al., 2017).

1.1.1.2. Función de las tetraspaninas

En general, la función principal de las tetraspaninas es organizar la localización, concentración local y tráfico intracelular de otras proteínas, tanto de membrana, como intracelulares, mediante la creación de los TEMs (Saint-Pol et al., 2017). En estas regiones la tetraspaninas interactúan con otras proteínas transmembrana, sobretodo proteínas de la superfamilia de las inmunoglobulinas, integrinas, metaloproteinasas (Yanez-Mo et al., 2008), receptores (Imai et al., 1995) y otras tetraspaninas, para formar complejos capaces de modular su actividad. Estas regiones además, tienen una composición lipídica característica, siendo ricas en gangliósidos y colesterol (Yanez-Mo et al., 2009). Por último, a través de sus dominios citosólicos, las tetraspaninas son capaces de reclutar proteínas intracelulares, que modulan su tráfico intracelular o su conexión con rutas de señalización implicadas preferentemente en procesos de adhesión, migración, protrusión y cambios en la morfología celular (Tejera et al., 2013; Termini and Gillette, 2017). Interaccionan de forma directa o indirecta con ERMs, que establecen conexiones con el citoesqueleto de actina (Sala-Valdes et al., 2006); con proteínas de la familia de las Rho GTP-asas (Lazo, 2007; Tejera et al., 2013), con PKC (Zuidscherwoude et al., 2017), PI4K y β -catenina, todas ellas moléculas implicadas de nuevo en adhesión y migración (Termini and Gillette, 2017). Los TEMs por tanto, se convierten en áreas de la membrana plasmática altamente especializadas en llevar a cabo funciones muy concretas, relacionadas fundamentalmente con procesos de adhesión (Franz et al., 2016). Una de las conexiones moleculares encontradas por nuestro grupo en un abordaje proteómico masivo, fue entre la tetraspanina CD81 y la enzima SAMHD1, implicada en el control de la replicación del VIH-1 (Perez-Hernandez et al., 2013; Rocha-Perugini et al., 2017b).

1.2. PAPEL DE LOS DOMINIOS RICOS EN TETRASPANINAS EN LA INFECCIÓN VIRAL

1.2.1 ENTRADA VIRAL

Para la gran mayoría de los virus, la entrada a su célula huésped depende del reconocimiento de un receptor específico en la superficie celular y de su dinámica en la superficie, así como su distribución y estequiometría. Es en este punto, donde las tetraspaninas juegan un papel importante ya que crean y estabilizan plataformas especializadas, que contienen las moléculas imprescindibles para interactuar e internalizar el virus y determinan que esta interacción sea efectiva (Dumas et al., 2014; Magnus and Regoes, 2012).

El mecanismo de entrada es diferente para cada virus, en el caso del virus del papiloma humano (VPH), depende de varias moléculas de superficie, integrinas, factores de crecimiento, entre otras y también de CD151 que agrupa estos componentes dentro de los TEMs y estimula su endocitosis. VPH interactúa con el complejo CD63-sintenina para transportar el virus hasta los cuerpos

multivesiculares donde la partícula viral se desensambla para continuar con su ciclo infeccioso (Florin and Lang, 2018). Las tetraspaninas también pueden ser receptores virales como en el caso del virus de la hepatitis C (HCV) (Pileri et al., 1998) en el que el dominio extracelular grande de CD81 interacciona con la glicoproteína E2 viral (Banse et al., 2018; Cunha et al., 2018), pero al igual que ocurre en otros casos, también facilita su interacción con otras moléculas implicadas en la entrada como EGFR o CLDN1 que son indispensables para que tenga lugar la endocitosis. En el caso del virus de la gripe, se internaliza preferentemente a través de regiones ricas en CD81 y una vez internalizado, esta tetraspanina es imprescindible para la fusión entre la membrana del endosoma y la membrana viral (Florin and Lang, 2018). En el caso del VIH (Figura 1A) se sabe que

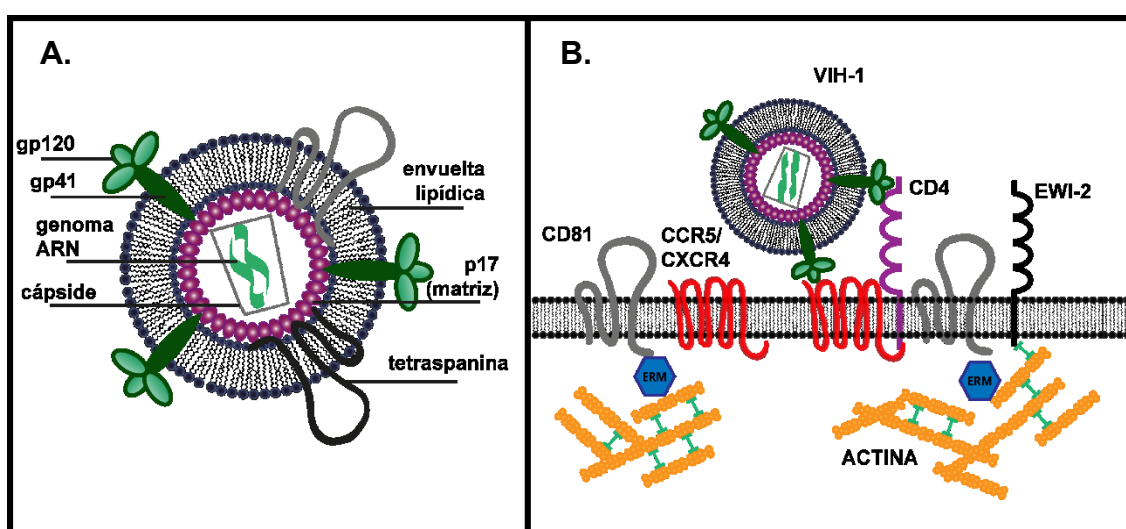


Figura 1. Los TEMs son importantes en el ciclo infeccioso del VIH. A. Estructura del VIH-1, además de las proteínas virales, los nuevos virus incluyen tetraspaninas de la célula hospedadora en su envuelta viral. **B.** El VIH-1 reconoce el receptor CD4 y el coreceptor CCR5 o CXCR4 en la célula hospedadora. Los TEMs participan en el mantenimiento de la estequiometría para que tenga lugar dicha interacción y además favorecen la formación de un esqueleto de actina cortical que facilita la entrada del virus.

uno de los aspectos más críticos en la entrada es la necesidad de generar dominios especializados en la superficie para conseguir mantener la estequiometría molecular correcta de la interacción virus-receptor-coreceptor (Dumas et al., 2014; Magnus and Regoes, 2012). Las tetraspaninas CD81 y CD82 se asocian al receptor CD4 en células T (Imai et al., 1995; Imai and Yoshie, 1993) y la unión de la proteína gp120 del virus a su receptor CD4 estimula la asociación de CD81 con este último (Gordon-Alonso et al., 2006). El virus tiene afinidad por la forma monomérica y además reducida, de CD4 (Bourgeois et al., 2006; Cerutti et al., 2014; Matthias et al., 2010), y CD81 es capaz de regular la dimerización de CD4 y su afinidad por gp120 (Fournier et al., 2010) (Figura 1B).

I.2.2. LOS TEMS PARTICIPAN EN LA REGULACIÓN DE LA DINÁMICA DEL CITOESQUELETO CORTICAL

Una vez el virus VIH interacciona con la superficie celular, éste tiene que entrar al interior de la célula. El éxito de este proceso depende de un paso de polimerización y posterior despolimerización del citoesqueleto de actina. Aunque inicialmente se creía que el citoesqueleto era una barrera frente a la infección, ya existen múltiples trabajos que muestran que por ejemplo, al inhibir ARP2/3, un regulador de la nucleación de la actina, se inhibe la entrada del virus; o que la unión de gp120 al receptor CD4 activa a la proteína moesina, que desencadena la reorganización del esqueleto subcortical de F-actina y estimula la agrupación de CD4 con su correceptor CXCR4 en linfocitos T (Barrero-Villar et al., 2009). Sin embargo otros estudios en células Hela describen a la moesina como un regulador negativo de la infección viral (Capalbo et al., 2011) al afectar la estabilidad de los microtúbulos que participan en el transporte del complejo de RetroTranscripción(RTC) al núcleo (Naghavi et al., 2007). Las tetraspaninas juegan un papel en este proceso, bien a través de su interacción con ERMs (Sala-Valdes et al., 2006) o con la proteína entrecruzadora de actina α -actinina (Gordon-Alonso et al., 2012). También la tetraspanina TSPAN7 ha sido identificada en células dendríticas como un efector de la nucleación de la polimerización de actina requerida para la formación de dendritas ricas en estos microfilamentos, que sirven para capturar, presentar y transferir más partículas víricas a los linfocitos T en un proceso conocido como trans-infección (Menager, 2017).

I.2.3. LAS TETRASPANINAS SE LOCALIZAN EN LAS ZONAS DE ENSAMBLAJE Y EN LA ENVUELTA DE LAS NUEVAS PARTÍCULAS VIRALES

En el caso de los virus VIH-I, el de la gripe o HLTV-I, las regiones de ensamblaje en la membrana, coinciden con regiones ricas en tetraspaninas (Thali, 2011). En el caso del VIH-I, es la propia proteína Gag viral la que induce el secuestro de las tetraspaninas CD9 y CD81 y por tanto las nuevas partículas virales incorporan diversas tetraspaninas como CD9, CD81, CD82, CD63 y CD231, que curiosamente reducen su capacidad infectiva (Sato et al., 2008). Este reclutamiento es específico ya que la molécula L6 con una topología similar no está incluida en la envuelta viral (Figura 1A) (Sato et al., 2008). También es importante señalar que el propio VIH-I controla la expresión de las tetraspaninas en la membrana plasmática (Haller et al., 2014), de forma que los linfocitos T de pacientes infectados expresan menos CD82 y CD81, mientras que la expresión de CD81 en linfocitos B aumenta (Lambele et al., 2015). Esta regulación se ha atribuido a dos proteínas virales, Vpu y también, pero en menor medida, a Nef. Vpu interacciona directamente con CD81 y estimula su degradación a través de la vía del proteasoma o la vía lisosomal (Lambele et al., 2015). Con todos estos datos el modelo actual propone que el virus necesita reducir la

expresión de las tetraspaninas en la célula infectada y por tanto en los nuevos viriones, para que la posterior infección sea eficaz.

1.2.4. LAS TETRASPANINAS PARTICIPAN EN VÍAS ALTERNATIVAS DE TRANSMISIÓN DEL VIH-I

Las células dendríticas son capaces de capturar las partículas de VIH-I dentro de vesículas intracelulares que son positivas para CD81 y CD63 (Izquierdo-Useros et al., 2007) que no están completamente cerradas si no que mantienen una abertura conectada al medio extracelular para liberar rápidamente las partículas virales durante la sinapsis entre células dendríticas y células T (Yu et al., 2008). En otra posible vía de transmisión, el VIH-I usa la vía endosomal para entrar en la célula dendrítica y sale al medio extracelular junto con los exosomas tras la fusión de los cuerpos multivesiculares con la membrana plasmática (Izquierdo-Useros et al., 2010; Wiley and Gummuluru, 2006). Estudios recientes sugieren que los exosomas secretados por las células dendríticas están cargados de moléculas que pueden facilitar la infección, como por ejemplo CCR5 y CXCR4, microARNs o proteínas virales como Nef (Kulkarni and Prasad, 2017).

El virus, como forma alternativa de propagación, induce la fusión de células infectadas por el virus y células sanas por medio de la proteína de la envuelta (Env). Esto da lugar a células muy grandes multinucleadas llamadas sincitios. Las tetraspaninas CD81 y CD9 regulan negativamente la formación de sincitios inducidos por el virus (Gordon-Alonso et al., 2006).

1.2.5. LAS TETRASPANINAS TAMBIÉN PARTICIPAN EN LAS FASES INTRACELULARES DE LA INFECCIÓN

Tras la entrada viral, la cápside (CA) formada por las proteínas de la cápside, las dos copias de ARN y las enzimas y proteínas virales, como RT e IN (Campbell and Hope, 2015), es liberada al citoplasma celular donde se desensambla antes de que tenga lugar la integración del genoma viral. La transcripción reversa tiene lugar a lo largo del desensamblaje, en un complejo llamado RTC (complejo de RetroTranscripción) formado por proteínas virales (transcriptasa reversa, integrasa, la proteína de matriz y Vpr), el genoma ARN y proteínas del hospedador que son necesarias para completar la síntesis del ADN complementario (cADN) (Campbell and Hope, 2015; Fassati, 2012; Li and De Clercq, 2016). Este RTC pasará a llamarse PIC (complejo de pre-integración) cuando el genoma ARN haya sido transformado a cADN, Aunque las tetraspaninas se localizan en la membrana plasmática y endosomal, existen evidencias que indican que CD63 podría estar regulando el transporte del RTC al núcleo y la integración (Fu et al., 2015; Li et al., 2011; Li et al., 2014).

Dentro de las moléculas del interactoma intracelular de la tetraspanina CD81, nuestro grupo encontró a la enzima SAMHD1 que ha sido muy estudiada en los últimos años por su importante

papel en el control de la replicación del VIH-1 (Perez-Hernandez et al., 2013; Rocha-Perugini et al., 2017b).

1.2.6. SAMHDI

SAMHDI, siglas de *sterile alpha motif and histidine-aspartate-domain-containing protein 1* (Ballana and Este, 2015), es una enzima capaz de hidrolizar desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) en su correspondiente nucleósido y trifosfato inorgánico. Algunos estudios le han asignado también la capacidad de degradar ARN de cadena sencilla, aunque estos resultados han sido siempre puestos en duda por las dificultades metodológicas que conlleva el estudio (Ryoo et al., 2014). Por consiguiente, esta enzima controlaría la disponibilidad de dNTPs necesarios para la síntesis tanto de ADN nuclear como mitocondrial; pero la concentración de dNTPs también es importante para asegurar la supervivencia celular y la integridad genómica, y a su vez tiene capacidad para regular procesos como la apoptosis y la inflamación (Mauney and Hollis, 2018). Se le ha atribuido un papel importante en la lucha contra infecciones virales, principalmente en células que no se dividen activamente como son los macrófagos, las células dendríticas y los linfocitos T CD4+ en reposo, donde los niveles de dNTPs se mantienen por debajo de los existentes en células activas (Ballana and Este, 2015). SAMHDI es un importante factor de restricción del virus VIH-1. VIH-2 sin embargo, expresa la proteína Vpx, que es capaz de reclutar el complejo E3 ubiquitina ligasa que marca a SAMHDI para su degradación por el proteasoma. SAMHDI bloquea la infección del VIH-1 al reducir los niveles de dNTPs por debajo de los requeridos para activar la transcriptasa reversa (Ballana and Este, 2015). SAMHDI es un importante factor restrictivo de la infección por VIH-1, pero también de otros virus con genoma de ADN como el herpes simple-1 (HSV-1) (Kim et al., 2013).

1.2.6.1. Mecanismos de regulación de SAMHDI

La forma activa de SAMHDI es un tetrámero. La asociación de las cuatro subunidades está controlada por la concentración de dNTPs en la célula, que participan en la estabilización del complejo. SAMHDI también está sujeta a modificaciones postraduccionales: puede ser fosforilada en la posición T592 por la ciclina A2/CDK1 tras la activación de células T, o a través de tirosinaquinasas estimuladas por IL-2 e IL-7 (Coiras et al., 2016; Cribier et al., 2013). Esta fosforilación hace que las células sean más susceptibles a la infección por VIH-1, pero parece hacerlo sin modificar su actividad dNTPasa (Welbourn et al., 2013). Por otro lado, la acetilación en posición K405 tiene el efecto contrario, estimulando la transición de la fase G1 a la S del ciclo celular (Lee et al., 2017). A través de la oxidación de tres cisteínas se afecta la unión de su sustrato y por tanto a su tetramerización. Además de alterar su actividad, esta modificación también regula la localización subcelular aumentando su presencia en el citoplasma (Mauney et al., 2017).

Puesto que la regulación funcional de SAMHDI en linfocitos T no se comprende totalmente, y debido al papel tan relevante de la tetraspanina CD81 en la infección por VIH-I, la relación entre estos dos factores tan críticos para la infección nos pareció tremendamente interesante y dió lugar al primer objetivo de esta esta tesis.

I.3. EL SISTEMA DE MEMBRANAS ENDOSOMALES

El transporte intracelular de proteínas está controlado por múltiples orgánulos: el retículo endoplasmático, el aparato de Golgi y el sistema endolisosomal que a su vez engloba un conjunto de compartimentos membranosos intracelulares: endosomas tempranos, endosomas de reciclaje, endosomas tardíos, cuerpos multivesiculares y lisosomas (Figura 2). Al sistema endolisosomal se le atribuyen funciones clásicas como son la degradación de componentes celulares y el transporte y reciclaje de proteínas de membrana (Huotari and Helenius, 2011). Sin embargo, a estas funciones se han ido añadiendo otras, como son la formación de exosomas y la reparación de la membrana plasmática. Todos estos orgánulos son enormemente dinámicos y están interconectados entre sí por medio de vesículas que tendrán distinta composición proteica en función del compartimento emisor y el receptor. Lo más habitual es diferenciarlas a través del tipo de proteína Rab que contienen (Bhain and Roy, 2014). Las Rabs son GTPasas ancladas a la cara citosólica de la membrana encargadas de modular el correcto tráfico vesicular, así como su formación y fusión (Schwartz et al., 2007). Estas proteínas a su vez crean dominios en las membranas endosomales a través del reclutamiento de otras proteínas efectoras y mediante la inclusión y síntesis de especies lipídicas determinadas tales como fosfatidilinositol-3-fosfato (PI3P) (Bhain and Roy, 2014; Wandinger-Ness and Zerial, 2014). La célula es capaz de internalizar diferentes moléculas y fragmentos de membrana mediante endocitosis. Las vesículas endocíticas viajan y liberan su cargo en endosomas tempranos. Los endosomas maduran a endosomas tardíos o cuerpos

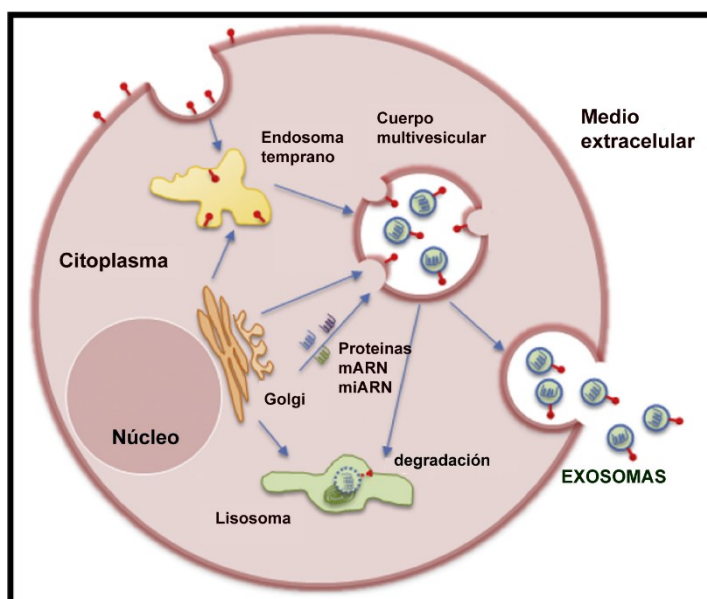


Figura 2. Sistema endolisosomal.

Los endosomas tempranos engloban macromoléculas del medio extracelular o de la membrana plasmática que serán procesadas o retornadas al exterior (reciclaje). Los cuerpos multivesiculares son endosomas tardíos con multitud de vesículas intraluminales en su interior. El destino de estos orgánulos puede ser fusionarse bien con lisosomas para degradar su contenido o bien con la membrana plasmática para secretar dichas vesículas intraluminales en forma de exosomas. Por otro lado, el aparato de Golgi establece conexiones bidireccionales con toda la red de compartimentos intracelulares. Modificado de (Huber et al. 2013)

multivesiculares (MVB), que reciben su nombre por contener múltiples vesículas intraluminales formadas a partir de invaginaciones de la membrana exterior del endosoma (Hanson and Cashikar, 2012). Durante la maduración de los endosomas tempranos, la célula podrá decidir si sus componentes serán reciclados a la membrana, a través de endosomas de reciclaje o serán destruidos por acción de los lisosomas para lo que madurarán en cuerpos multivesiculares y posteriormente en endosomas tardíos, que son un segundo punto de control sobre el reciclaje del contenido o su degradación al fusionarse con los lisosomas para degradar su contenido. Los cuerpos multivesiculares también pueden optar por fusionarse con la membrana plasmática y liberar su contenido al exterior celular en forma de vesículas extracelulares denominadas exosomas. Estas vesículas tienen un tamaño entre 30 y 150 nm y una composición lipídica y proteica bastante definida. Los mecanismos de selección del cargo de los exosomas dependen tanto del complejo ESCRT como de otros mecanismos de formación de microdominios de membrana, como son las tetraspaninas o determinados lípidos como la ceramida, esfingolípidos con ácidos grasos de cadena larga, fosfatidilserina y fosfolípidos con ácidos grasos insaturados (Figura 3) (Skotland et al., 2019).

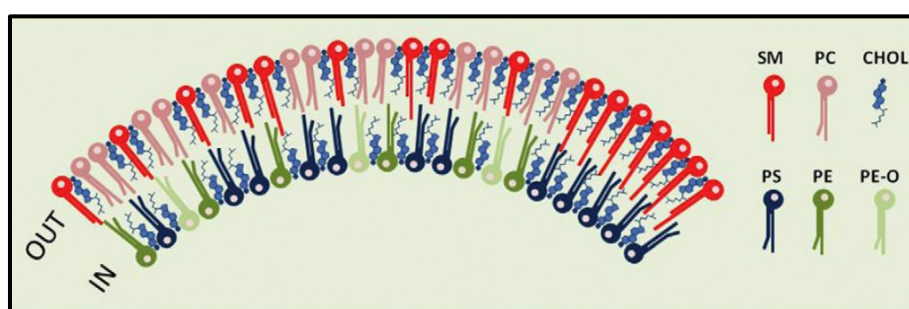


Figura 3. Membrana exosomal. Esquema de la composición lipídica típica de un exosoma. Estas exovesículas poseen un alto contenido en colesterol y esfingolípidos formados por ácidos grasos de cadena muy larga. La fosfatidil etanolamina con carga positiva se encuentra en la membrana interna mientras que la fosfatidilcolina se encuentra en la parte externa. Chol, colesterol; PC, fosfatidilcolina; PE, fosfatidiletanolamina; PE O/P, PE eters (alquil o alquenil); PS, fosfatidilserina; SM, esfingomielina. Modificado de (Skotland et al., 2019)

I.3.1. CONEXIONES ENTRE EL SISTEMA ENDOLISOSOMAL, EL APARATO DE GOLGI Y LA MITOCONDRIA

El sistema endolisosomal establece conexiones con el aparato de Golgi, necesarias para el transporte de las enzimas hidrolíticas lisosomales y para retirar material endosomal durante el proceso de maduración. Dichos contactos por tanto ocurren a nivel de endosomas tempranos, tardíos y lisosomas (Huotari and Helenius, 2011).

Existen evidencias de que las mitocondrias también son capaces de establecer conexiones con el sistema endosomal a través de vesículas dirigidas a los MVB y cuya función principal parece ser la de desprenderse de material dañado y mantener la integridad mitocondrial. Este material en último

término, será degradado por el lisosoma (Soto-Heredero et al., 2017). Por otro lado la membrana mitocondrial establece contactos con la membrana del retículo endoplásmico por medio de proteínas especializadas, y cuya función principal es la transferencia de componentes entre ambos compartimentos, como por ejemplo el calcio (van Vliet et al., 2014). Estas regiones están enriquecidas en canales de calcio, quinasas y proteínas implicadas en la síntesis de fosfolípidos enriquecidos en estos orgánulos, como la fosfatidilserina entre otros (Rowland and Voeltz, 2012).

La mitocondria también es capaz de establecer contactos directamente con la membrana del lisosoma (Audano et al., 2018). Ambos orgánulos son tremendamente importantes en la energética celular, por lo tanto, es importante que existan conexiones entre ambos; hay evidencias de que los lisosomas son capaces de detectar el ratio $NAD^+/NADH$ celular y adaptar su biogénesis al estado metabólico celular. De manera que la inhibición transitoria con rotenona u otro desacoplante de la cadena respiratoria mitocondrial, genera un aumento transitorio en la biogénesis lisosomal (Audano et al., 2018). Sin embargo, defectos genéticos mitocondriales que alteran la energética celular de forma persistente, desencadenan una disminución de su biogénesis, así como defectos en su funcionamiento y en la fusión con autofagosomas (Baixauli et al., 2015).

I.3.2. SISTEMA ENDOSOMAL Y AUTOFAGIA

El sistema endolisosomal también está íntimamente relacionado con la autofagia. La autofagia es el proceso de degradación de componentes celulares para mantener la homeostasis. Este proceso comienza con la formación del autofagosoma que es la membrana encargada de englobar aquellos elementos que serán degradados (Figura 4). Actualmente existen múltiples evidencias de que el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi, la mitocondria, la membrana plasmática así como los endosomas de reciclaje son una fuente de membrana para la formación del autofagosoma y no se puede descartar que otros orgánulos lo sean (Bissa and Deretic, 2018). Además hay estudios que ponen de manifiesto el posible papel que puede tener la ruta secretora en este proceso, ya que muchas proteínas son compartidas por ambos, como es el caso de VAMP3 entre otros (Davis et al., 2017).

Existe otro mecanismo de eliminación de componentes intracelulares denominado autofagia secretora, que consiste en la liberación al exterior de la célula de vesículas intracelulares como lisosomas o microvesículas. Inicialmente se pensó que estas estructuras contendrían solamente productos aberrantes como proteínas mal plegadas, sin embargo se ha demostrado que son capaces de liberar proteínas funcionales con capacidad de señalización (Schwartz et al., 2007; Zahoor and Farhan, 2018). La liberación de exosomas y la autofagia son dos procesos íntimamente ligados (Figura 5A). Hay trabajos que muestran que al bloquear la liberación de exosomas los cuerpos multivesiculares que los contienen son redirigidos y llevados a degradación (Xu et al., 2018). De forma análoga, la inhibición de la autofagia o del correcto funcionamiento de los

lisosomas puede desencadenar un aumento de la liberación de exosomas (Figura 5B), mientras que al incrementar el estrés celular puede haber un aumento simultáneo de la autofagia y de la liberación de exosomas como se ha observado en células de cáncer de próstata (Xu et al., 2018). Por todo ello se postula que el sistema endosomal es un nodo clave en la regulación metabólica de la célula.

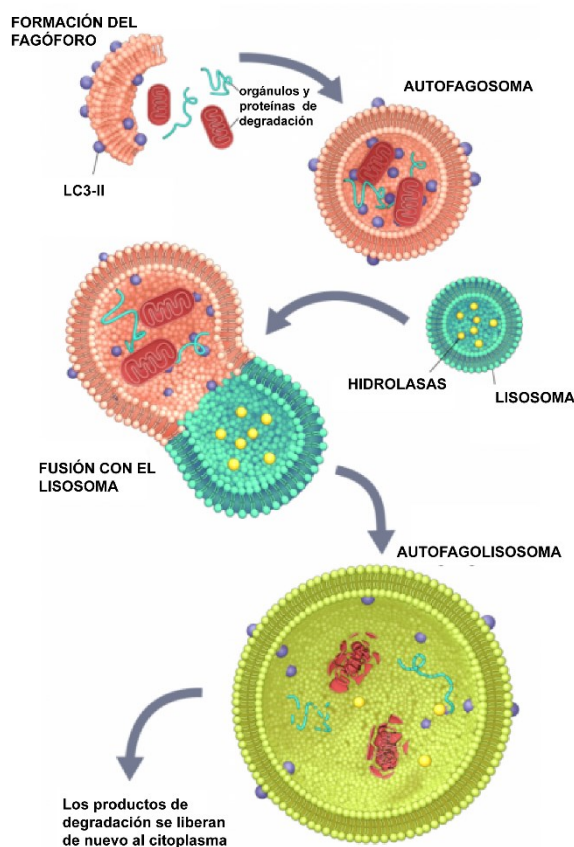


Figura 4. Macroautofagia. Este proceso comienza con la formación del fagóforo, una doble membrana que se expande para dar lugar al autofagosoma. Esta membrana parece que puede derivar de otros orgánulos, principalmente del retículo endoplásmico, pero también de endosomas, mitocondrias e incluso de la membrana plasmática. En su interior se incluye el material celular que va a ser degradado al fusionarse con lisosomas, que además de tener un pH ácido contienen hidrolasas. La fusión de ambos compartimentos recibe el nombre de autofagolisosoma. En el proceso de expansión del autofagosoma se reclutan múltiples proteínas necesarias para el proceso, entre ellas LC3 (LC3-I) que se expresa de manera ubicua y que se acopla a PE para anclarse a la membrana del autofagosoma (LC3-II). Esta proteína se emplea como marcador para monitorizar la autofagia, ya que mediante western-blot la lipidación supone un incremento en la movilidad electroforética. Este tipo de autofagia durante mucho tiempo se ha considerado no selectiva, sin embargo, cada vez está más aceptado que deben existir proteínas adaptadoras capaces de dotar de selectividad al proceso.

I.3.3. PAPEL DE LAS TETRASPANINAS EN LOS COMPARTIMENTOS ENDOSOMALES

El sistema de endomembranas está enriquecido en tetraspaninas, especialmente CD63, CD9 o CD81. Aunque no se han descrito alteraciones fundamentales en su biogénesis y mantenimiento tras la delección del gen de diversas tetraspaninas en animales experimentales (a excepción de CD63 en las células de melanoma donde sí parece ser importante para la formación de los melanosomas), múltiples mecanismos de compensación entre diversos miembros de esta superfamilia podrían explicar esta falta de efecto funcional. Sí que existen evidencias del control por parte de las tetraspaninas del transporte de otras proteínas a lo largo de los distintos compartimentos endolisosomales. Existen múltiples ejemplos ya descritos, en los que por ejemplo CD63 estimula la internalización de H^+,K^+ -ATPase, CD37 regula la endocitosis de Dectina-I desde

la superficie, o CD9 la internalización de MHC-II (Duffield et al., 2003; Meyer-Wentrup et al., 2007; Rocha-Perugini et al., 2017a) o evita la degradación de la glicoproteína 130 receptora de IL-6 (gp130) al estabilizarla en la membrana y evitar su ubiquitinación (Shi et al., 2017). También pueden interactuar con receptores de membrana tipo GPCRs o EGFR donde su actividad está más enfocada a modular su activación o inactivación, estabilidad en la membrana y afinidad por el sustrato (Termini and Gillette, 2017)

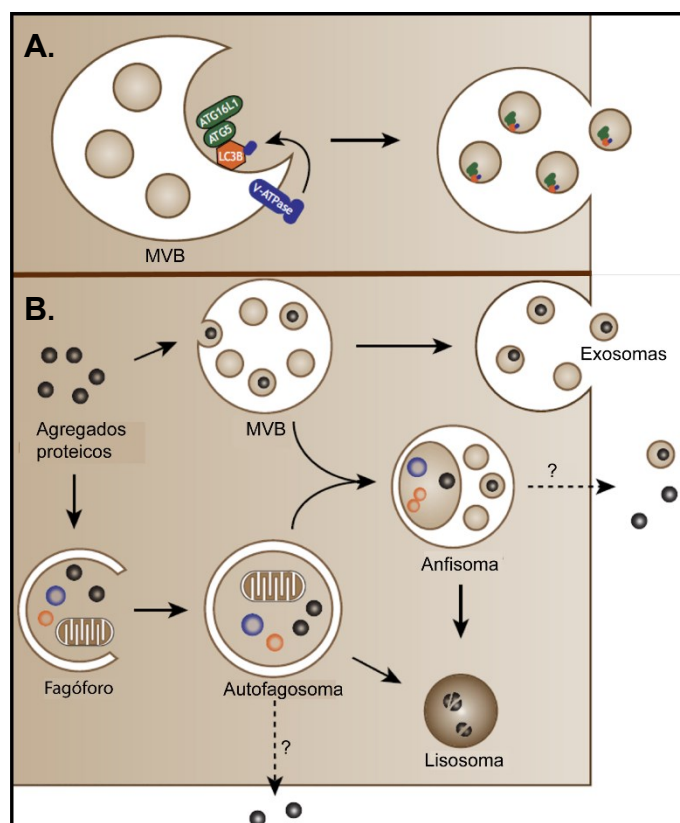


Figura 5. Existe una relación muy íntima entre la autofagia y la secreción de exosomas. A. Hay datos que muestran que elementos que participan en la autofagia lo hacen también en la biogénesis de exosomas. Los complejos ATG5-ATG16 que típicamente participan en la formación de los autofagosomas se localizan en cuerpos multivesiculares (MVB) y median la lipidación no canónica de LC3. Esto facilita la disociación de la V-ATPasa, impide la acidificación del MVB y su degradación por el lisosoma. **B.** Existen múltiples tipos de autofagia en función de su especificidad, En la figura se muestra un ejemplo de agregados de proteínas aberrantes típicos de enfermedades neurodegenerativas, que pueden ser secuestrados en MVB y degradados, o externalizados como exosomas, cuando aparecen disfunciones en la autofagia. Modificado de (Xu et al., 2018)

1.3.3.1 Las tetraspaninas son componentes de vesículas extracelulares

En los últimos años, el interés por las tetraspaninas se ha incrementado notablemente debido a que son componentes esenciales y se emplean como marcadores de vesículas extracelulares (EVs), tanto microvesículas como exosomas. CD9, CD63, CD37, CD81, o CD82 están especialmente enriquecidos en exosomas, mientras que en el caso de las microvesículas CD9 y CD81 son los más abundantes (Andreu and Yanez-Mo, 2014). Actualmente se utilizan principalmente como marcadores de estas estructuras, pero a medida que avanza el estudio de su biología, parece evidente que las tetraspaninas tienen también un papel importante en la formación e inclusión del cargo dentro de los exosomas. Así por ejemplo, se ha descrito que tanto en linfocitos B, como en las vesículas que secretan, MHC-I y MHC-II aparecen asociados a CD9 y CD81 (Saunderson et al., 2008), mientras que la delección de CD81 afecta al reclutamiento selectivo a exovesículas de un

conjunto de moléculas que se asocian a esta tetraspanina (Brzowski et al., 2018; Perez-Hernandez et al., 2013). También existen evidencias que indican que podrían modular la cantidad de exosomas liberados por la célula; así encontramos trabajos donde al eliminar el gen de CD9 o CD63, disminuye drásticamente la secreción (Chairoungdua et al., 2010; Hurwitz et al., 2018), aunque en otros casos no se observan diferencias (Brzowski et al., 2018), lo cual sugeriría un efecto dependiente del tipo celular.

En esta tesis doctoral nos planteamos el estudio a nivel celular de la función de la tetraspanina CD9 en los procesos de formación y secreción de exosomas y de regulación de la maduración y destino de orgánulos del complejo endolisosomal.

I.4. PAPEL DE LOS DOMINIOS RICOS EN TETRASPANINAS EN INVASIÓN Y METÁSTASIS

Los dominios ricos en tetraspaninas son importantes también en los procesos de invasión y metástasis. Dependiendo del tipo celular y de la tetraspanina, podrán ser promotoras de invasividad o supresoras de tumores.

El papel de las tetraspaninas en el proceso tumoral dependerá fundamentalmente de las proteínas con las que establezca su asociación y será diferente según el tipo celular (Hemler, 2014) pero van a regular procesos de adhesión al asociarse con integrinas, o uniones célula-célula como es el caso de TSPAN8 con EPCAM y CD44. De manera general, las tetraspaninas participan en la formación de estructuras protrusivas empleadas por la célula para invadir el tejido (Bari et al., 2011; Zukauskas et al., 2011). Pero también participan regulando la activación de cascadas de señalización intracelular en las células tumorales, así por ejemplo CD9 puede activar la señalización a través de p38MAPK y JNK para aumentar en último término la expresión de la metaloproteasa MMP-2 (Hong et al., 2005). Otra forma en la que pueden promover el crecimiento tumoral, es facilitando la angiogénesis o modulando la integridad y permeabilidad de los vasos sanguíneos donde las integrinas y su relación con las tetraspaninas vuelve a jugar un papel importante (Detchokul et al., 2014).

Son muchos los ejemplos de metaloproteasas reguladas por tetraspaninas, algunos ejemplos incluyen a la subfamilia TSPANC8 (con 8 cisteínas en su dominio EC2) o TSPAN 12 que promueven la maduración y la actividad de ADAM-10, capaz de procesar diferentes proteínas de membrana desencadenando respuestas protumorales. CD9 es un regulador de la actividad metaloproteasa de ADAM-17 (Gutierrez-Lopez et al., 2011) y CD151 es capaz de aumentar la expresión de la metaloproteasa de matriz 9 (MMP-9) y en células endoteliales se asocia y regula la actividad de MT1-MMP (Yanez-Mo et al., 2008).

I.4.1. METALOPROTEINASA DE MEMBRANA TIPO I: MTI-MMP

La ruptura de matriz extracelular es llevada a cabo por un grupo de proteínas llamadas Metaloproteinasas de matriz (MMP). Dentro de este grupo hay multitud de miembros, casi todos secretados al espacio extracelular, aunque algunas pueden ser expresadas como proteínas transmembrana, como es el caso de MTI-MMP, también denominada MMP-14. MTI-MMP tiene una gran relevancia en angiogénesis y en cáncer (Poincloux et al., 2009). Muchos trabajos muestran una fuerte correlación entre los niveles de expresión MTI-MMP y la capacidad invasiva del tumor (Egeblad and Werb, 2002; Rosse et al., 2014). MTI-MMP fue inicialmente descrita como una enzima con capacidad gelatinolítica (Imai et al., 1996), pero con el tiempo se fueron describiendo muchos más sustratos, entre ellos algunos componentes de la matriz extracelular, como proteoglicanos, fibronectina, vitronectina y laminina-I así como α 1-inhibidor de la proteínasa y α 2-macroglobulina (Ohuchi et al., 1997). Uno de sus sustratos mejor estudiados es otra metaloproteínasa, pro-MMP2, que tiene que sufrir un corte proteolítico para ser enzimáticamente activa (Itoh et al., 2006). Este mecanismo de activación es compartido por MMP-13 (Knauper et al., 2002). Como MTI-MMP se expresa en la superficie celular, algunas proteínas transmembrana son susceptibles de ser proteolizadas por ella como por ejemplo CD44 (Kajita et al., 2001) sindecano (Endo et al., 2003), la integrina α v (Ratnikov et al., 2002), la enzima transglutaminasa (Belkin et al., 2001) o KISS-1 (Takino et al., 2003a) entre otros.

I.4.1.1. Mecanismos que regulan la actividad de MTI-MMP

Debido a la gran versatilidad de sustratos procesados por esta enzima y los bajos niveles de expresión necesarios para detectar una alta actividad, MTI-MMP tiene que estar sometida a una regulación muy precisa a muchos niveles: expresión génica o transcripcional, mecanismos que regulan su endocitosis, homodimerización, autoprocesamiento, inhibidores como TIMP-2, modificaciones postraduccionales y su localización en estructuras especializadas (Gingras and Beliveau, 2010; Itoh and Seiki, 2004).

La dimerización de MTI-MMP es fundamental para poder actuar sobre dos de sus sustratos: el colágeno y pro-MMP2. El autoprocesamiento catalítico de MTI-MMP también requiere de al menos dos moléculas de MTI-MMP lo suficientemente próximas. El resultado son dos fragmentos inactivos, uno de 44 KDa y otro soluble de 18 KDa. El dominio de 18 KDa comprende el dominio catalítico, aunque no se le ha podido asignar ninguna función o actividad. El fragmento más grande está formado por la región horquilla, el dominio hemopexina, la región transmembrana y el dominio citosólico y algunos autores le atribuyen la capacidad de ejercer una regulación negativa sobre la forma activa de MTI-MMP por un simple mecanismo de competición en la dimerización (Tam et al., 2002). Otros estudios sin embargo, mostraron que células que expresaban la especie de 44KDa tenían una tasa de crecimiento mayor en matrices tridimensionales de colágeno, así

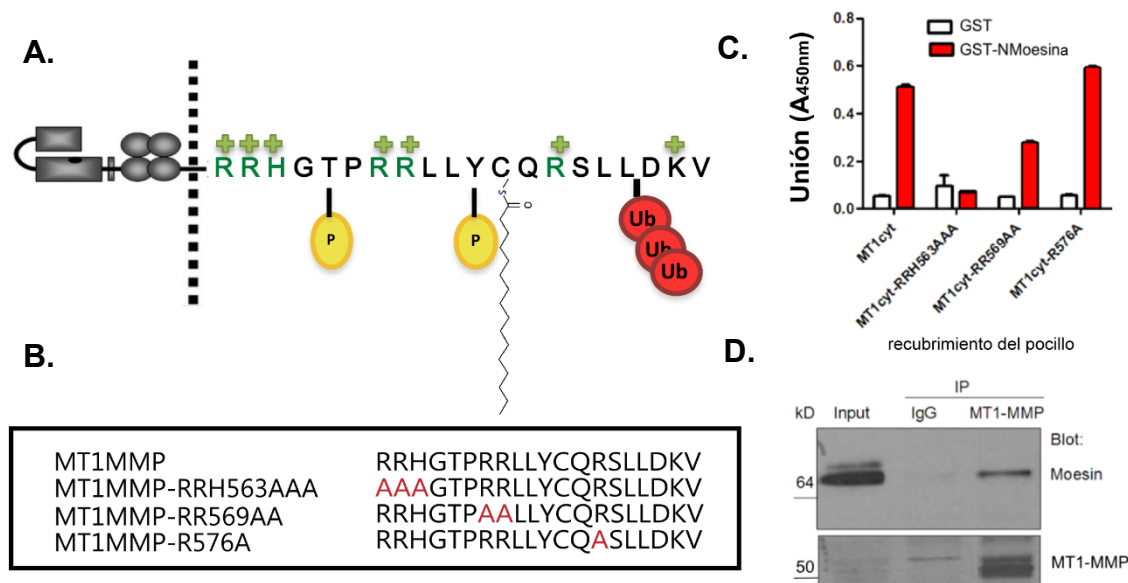


Figura 6. El extremo carboxilo terminal de MTI-MMP interactúa con ERM. **A.** Esquema de MTI-MMP con la secuencia de aminoácidos del extremo carboxilo terminal. En verde se representan los aminoácidos cargados positivamente que fueron considerados para interactuar con ERM. En amarillo se indican los aminoácidos susceptibles de fosforilación, palmitoilación y ub, ubiquitinación, modificaciones postraduccionales que contribuyen a la regulación de la actividad de MTI-MMP. **B.** Secuencias carboxilo terminal resultantes al mutar los aminoácidos señalados en verde (A). **C.** Pocillos recubiertos de estreptavidina se incubaron con péptidos portadores de la secuencia citosólica de MTI-MMP salvaje y de cada una de las mutaciones. Una vez unidos, se pusieron en contacto con péptidos acoplados a GST con la secuencia amino-terminal de la moesina. La unión entre ambas fue detectada mediante anticuerpos frente a GST acoplados a HRP. **D.** La interacción entre MTI-MMP y moesina fue detectada en células endoteliales (HUVEC) mediante coimmunoprecipitación usando anticuerpos frente a MTI-MMP o IgG como control. Los resultados se analizaron mediante electroforesis en condiciones reductoras. Datos no publicados del grupo de la Dra AG Arroyo.

como una mayor activación de pro-MMP2 (Cho et al., 2008). Como las regiones citosólicas de ambas especies (autoprocesada e intacta) son exactamente iguales, la maquinaria encargada de su internalización no puede discriminar entre ambas, de forma que cuanto mayor sea la cantidad del fragmento de 44kDa, menos MTI-MMP activa es retirada de la membrana (Hernandez-Barrantes et al., 2000). El dominio C-terminal citosólico de MTI-MMP contiene múltiples secuencias para la interacción con otras proteínas, como FHL-1 (Sakamoto and Seiki, 2010) o radixin (Terawaki et al., 2015).

La endocitosis de MTI-MMP está regulada por la fosforilación de dos aminoácidos diferentes en el dominio citosólico (Thr567 o Tyr573), dependiendo de cuál sea la ruta de señalización implicada (Figura 6A). Recientemente se ha demostrado que en los invadopodios, que son estructuras protrusivas formados por las células durante procesos de invasión, se secretan activamente exosomas enriquecidos en MTI-MMP y esta secreción en exovesículas es importante en la capacidad invasiva (Hakulinen et al., 2008; Watanabe et al., 2013).

La inclusión de MTI-MMP en dominios ricos en tetraspaninas también regula su función. En células endoteliales, CD151 actúa como enlace entre la metaloproteasa y la integrina $\alpha 3 \beta 1$ controlando

tanto su actividad, como su localización en uniones laterales (Figura 7A) (Yanez-Mo et al., 2008). CD9 interacciona de forma débil con MT1-MMP en células tumorales y regula positivamente su actividad en combinación con otras tetraspaninas (Lafleur et al., 2009). CD63 controla los niveles de expresión de MT1-MMP al favorecer su degradación por la vía lisosomal (Takino et al., 2003b). Por tanto, la localización, exocitosis y reciclaje de MT1-MMP podrían estar reguladas tanto por su dominio como por su inclusión en microdominios ricos en tetraspaninas.

1.4.2. ERM

El término ERM proviene de las iniciales de los tres miembros que componen esta familia, ezrina, radixina y moesina, con características estructurales y funcionales comunes y que actúan como enlace entre proteínas transmembrana y el citoesqueleto de actina (McClatchey, 2014). Poseen un dominio N-terminal (FERM) capaz de interactuar con proteínas transmembrana, seguido de una región con estructura en α -hélice, y el dominio C-terminal (C-ERMAD; C-terminal ERM association domain) con afinidad por actina. Cuando las ERM están en estado inactivo, el dominio FERM interactúa con el dominio C-ERMAD y se enmascara el sitio de unión a actina (Figura 7B). Para ser activas, han de interactuar con fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato en la membrana plasmática, momento en el cual serán accesibles a quinasas que fosforilarán una treonina del dominio C-terminal, exponiendo el sitio de unión a actina (Figura 7C) (Ivetic and Ridley, 2004).

Las ERMs interactúan con múltiples proteínas de la superficie celular, como CD44 (Tsukita et al., 1994), CD43 (Cannon et al., 2011) o ICAM3 (Serrador et al., 1997) o con tetraspaninas, como CD81 y CD9, de forma directa o indirectamente a través de EWI-2 o EWI-F (Sala-Valdes et al., 2006). Por tanto, estas proteínas contribuyen a crear o estabilizar dominios especializados en la

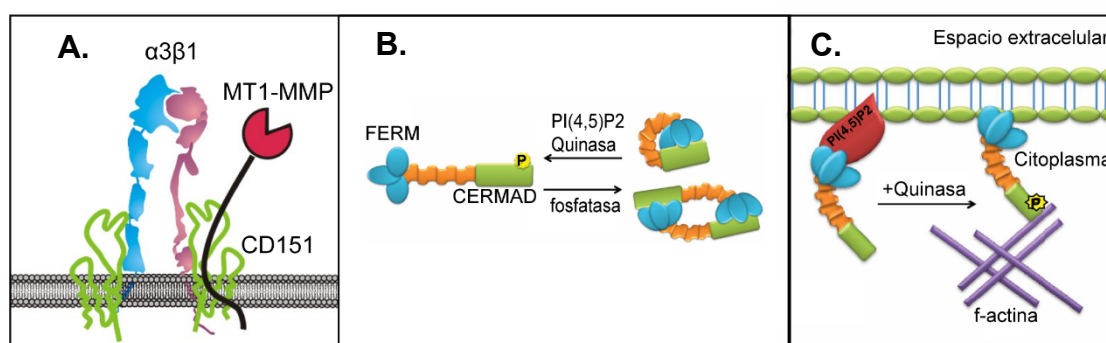


Figura 7. MT1-MMP y ERMs se localizan en TEMS. A. Complejo ternario formado por MT1-MMP la integrina $\alpha 3 \beta 1$ y CD151 que actúa como enlace entre ambas en células endoteliales, donde regula su actividad colagenolítica. **B.** Las proteínas ERM en su forma inactiva se encuentran plegadas, cuando se unen a PI (4,5)P₂ en la membrana plasmática, hay quinasas que fosforilan residuos conservados de treonina, permitiendo que el dominio de interacción con actina se exponga (verde). Sin embargo, cuando se desfosforila, adquiere una conformación cerrada que bloquea el dominio intramolecularmente o intermolecularmente dando lugar a monómeros o dímeros inactivos respectivamente. Extremo amino terminal (FERM), extremo carboxilo terminal (CERMAD) **C.** Cuando se unen a PI(4,5)P₂ de la membrana a través del dominio amino-terminal se fosforilan e interactúan con el citoesqueleto de actina y con proteínas de membrana. Tras esto regularán la activación de cascadas de señalización directamente o a través de otras proteínas. Modificado de Tejera et al. 2013 y (Clucas and Valderrama, 2014)

membrana reclutando receptores y otras proteínas y son claves en procesos de señalización (Fehon et al., 2010). Se ha demostrado in vitro que radixina podía interactuar con la cola citosólica de MT1-MMP a la vez que con uno de sus sustratos, CD44 (Terawaki et al., 2015). MT1-MMP posee aminoácidos cargados positivamente en su región C-terminal que la harían susceptible de interactuar con ERMs. Datos no publicados del grupo de la Dra. Alicia García Arroyo soportan la implicación de dos grupos de aminoácidos básicos localizados en este dominio como los responsables de la interacción con moesina, mediante ensayos de interacción in vitro utilizando péptidos con la secuencia salvaje de dicho dominio carboxilo terminal, o mutantes que sustituirían por alanina los grupos de residuos básicos, con la secuencia amino terminal de la moesina acoplada a GST (Figura 6B y C); o mediante co-inmunoprecipitación de las moléculas endógenas en células HUVEC (Figura 6D).

En esta tesis doctoral nos planteamos por tanto, dilucidar la contribución relativa de las ERMs y de las tetraspaninas a la regulación de la actividad de MT1-MMP.

2.

Objetivos

1. Estudio de la interacción entre SAMHD1 y CD81 y su importancia en la replicación del virus de inmunodeficiencia humana I (VIH-I).
2. Caracterización del papel de CD9 en los mecanismos de regulación del sistema de endomembranas celular y en la biogénesis de exosomas.
3. Análisis de la relevancia funcional de la asociación de MT1-MMP con ERM5 o de su inclusión en TEMs y su papel en su distribución subcelular y su actividad enzimática.

3.

Materiales y métodos

3.1. CULTIVOS CELULARES

- ◆ **Células SUM-I59PT:** línea celular epitelial de cáncer anaplásico de mama, fue cultivada en DMEM F-12 suplementado con 5% de suero de ternera fetal (STF), 1% de penicilina/estreptomicina, aminoácidos no esenciales, hidrocortisona (1µg/ml) e insulina (5µg/ml).
- ◆ **Células MCF-7:** línea celular epitelial humana de adenocarcinoma mamario, fue cultivada en medio DMEM, suplementado con 10% de STF, 1% de penicilina/estreptomicina, y 0.01mg/ml de insulina.
- ◆ **Células Hela P4 MAGI CCR5 (Hela-R5):** línea celular de cáncer cérvico uterino, modificada para la expresión estable el correceptor CCR5 del virus VIH-1. Se cultivó en DMEM suplementado con un 10% de STF, 1% de penicilina/estreptomicina, 2mM de glutamina y 1µg/ml de puromicina para mantener la presión selectiva sobre la expresión de CCR5.
- ◆ **Jurkat J77 clon 20:** línea celular inmortalizada obtenida a partir de los linfocitos T de un paciente con leucemia linfoblástica. Estas células se crecieron en medio RPMI suplementado con un 10% de STF y 1% de penicilina/estreptomicina.
- ◆ **Células Sk-Mel-147 y Sk-mel-103:** ambas son líneas celulares de melanoma humano. Se cultivaron en medio DMEM suplementado con un 10% de STF, 1% penicilina/estreptomicina y 2 mM de glutamina.
- ◆ **Linfoblastos humanos** se aislaron de sangre periférica de donantes sanos procedente del Centro de transfusiones de la comunidad de Madrid, mediante centrifugación por gradiente de densidad de ficol. Tras una centrifugación a 1800 rpm durante 30 min se obtuvo un anillo de células que se recuperó y se lavó varias veces con PBS. Para eliminar los monocitos de la mezcla celular se dejaron adherir en placa durante 30 min a 37 °C. Transcurrido este tiempo, las células que permanecían en suspensión se cultivaron en RPMI-1640 suplementado con un 10% de STF y se activaron en presencia de PHA (fitohemaglutinina) (1µg/ml). En algunos casos la activación de estas células se hizo utilizando enterotoxina E de *Staphylococcus* (SEE) (0.1ng/ml), en cuyo caso no se eliminaron los monocitos del cultivo ya que son requeridos para su presentación. Tras dos días de activación en ambos casos las células se cultivaron en presencia de interleuquina 2 (IL-2, 50 U/ml).

3.2. REACTIVOS

◆ Péptidos bloqueantes

Para bloquear la actividad intracelular de la tetraspanina CD81 o CD9 se diseñaron péptidos que contienen la secuencia del extremo carboxilo terminal (CD81pep) o la secuencia carboxilo

terminal de CD9 (CD9_{pep}), LifeTein (South Plainfield). Estos péptidos son internalizados por la célula. Como control se empleó una secuencia aleatoria basada en la secuencia de CD81 (scramble). Todos los péptidos se sintetizó una versión marcada fluorescentemente en el extremo amino terminal con tetrametilrodamina (TAMRA) que permite su visualización por microscopía de fluorescencia o citometría, y una versión sin marcar.

- ◆ CD81_{pep}: **RRRRRRRCCGIRNSSVY**
- ◆ CD9_{pep}: **RRRRRRRCCAIRRNREMV**
- ◆ Scramble: **RRRRRRRYSVNICRGCS**

El tratamiento consiste en administrar directamente al cultivo celular una concentración de 250 μ M de péptido, cada dos días durante una semana.

◆ **Sondas fluorescentes**

○ **Lysotracker green**

El marcaje de lisosomas con Lysotracker Green (Invitrogen) se hizo siguiendo las instrucciones del fabricante. Para las células Skmel-147 se añadió una concentración de 75nM en medio de cultivo sin suero durante 10 min a 37 °C. Transcurrido ese tiempo se lavó con PBS y se añadió medio completo para su visualización mediante microscopía de fluorescencia a 37°C 5%CO₂. Para su análisis por citometría de flujo, las células se tripsinizaron y resuspendieron en PBS.

○ **Mitotracker green**

Esta sonda se utiliza para el marcaje específico de mitocondrias y se llevó a cabo siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante. Se añadió al cultivo celular 100nM de Mitotracker green (Invitrogen) en medio sin suero durante 1 hora a 37 °C. Transcurrido ese tiempo las células se lavaron con PBS y se tripsinizaron y resuspendieron en PBS para analizarlas por citometría de flujo.

◆ **Inhibidores**

Se emplearon diferentes inhibidores de los sistemas de degradación celular que se añadieron al medio de cultivo durante el tiempo indicado en cada figura: MG-132 inhibidor del proteasoma (Sigma), cloruro de amonio (NH₄Cl, Sigma) inhibidor del pH ácido del lisosoma o Bafilomicina A1 (Sigma) inhibidor de la bomba de protones lisosomal.

3.3. ANTICUERPOS

Se listan a continuación los anticuerpos utilizados a lo largo de esta tesis

ANTICUERPO	ORIGEN	DESCRIPCIÓN/COMPAÑÍA
GFP	Conejo	Living Colors, 632592
ERM	Conejo	90.3 cedido por Dr. H Furthmayr, Stanford, USA
phospho-ERM	Cabra	Cell Signaling Technology
Tubulina	Ratón	Sigma
EEA1	Cabra	Santa Cruz
LAMP1	Ratón	Abcam
CD63	Ratón	Clon Tea3/18 y Tea3/10
CD81	Ratón	5A6 producido por Dr. S. Levy, Stanford, USA
CD9	Ratón	Clon VJ1/20
CD151	Ratón	Clon LIA1/1
CD59	Ratón	Clon VJ1/12
CD4	Ratón	Clon HP2/6
CD147	Ratón	Clon VJ1/9
HGS	Conejo	Abcam
Colágeno	Ratón	Sigma
Cofilina	Ratón	Abcam
SAMHD1	Ratón	Sigma
SAMHD1	Conejo	Sigma
SAMHD1	Conejo	ProsCi
phosphoThr592		
LC3	Conejo	MBL international
LC3	Ratón	Clon 4E12, MBL international
p62	Conejo	Cell Signaling Technology
PI50glued	Ratón	BD biosciences

3.4. COINMUNOPRECIPITACIÓN

Para realizar la inmunoprecipitación en linfoblastos T, 20 millones de células se lisaron con NP-40 al 0.5% en PBS en presencia de inhibidores de proteasas y fosfatasa. Los lisados se preclarearon mediante incubación con esferas de sefarosa acoplada a proteína G (G-sefarosa) durante dos horas a 4°C. Después se incubaron otras 2 horas con las esferas de sefarosa en las que previamente se habían inmovilizado anticuerpos anti-CD81 (5A6) o anti-SAMHDI. Tras varios lavados, los complejos proteína-anticuerpo fueron eluidos con Laemmli y analizados por western-blot.

3.5. PULL DOWN

30 nmoles de péptidos biotinilados en el extremo amino (Ray Biotech) se conjugaron con 40 µl de bolas de estreptavidina sefarosa (GE Healthcare).

CD151, biotina-SGSG-YRSLKLEHY

CD81, biotina-SGSG-CCGIRNSSVY

CD9, biotina-SGSG-CCAIRRNREMV

Las células se lavaron con PBS frío y se lisaron con NP-40 al 1% en PBS en presencia de inhibidores de fosfatasa y proteasas (Complete, PhosSTOP; Roche). Los lisados se preclarearon incubandolos con esferas de estreptavidina-sefarosa durante dos horas a 4°C, y después se precipitaron con los péptidos biotinilados acoplados a bolas de sefarosa. Tras varios lavados con PBS, los complejos fueron eluidos con Laemmli y analizados por western-blot.

3.6. WESTERN BLOT

En todos los casos, las células fueron lisadas en PBS con Triton X-100 al 1% con inhibidores de proteasas y fosfatasa. Los geles usados para analizar MT1-MMP contienen un 8% de acrilamida en presencia de SDS en condiciones reductoras. En el resto de los ensayos se utilizaron geles al 10-12% de acrilamida. Siempre que se analizó la presencia de tetraspaninas se usaron condiciones no reductoras en la electroforesis.

3.7. TRANSFECCIÓN DE ADN O siARN

La transfección de ADN se llevó a cabo mediante electroporación (Gene Pulser II, BIORAD). Las condiciones se ajustaron para cada línea celular teniendo en cuenta la eficiencia de transfección y el porcentaje de supervivencia. Así pues, en el caso de la línea celular MCF-7, por cada punto de transfección se emplearon 6 millones de células y 20 µg de ADN que se resuspendieron en un volumen final de 200 µl de Optimem. Las condiciones de electroporación se fijaron a 150V y 950µF. En el caso de las líneas celulares SUM-159, Hela-R5, Skmel-103 y Skmel-147 para cada

punto de transfección se emplearon 3 millones de células en 200 µl de medio sin suero, 37.5 mM de NaCl y 20 µg de ADN a 200V y 975µF.

Para el silenciamiento de CD81, linfoblastos humanos fueron sometidos a dos pulsos de transfección con una separación de 72 horas entre ellos. Se utilizaron 20 millones de células por punto de transfección, 1 µM de siARN en 400 µl de Optimem a 32 ms 240 V.

3.8. CONSTRUCCIONES

◆ CD81

Se emplearon dos construcciones de CD81, una acoplada a GFP y la versión truncada de CD81 (CD81-ΔCyt-GFP) sin el extremo carboxilo terminal. Como control se usó un plásmido que únicamente expresaba GFP. Ambas fueron previamente descritas (Tejera et al., 2013).

◆ Mutagénesis de MTI-MMP

Para generar las mutaciones en la cola citosólica de MTI-MMP-mGFP se utilizó el kit de mutagénesis dirigida de Agilent Technologies (Quick Change Lightning site directed mutagenesis Kit). La secuencia de los oligos utilizados se diseñó teniendo en cuenta los parámetros indicados en el kit. Las secuencias resultantes fueron las siguientes:

MTI-MMP-RRH563AAA

5' CTTGCAGTCTTCTTCTTCGCAGCCGCT**GGGACCCCCAGGCGAC 3'**

5' GTCGCCTGGGGTCCCAGCGGCTGCGAAGAAGAAGACTGCAAG 3'

MTI-MMP-RR569AA

5' GACGCCATGGGACCCCCGCGGCA**CTGCTCTACTGCCAGCG 3'**

5' CGCTGGCAGTAGAGCAGTGCCGCGGGGGTCCCATGGCGTC 3'

MTI-MMP-R576A

5' CGACTGCTCTACTGCCAGGCTT**CCCTGCTGGACAAGG 3'**

5'CCTTGTCCAGCAGGGAAGCCTGGCAGTAGAGCAGTCG3'

La mutación fue confirmada en todos los casos mediante secuenciación.

◆ siARN

Para reducir la expresión de CD81 en linfoblastos T y Hela/R5 se empleó las secuencia

FW 5'CAAUUUGUGUCCCUCCGGGCTT3'

REV 5' GCCCGAGGGACACAAAUUGTT3'

O bien una secuencia control, ambas obtenidas de Eurogentec.

◆ CRISPR/Cas 9

Empleamos el plásmido pX330 que contiene la secuencia para la proteína Cas9 y sitio de restricción para la enzima BsbI en el que se clona la secuencia ARN guía, que otorga la especificidad por un determinado gen.

- Se diseñaron dos pares de secuencias alineadas, dirigidas frente al exón 2 del gen de **CD8I** siguiendo las indicaciones del kit:

ARN guía I

FW 5' CACCGGCTGGCTGGAGGCGTGATCC 3'

REV 5' AAACGGATCACGCCTCCAGCCAGCC 3'

ARN guía II

FW 5' CACCGGCGCCCAACACCTTCTATGT 3'

REV 5' AAACACATAGAAGGTGTTGGGCGCC 3'

- Para la tetraspanina **CD9** se usaron secuencias dirigidas frente al exón 2.

ARN guía I

FW 5' CACCGTTCTTGCTCGAAGATGCTCT-3'

REV :5' AAACAGAGCATCTTCGAGCAAGAAC-3'

ARN guía II

FW 5' CACCGGAATCGGAGCCATAGTCCAA-3'

REV 5' AAACCTGGACTATGGCTCCGATTCC-3'

- En el caso de la tetraspanina **CD151**, el esquema de trabajo fue el mismo. En este caso las guías fueron dirigidas frente al exón I:

ARN guía I

FW 5' CACCGAGCAATTGTAGGTAAACAGC 3'

REV 5' AAACGGCTGTTTACCTACAATTGCTC 3'

ARN guía II

FW 5' CACCGCTGGATGAAGGTCTCCTCAACT 3'

REV 5' AAACAGTTGGAGACCTTCATCCAGC 3'

Este sistema utiliza un plásmido que además codifica para GFP sirviendo de reportero de la transfección, lo que permitió hacer una primera ronda de selección mediante separador celular de las células positivas. Las células recuperadas, se mantuvieron en cultivo durante una semana para permitir que el sistema eliminase el gen de interés y la proteína previamente sintetizada. Tras teñir con anticuerpos específicos, fue posible seleccionar mediante una segunda separación, las células que habían dejado de expresar CD81, CD9 o CD151 respectivamente, en su superficie.

♦ **LC3 acoplada en tándem a proteínas fluorescentes (LC3-td)**

Para monitorizar el flujo de la autofagia se usó una construcción de LC3 acoplada a dos proteínas fluorescentes: mTagRFP-mWasabi-LC3 cortesía de Tamotsu Yoshimori. Este reportero se basa en la distinta estabilidad de cada una de las proteínas fluorescentes a distintos pHs. La proteína mWasabi es una proteína fluorescente verde muy inestable en compartimentos ácidos, como los lisosomas, donde no puede emitir fluorescencia, por lo que en este ambiente solo se detecta fluorescencia en el canal rojo, mientras que a pHs más altos, ambas son capaces de emitir fluorescencia y se detectará señal en los canales verde y rojo. Las células se transfectaron por electroporación y se sembraron en cristales cubiertos de FN 0.5µg/ml en condiciones de cultivo normales (DMEM 10%STF) o se sometieron a diferentes tiempos de ayuno al eliminar el suero del medio de cultivo. Tras esto, las células se fijaron con PFA 4% y se analizaron por microscopía confocal.

♦ **mt-mKeima**

Esta construcción se empleó para analizar la mitofagia en células vivas (Klionsky et al., 2016). Se basa en la proteína fluorescente mKeima que está acoplada a la secuencia de COXVIII para dirigir su localización hacia la matriz mitocondrial. Su máximo de emisión es a 620nm, sin embargo, a pH neutro el pico de absorción es a 440 y a pH ácido a 550nm, esta particularidad se aprovecha para monitorizar su incorporación en compartimentos ácidos para su degradación (autofagolisosomas). Células Skmel-147 se transfectaron mediante electroporación y 24 horas después se obtuvieron imágenes de las células vivas mediante microscopía confocal a 37°C 5%CO₂. Se calculó la relación entre la intensidad de señal a 620 nm obtenida al excitar con el láser 561 y el láser 488. El índice tendrá un valor mayor cuanto más activo sea el proceso de mitofagia en la célula.

3.9. INFECCIÓN VIRAL

Los ensayos de infección viral se realizaron con dos variantes del virus HIV-1: NL4-3 con tropismo para el correceptor CXCR4 y BaL con afinidad por el correceptor CCR5. Por otro lado, se empleó una variante modificada del HIV-1 pseudotipado con la cubierta del virus de la estomatitis vesicular HIV-VSV-G cuya entrada en la célula tiene lugar por endocitosis, y por tanto es independiente de receptor. Este virus se generó al transfectar células HEK293T con el plásmido pNL4-3.LucR-E(N.

Landau, NIH AIDS Reagent Program) y el plásmido que codifica para la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular, pcDNA3-VSV. El plásmido pNL4-3.LucR-E- tiene mutaciones en el marco de lectura del gen de la envuelta Env (E-) y de Vpr (R-) implicado en la fase de replicación. Pasadas 24 horas de la transfección, se cambió el medio de las células y se esperaron dos horas para recoger las partículas virales producidas. Para eliminar restos celulares y posibles agregados, el medio se pasó por un filtro de 0.45 µm, se alicuotó y congeló a -80 grados hasta su uso. El título viral se cuantificó con un kit de ELISA Gag p24 (INNOTEST HIV-I Antigen mAb; Innogenetic). Para infectar células Hela/R5, se sembraron el día anterior en placas de 24 pocillos. Aquellos con una confluencia del 70-80% se infectaron con 100 ng de virus Bal por pocillo, o 50 ng de la cepa HIV-VSV-G. En el caso de los linfoblastos T o de células Jurkat, se contaron y se infectaron con 100ng de HIV-I NLA-3 por millón de células, o con 200ng de HIV-VSV-G por millón de células. Tras dos horas de infección a 37°C, las células se lavaron para eliminar las partículas virales que no habían infectado la célula y se incubaron a 37 °C 5% CO₂ durante 24 ó 48 horas, se lisaron con NP-40 al 0.2% y el ADN total fue extraído con el kit *QiAmp DNA mini kit* (Qiagen). Los productos de la transcripción reversa viral se analizaron al amplificar el ADN genómico usando la mezcla para PCR Power SYBR Green PCR (Applied Biosystems) y los cebadores:

- ◆ Para los productos de transcripción reversa tempranos:

FW 5'-CAGGATTCTTGCCTGGAGCTG-3'

REV 5'-GGAGCAGCAGGAAGCACTATG-3'

- ◆ Para los productos de la transcripción reversa tardíos:

FW 5'-TGTGTGCCCGTCTGTTGTGT-3'

REV 5'-CGAGTCCTGCGTCGAGAGAT-3'

Para cuantificar la concentración de ADN total en cada caso y poder normalizar los resultados, se amplificó el gen de β-actina. Todas las reacciones fueron realizadas por triplicado.

Para cuantificar la infección viral se generaron virus al cotransfectar células HEK293T con el plásmido pNL4-3.LucR-E- que lleva acoplada la secuencia de la luciferasa junto a la de Nef y el plásmido que porta la secuencia de la envuelta del HIV-I (NIH AIDS Reagent Program) o el que codifica para la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular. La infección con estos virus, al igual que en el caso anterior, se hizo en células Hela/R5 sembradas en placas de 24 pocillos. Se infectaron con 50 ng de HIV-I p24 Gag por millón de células durante dos horas, se lavaron varias veces y tras 48 horas a 37°C se analizó la actividad luciferasa con el kit Steady Glo luciferase (Promega Corporation, WI, USA) en un luminómetro I450 Microbeta Luminescence Counter.

3.10. MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN DE dNTPs INTRACELULARES

Para la cuantificación de dNTPs las células se lisaron en metanol frío al 65% y se agitaron en vórtex durante 2 minutos. Los extractos se incubaron a 95°C durante 3 minutos, se centrifugaron durante 3 minutos a 14000 rpm y el sobrenadante se concentró mediante speed vaccum. Las muestras se analizaron siguiendo el protocolo descrito previamente (Diamond et al., 2004)

3.11. AISLAMIENTO DE EVs MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN POR TAMAÑO

Un total de 45 ml de medio de cultivo condicionado se sometió a un primer paso de centrifugación a 400 g durante 5 minutos y posteriormente 10 minutos a 2000 g para eliminar células y restos celulares. El medio resultante se concentró por ultrafiltración a 2000 g durante 30 minutos usando filtros Amicon Ultra-15 (Millipore, Billerica MA), hasta obtener un volumen final de 1.5 ml que se cargó en una columna de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). Las columnas se prepararon en jeringas de 20 ml (BD, PLASTIPAK), usando como matriz sefarosa CL-2B (Sigma Aldrich) hasta alcanzar una altura final de 4.3 cm. Se equilibraron y se eluyeron por gravedad con PBS previamente filtrado a través de filtros de poro de 0.2 μm . Se recogieron 20 fracciones de 500 μl de forma secuencial y se analizó la concentración de proteína de cada una de ellas usando el método colorimétrico BCA. La detección de las fracciones enriquecidas en EVs se hizo mediante citometría con bolas de látex, tras marcarlas con anticuerpos frente a CD63. Las tres fracciones (normalmente de la 8-10) con mayor intensidad media de fluorescencia (MFI) se juntaron para realizar los análisis posteriores.

3.12. AISLAMIENTO DE EVs POR ULTRACENTRIFUGACIÓN

El medio de cultivo condicionado se centrifugó a 400 g durante 5 minutos y a 2000g durante 10 minutos para eliminar células y restos celulares. El sobrenadante se centrifugó de nuevo a 17000 g durante 20 minutos y después a 100000 g durante 2 horas (ultracentrífuga Sorvall AH- 627 rotor, L8-70M, Beckman). El precipitado obtenido se lavó con 30ml de PBS y se volvió a centrifugar de nuevo durante 2 horas a 100000 g, el precipitado final se resuspendió en 1.5 ml de PBS.

3.13. CITOMETRÍA DE FLUJO DE EVs POR ACOPLAMIENTO A BOLAS DE LÁTEX

50 μl de EVs aisladas previamente por SEC o por ultracentrifugación se incubaron con 0.25 μl de esferas de látex aldehído/sulfato ($\phi = 4 \mu\text{m}$; 5.5×10^6 partículas/ml; Invitrogen, Carlsbad, CA) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las diluciones seriadas de las muestras se hicieron utilizando PBS filtrado como diluyente. Transcurrido el tiempo de incubación, se añadió 1 ml de

BCB (PBS suplementado con 0.1% BSA; Roche, y 0.01% NaN₃; G-Biosciences) y las muestras se incubaron toda la noche en rotación. Las EVs acopladas a las bolas se precipitaron por centrifugación a 2000 g 10 minutos, se lavaron con BCB y se marcaron con los diferentes anticuerpos primarios y anticuerpos secundarios acoplados al fluorocromo FITC (ThermoFisher Scientific) en ambos casos durante 30 minutos a 4 °C. Como control negativo se utilizaron las bolas acopladas a la muestra de EVs sin diluir y un control de isotipo seguido del anticuerpo secundario, o en ausencia del anticuerpo primario. El análisis se realizó en citómetros convencionales (FacsVerse y FACSCanto A, BD Biosciences, San Jose, CA) y los resultados se analizaron usando el software FlowJo (version Tree Star, Ashland, OR). La selección de las EVs acopladas a las bolas de 4 µm de diámetro se hizo en función de los parámetros FCS/SSC de forma que cualquier agregado de anticuerpo o vesículas no acopladas son excluidos del análisis.

3.14. CITOMETRÍA DE FLUJO Y SEPARACIÓN CELULAR

Las células se tripsinizaron y se lavaron con PBS para eliminar restos de medio de cultivo, posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario de interés diluido en PBS durante 30 minutos a 4 °C y tras un lavado intermedio con PBS, con el anticuerpo secundario correspondiente acoplado a fluorocromos (ThermoFisher Scientific) durante 30 minutos a 4 °C. Para analizar proteínas intracelulares las células se fijaron con PFA al 2% (Electron Microscopy Sciences), y se permeabilizaron con el kit de BD Cytotfix/Cytoperm antes de incubar con los anticuerpos. Como control negativo se usaron células únicamente tratadas con el anticuerpo secundario. En el caso de la citometria de flujo el análisis se hizo en un FACSCalibur o FACSCanto (Becton Dickinson). Las separaciones celulares se realizaron en un FACSAria Fusion, en PBS/EDTA a una concentración de 20millones/ml.

3.15. ANÁLISIS DE SEGUIMIENTO DE PARTÍCULAS (NTA)

La concentración de EVs fue determinado mediante usando el NANOSIGHT LM10 (Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK) equipado con un dispositivo de carga acoplada (CCD) cámara (modelo F-033) y un láser de 638 nm. Los análisis se hicieron mediante el software NTA 3.0. El umbral de detección se ajustó a 5. Las muestras se diluyeron antes de ser cargadas en el sistema teniendo en cuenta la concentración de partida, y se grabaron videos de 60 segundos repetidos por triplicado con el obturador de la cámara a 30.02 ms y la ganancia a 650, como recomienda el fabricante.

3.16. ENSAYOS DE DEGRADACIÓN DE MATRIZ

Para la preparación de gelatina fluorescente, 2 mg/ml de gelatina (Sigma) se disolvieron en un tampón que contiene 61 mM de NaCl y 50mM de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ pH9.3 durante una hora a 37°C. Tras esto, la gelatina disuelta se incubó durante 2 horas con 36 $\mu\text{g}/\text{ml}$ isotiocianato de Rodamina B en oscuridad, y la mezcla resultante fue dializada en PBS a temperatura ambiente. Para recubrir los cubreobjetos con la gelatina acoplada a rodamina, ésta se mezcló con glutaraldehído frío a una concentración final del 0.5% en PBS. A cada cristal se le añadió un volumen suficiente para cubrir su superficie, aproximadamente unos 100 μl . Esta mezcla se incubó 15 minutos a 4°C y después, los cristales se lavaron con PBS para eliminar el reactivo sobrante. Se esterilizaron con etanol al 70% durante un minuto, y tras eliminar el exceso se dejaron secar. Una vez evaporado el etanol, se incubaron con medio completo durante una hora a 37°C. Se sembraron 20000 células por cubreobjeto y se cultivaron sobre la matriz durante 6 horas. Transcurrido este tiempo, las células fueron fijadas con para-formaldehído (PFA) al 4%, 10 minutos. La fijación fue bloqueada con varios lavados de TBS y los cristales se montaron usando medio Fluoromont-G (SouthernBiotech). Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio confocal como se describe más tarde, y el área de degradación o la intensidad de fluorescencia de cada célula se analizó mediante el software Image J (NIH).

3.17. MEDIDA DE LA TRANSFERENCIA RESONANTE DE ENERGÍA FÖSTER (FRET) A TRAVÉS DE LA VIDA MEDIA DE FLUORESCENCIA (FLIM)

Células SUM-159 fueron co-transfectadas transitoriamente con las distintas construcciones de la proteína MTI-MMP acoplada a la forma monomérica de EGFP; y CDI51 acoplada a la forma monomérica de la proteína Ruby. EGFP posee un máximo de excitación a 487nm y de emisión a 509 nm; mientras que el máximo de excitación para mRuby es 558nm y el de emisión es 605nm. El solapamiento de los espectros de emisión de EGFP (donador) y de excitación de Ruby (aceptor) las convierte en un par de fluoróforos óptimos para el fenómeno de FRET. 24 horas después de la transfección, las células se sembraron en placas MatTek cubiertas de colágeno a una concentración de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Las imágenes de FLIM (fluorescence lifetime microscopy) se obtuvieron en un sistema de escaneado acoplado a un espectrofotómetro de dos canales Alba spectrometer (ISS Inc.) combinado con una tarjeta digital frequency domain (DFD) fast-FLIM card (ISS Inc.) y equipado con fotomultiplicadores H7422 (Hamamatsu Photonics). El modulo ALBA estaba acoplado a un microscopio invertido Nikon Ti-E (Nikon Corp.) equipado con un objetivo Plan apocromático Nikon MRD07600 CFI 60_/1.2-NA WI, una lámpara de epifluorescencia, campo claro, incubador y una cámara de calentamiento (Okolab SRL). La excitación de doble fotón a 830 nm se obtuvo con un láser pulsado MaiTai DeepSee laser (Newport Corp.) y la emission fue recogida después con filtros FF01-680/SP y BP530/43 (Semrock Inc., IDEX Corporation). El

análisis de tipo Phasor se obtuvo con SimFCS (Globals Unlimited, LFD). Se analizó la dispersión del fluoróforo donador para determinar el tamaño de la máscara en el phasor.

3.18. MICROSCOPIA CONFOCAL DE FLUORESCENCIA

Las células se sembraron sobre cubreobjetos recubiertos de colágeno (Nutragen) a una concentración de 20 µg/ml, fibronectina 5 µg/ml o poli-L-lisina (Sigma); o con anticuerpos frente a CD81 o CD4 a 10 µg/ml. Se fijaron con PFA al 4% (Electron Microscopy Sciences) durante 15 minutos y cuando fue requerido para realizar tinciones de proteínas intracelulares, las células se permeabilizaron con Triton X-100 al 0.5% diluido en TBS. Las muestras se bloquearon con BSA al 1% en TBS a 37°C durante una hora y se añadieron los anticuerpos primarios correspondientes, y tras extensos lavados, los anticuerpos secundarios acoplados a fluorocromos de tipo Alexa. En el caso de las células Skmel-147, la permeabilización se realizó en condiciones más suaves utilizando saponina 0.1%. En esta situación la incubación con los anticuerpos primarios y secundarios, así como los lavados, se hicieron también en presencia de saponina. Las muestras se montaron con Fluoromont-G (Southern Biotech) al que previamente se había añadido DAPI (1 µg/ml). Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio confocal Leica TCS-SP5 equipado con láseres de argón y helio-neón, acoplados a su vez, a un microscopio invertido de epifluorescencia Leica DMIRBE (Leica Microsystems, Heidelberg, Alemania). Los análisis de imagen fueron hechos con el software Image J (NIH) y los estudios de colocalización se hicieron con el complemento Coloc2.

3.19. ENSAYOS DE LIGACIÓN POR PROXIMIDAD

Estos ensayos se hicieron siguiendo las instrucciones del kit Duolink (Sigma). Las células se sembraron sobre poli-L-lisina y se fijaron con PFA 4% previamente. Como anticuerpos primarios se usaron SAMHD1 (anticuerpo policlonal de conejo), CD81 (5A6, monoclonal de ratón), ERM (90:3, policlonal de conejo) o CD147 (VJ1/9, monoclonal de ratón).

3.20. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Las células se fijaron directamente en la placa de cultivo con una mezcla de paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 2% en tampón fosfato 0.1M pH 7.4 durante 1-2 horas a temperatura ambiente. Tras lavar con tampón fosfato 0.1M pH 7.4, se incubaron durante 1 hora a 4°C con Tetróxido de Osmio 1% en agua bidestilada y 1% de ferricianuro potásico. Tras esto se trataron durante un minuto con ácido Tánico al 0.15% en fosfato 0.1M pH 7.4 y con acetato de Uranilo al 2% en agua durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Las muestras se deshidrataron con etanol al 50%, 75%, 90%, 95% y finalmente al 100% en todos los casos durante 10 minutos a 4°C. La infiltración se hizo secuencialmente en epón: etanol (1:2), epón: etanol (1:1), epón: etanol

(2:1), durante 60 minutos a temperatura ambiente y en epón 100% toda la noche a 4°C. Tras esto se cubrió la placa con epón completo y se dejó polimerizar 48 horas a 60°C. Se usó resina epoxi, TAAB 812 (TAAB laboratories, Berkshire, England). Se hicieron cortes ultrafinos de 60-70 nm en un ultramicrotomo LEICA ULTRACUT UCT (Leica, Viena). Las secciones se tiñeron con acetato de uranilo al 2% en agua durante 7 min y con citrato de plomo de Reynolds durante 2 min. El microscopio electrónico es Jeol JEM-1010 (Jeol, Japan) a un voltaje de 80Kv. Las fotos se tomaron con una cámara CMOS 4K x 4K , F416 de TVIPS (Gauting, Germany)

3.21. PROTEÓMICA

El análisis del perfil proteico se hizo a partir de EVs de las células Skmel-147 aisladas por SEC y posterior ultracentrifugación a 100000g durante 4 horas a 4 °C. Las muestras se cuantificaron y concentraron por SDS-PAGE teñido con Coomassie (GelCode™ Blue Stain Reagent_ThermoFisher). Las bandas se cortaron y se redujeron con 10 mM de DTT durante 1 hora a 56°C y se alquilaron con 50mM de iodoacetamida durante una hora a temperatura ambiente. Las muestras se digirieron con tripsina (Promega, Madison, WI). Los fragmentos de gel se deshidrataron usando acetonitrilo y los trocitos se secaron en un Speedvac. Se rehidrataron con 50mM de bicarbonato de amonio pH 8.8 y 60 ng/μl de tripsina a una proporción 5:1 (proteína:tripsina). Se dejaron en hielo 2 horas y posteriormente se incubaron durante 12 horas a 37 °C. La digestión se paró añadiendo con 1% de ácido trifluoroacético. Los sobrenadantes se secaron y desalaron sobre puntas OMIX C18 (Agilent Technologies). Las muestras se resuspendieron en 10 μl de ácido fórmico 0.1% y se analizaron por cromatografía reversa de fase líquida –espectrometría de masas en un sistema Easy-nLCII acoplado a un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap-Velos Pro (Thermo Scientific). La identificación de los péptidos se hizo usando el algoritmo SEQUEST (Proteome Discoverer 1.4, Thermo Scientific) y el software PEAKS Studio 8.5 (Bioinformatics solutions Inc.). La base de datos utilizada fue Uniprot-Homo sapiens. Fasta. Para la cuantificación relativa, la digestión fue marcada con el reactivo iTRAQ 8PLEX Multiplex Kit (Applied Biosystems). Los péptidos se disolvieron en 0.5 M de bicarbonato de trietilamonio pH 8. Cada reactivo de iTRAQ fue disuelto en 50 μl de isopropanol y se añadió a la mezcla de péptidos durante dos horas a temperatura ambiente. El marcaje se paró añadiendo 0.1% de ácido fórmico. Todos los sobrenadantes se deshidrataron y las muestras se mezclaron. Esta mezcla se desaló en OASIS HLB Extraction Cartridges (Waters Corporation) y se analizó en el espectrómetro de masas.

3.22. INTERNALIZACIÓN

El mismo número de células se sembró en placas multipocillo y transcurridas 24 horas se lavaron con HBSS frío y se marcaron con biotina utilizando con EZ-Link sulfo-NHS-SS-biotina

(sulfosuccinimidil-20(biotinamida)etil-1,3-ditiopropionato) a 0.5mg/ml (Invitrogen) durante 30 minutos a 4°C. Se lavaron dos veces con medio completo para eliminar la biotina no unida y se incubaron durante 0, 15 ó 30 minutos a 37°C y 5% de CO₂ para permitir la internalización de las proteínas marcadas. Tras esto, las células se volvieron a lavar con HBSS frío y se incubaron 15 minutos a 4°C con 100mM de ácido 2-mercaptoetano sulfónico (MESNA; Sigma) diluido en 50 mM Tris-HCl (pH 8.6), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, and 0.2% BSA. Las células se lavaron de nuevo con PBS frío y se incubaron con 120 mM de iodoacetamida (Sigma) durante 10 minutos a 4°C. Las muestras se lisaron en Triton X-100 1% en PBS con inhibidores de proteasas (Roche). Los lisados se incubaron con esferas de proteína-G sefarosa previamente acopladas al anticuerpo anti-GFP toda la noche. Tras extensos lavados, las muestras se eluyeron con laemmlí a 70°C durante 10 minutos y se cargaron en geles de poliacrilamida al 8% en condiciones no reductoras. Las membranas se revelaron con streptavidina-HRP (Invitrogen) usando Fujifilm-LAS 4000. Posteriormente se realizó un proceso de “stripping” y se incubó con anti-GFP para medir la cantidad de MTI-MMP total y poder normalizar los datos.

3.23. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los datos fue realizado con el software GraphPad Prism (GraphPad Software Inc). El p-valor fue calculado mediante la prueba t de Student de dos colas. Para análisis de más de dos grupos se empleó ANOVA de una o dos vías según el caso, así como comparaciones múltiples post-hoc de Bonferroni, Tukey o Dunn's según requerido. El valor de significación estadística fue *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

4.

Resultados

4.1. ESTUDIO DE LA IMPORTANCIA DE LA TETRASPANINA CD81 EN LA INFECCIÓN POR VIH

4.1.1. CD81 INTERACCIONA CON SAMHDI

En trabajos anteriores del laboratorio (Perez-Hernandez et al., 2013) se detectó, por estudios de espectrometría de masas, una posible interacción entre SAMHDI y CD81 en linfoblastos T. Para corroborar estos resultados, realizamos tanto ensayos de pull-down como de inmunoprecipitación. En el primer caso se usaron péptidos biotinilados con la secuencia carboxilo terminal de diferentes tetraspaninas (CD151, CD81 y CD9) que se pusieron en contacto con lisados de linfoblastos T. Los resultados se analizaron mediante geles de poliacrilamida y solo en el caso de CD81 se detectó una interacción específica con SAMHDI (Figura 8A). Para analizar si esta relación existe de manera fisiológica la célula, se llevaron a cabo ensayos de coimmunoprecipitación que también se analizaron mediante western-blot. Así pues, al precipitar CD81, con anticuerpos específicos para la tetraspanina, de lisados celulares, fuimos capaces de detectar la presencia de SAMHDI en los inmunoprecipitados (Figura 8B). Cuando se hizo el mismo procedimiento pero de manera inversa, es decir, detectando CD81 al inmunoprecipitar SAMHDI, se confirmó la interacción entre ambas moléculas (Figura 8B).



Figura 8. CD81 interacciona con SAMHDI a través de su región carboxilo terminal. **A.** Lisados de linfoblastos T se pusieron en contacto con péptidos biotinilados que portan la secuencia del extremo carboxilo terminal de las tetraspaninas CD151, CD81 y CD9. La presencia de SAMHDI se detectó por western- blot mediante marcaje con anticuerpos anti-SAMHDI. Se muestra un control negativo de sefatorosa y la señal positiva del lisado total **B.** Los lisados de linfoblastos T se inmunoprecipitaron con anticuerpos para SAMHDI o CD81. Tras esto, las membranas fueron reveladas con ambos anticuerpos. También se muestra el lisado total (WCL) y como control negativo las microesferas de sefatorosa sin anticuerpo.

Posteriormente se analizó la distribución celular de ambas proteínas mediante ensayos de inmunofluorescencia (Figura 9). CD81 tiene una distribución restringida a la membrana plasmática, mientras que SAMHDI se localiza en núcleo y citoplasma, tanto en células Hela/R5, como en linfoblastos T, y en ninguno de los dos casos se detectó una colocalización clara entre ambos marcajes, lo cual sugiere que la interacción entre SAMHDI y CD81 debe ocurrir de forma transitoria. A continuación, se llevaron a cabo experimentos en los que se sembraron células sobre cubreobjetos recubiertos con el anticuerpo anti-CD81 que reconoce el segundo bucle de la extracelular y unirá las moléculas de tetraspanina presentes en la superficie celular, forzando su agrupación. Tras esto se detectó la localización de SAMHDI usando un anticuerpo específico (Figura 10A). De esta forma, las células control, sembradas sobre un sustrato convencional como la poli-L-

lisina, muestran una tinción de SAMHDI débil y difusa. Sin embargo, en presencia de anticuerpos frente a CD81, la localización de SAMHDI pasa de ser difusa a lo largo de todo el citoplasma a formar agregados próximos a la membrana ventral que se observan como puntos muy brillantes tras su tinción (Figura 22A).

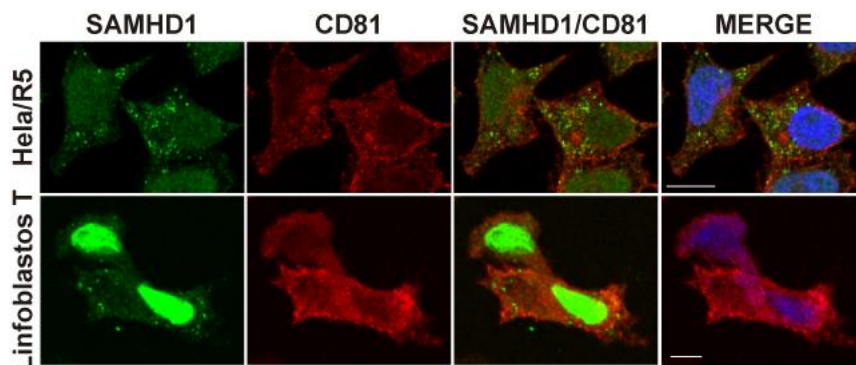


Figura 9. Distribución celular de SAMHDI Y CD81. Células Hela/R5 fueron sembradas sobre cubreobjetos recubiertos de poli-L-lisina (PLL), fijadas, permeabilizadas y teñidas con anticuerpos frente a SAMHDI (verde) y CD81 (rojo). Las imágenes fueron obtenidas mediante microscopía confocal. Se muestra un único plano. Barra de escala 10 μ m. A la derecha se muestra la fusión los dos canales junto con el canal de UV para la tinción con DAPI, que marca el núcleo.

Para corroborar que este cambio en el patrón de distribución de SAMHDI se debe específicamente al entrecruzamiento de CD81, se usaron anticuerpos que inducen agrupación de CD4, el receptor de VIH que se asocia con CD81 en linfoblastos T (Imai et al., 1995) y también se observó un reclutamiento en parches en la membrana de la tinción de SAMHDI (Figura 10A). Por contra, si se usan los mismos sustratos en células con una expresión muy reducida de CD81, mediante el uso de ARN de interferencia pequeño (siARN), los cambios en la localización de SAMHDI a lo largo de las diferentes condiciones se pierden (Figura 10A) Estos resultados nos permiten afirmar que dichos cambios en la distribución de SAMHDI son causados directamente por el agrupamiento de CD81.

Con motivo de afianzar los resultados que sugerían una interacción entre ambas moléculas, se realizaron ensayos de ligación por proximidad, que se asemejan a una inmunofluorescencia convencional, pero en este caso, los anticuerpos secundarios de cada especie llevan acopladas unas sondas de ADN con secuencias complementarias (Figura 10B). Así pues, estos anticuerpos secundarios reconocerán al anticuerpo primario de su especie correspondiente y, si las dos proteínas de interés están suficientemente próximas, las sondas de ADN pueden ligar y se genera un ADN circular que es amplificado al añadir a la mezcla una ADN polimerasa y nucleótidos marcados fluorescentemente, que son los que aportan la señal detectada por microscopía.

Para comprobar la especificidad de este ensayo se utilizó la pareja de anticuerpos SAMHDI/CD147 como control negativo, y como control positivo ERM/CD81, cuya interacción ha sido descrita anteriormente en linfoblastos T (Sala-Valdes et al., 2006). Solo en este caso y en los experimentos

con anticuerpos contra SAMHDI y CD81 dieron lugar a señal fluorescente en la célula, corroborando una vez más la especificidad de la interacción (Figura 10B).

Con todos estos experimentos se demostró la interacción directa entre ambas proteínas. El siguiente paso fue dilucidar la relevancia funcional de dicha interacción.

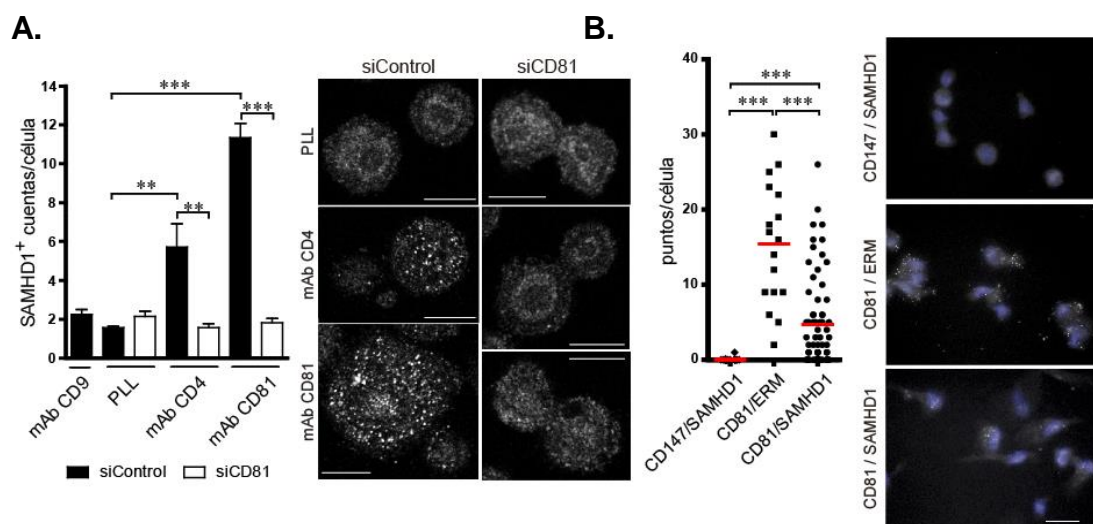


Figura 10. La interacción de CD81 y SAMHDI se detecta in vivo. **A.** Células HeLa/R5 se transfectoron con siRNA control (siControl) o con siRNA específico de CD81 (siCD81) y se sembraron sobre PLL (10 μg/ml) o sobre anticuerpos monoclonales frente a CD4 (HP2/6, 10 μg/ml) o CD81 (5A6, 10 μg/ml). Las células se dejaron adherir durante dos horas, tiempo tras el cual se fijaron, permeabilizaron y tiñeron con el anticuerpo de SAMHDI. Las imágenes se adquirieron mediante microscopía confocal. Se muestra un único plano ventral. Barra de escala 10 μm. El resultado de la cuantificación de las imágenes se recoge en la gráfica de la izquierda, concretamente se contaron el número de agregados de SAMHDI por célula (en un total de 50 células de 3 experimentos independientes). Los resultados se analizaron mediante ANOVA de una vía con el criterio de Tukey. **B.** Ensayo de ligación por proximidad. Se sembraron linfoblastos T sobre PLL, se fijaron, permeabilizaron y se marcaron con el anticuerpo de anti-SAMHDI policlonal de conejo y anti-CD81 monoclonal de ratón seguidos de las sondas PLA que dan señal positiva cuando la distancia entre ambas moléculas es menor de 50 nm. Como control negativo se usó la pareja de anticuerpos SAMHDI/CD147, y CD81/ERM como control positivo. Barra de escala 10 μm. En este caso se cuantificó el número de puntos en los que se traduce la interacción positiva entre cada pareja de moléculas por célula. Cada punto del gráfico representa una célula, y las líneas en rojo las medias que se analizaron mediante ANOVA de una vía con el criterio de Dunns. **P* < 0.05, ***P* < 0.01 y ****P* < 0.001.

4.1.2. CD81 ES IMPORTANTE PARA EL CICLO INFECTIVO DEL VIRUS VIH-1

Para estudiar la relevancia fisiológica de la relación entre SAMHDI y CD81 procedimos a analizar el proceso infectivo del virus VIH, puesto que SAMHDI tiene una importante función de la infección por VIH a nivel de la retrotranscripción viral. Puesto que también ha sido descrito con anterioridad que la tetraspanina CD81 juega un papel fundamental en la entrada del virus en linfoblastos T (Gordon-Alonso et al., 2006), si utilizamos solamente un virus salvaje, no es posible diferenciar en qué etapa de la infección es relevante la interacción SAMHDI/CD81. Por ello, los ensayos se hicieron en paralelo con un pseudovirus que tiene como envuelta la proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G-VIH). Con este virus se elimina la fase de entrada como paso limitante ya que no es dependiente del receptor CD4 y CD81, si no que ocurre por endocitosis mediada por

clatrina, por tanto, cualquier alteración en el ciclo infectivo de este virus será probablemente debido a alteraciones en las fases posteriores a la entrada (Figura 11A).

Transcurridas 24 ó 48 horas tras la infección se cuantificaron mediante PCR cuantitativa (qPCR) los productos tempranos y tardíos del virus. Los productos tempranos detectan la cadena de ADN formada por la transcripción reversa del ARN viral, mientras que los tardíos detectan la cadena + que se forma posteriormente usando como molde la hebra de DNA -. También se hicieron ensayos utilizando virus que portan el gen de la luciferasa como reportero. En este último caso, la infección es directamente proporcional a la cantidad de señal detectada en un luminómetro (Figura 11B).

Con todas estas herramientas estudiamos el rol de CD81 en la infección. Para ello se transfectaron células HeLa/R5 con una construcción de CD81 que lleva acoplada la proteína GFP en la región citosólica (CD81-GFP) y una forma mutada de la tetraspanina en la que se había eliminado la región carboxilo terminal, encargada de interactuar con SAMHD1 (CD81 Δ Cyt-GFP). Como control negativo en estos ensayos, se usó GFP libre. Las células transfectadas se infectaron con virus con

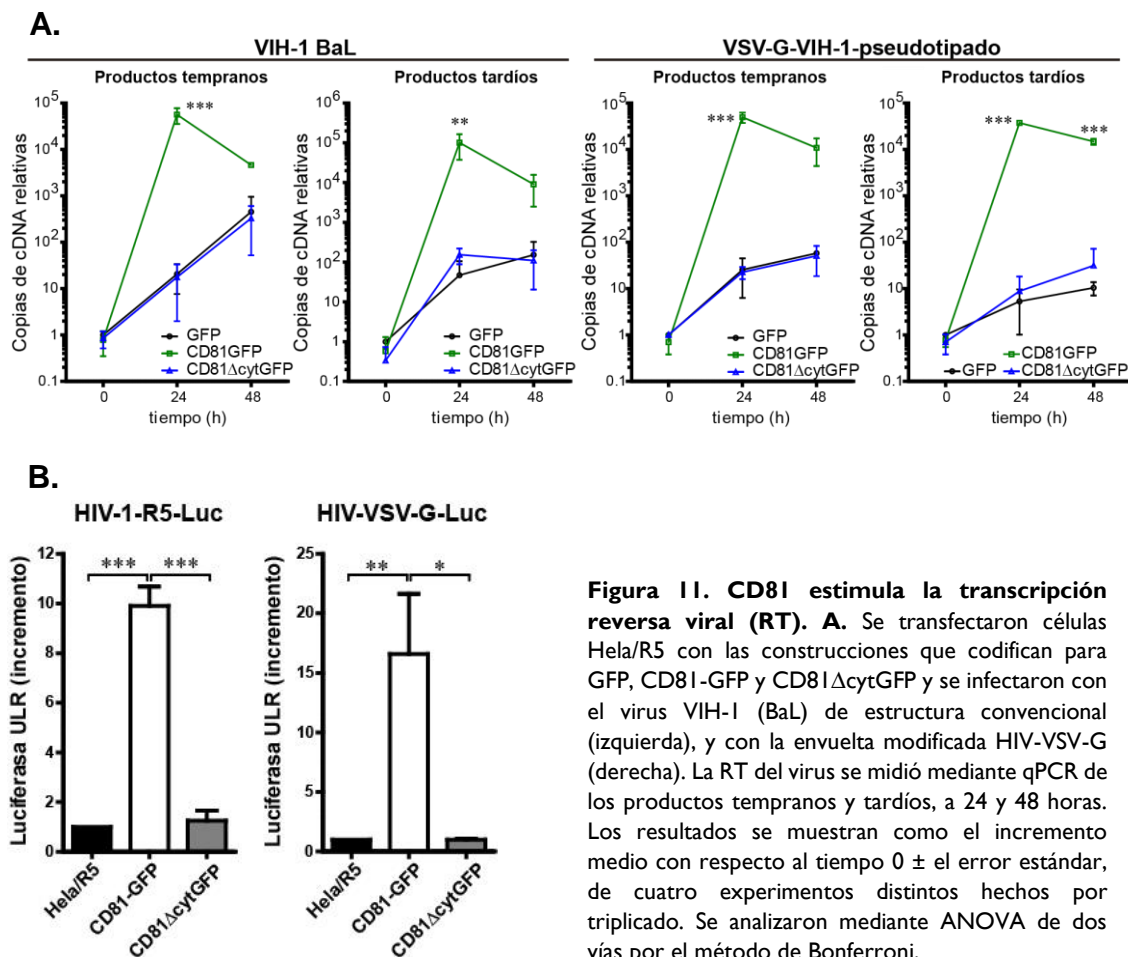


Figura 11. CD81 estimula la transcripción reversa viral (RT). A. Se transfectaron células HeLa/R5 con las construcciones que codifican para GFP, CD81-GFP y CD81 Δ CytGFP y se infectaron con el virus VIH-1 (BaL) de estructura convencional (izquierda), y con la envuelta modificada HIV-VSV-G (derecha). La RT del virus se midió mediante qPCR de los productos tempranos y tardíos, a 24 y 48 horas. Los resultados se muestran como el incremento medio con respecto al tiempo 0 \pm el error estándar, de cuatro experimentos distintos hechos por triplicado. Se analizaron mediante ANOVA de dos vías por el método de Bonferroni.

B. En este caso se analizó la infección utilizando un virus de único ciclo infectivo, capaces de expresar el gen de la luciferasa y con ambos tipos de envuelta, HIV-1-R5-Luc y HIV-VSV-G-Luc. En la gráfica se muestra el incremento de la media de la actividad luciferasa \pm el error estándar, medida en Unidades de Luminiscencia Relativa (ULR). Los datos proceden de 3 experimentos independientes realizados por triplicado. Para el análisis estadístico se empleó ANOVA de una vía y post-test de Tukey.

los dos tipos de envuelta descritos anteriormente (Figura 11 A y B). Los resultados mostraron un claro incremento de la infección en células que sobreexpresan CD81-GFP medida tanto por PCR cuantitativa (Figura 11 A) como por actividad luciferasa (Figura 11 B).

La tetraspanina con el carboxilo terminal truncado no ejercía ningún efecto, alcanzando valores similares a los de las células transfectadas con el control (GFP). Este comportamiento se reprodujo con ambos tipos de envuelta viral, tanto mediante la PCR de productos tempranos o tardíos como mediante la medida de actividad luciferasa (Figura 11 A y B), lo que demuestra que los cambios observados no se deben a un defecto en la entrada del virus, si no, a alteraciones en pasos posteriores y que, además, están mediadas por la región carboxilo terminal de CD81.

A continuación, analizamos las consecuencias de eliminar por completo la expresión de CD81 mediante la tecnología CRISPR/Cas9, como se confirmó mediante western-blot (Figura 12A). Tras

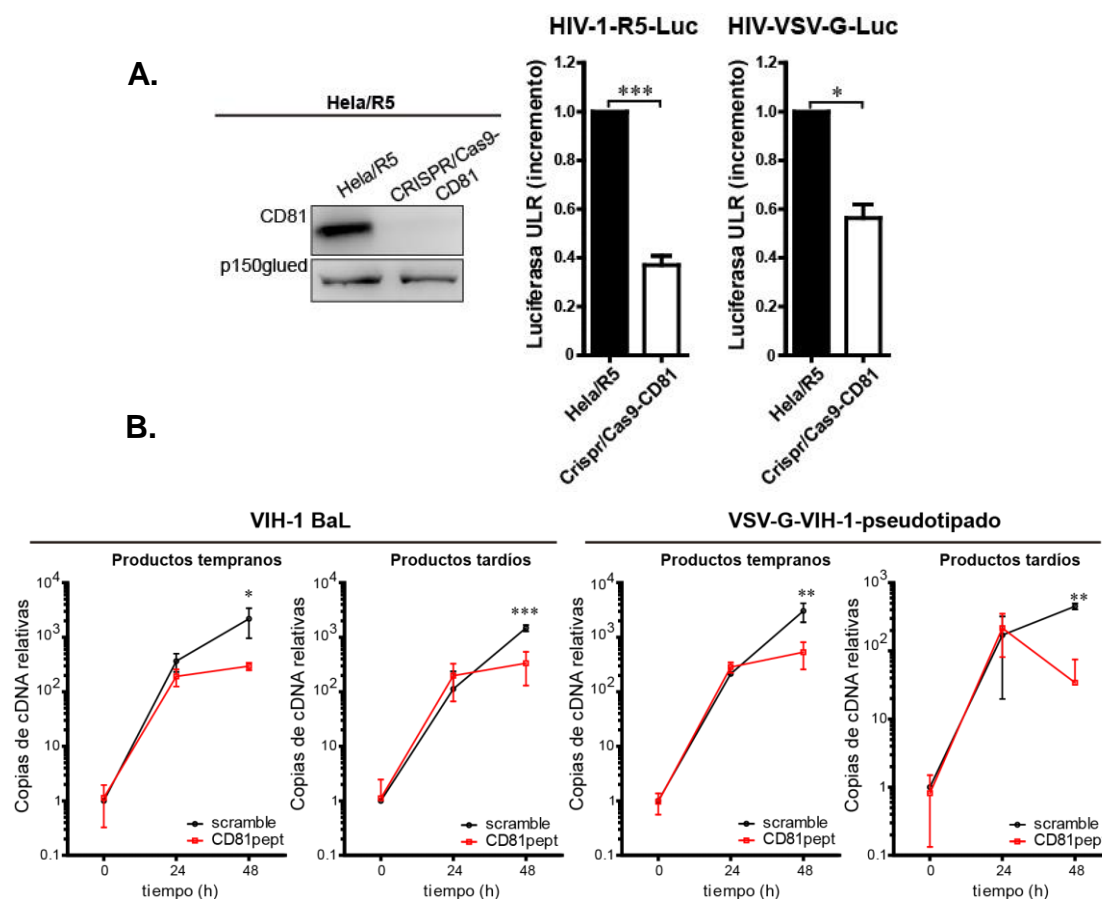


Figura 12. La expresión de CD81 es importante para la transcripción reversa del VIH-1 en células HeLa/R5. A. Se eliminó el gen de CD81 mediante el sistema CRISPR/Cas9, en células HeLa/R5. El éxito del proceso fue corroborado mediante western-blot de lisados celulares con anti-CD81. Como control de carga se utilizó p150glued. Estas células junto con las células control fueron infectadas con los virus que expresan la enzima luciferasa y ambos tipos de envuelta HIV-R5-Luc y HIV-VSV-G-Luc. Los datos se representan como el incremento relativo con respecto a la media del grupo control \pm el error estándar, y se analizaron mediante la prueba t de Student de tres experimentos independientes realizados por triplicado $***P < 0.0001$ (izquierda) and $*P = 0.0157$ (derecha). **B.** Células HeLa/R5 se trataron durante cinco días con el péptido citopermeable control (scramble) o con el que porta la secuencia del dominio citosólico de CD81 (CD81pept). En ambos casos se empleó a una concentración de 2 μ M. Los datos se analizaron de la misma forma que en experimentos anteriores. Ver figura 11A.

esto, el esquema de trabajo fue el mismo que en el caso anterior: las células se infectaron con las distintas variantes del virus, y aquellas que no poseen el gen de CD81 (CRISPR/Cas9 CD81) muestran una reducción en los productos de la RT tanto para el virus VIH-I como para el VSV-VIH (Figura 12A). En paralelo, bloqueamos la actividad intracelular de la tetraspanina añadiendo a las células un péptido que porta la secuencia de la región citosólica de CD81. Estas células se infectaron con VIH-I BaL y VSV-G-VIH y los productos de la retrotranscripción se analizaron por PCR cuantitativa (Figura 12B), observándose el mismo efecto inhibitorio.

Para determinar la relevancia de este sistema en un contexto más fisiológico, utilizamos linfoblastos T aislados de sangre periférica de donantes sanos en los que redujimos la expresión de CD81 mediante ARN pequeño de interferencia (siCD81) (Figura 13A) o el péptido bloqueante citopermeable (CD81pept) (Figura 13B). En ambos casos los resultados confirmaron la contribución positiva de CD81 en la retrotranscripción viral.

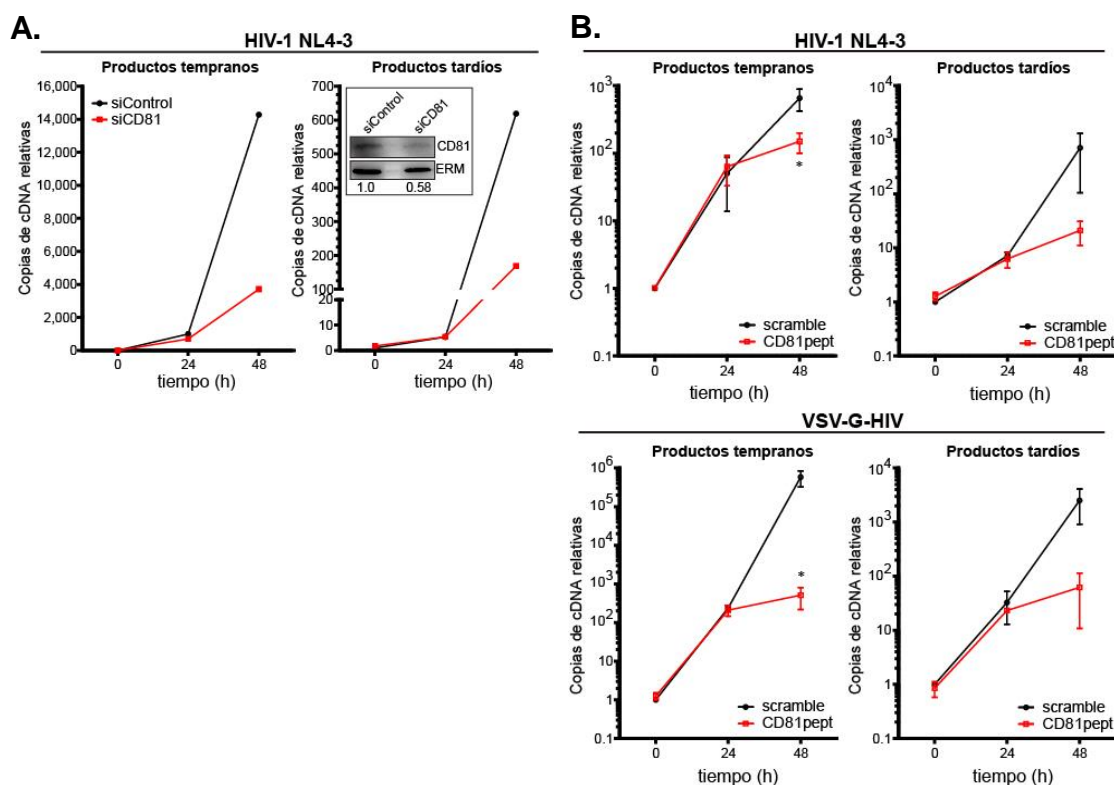


Figura 13. CD81 participa en la transcripción reversa del VIH-I en linfoblastos T. **A.** Se consiguió reducir la expresión de CD81 en linfoblastos T primarios mediante siRNA y se infectaron con HIV-1-NL4-3. Los productos de la RT tempranos y tardíos se midieron por qPCR. En la imagen se muestra un experimento representativo de los dos que se hicieron. También se muestra la eficiencia del silenciamiento cuantificado mediante western-blot, donde se utilizó ERM como control de carga. Los números en la parte inferior del gel son el resultado de la relación entre la señal de CD81/ERM. **B.** Linfoblastos T tratados con 2 μ M de péptido scramble y CD81 (CD81pept) durante cinco días, se infectaron con HIV-1-NL4-3 y el virus modificado HIV-VSV-G. Los datos se representan como el incremento en la RT media con respecto al tiempo 0 \pm el error estándar de dos experimentos independientes realizados por triplicado. Los resultados se analizaron por ANOVA de dos vías mediante el método de Bonferroni.

4.1.3. CD81 REGULA LA DISPONIBILIDAD DE dNTPS EN LA CÉLULA

Para saber si la importancia de CD81 en la replicación viral se debe a la regulación de la actividad de SAMHDI, decidimos utilizar la línea celular Jurkat, que expresa CD81 pero carece de expresión de SAMHDI (datos no mostrados). Estas células fueron transfectadas con el siARN frente a CD81 o se trataron con el péptido citopermeable bloqueante y se infectaron con el virus del VIH. El descenso en la expresión de CD81 se cuantificó mediante western-blot (Figura 14A). Los efectos sobre la replicación se midieron por PCR cuantitativa y no se observaron diferencias entre condiciones, lo que confirma que el efecto observado depende de la presencia de SAMHDI (Figura 14).

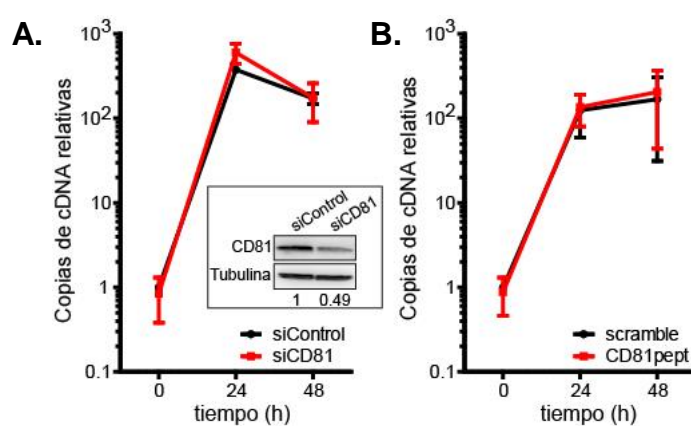


Figura 14. CD81 requiere la presencia de SAMHDI para ejercer su regulación sobre la RT viral. **A.** Células T Jurkat se transfectaron con el siRNA de CD81 y el control. La eficiencia del procedimiento se analizó mediante western-blot. Como control de carga se usó tubulina. En la parte inferior se muestra el resultado de la relación entre la señal de CD81/tubulina. Las células se infectaron con la cepa HIV-1-NL4-3 y los productos de la retrotranscripción se midieron mediante qPCR tras 24 y 48 horas. Los resultados se expresan como el incremento de la media con respecto al tiempo 0 \pm el error estándar de dos experimentos realizados por triplicado. **B.** En este caso, las células Jurkat se trataron durante cinco días con una concentración de 2 μ M del péptido control (scramble) y CD81. La infección se realizó con la cepa HIV-1-NL4-3 y los resultados se analizaron igual que en A.

Debido a que la ausencia de SAMHDI anula el efecto positivo de CD81 sobre la replicación viral, el siguiente paso más lógico fue caracterizar cómo la actividad de SAMHDI era modulada en presencia y ausencia de la tetraspanina. SAMHDI parece tener diferentes sustratos, algunos mejor caracterizados que otros. Fundamentalmente ha sido descrita como una proteína capaz de degradar desoxiribonucleósidos trifosfato (dNTPs). Los niveles de dNTPs se midieron en células HeLa/R5 transfectadas con CD81GFP o el mutante truncado en el dominio citosólico (CD81 Δ Cyt-GFP), los resultados mostraron que al sobreexpresar CD81 se incrementaba la cantidad de dNTPs presentes en la célula (Figura 15A). Esta medida se repitió en células HeLa/R5 y HeLa/R5 Crispr/Cas9CD81 y en linfoblastos T donde la expresión de CD81 se había reducido mediante siRNA (Figura 15B) y en todos los casos, al eliminar o inhibir a CD81 se detectó un descenso en la cantidad de dNTPs intracelulares.

Al ser CD81 una proteína de membrana nos pareció lógico pensar que la tetraspanina podría estar controlando la localización de SAMHDI en la célula. SAMHDI tiene una localización predominantemente nuclear, aunque con condiciones de permeabilización más suaves es posible observar su presencia en el citoplasma (Figura 16A). Realizamos tinciones de células HeLa/R5 usando el anticuerpo frente a SAMHDI y lo primero que observamos es que su distribución en condiciones basales es generalmente difusa y granulosa en el citoplasma de forma bastante homogénea. Sin embargo, en muchas células aparecen además agrupaciones brillantes de mayor tamaño que aumentaban su número cuando disminuía la expresión de CD81 mediante siCD81 (Figura 16A) o se trataban con el péptido bloqueante de CD81 (Figura 16B). En células que sobreexpresaban CD81-GFP, GFP, y CD81 Δ cytGFP se observó el efecto contrario (Figura 16C).

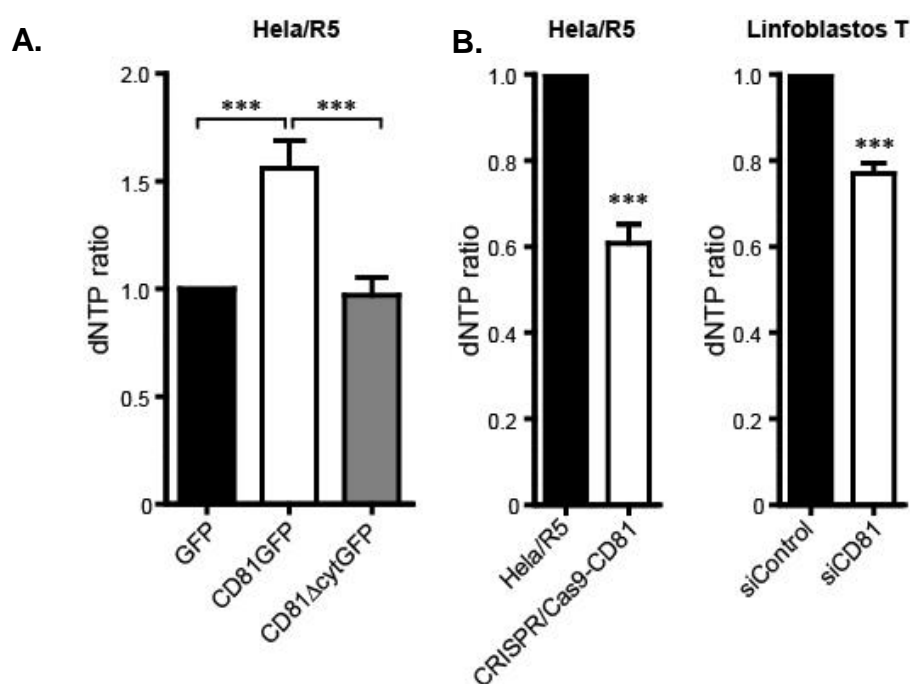


Figura 15. CD81 regula la cantidad de dNTPs en la célula a través de SAMHDI. **A.** La concentración de dNTPs se midió en células HeLa/R5 transfectadas con GFP, CD81-GFP y CD81 Δ cytGFP. Los datos se representan como el incremento de la media con respecto al control \pm el error estándar de tres experimentos independientes analizados por ANOVA de una vía y test de Tukey. **B.** Se hizo el mismo análisis pero en células HeLa/R5 control y HeLa/R5 CRISPR/Cas9-CD81 (izquierda), y linfoblastos T primarios transfectados con siRNA control o frente a CD81 (siCD81) (derecha). En este caso los datos fueron analizados mediante t de Student de cuatro experimentos independientes en HeLa/R5 (** $P < 0.0001$) y de dos en linfoblastos T: (** $P < 0.0001$).

A continuación, quisimos saber a qué correspondían estos agregados e hicimos tinciones usando anticuerpos frente a marcadores de lisosomas (LAMP-1) o endosomas tempranos (EEA-1) y SAMHDI en células transfectadas con el siARN de CD81 o el siRNA control (Figura 17). Estos ensayos revelaron que la tinción de SAMHDI colocalizaba con endosomas tempranos (Figura 17).

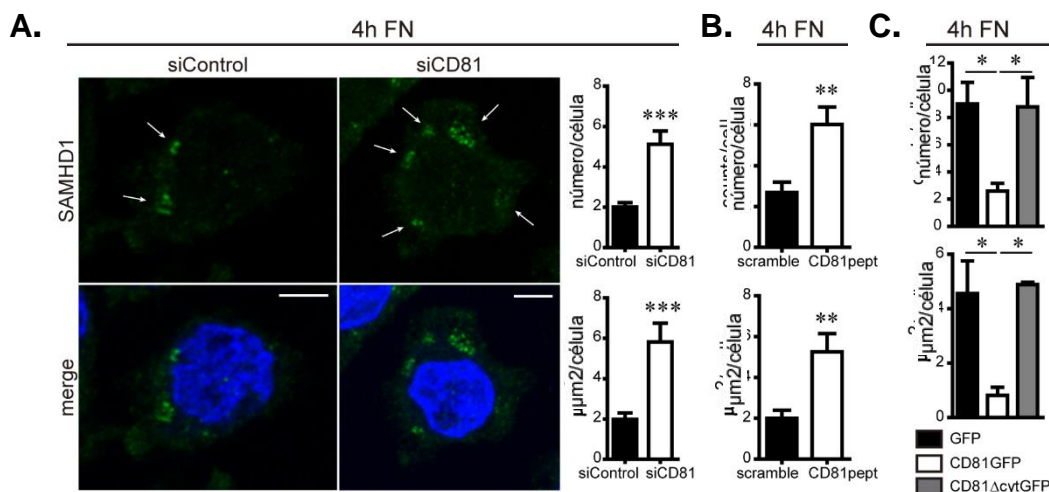


Figura 16. CD81 controla la localización de SAMHD1 en estructuras intracelulares. **A.** Células HeLa/R5 fueron transfectadas con siRNA control o frente a CD81 y se adherieron sobre cubreobjetos recubiertos con FN durante 4 horas, tiempo tras el cual se fijaron, permeabilizaron y tiñeron con anti-SAMHD1 (verde). Las imágenes se adquirieron mediante microscopía confocal y el núcleo se marcó en azul (DAPI). Las imágenes muestran un solo plano confocal. Barra de escala 10 μm. Las flechas blancas marcan las acumulaciones de SAMHD1 en estructuras intracelulares. Se cuantificó el número de agrupamientos por célula (número/célula) y el área de los mismos (μm²), en 230 células de cuatro experimentos independientes. Los resultados se analizaron mediante t de Student. ***P = 0.0005 (arriba) y ***P = 0.0006 (abajo). **B.** Células HeLa/R5 se trataron durante cinco días con el péptido citopermeable control (scramble) y bloqueante de CD81 (CD81pept) y se repitieron los mismos análisis que en **A**, pero en 400 células de cuatro experimentos independientes, analizados también mediante t de Student **p = 0.0063 (arriba) y **p=0.0054 (abajo). **C.** Células HeLa/R5 transfectadas con GFP, CD81-GFP y CD81ΔcytGFP se analizaron de la misma forma pero en un total de 20 células de 2 experimentos independientes mediante ANOVA de una vía y test de Tukey.

4.1.4. CD81 REGULA LA EXPRESIÓN DE SAMHD1 EN LA CÉLULA

En las tinciones realizadas también se observaba un aumento en los niveles de expresión de SAMHD1 en ausencia de CD81. Para comprobar si la tetraspanina estaba de hecho modificando la expresión de la enzima analizamos la cantidad de proteína por célula tanto por western-blot como por citometría de flujo (Figura 18). SAMHD1 en los análisis por western blot muestra un patrón con múltiples bandas tanto en linfoblastos T como en HeLa/R5 (Figura 18A), debido a que la forma monomérica de 72 KDa establece interacciones con otras subunidades pudiendo formar dímeros y más importante tetrameros, que son los que tienen actividad dNTPasa. Además, existen modificaciones posttraduccionales que contribuyen a la aparición de otras formas de menor peso molecular como es el caso de la forma oxidada de SAMHD1. Los ensayos de citometría se realizaron en células HeLa/R5 y CRISPR/Cas9CD81 (Figura 18B). Ambos métodos revelaron un aumento en los niveles de SAMHD1 en ausencia de CD81.

Tras estos descubrimientos decidimos analizar si la degradación de SAMHD1 estaba alterada. Para ello tratamos las células con inhibidores de las distintas vías de degradación proteica: NH₄Cl que inhibe al lisosoma al disipar el pH ácido de estos orgánulos e inhibe la autofagia y MG132 que inhibe al proteasoma (Figura 18C).

Cuando las células control fueron tratadas con este último inhibidor, la cantidad de SAMHDI aumentaba. Sin embargo, el tratamiento en células que no expresan CD81 no tiene ningún efecto. Esto indica que la actividad del proteasoma está ya de por sí reducida en células carentes de CD81, antes de añadir el inhibidor. Si tratamos las células con NH₄Cl se observa un pequeño incremento en la expresión de SAMHDI tanto en las células control como en las delecionadas para CD81, siempre siendo más alta en las células CRISPR/Cas9 CD81 (Figura 18C). Esto quiere decir que la degradación de SAMHDI ocurre solo de forma marginal por la vía lisosomal y que esta vía no está afectada por la deleción de CD81. Sin embargo, en ausencia de CD81, la célula incrementa la tasa de degradación de SAMHDI por la vía del proteasoma, lo que incrementa los dNTPs disponibles en la célula para que el virus pueda llevar a cabo la transcripción reversa. Por tanto, la inhibición de CD81 es una posible estrategia para actuar frente a la infección de VIH u otros virus que requieran dNTPs para replicarse.

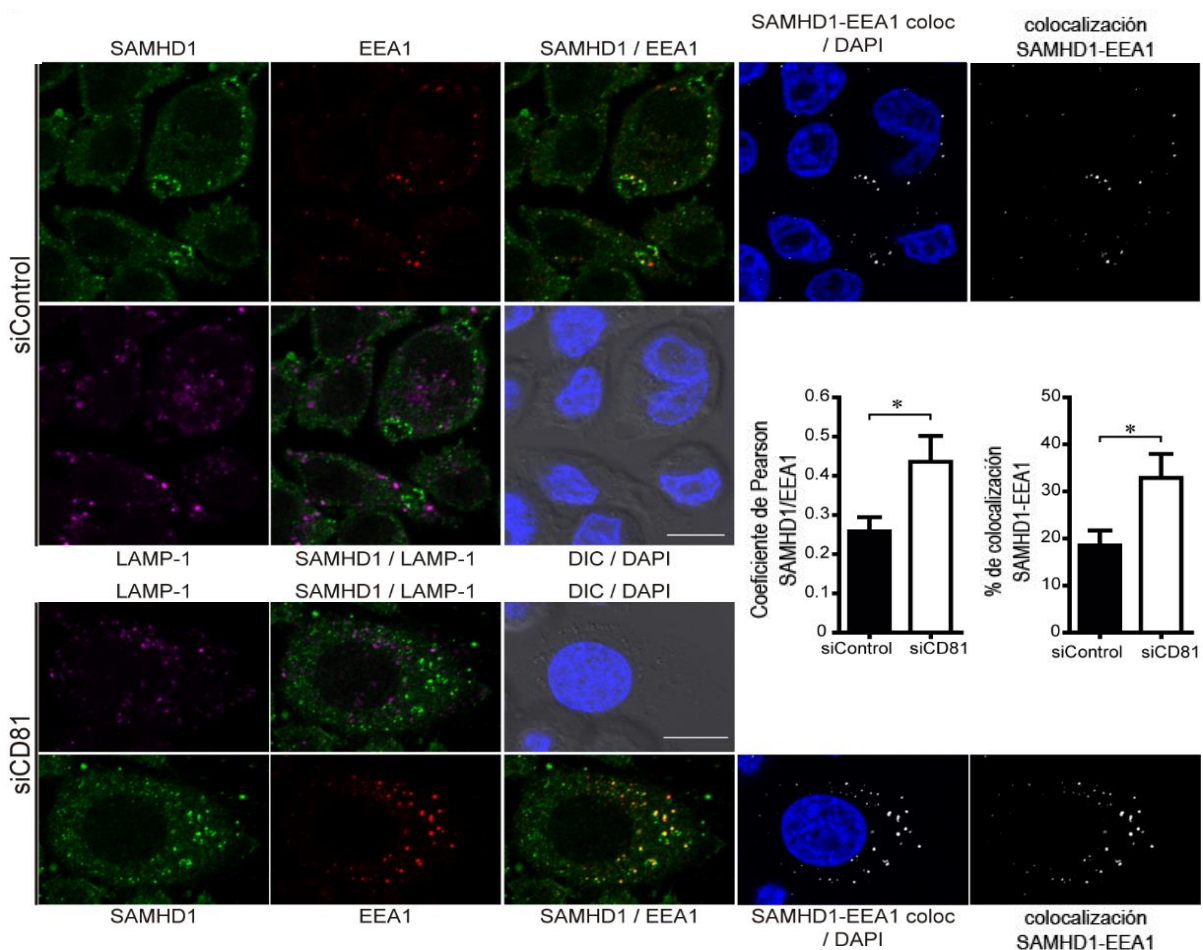


Figura 17. SAMHDI está parcialmente enriquecido en endosomas tempranos. Células HeLa/R5 se transfectaron con siRNA control o siRNA de CD81. Las células se sembraron sobre cubreobjetos recubiertos de FN, se fijaron, permeabilizaron y se tiñeron con anti-SAMHDI (verde), EEA-I (rojo) y LAMP-I (magenta). El núcleo se marcó con DAPI (azul). También se muestran las imágenes de DIC, la colocalización entre SAMHDI y EEA1 en los dos canales, así como la imagen con las regiones de colocalización positiva marcadas como áreas blancas. Únicamente se muestra un plano confocal. Barra de escala 10 μ m. Todas las imágenes obtenidas se cuantificaron, utilizando el total de imágenes de la secuencia tridimensional. Se calculó el coeficiente de Pearson como medida de colocalización y el porcentaje de SAMHDI que colocaliza con endosomas tempranos. Se analizaron 200 células de tres experimentos independientes mediante t de Student * $p = 0.0262$ (Pearson) y * $p = 0.0479$ (%).

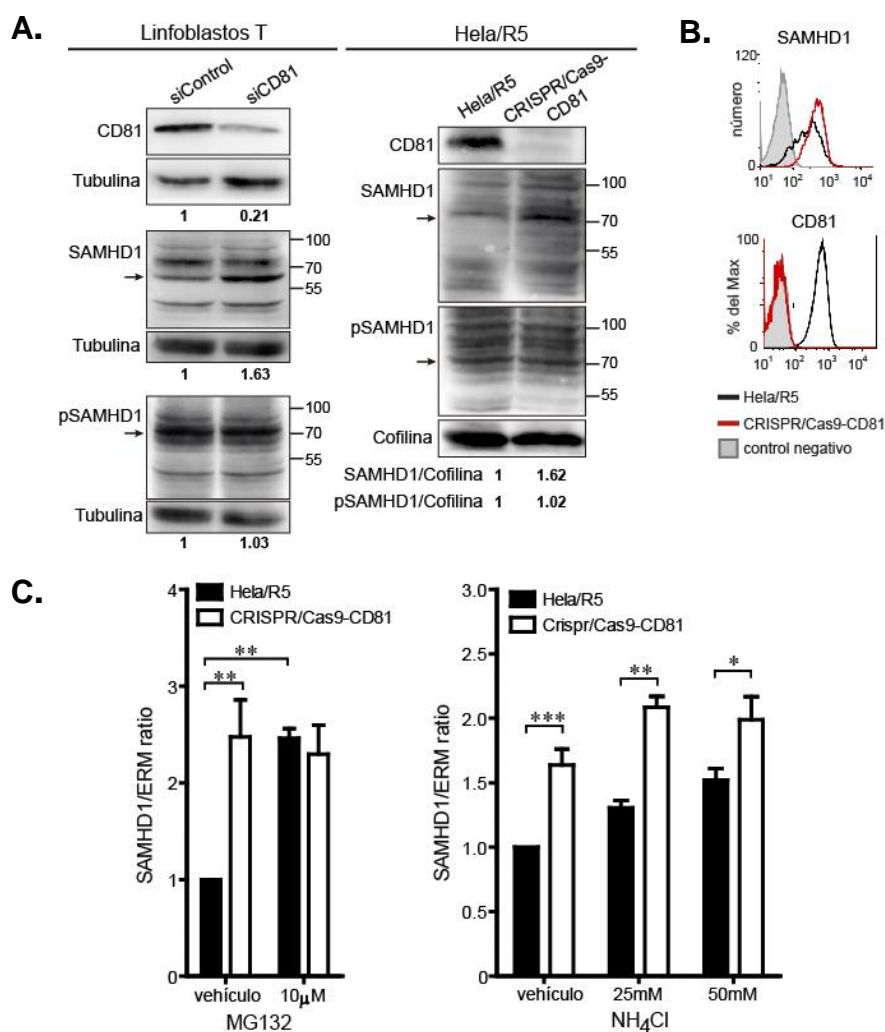


Figura 18. CD81 regula la expresión de SAMHD1. **A.** Linfoblastos T transfectados con siRNA control y de CD81 (siCD81) (izquierda) y HeLa/R5 control o sin CD81 (CRISPR/cas9-CD81) (derecha) se lisaron y se analizó mediante western-blot la expresión de SAMHD1, CD81 y la forma fosforilada de SAMHD1 (pSAMHD1). Como control de carga se utilizó tubulina o cofilina. Bajo las imágenes se indica el valor de la relación entre la intensidad de la banda y su control de carga. **B.** Se analizó la expresión de SAMHD1 mediante citometría de flujo en HeLa/R5 control y CRISPR/Cas9-CD81. La imagen muestra un experimento representativo de 3. Para el control negativo las células se marcaron con el anticuerpo secundario. **C, D.** Las células fueron tratadas durante seis horas con MG132 o NH_4Cl a la concentración indicada. Tras esto, las células se lisaron y se analizó la expresión de SAMHD1, y de ERMs como control de carga, por western-blot. Los gráficos muestran los valores de la relación entre la intensidad de SAMHD1/ERM, como el incremento de la media con respecto al grupo control, de tres experimentos en c, o dos en d, analizados por ANOVA de una vía y análisis de Bonferroni.

4.2. ESTUDIO DEL PAPEL DE CD9 EN EL SISTEMA ENDOSOMAL

4.2.1. LA SECRECIÓN DE EVS DEPENDE DE CD9

Trabajos previos en el laboratorio demostraron que al eliminar el gen para CD81 o al bloquear su actividad mediante el uso de péptidos, no se producían cambios en la secreción de EVs aunque sí se observaban algunos cambios en su composición proteica (Perez-Hernandez et al., 2013). En este contexto, nos preguntamos si CD9, que está especialmente enriquecida en EVs, podría tener un papel más crítico en su biogénesis. Debido a que CD9 es un importante regulador de la progresión tumoral y la metástasis, decidimos emplear una línea celular de melanoma humano para nuestros estudios: Skmel-147 (Fan et al., 2010). De forma análoga a lo que se realizó en experimentos anteriores, el gen de la tetraspanina se eliminó mediante el sistema CRISPR/Cas9 y en paralelo, las células control se trataron con un péptido que porta la secuencia de la región carboxilo terminal de

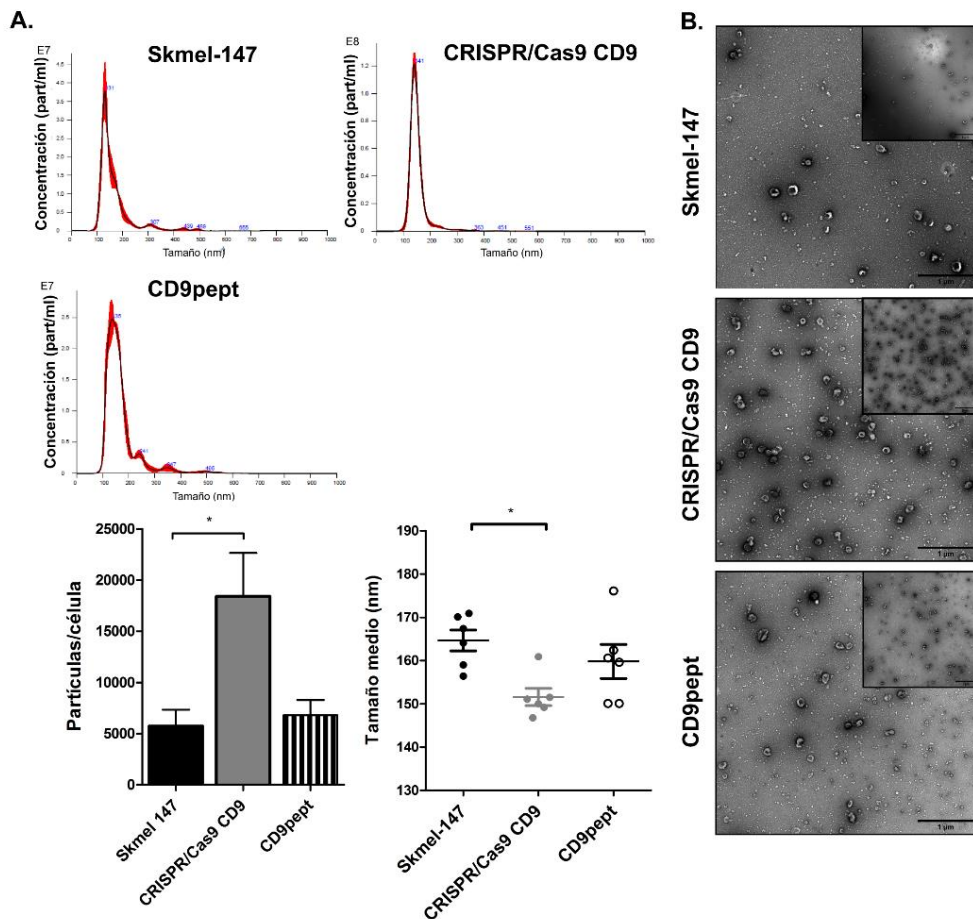


Figura 19. La ausencia de CD9 incrementa la secreción de EVs. A. Se muestra un gráfico de NTA representativo de cada condición. La gráfica de la izquierda recoge los datos de concentración con respecto al número de células sembrado en cada experimento (partículas /célula), a la derecha el tamaño medio de las partículas (nm). En ambos casos se representa la media \pm el error estándar de 6 experimentos independientes analizados mediante ANOVA de una vía y test de comparaciones múltiples de Dunn's $*p < 0.05$. **B.** Se aislaron las EVs del medio mediante cromatografía de exclusión (SEC), se fijaron y tiñeron para microscopía electrónica de transmisión. El cuadro más pequeño es una imagen a menores aumentos para mostrar la diferencia de concentración en cada condición. Barra de escala 5 μ m para la imagen pequeña y 1 μ m para la principal.

CD9 (CD9pept). Mediante Nanoparticle Tracking Analyses (NTA) se cuantificaron las vesículas extracelulares (EVs), directamente en medios de cultivo condicionados con el objetivo de afectar lo menos posible la integridad de las vesículas. Los datos de concentración obtenidos, normalizados respecto al número de células presente en cada experimento, muestran un incremento en la secreción de vesículas en los cultivos de células delecionadas para CD9 (Figura 19A), siendo dichas vesículas de un menor tamaño (Figura 19A). Los resultados de NTA se confirmaron con el sistema Spectradyne que detecta cambios en el pulso eléctrico al paso de una partícula por un poro, lo que le hace mucho más sensible y fiable que los métodos que usan la dispersión de la luz como mecanismo de detección. Con este otro método se cuantificaron 1.59×10^{10} partículas/ml en el medio condicionado por células Skmel-147, 3.12×10^{11} partículas/ml en el medio de células CRISPR/Cas9 CD9 y 2.2×10^{10} partículas/ml en las células tratadas con el CD9pep. En paralelo, estas vesículas se purificaron por cromatografía de exclusión por tamaño y posteriormente se analizaron mediante microscopía electrónica (Figura 19B). En todos los casos, detectamos que las células que no expresan CD9 secretan un número mayor de vesículas en comparación con las células control, mientras que no detectamos variaciones en estos parámetros en las células tratadas con el péptido. Los resultados de microscopía electrónica corroboran que su estructura es correcta y que no parece haber defectos en su biosíntesis (Figura 19B).

4.2.2. DISEÑO DE UN MÉTODO DE DETECCIÓN DE EVS MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

Debido al tamaño tan reducido de las vesículas extracelulares, las técnicas que existen actualmente para su cuantificación no son muy precisas, requieren tiempo y aparataje muy caro. En el laboratorio

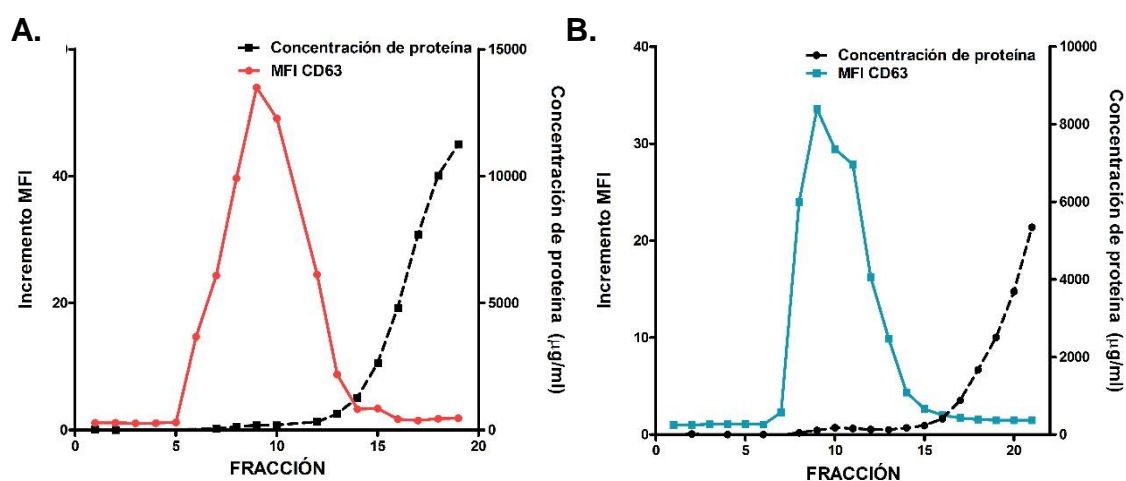


Figura 20. Perfil de elución de las EVs por SEC. Sobre la columna de sefarsa se carga el medio de cultivo condicionado previamente concentrado de células de melanoma (A) o linfoblastos T (B). La línea oscura muestra los valores de intensidad media de fluorescencia (MFI) de cada fracción obtenida mediante citometría de flujo tras acoplarlas a las microesferas de aldehído-sulfato y marcarlas con el anticuerpo frente a CD63. Se representan como el incremento de la intensidad de fluorescencia de la muestra con respecto al control de isotipo (eje Y izquierdo). La línea coloreada marca en ambos casos la concentración de proteína de cada fracción medida mediante BCA (eje Y derecho).

nos planteamos el diseño de un método de análisis semi-cuantitativo que nos permita comparar muestras entre sí de manera fiable. Como las vesículas extracelulares se encuentran por tamaño por debajo de los límites de resolución de la citometría, hay que emplear estrategias alternativas para poder analizarlas mediante un citómetro de flujo convencional. Una estrategia posible es acoplar las EVs a microesferas de látex de 4 μm de diámetro, a las que las vesículas se unen inespecíficamente cuando sus proteínas interactúan con los grupos aldehído sulfato expuestos en la superficie de las microesferas. Debido a la naturaleza de este acoplamiento, hay que tener en cuenta que cualquier contaminante proteico podría competir en la unión, así que se requiere que la muestra sea lo más limpia posible. Para conseguirlo se utilizó el método que mejor separa las vesículas de las proteínas solubles del medio, la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC).

Para estos experimentos se utilizaron EVs secretadas por células de melanoma Skmel-103 y linfoblastos T. Las células se sembraron durante una semana y transcurrido este tiempo el medio de cultivo se concentró mediante ultrafiltración para reducir el volumen de 60 ml hasta 1.5 ml que se carga en una columna de sefarosa. El perfil de elución de vesículas se analizó por citometría de flujo de cada una de las fracciones, tras acoplarlas a las microesferas de látex y marcarlas con anticuerpos frente a CD63. También se analizó la concentración proteica mediante BCA. Como se observa en la Figura 20, mediante SEC es posible separar las vesículas extracelulares en las fracciones con mayor señal para CD63 en las que los valores de concentración de proteína son prácticamente indetectables, del resto de contaminantes proteicos del medio de cultivo que eluyen en las últimas fracciones de la cromatografía. El perfil proteico de estas vesículas varía en función del tipo celular, por eso es importante caracterizarlas previamente para conocer qué marcador se expresa mejor y permite obtener una mayor intensidad de fluorescencia. Para el análisis se emplearon marcadores típicos de EVs como las tetraspaninas CD9, CD81 y CD63 y MHC-I así como la proteína reguladora

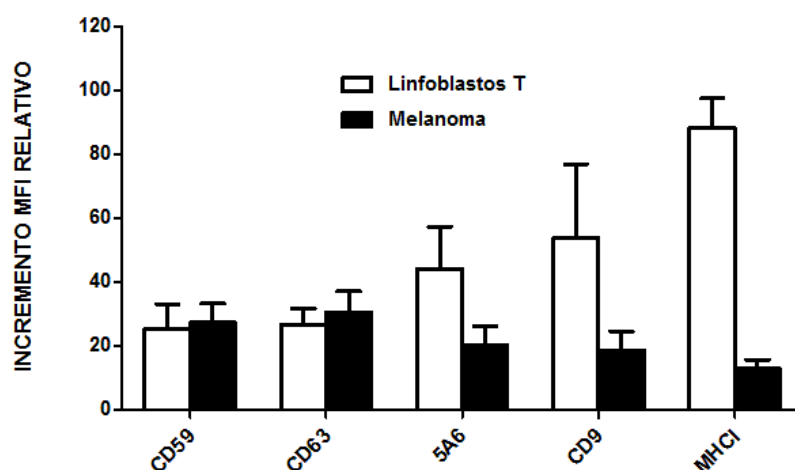


Figura 21. Caracterización de las vesículas extracelulares. A. Las EVs de melanoma y de linfoblastos T aisladas mediante SEC se analizaron por citometría de flujo tras teñirlas con anticuerpos frente a marcadores típicos de EVs. Los datos se muestran como la media \pm el error estándar del incremento de la media de fluorescencia, con respecto al control negativo, de 3-5 experimentos.

del complemento acoplada a GPI CD59, que se expresa de forma muy abundante en casi todos los tipos celulares. CD63 y CD59 fueron las proteínas con mayor expresión en las vesículas procedentes de melanoma y CD63 y MHC1 en las secretadas por linfoblastos T (Figura 21). Tras esto, quisimos comprobar si era posible detectar cambios en la concentración de vesículas y si estos cambios tenían una relación lineal con la señal detectada por citometría. Para ello se eligieron dos marcadores para cada tipo celular y se prepararon múltiples diluciones seriadas de las vesículas que se acoplaron a las microesferas de látex para ser marcadas y analizadas. Como se muestra en la Figura 22 A y B, al representar la concentración frente a la intensidad media de fluorescencia se obtiene una curva que se satura a las concentraciones más altas, pero hay un rango que posee un

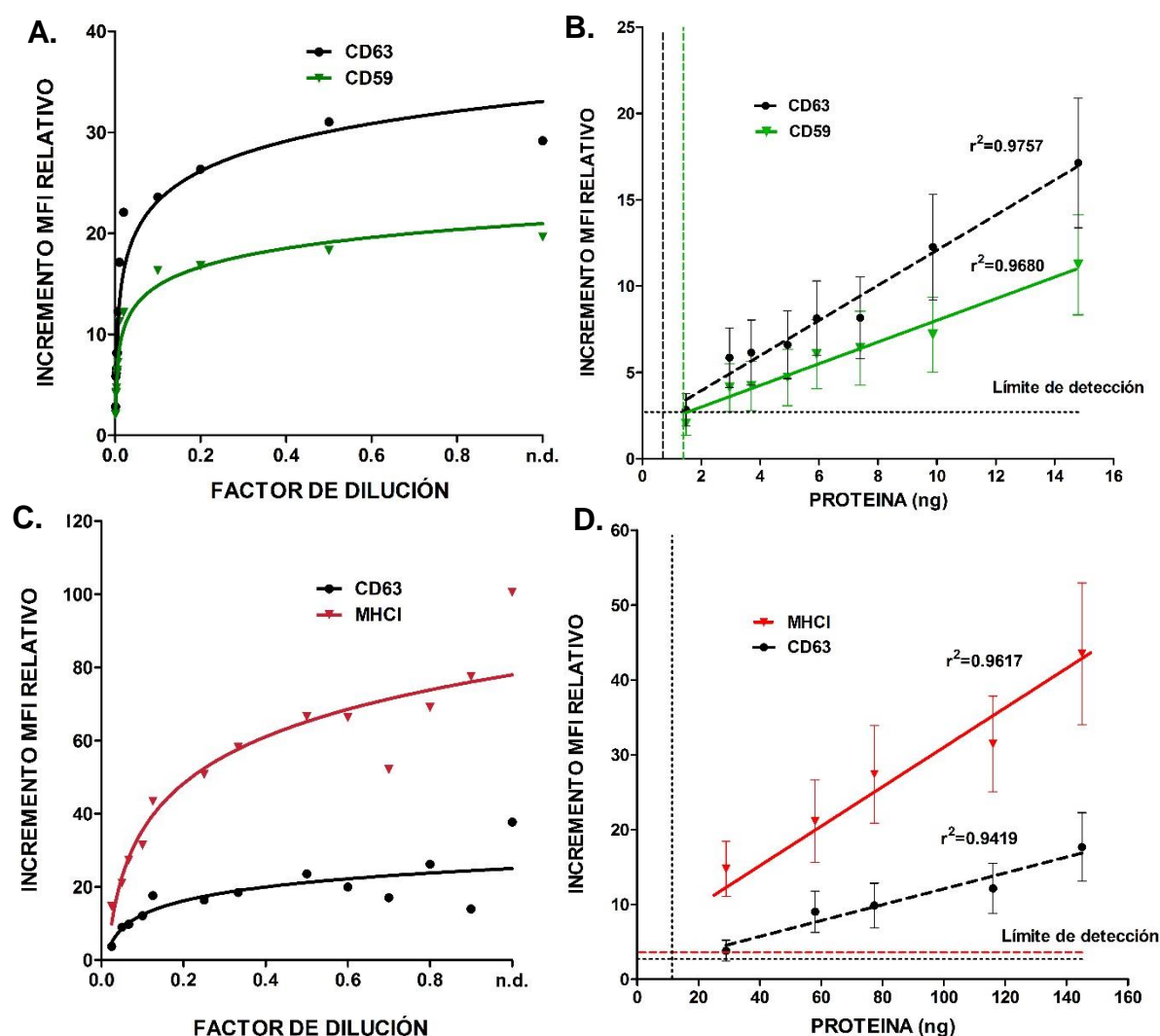


Figura 22. Los valores de MFI y la cantidad de vesículas tienen una correlación lineal. Las diluciones de EVs se acoplaron a las microesferas y se analizaron por citometría de flujo. Los gráficos superiores corresponden a los datos de melanoma y los inferiores a los de linfoblastos T. En las gráficas A y C se representa el factor de dilución en el eje X y el incremento de MFI con respecto al control negativo en el eje Y. En las gráficas B y D en el eje X se representa la concentración de proteína de cada fracción, obtenida a partir de medir la fracción sin diluir mediante BCA, y los valores de intensidad de fluorescencia con respecto al control negativo se representan en el eje Y. En ambas gráficas solo se representan los valores que se encuentran dentro del rango lineal del método (en el caso de las vesículas de melanoma las diluciones comprendidas entre 1/100-1/1000 y en linfoblastos T de 1/8-1/40). Para la detección se usó anti-CD63, anti-CD59 y anti-MHC1. El límite de detección para cada anticuerpo se representa como una línea discontinua. Los valores de r^2 se muestran en el gráfico. En todos los casos $p < 0.001$.

comportamiento lineal. Medimos la concentración proteica de las vesículas y representamos la señal frente a la concentración de cada punto (Figura 22 C y D). La zona lineal se sitúa entre 1 y 15 ng para las células Skmel103 y entre 30 y 150 ng para MHC I y CD63 en linfoblastos T y además los valores de r^2 de las rectas son próximos a 1. El límite de detección del ensayo está determinado por la señal del control negativo + 3 veces su desviación estándar, que se ha representado con una línea discontinua en los gráficos de la Figura 22 B y D.

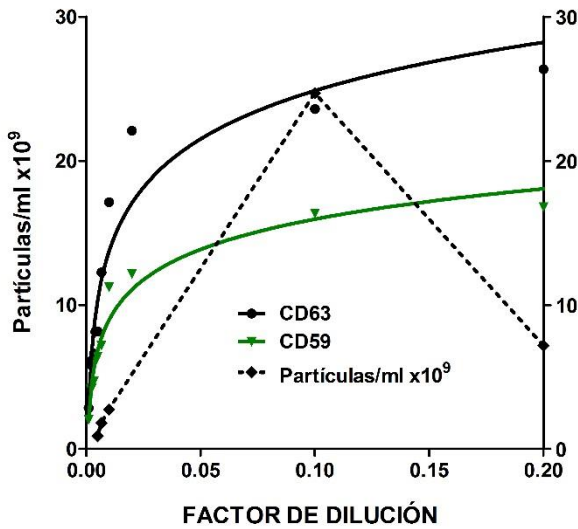


Figura 23. Comparativa entre la cuantificación realizada a través de la citometría de flujo y los análisis de NTA. Varias diluciones se analizaron mediante ambos métodos. La concentración de partículas se representa en el eje Y izquierdo, y los datos de fluorescencia obtenidos con anti-CD63 y anti-CD59, como incremento de la intensidad de fluorescencia con respecto al control, se muestran en el eje Y derecho.

El método más empleado para medir concentración de vesículas es el NTA, aunque sus resultados son altamente dependientes de la concentración y de la calidad de la muestra. Como se observa en la gráfica, esta técnica detectó las diferencias en muestras que han sido diluidas entre 10 y 200 veces. Sin embargo, para diluciones que contenían un número mayor de vesículas, la medida se encontraba fuera del rango de linealidad de la técnica y, como ocurre con la dilución de 0.2, el

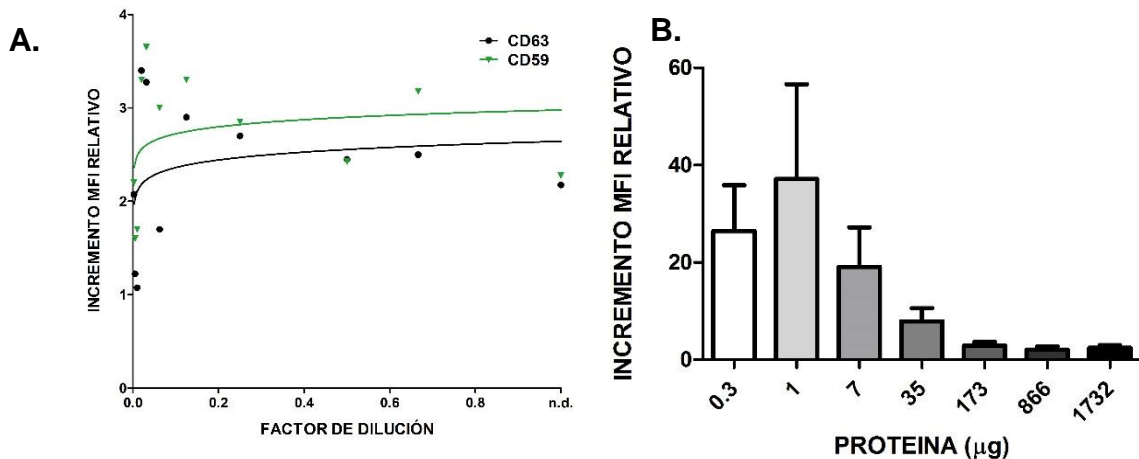


Figura 24. La señal de fluorescencia se reduce en presencia de contaminantes proteicos. A. Las vesículas de melanoma se concentraron mediante ultracentrifugación y se repitieron las diluciones seriadas antes de acoplarlas a las microesferas. Se marcaron usando anti-CD63 y anti-CD59. En la gráfica se muestran los valores de fluorescencia con respecto al control negativo (eje Y) y en el eje X el factor de dilución de la muestra. B. Vesículas aisladas por SEC se acoplaron a las microesferas en presencia de cantidades crecientes de proteína que se obtuvo de las últimas fracciones de SEC y se midieron por citometría de flujo usando anti-CD63. Los datos corresponden a la media \pm error estándar de la MFI respecto al control en tres experimentos independientes.

aparato dio como resultado una menor concentración que para diluciones mayores. El problema principal con esta técnica de cuantificación es que para el operador es difícil conocer cuándo el sistema está en condiciones de saturación y por tanto es fácil obtener resultados erróneos (Figura 23). También analizamos si el método se puede usar con muestras de EVs aisladas con otras técnicas como la ultracentrifugación. Los resultados se muestran en la Figura 24A. Como predijimos inicialmente, los contaminantes proteicos impiden detectar diferencias en la concentración principalmente porque compiten con la unión de las vesículas a las microesferas. Para corroborar esta idea añadimos cantidades crecientes de proteína a las vesículas que previamente habíamos aislado por SEC (Figura 24B) y observamos un declive de la señal obtenida por citometría.

4.2.3. EL AUMENTO DE LA CONCENTRACIÓN DE EVs AL ELIMINAR CD9 FUE DETECTADO POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Una vez que pusimos a punto el método para cuantificar EVs, analizamos los medios condicionados de Skmel-147, CRISPR/cas9CD9 y CD9pept. La recta patrón se hizo utilizando dos marcadores típicos de EVs CD63 y CD59 (Figura 25). Al interpolar los datos de MFI de las muestras se obtiene para CRISPR/Cas9 CD9 una cantidad de proteína vesicular de 370,5 μg o 375,1 μg al interpolar en la recta de CD63 o CD59, respectivamente. Las células tratadas con el péptido de CD9 arrojan unos valores de 127,3 μg o 97,4 μg ; frente a los 212 μg del grupo control. Los datos corroboran el aumento de la cantidad de vesículas liberadas por las células CRISPR/Cas9 CD9 detectado anteriormente mediante técnicas convencionales y apuntan, sin embargo, a una reducción de EVs tras el tratamiento con el péptido bloqueante. Esta reducción también se había detectado en algunos ensayos mediante técnicas convencionales, pero con una gran variabilidad en la medida.

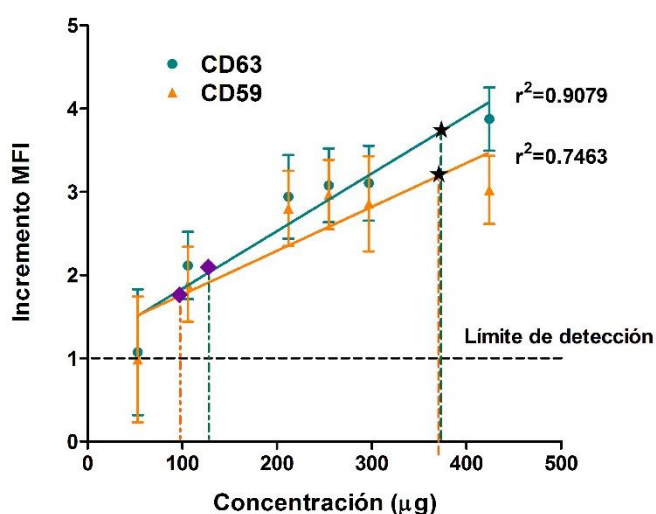


Figura 25. Análisis de la concentración de EVs secretada por las células Skmel-147 mediante citometría de flujo. La recta patrón se hizo utilizando anticuerpos frente a CD63 (verde) y CD59 (naranja). Los valores de r^2 de cada recta se muestran en la gráfica y la línea discontinua negra indica el límite de detección del método. Los valores de MFI obtenidos al diluir las muestras de EVs procedentes de las células CRISPR/Cas CD9 y CD9 pept a la mitad, se interpolaron en ambas rectas para obtener la cantidad de proteína correspondiente (valores en el texto). Éstos se representan como estrellas negras en el caso de las muestras CRISPR/Cas CD9, y para CD9pept como rombos de color morado.

4.2.4. CD9 CONTROLA EL CARGO DE LAS EVs

CD9 afecta a la concentración de EVs secretadas por las células, pero también puede tener la capacidad de controlar qué proteínas son incluidas en estas vesículas. Para analizar este factor hicimos un análisis mediante espectrometría de masas comparando EVs derivadas de medio condicionado de células control, tratadas con el péptido bloqueante o delecionadas mediante CRISPR/Cas9. Mediante esta técnica fuimos capaces de detectar que tanto el tratamiento con el péptido bloqueante o la deleción génica altera la composición de las EVs. En la Figura 26 se muestran aquellas proteínas que se veían aumentadas o disminuidas agrupadas en función de su localización o del proceso biológico en el que participan. Solo se muestran los datos para las células CRISPR/Cas

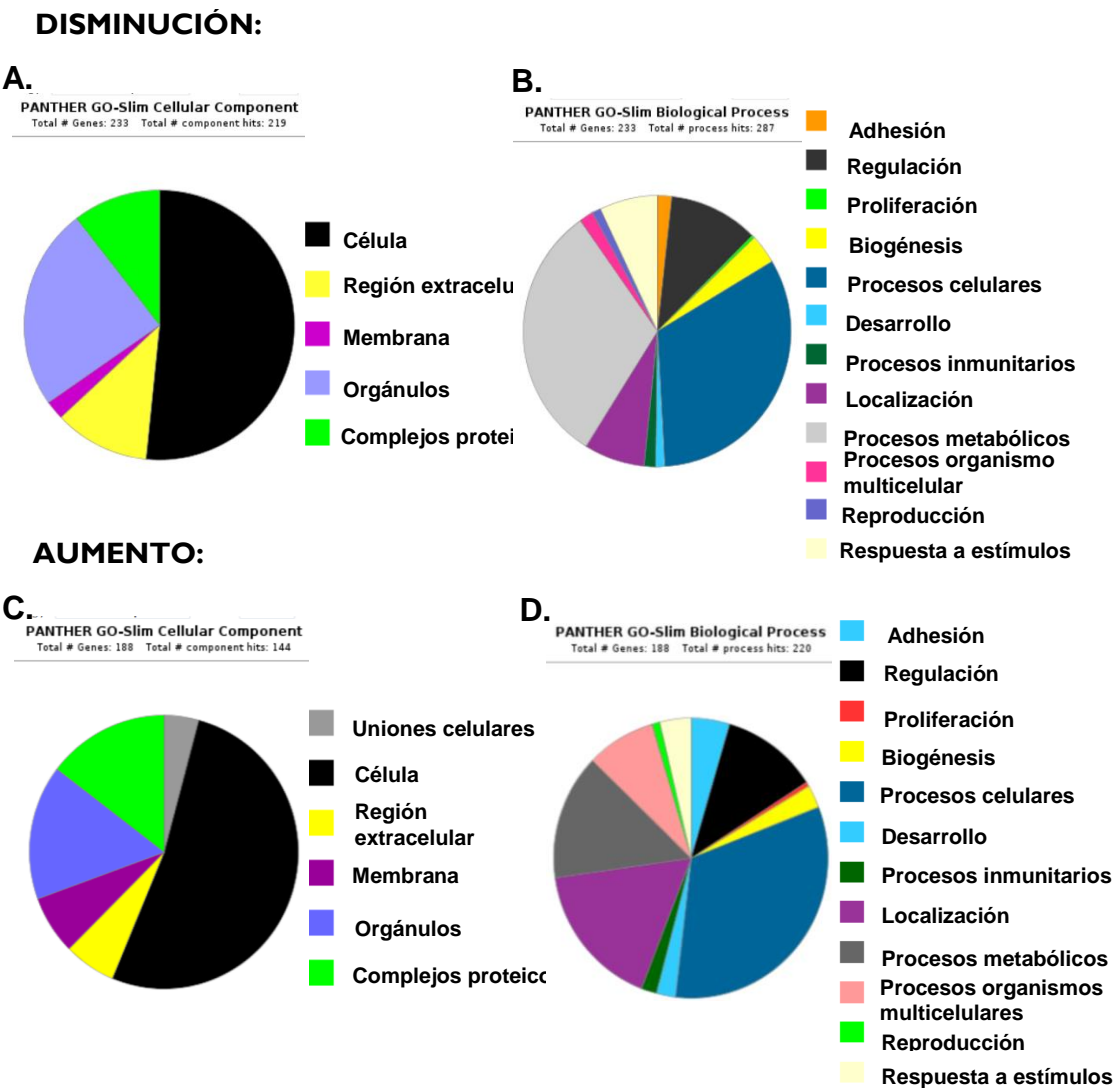


Figura 26. Análisis proteómico de las EVs mediante tecnología iTRAQ. Cambios en el contenido proteico de las vesículas aisladas del medio de cultivo de células CRISPR/Cas CD9 mediante SEC, con respecto a células Skmel-147 control. La información obtenida por espectrometría de masas fue analizada en **A**, **B**, **C** y **D** con el software PANTHER 14.1 **A** y **B**. representan proteínas que han disminuido su expresión en células que no expresan CD9 con respecto a las células control. En **A**. se agrupan en función de su localización en **B**. de su función biológica. **C** y **D**, representan proteínas que han incrementado su expresión con respecto al control **C**, agrupadas según su localización y **D**. según su papel biológico.

CD9. En general, en los medios condicionados de las células CRISPR/Cas9 se observa un aumento en la secreción de proteínas que son marcadores típicos de exosomas, tales como otras tetraspaninas y componentes del complejo ESCRT; así como de vesículas pequeñas y densas como proteínas de matriz extracelular. En el caso de los medios condicionados de células tratadas con el péptido bloqueante del carboxilo terminal de CD9 se observa un aumento de estas últimas, pero una reducción de los marcadores típicos de exosomas, tales como proteínas de unión a ácidos nucleicos, integrinas y tetraspaninas.

4.2.5. CD9 INTERVIENE EN LA FORMACIÓN DE VACUOLAS INTRACELULARES

La línea de melanoma empleada presenta una gran cantidad de vacuolas intracelulares, claramente observables en microscopía de contraste de fase o contraste de interferencia diferencial (DIC). Al eliminar la expresión de CD9, lo primero que se observó mediante microscopía DIC, fue una

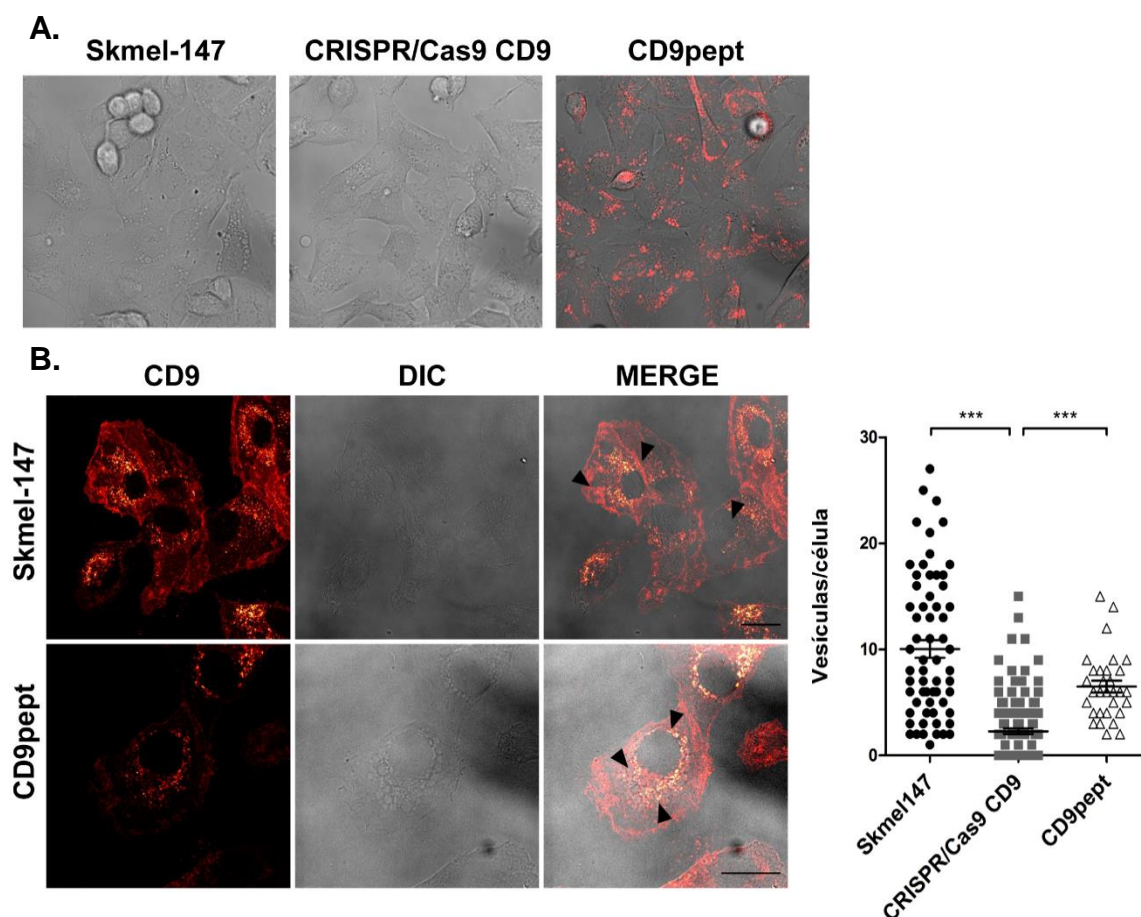


Figura 27. Las células Skmel-147 poseen gran cantidad de vacuolas intracelulares. A. Imágenes de contraste interferencial (DIC) de las células sembradas sobre fibronectina 0.5 $\mu\text{g/ml}$. En el caso de las células tratadas con CD9pept se muestra también la distribución del péptido marcado fluorescentemente en el canal rojo. **B.** Células sembradas sobre fibronectina 0.5 $\mu\text{g/ml}$, fijadas, permeabilizadas y marcadas con anti-CD9. Las flechas negras señalan vacuolas marcadas con el anticuerpo de CD9. La gráfica de la derecha recoge la cuantificación del número de vesículas en 30-100 células de dos experimentos independientes, y se representan como la media \pm el error estándar, analizados mediante ANOVA de una vía y test de comparaciones múltiples de Dunn's *** $p < 0.001$.

disminución drástica en el número y tamaño de estas estructuras (Figura 27A). Se analizó la expresión de CD9 mediante la tinción con anticuerpos específicos en células control y se observó que la tetraspanina se localizaba tanto en la superficie celular como en la membrana de estas vacuolas (Figura 27B).

Para facilitar la observación y cuantificación de estas estructuras las células se transfectaron con un plásmido que codifica para la proteína GFP que, al no estar acoplada a ninguna proteína específica, se distribuye homogéneamente por toda la célula, tanto por el citoplasma como en el núcleo, pero no accede a ciertos compartimentos intracelulares en los que no se detectará fluorescencia. Se adquirieron imágenes de estas células por microscopía confocal y se cuantificó el número de

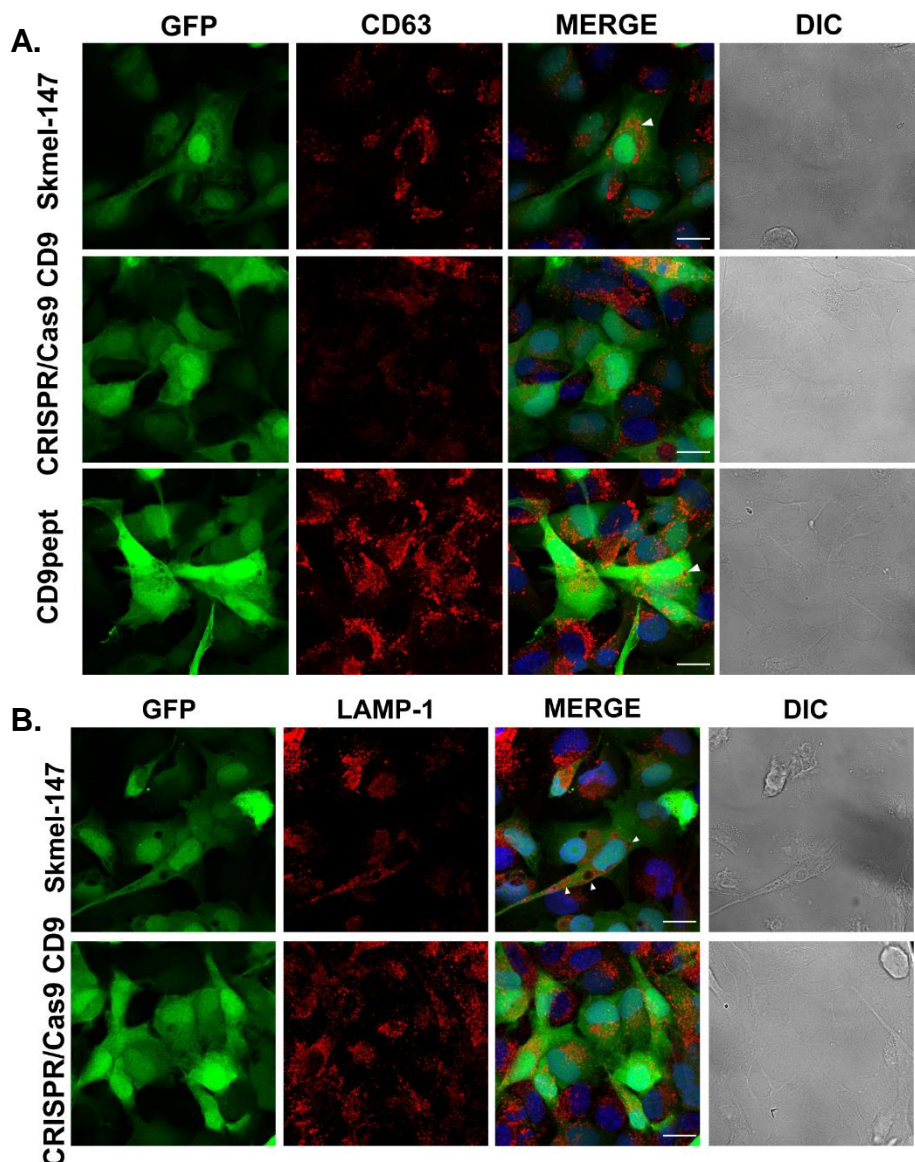


Figura 28. Las vacuolas intracelulares son positivas para marcadores de la ruta endolisosomal. Células transfectadas con GFP (verde) sembradas sobre fibronectina 0.5 $\mu\text{g/ml}$, fijadas, permeabilizadas y marcadas con (A) anti-CD63 o (B) anti-LAMP-1 (rojo). Las imágenes son la proyección máxima de la serie de planos adquirida mediante microscopía confocal. A la derecha se muestra la fusión de los dos canales junto con el UV para el DAPI que tiñe el núcleo (MERGE) y la imagen de contraste de interferencia diferencial (DIC). Barra de escala 20 μm . Las flechas en blanco señalan vacuolas mostrando inmunomarcaje.

vacuolas por célula. Los resultados mostraron claramente una disminución del número en las células que no expresan CD9 (CRISPR/CasCD9) y una reducción parcial al tratar con el péptido bloqueante frente a CD9 (Figura 28B).

Para caracterizar estos compartimentos vacuolares se hicieron tinciones con el anticuerpo que reconoce a la tetraspanina CD63, que como ya se ha mencionado, es un componente muy importante de la mayor parte del sistema de endomembranas sobretodo endosomas tempranos y tardíos (Figura 29A), con LAMP-1, marcador específico de lisosomas (Figura 29B) y con HGS, marcador de endosomas y cuerpos multivesiculares (Figura 30). Como se observa en las imágenes, gran parte de estas vesículas son positivas para CD63 y LAMP-1 mientras que todas mostraban tinción para HGS excepto algunas de las vesículas más grandes.

Se examinó mediante microscopía electrónica la estructura intracelular de las células (Figura 30). Además de la presencia de vacuolas intracelulares en las células control, lo más destacable que observamos fue mayor número de cuerpos multivesiculares, en las células CRISPR/CasCD9 mientras que en las células control la mayoría ellos aparecían fusionados con lisosomas. Por tanto parece que los cuerpos multivesiculares de las Skmel-147 tienen mayor tendencia a entrar en la ruta de degradación que en las células CRISPR/CasCD9. En las células tratadas con el péptido se observan gran cantidad de endosomas y lisosomas.

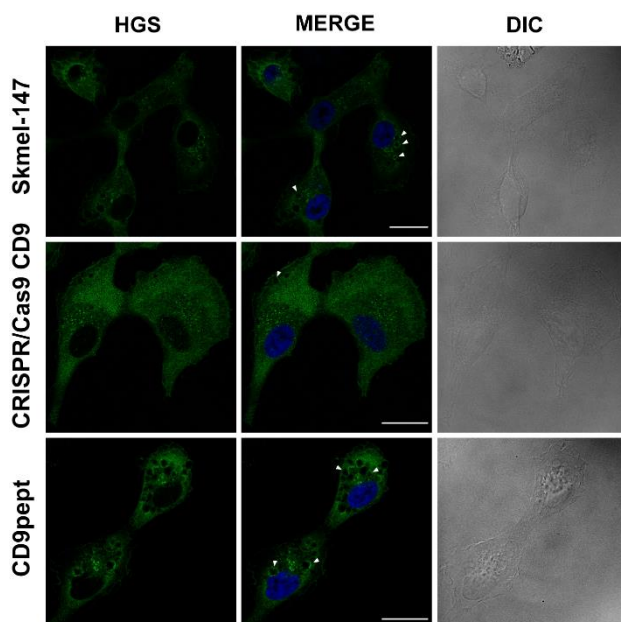


Figura 29. Las células Skmel-147 poseen gran cantidad de vacuolas que son componentes del sistema endosomal. Células Skmel-147, CRISPR/CasCD9 y CD9pet sembradas sobre cristales cubiertos con fibronectina, permeabilizadas y marcadas con el anticuerpo frente a HGS (verde). Las flechas en blanco señalan vacuolas marcadas con el anticuerpo. Se muestra en la columna intermedia la fusión de la imagen con DAPI y a la derecha la foto de DIC. Barra de escala 20 μ m.

4.2.6. CD9 PARTICIPA EN AUTOFAGIA

Múltiples trabajos han descrito que las células de melanoma tienen una autofagia exacerbada (Checinska and Soengas, 2011), así que nuestra primera hipótesis fue que al eliminar CD9 se podrían estar alterando los mecanismos de autodegradación de la célula. Para evaluar este proceso,

analizamos los niveles de LC3, un marcador clásico de autofagia. LC3 participa en la formación del autofagosoma, que es la membrana que engloba el material que debe ser degradado. Para monitorizar el proceso de autofagia utilizamos la construcción de LC3 unida a dos proteínas fluorescentes RFP (roja) y Wasabi (verde)(mRFP-mWasabi-LC3). Los autofagosomas muestran señal de LC3 en ambos canales de fluorescencia. Sin embargo, la proteína Wasabi es altamente sensible al pH ácido ambiente en el que es incapaz de emitir fluorescencia, de forma que cuando el autofagosoma se fusiona con el lisosoma solo se detecta fluorescencia procedente de RFP. Mediante esta construcción pudimos observar que un gran porcentaje de estas vacuolas expresan en su membrana la construcción de LC3 mostrando señal en ambos canales, lo que nos indica que son autofagosomas (Figura 31A). Al comparar los resultados de las células crecidas en condiciones normales o estimulando la autofagia *in vitro* mediante la supresión de nutrientes o, lo que es lo mismo, eliminando el suero del medio de cultivo; observamos que no había diferencias en cuanto al número de estructuras con fluorescencia en ambos canales entre las células Skmel147 y las tratadas con el péptido bloqueante frente a CD9 o CRISPR/Cas9 CD9 (Figura 31B). Sin embargo, cuando se

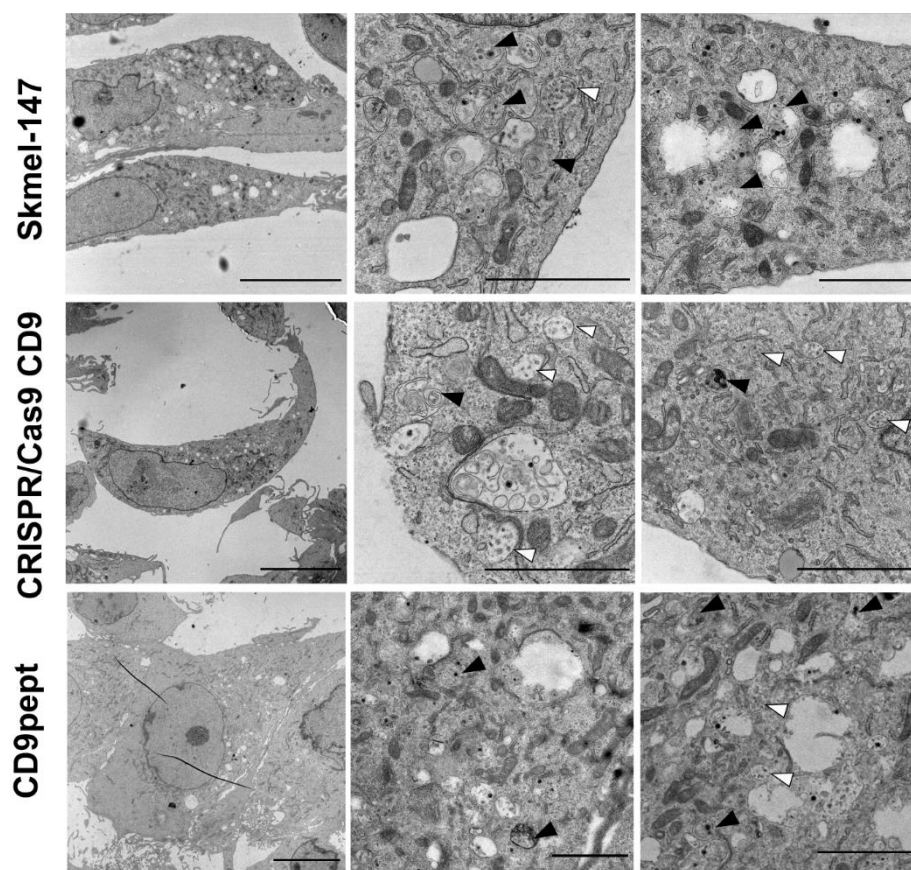


Figura 30. Las imágenes de microscopía electrónica revelan que las Skmel-147 tienen gran cantidad de vacuolas intracelulares. Células Skmel147, CRISPR/Cas CD9 y tratadas con el péptido de CD9 fueron fijadas y teñidas para microscopía electrónica de transmisión. La columna de la izquierda muestra imágenes de menor aumento donde se puede apreciar gran cantidad de vesículas con respecto a las CRISPR/cas CD9. Las células tratadas con el péptido bloqueante de CD9 también presentan vacuolas intracelulares. Las flechas en blanco señalan cuerpos multivesiculares, en negro lisosomas. Barra de escala 2 μ m.

elimina CD9 aumenta el número de puntos que sólo emiten en el canal RFP+ (autofagolisosomas) tanto en condiciones de cultivo normales como en ayuno (Figura 31C). El tratamiento con el péptido bloqueante produce un efecto parcial (no mostrado).

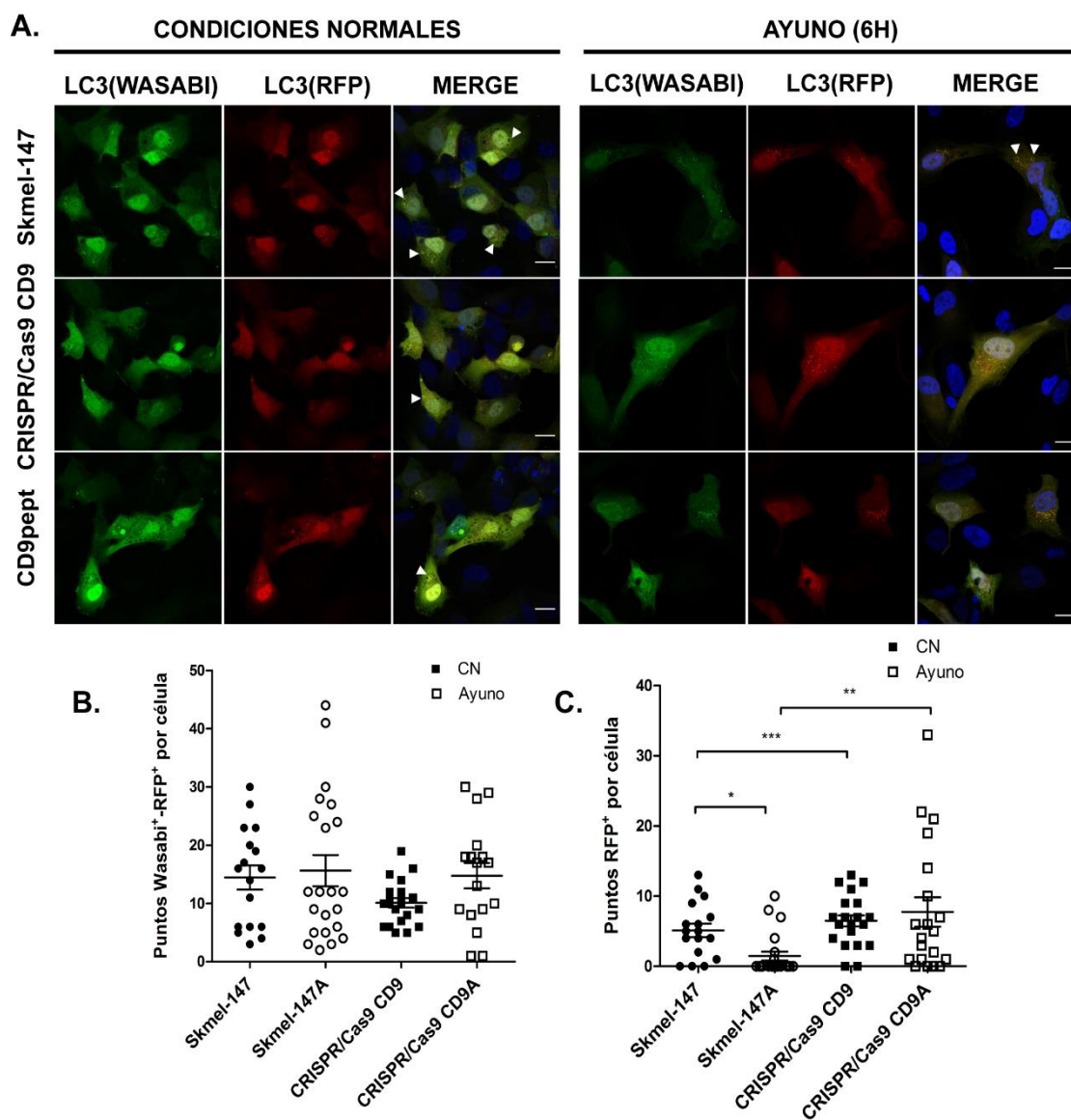


Figura 31. LC3 decora la membrana de las vacuolas intracelulares en las células Skmel-147. Las células Skmel-147, CRISPR/cas9 CD9 y CD9pept se transfectoron con LC3-WASABI-RFP. Se utilizó el péptido de CD9 sin marcaje fluorescente para no afectar a la señal de la RFP. Se sembraron sobre cristales cubiertos de fibronectina 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y se dejaron 6 horas en medio con suero, condiciones normales (izquierda) o sin suero, en ayuno (derecha). Se fijaron y se tiñeron con DAPI. Se muestran las imágenes de LC3 en el canal verde (Wasabi) y rojo (RFP), la unión de los canales rojo, verde y UV para el DAPI aparece en la columna derecha (MERGE). Se cuantificó el número de puntos por célula en un total de 20 células de 2 experimentos independientes. La gráfica **B** muestra los resultados de la cuantificación de los puntos dobles positivos (GFP+RFP+) y **C** los rojos (RFP+) entre condiciones normales (Skmel147 y CRISPR/cas9 CD9) y en ayuno (Skmel147A y CRISPR/Cas9 CD9A). No se observaron diferencias significativas en las células tratadas con el péptido bloqueante de CD9 (no mostrado). Los datos se representan como la media \pm el error estándar y se analizaron por ANOVA de una vía y el test de comparaciones múltiples de Dunn's. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Para continuar estudiando el proceso de autofagia, medimos los niveles de LC3 y p62 endógeno mediante western-blot. Muchos trabajos hacen hincapié en que este tipo de análisis no es un indicador muy fiable del estado de la autofagia celular ya que éste es un proceso extremadamente dinámico, y el análisis por western-blot no permite diferenciar entre los múltiples tipos específicos de autofagia que existen. Para abordar la dinámica del proceso se usaron elementos activadores como el ayuno, e inhibidores como NH₄Cl que destruye el pH ácido del lisosoma y la bafilomicina A1, un inhibidor de la bomba de protones lisosomal (Figura 32 A, B y C)). Este ensayo no detectamos diferencias entre grupos experimentales, pero pudimos confirmar que no había defectos en la actividad lisosomal, puesto que LC3 y p62 se acumulaban al inhibir a ésta (Figura 32 A, B y C).

Para analizar más en detalle el funcionamiento de los lisosomas, cuya actividad depende en gran medida de que mantengan un pH ácido, utilizamos la sonda fluorescente LysoTracker Green, que es permeable a la membrana y su fluorescencia aumenta a pH ácido. En estos ensayos, medidos tanto

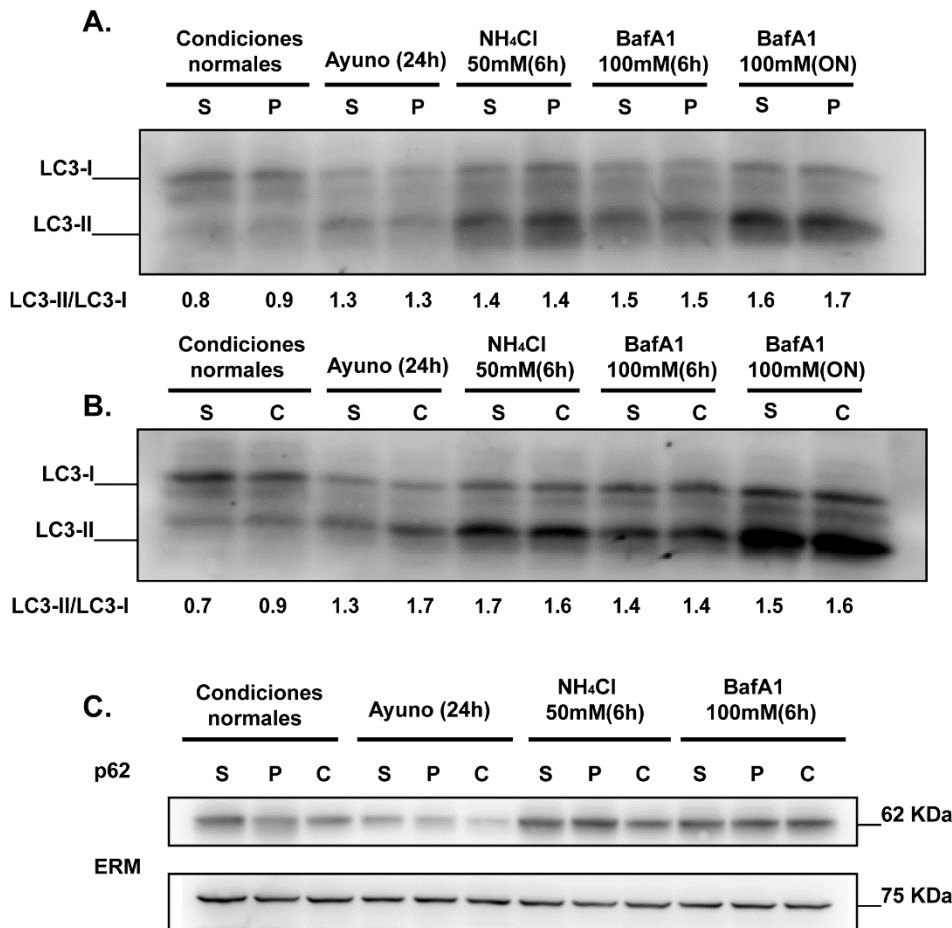


Figura 32. CD9 no afecta a la autofagia global. Las células fueron sometidas a diferentes tratamientos como se indica en la Figura, estimuladores de la autofagia como el ayuno, e inhibidores como el NH₄Cl y la bafilomicina A1 (BafA1) a los tiempos indicados en la Figura y posteriormente se lisaron. En **A** se compararon las Skmel-147 (S) y CD9^{pep} (P), mientras que en **B** la comparativa se realizó entre células Skmel-147 (S) y CRISPR/Cas9 CD9 (C). En ambos geles se analizó la relación entre la intensidad de la banda de L3-II y LC3-I como medida de la inducción de la autofagia. En todos los casos las células responden correctamente a todos los estímulos, como indica el incremento de LC3-II. **C.** Se muestra el western-blot para p62, como control de carga se usó anti-ERM, al igual que ocurre con LC3, las células responden correctamente a los estímulos acumulando p62.

por microscopía de fluorescencia como por citometría de flujo, no se observaron diferencias entre grupos en condiciones normales. Sin embargo, tras someter a las células a la privación de nutrientes durante un periodo de 24 ó 48 horas, las células CRISPR/cas9 CD9 generan un incremento mayor de la fluorescencia, lo que indica un mayor aumento de compartimentos ácidos durante el ayuno (Figura 33 A y B).

Decidimos analizar de forma aislada la autofagia específica para la mitocondria o mitofagia. Para ello las células se transfectaron con un plásmido que contiene la secuencia de una proteína de matriz mitocondrial (COX VIII) acoplada a una proteína fluorescente, Keima, que además de ser resistente a las proteasas lisosomales tiene una fluorescencia dependiente de pH. A pH ácido tiene un máximo de excitación a 561nm y a pH neutro el máximo de excitación se desplaza a 458nm, mientras que la longitud de onda de emisión es la mismo en ambas condiciones (610nm). Podemos por tanto monitorizar el proceso de mitofagia al medir el aumento de la excitación a 561nm cuando la mitocondria es internalizada en el autofagolisoma. Se adquirieron imágenes de las células vivas mediante microscopia confocal y se midieron los valores de intensidad de fluorescencia a 610 nm, cuando se excitaba con uno u otro láser. La relación entre ambas longitudes de onda se muestra en la Figura 34. En estos análisis observamos una reducción en los niveles de mitofagia en las células

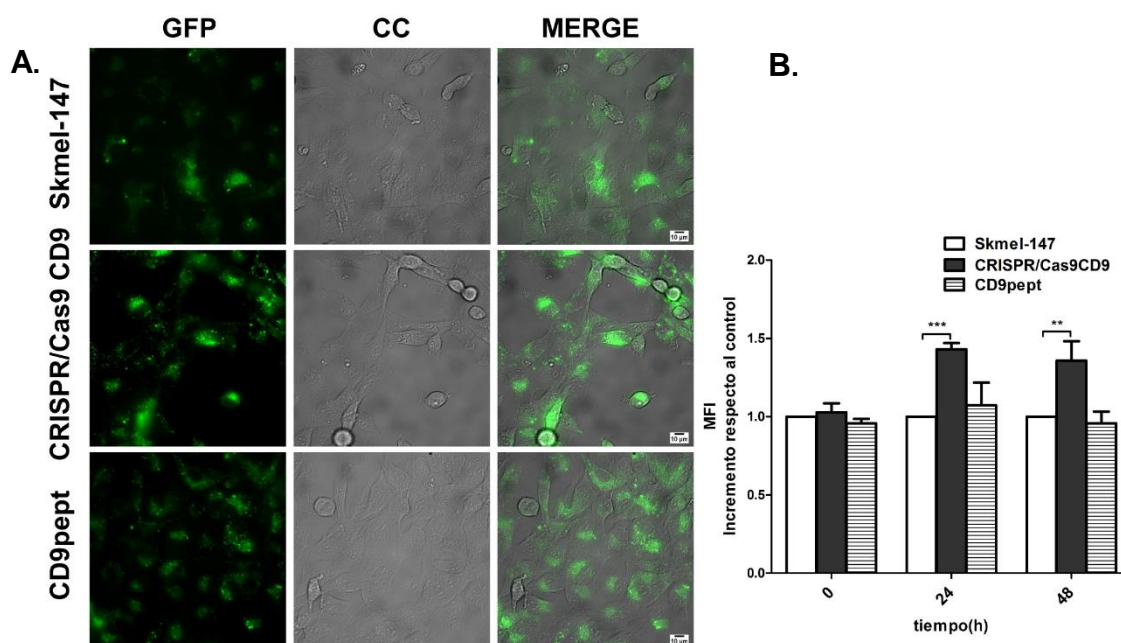


Figura 33. Las células CRISPR/Cas9 CD9 presentan un mayor número de compartimentos ácidos tras el ayuno. A. Tras 24 horas de ayuno las células se trataron in vivo con la sonda LysoTracker Green (verde) durante 15 minutos antes de la adquisición de las imágenes por microscopía de fluorescencia y campo claro (CC). Barra de escala 10 μ m. A la derecha se muestra la fusión de ambas imágenes. **B.** El marcaje con lisotracker Green también se evaluó mediante citometria de flujo tras someter a las células al mismo tiempo de marcaje en condiciones de cultivo normales, con medio suplementado con STF al 10% y tras someterlas a condiciones de ayuno (sin suero) durante 24 ó 48 horas. Los resultados se representan como el incremento de la intensidad media de fluorescencia (MFI) con respecto al valor del control y son la media \pm el error estándar de 3 experimentos independientes. Se analizaron mediante ANOVA de doble vía y post-test de Bonferroni ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$.

sin CD9 en condiciones de cultivo normales, que se restablecían cuando las células son sometidas a condiciones de ayuno (Figura 34).

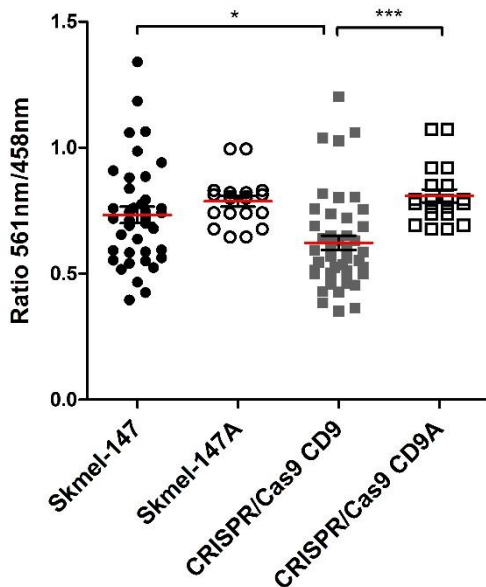


Figura 34. Las células CRISPR/Cas9 CD9 presentan defectos en la mitofagia. La gráfica recoge los valores obtenidos de la relación entre la señal obtenida al excitar a 561 nm y a 458 nm. Se muestran los datos obtenidos de 20-40 células diferentes de 3 experimentos independientes. En condiciones de cultivo convencionales (Skmel-147 y CRISPR/Cas9 CD9) y en ausencia de suero (Skmel-147A y CRISPR/Cas9 CD9A). Cada punto del gráfico indica el valor de una única célula y la línea roja la media de los datos \pm el error estándar. Los valores se analizaron mediante ANOVA de una vía y el test de comparaciones múltiples de Dunn's * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Para analizar si este defecto en la mitofagia podía provocar alteraciones en la cantidad de mitocondrias en la célula empleamos la sonda Mitotracker Green para medir la masa mitocondrial total de estas células. Como se observa en el gráfico, las células CRISPR/Cas9 CD9 muestran una tendencia, sin llegar a ser significativa, a tener mayor masa mitocondrial (Figura 35).

Por tanto CD9 es un importante regulador del destino de los cuerpos multivesiculares, de la mitofagia así como un represor de la secreción de EVs y un importante factor en la selección de proteínas incluidas dentro de las EVs

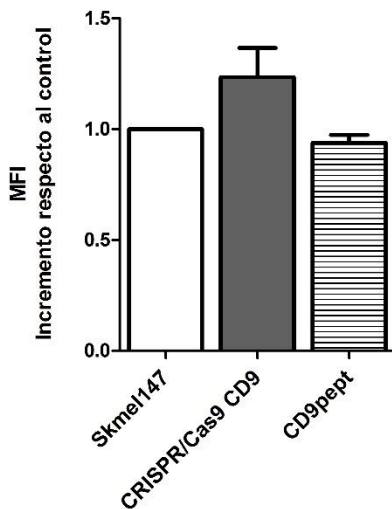


Figura 35. Las células CRISPR/Cas9 CD9 muestran un incremento en la masa mitocondrial. Las células se trataron con Mitotracker Green 100 nM durante una hora y la tinción se analizó mediante citometría de flujo. Como control negativo se utilizaron células sin marcar con la sonda fluorescente. Los datos de intensidad media de fluorescencia (MFI) se representan como el incremento con respecto al control, son la media \pm el error estándar de 3 experimentos independientes. Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía y el test de comparaciones múltiples de Dunn's.

4.3. PAPEL DE LOS TEMS EN LA REGULACIÓN DE MTI-MMP

4.3.1. MTI-MMP INTERACCIONA CON ERMS A TRAVÉS DE SU REGIÓN CITOPLASMÁTICA

Tras demostrar que CD9 es importante para el mantenimiento de la homeostasis celular en un modelo tumoral, quisimos estudiar la implicación de los TEMs en un modelo de invasión. Existen evidencias de que MTI-MMP es capaz de interactuar tanto con CD151 como con proteínas ERM, y ya que estas proteínas interactúan con el citoesqueleto de actina es posible que fueran importantes para controlar su localización y limitar su actividad degradativa a regiones específicas de la superficie celular. Esta proteasa nos permitiría así evaluar cuál de los dos mecanismos (TEM o citoesqueleto) era predominante en la regulación del tráfico intracelular de una molécula asociada.

El grupo de la Doctora Alicia García Arroyo presentó con anterioridad resultados que iniciaron esta investigación. En concreto describió que MTI-MMP puede interactuar con ERMs a través de su dominio intracelular. En sus estudios se analizaron tres grupos independientes de aminoácidos situados en el extremo carboxilo terminal: MTI-MMP-RRH563, MTI-MMP-RR569 y MTI-MMP-R576 por tratarse de aminoácidos con carga positiva, ya que las proteínas ERM tienen afinidad por regiones con estas características. De entre estos tres grupos, solo los dos primeros parecían ser importantes para la interacción con moesina *in vitro*, siendo el RRH563 el más crítico.

Nosotros quisimos ir más allá, y analizar la relevancia de esta interacción para la actividad enzimática de MTI-MMP en un contexto biológico. Para ello utilizamos un plásmido que contiene la secuencia de MTI-MMP acoplada a GFP en el extremo carboxilo terminal. El dominio citosólico fue modificado por mutagénesis dirigida para sustituir cada uno de los grupos de aminoácidos mencionados anteriormente, por alaninas, que no tienen carga y su cadena lateral es pequeña, y por tanto, este cambio no debiera afectar a la estructura tridimensional de la metaloproteasa (Figura 36A).

Se transfectaron células MCF-7, que no expresan MTI-MMP endógena, con las distintas construcciones de MTI-MMP. Mediante técnicas de microscopía confocal analizamos la localización de la forma salvaje y las formas mutadas y su relación con las ERMs al teñir con anticuerpos específicos de la forma fosforilada, que es la forma activa y con capacidad para establecer interacciones con proteínas de la superficie celular. Los resultados mostraron una disminución del coeficiente de Pearson cuando expresaban la versión mutada en el grupo de aminoácidos RRH563, lo que sugiere una vez más, que son claves en la interacción con ERMs (Figura 36B).

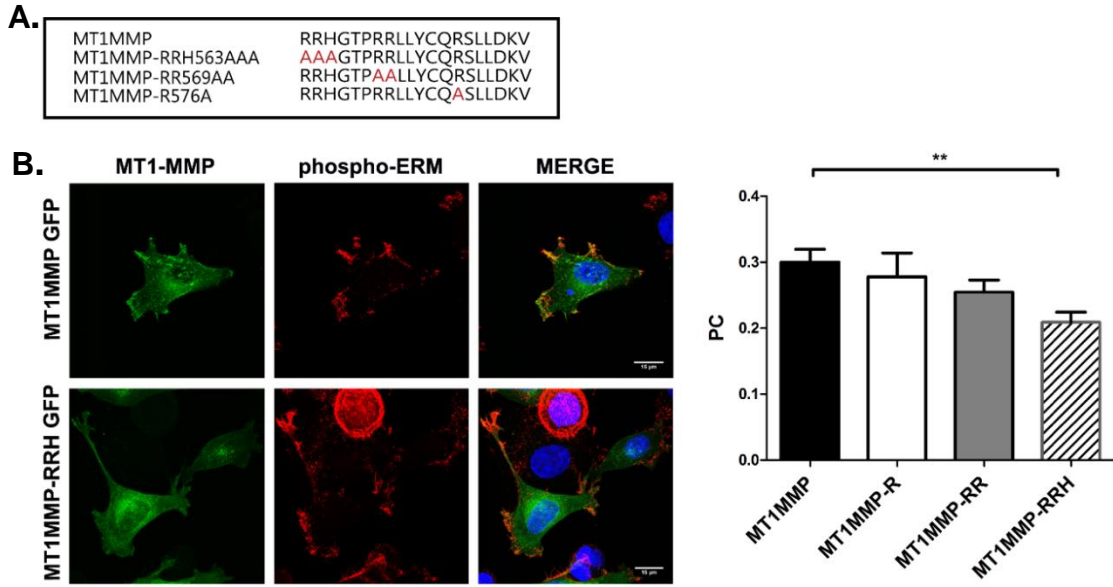


Figura 36. La mutación del motivo RRH en el dominio citosólico de MTI-MMP afecta a su colocalización con ERMs. **A.** En la imagen se muestran las secuencias de aminoácidos de la región citosólica de MTI-MMP de la forma salvaje y en las mutadas. En rojo se señalan los aminoácidos que han sido intercambiados por alaninas mediante mutagénesis dirigida. **B.** Células MCF-7 transfectadas con las distintas versiones de la metaloproteasa (verde) se sembraron sobre cristales recubiertos de colágeno 20 µg/ml, se fijaron, permeabilizaron y marcaron usando un anticuerpo frente a la forma fosforilada de las ERM (phospho-ERM, rojo). Solo se muestran las imágenes obtenidas por microscopía confocal de la forma salvaje y el mutante RRH563, a la derecha se muestra la fusión de ambos canales y del DAPI (azul). Barra de escala 15 µm. A la derecha se muestra la gráfica con el análisis del nivel de colocalización entre MTI-MMP y phosphoERM medido a través de los valores del coeficiente de Pearson (PC) de 10 o más células. Los datos representan la media ± el error estándar. El análisis estadístico se hizo mediante ANOVA de una vía y el test de comparaciones múltiples de Tukey **p<0.01.

4.3.2. LA INTERACCIÓN CON ERMs MODULA LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE MTI-MMP.

Mediante microscopía confocal se analizó la localización tanto de la forma salvaje como de las tres versiones mutadas de MTI-MMP. Se observó que MT1MMP-RRH presentaba una mayor localización en vesículas intracelulares. Con el fin de determinar de qué tipo de vesículas se trata, hicimos tinciones con anticuerpos específicos para CD63 que marca tanto endosomas tardíos, como lisosomas, EEA-1 que marca endosomas tempranos y LAMP-1, marcador de lisosomas (Figura 37 A, B y C). El grado de colocalización entre MTI-MMP y estos marcadores se evaluó a través del coeficiente de Pearson, que como se representa en la Figura 37 A y B, es mayor en el grupo RR569 y el RRH563 con CD63 y LAMP-1 con respecto a la forma salvaje de la enzima, y con EEA-1, solo en el caso del RRH563 (Figura 37C).

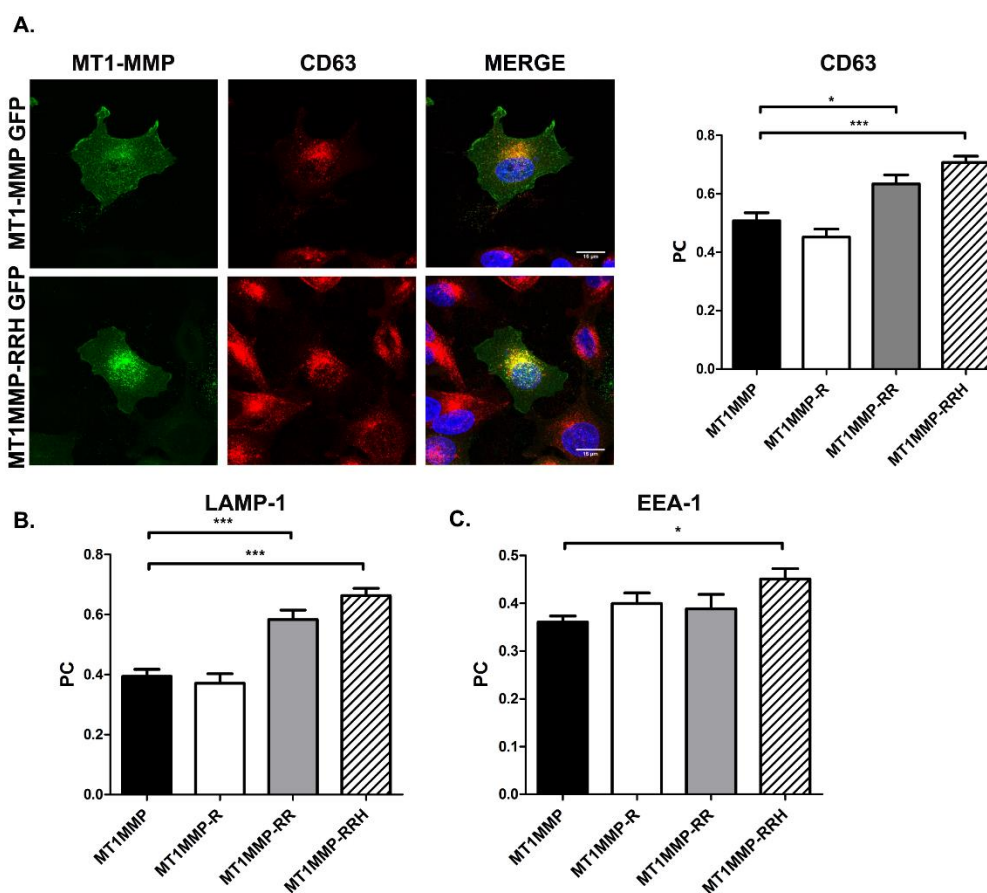


Figura 37. La interacción de MTI-MMP con ERMs es importante para controlar su localización intracelular. **A.** Imágenes de microscopía confocal de células MCF-7 sembradas sobre colágeno 20µg/ml transfectadas con el plásmido de MTIMMP y el mutante MTIMMP-RRH (verde), fijadas y teñidas con anticuerpos frente a CD63 (rojo). Los datos de colocalización medida a través del coeficiente de Pearson (PC) Datos de colocalización de MTI-MMP evaluados por el valor del coeficiente de Pearson con **B** LAMP1 específico de lisosomas o **C.** EEA-1 marcador de endosomas tempranos. Los datos fueron representados como la media \pm el error estándar de 10 células de 2 experimentos independientes y analizados por ANOVA de una vía y el test de comparaciones múltiples de Bonferroni * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

4.3.3. LA INTERACCIÓN CON ERMS REGULA LA ACTIVIDAD DE MTI-MMP

La actividad de la metaloproteasa se analizó mediante ensayos de degradación de matriz de gelatina, uno de los principales sustratos de MTI-MMP. En concreto, se utilizó gelatina porque es fácil de marcar con rodamina fluorescente en el laboratorio. Se sembraron las células durante 6 horas sobre la matriz marcada, tiempo tras el cual se cuantificó el área de degradación como parámetro para medir diferencias en la actividad. Como se representa en la Figura 38A, los resultados muestran un aumento de la actividad de MTI-MMP al eliminar el grupo RR569 o el RRH563. Las células no transfectadas no mostraban áreas de degradación, al no expresar la proteasa MTI-MMP.

MTI-MMP tiene capacidad de dimerizar y procesar otras moléculas de MTI-MMP adyacentes para eliminar el dominio catalítico e inhibir su actividad. Esto se puede medir mediante western-blot que permite distinguir las distintas formas de la enzima a través de su peso molecular, la forma activa de MTI-MMP tiene unos 65 KDa, que sumado a la GFP, tiene un peso molecular total de 92 KDa. Cuando se autoprocresa, el dominio catalítico se elimina y el fragmento transmembrana resultante tiene un peso molecular de 44 KDa, que con la GFP sumarán un total de 71 KDa. Como se puede ver en la Figura 38B, la versión que contiene la mutación en los aminoácidos RRH563, muestra una disminución en la cantidad de enzima autoprocresada.

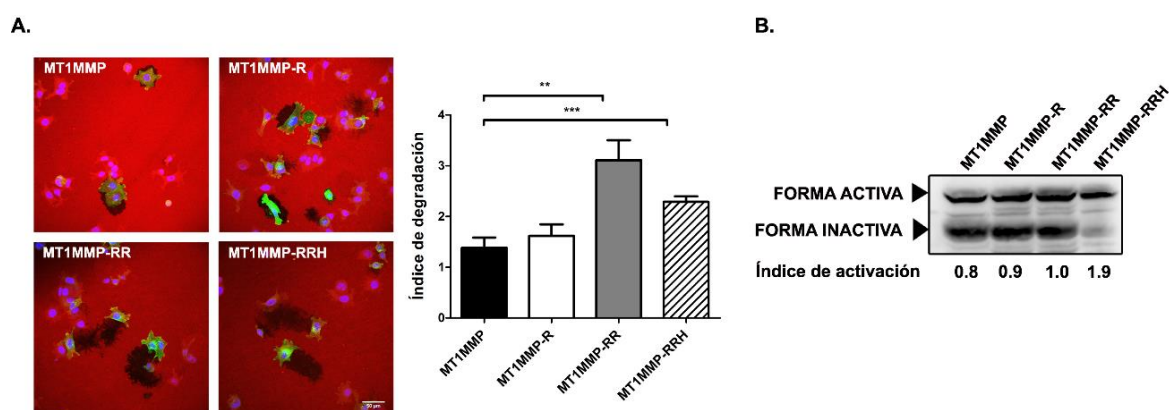


Figura 38. La interacción con ERMs afecta a la actividad gelatinolítica de MTI-MMP. A. Para los ensayos de degradación de matriz, se recubrieron cristales con gelatina-rodamina a 2mg/ml. Tras transfectar las células con las distintas construcciones de MTI-MMP, se sembraron durante 6 horas, se fijaron y se analizaron mediante microscopía confocal. El área degradada por cada célula individual se midió usando el software Image J y los datos se normalizaron con respecto al área celular (índice de degradación). Los datos representan la media \pm el error estándar de 26-50 células en 3 experimentos independientes, analizados usando ANOVA de una vía y test de comparaciones múltiples de Dunn's $**p < 0.01$, $***p < 0.001$. **B.** La actividad autocatalítica se evaluó mediante western-blot. La forma activa posee un peso molecular de 92kDa y la inactiva 71 KDa. El índice de activación que se indica en la parte inferior de la imagen corresponde a la relación entre la intensidad de la banda correspondiente a la forma activa entre la inactiva.

4.3.4. LA INTERACCIÓN CON ERMS NO AFECTA A LA INCLUSIÓN DE MTI-MMP EN TEMS

Como ha sido descrito previamente, MTI-MMP se asocia a la tetraspanina CD151 y así se genera un complejo trimolecular con la integrina $\alpha 3 \beta 1$ (Yanez-Mo et al., 2008) importante para la actividad colagenolítica de la enzima. Con esta información, nos planteamos si la interacción con ERMs podría ser importante para la formación de estos complejos y para la inclusión de MTI-MMP en los dominios ricos en tetraspaninas. Para contestar a estas preguntas se utilizó el método de FLIM-FRET que permite estudiar de manera muy precisa en la célula la interacción entre dos proteínas. Para este estudio se co-transfectaron en células SUM-159 MTI-MMP acoplada a GFP y CD151 acoplada a la proteína RUBY que forma una buena pareja de FRET debido a los espectros de excitación/emisión de ambas proteínas fluorescentes.

Los resultados de estos experimentos se representan de forma visual en el gráfico tipo Phasor-Plot, donde se recogen los valores de vida media de fluorescencia posibles y se les asigna un código de colores (Figura 39A). La vida media disminuye cuando se produce la transferencia resonante de energía (FRET). Con este código se puede representar el valor de vida media de fluorescencia de cada pixel en la imagen de la célula analizada, lo cual aporta información sobre la distribución de las interacciones in situ. Gracias a esto, pudimos confirmar la interacción entre MTI-MMP y CD151, incluso tras mutar la región citoplasmática de la metaloproteasa. Sin embargo, la distribución tanto de la señal de fluorescencia como de FRET aparece alterada (Figura 39B). En el caso de la forma salvaje, la eficiencia de FRET es mucho mayor en las espículas y protrusiones, mientras que en el mutante del motivo RRH este efecto se pierde y vemos que la interacción está deslocalizada. Esto quiere decir que la acumulación de los complejos metaloproteasa-tetraspanina en estructuras especializadas es dependiente de la interacción con ERM5.

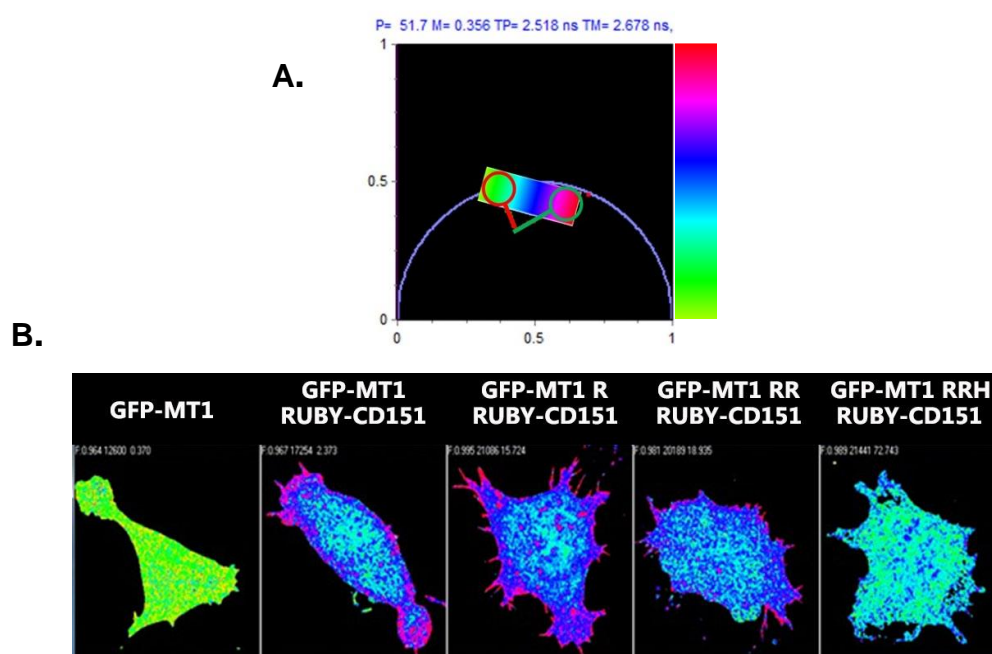


Figura 39. Estudios de FLIM-FRET muestran que las mutaciones en el dominio intracelular de MTI-MMP tienen efectos críticos en su interacción con CD151. **A.** Phasor-plot donde se representan los valores de vida media de fluorescencia posibles para la GFP, desde los que corresponden a la ausencia de FRET, rodeados por un círculo rojo, hasta los correspondientes cuando el fenómeno de FRET es máximo, en un círculo verde. El gradiente de colores entre ambos puntos muestra el color que corresponde a cada valor de vida media de fluorescencia comprendido en ese rango. **B.** La forma salvaje MTI-MMP-GFP y los tres mutantes se cotransfectaron con CD151-RUBY y se analizaron los cambios en la vida media de fluorescencia de la GFP como consecuencia del fenómeno de FRET. La imagen de la izquierda corresponde a las células transfectadas únicamente con MTI-MMPGFP para conocer la vida media de fluorescencia en ausencia de FRET.

4.3.5. INFLUENCIA DE LA TETRASPANINA CD151 SOBRE LA ACTIVIDAD DE MTI-MMP

Decidimos a continuación analizar la importancia de CD151 en la actividad de MTI-MMP. Para ello eliminamos la expresión de la tetraspanina mediante la tecnología CRISPR/Cas9, y las células que no expresaban la tetraspanina se seleccionaron mediante citometría de flujo para asegurarnos de tener una población homogénea. Se transfectaron las distintas construcciones de MTI-MMP en estas células y se analizó su colocalización con ERMs activadas (Figura 40). Se observó que en ausencia de CD151 el mutante del motivo RRH presentaba nuevamente un menor grado de colocalización con ERMs.

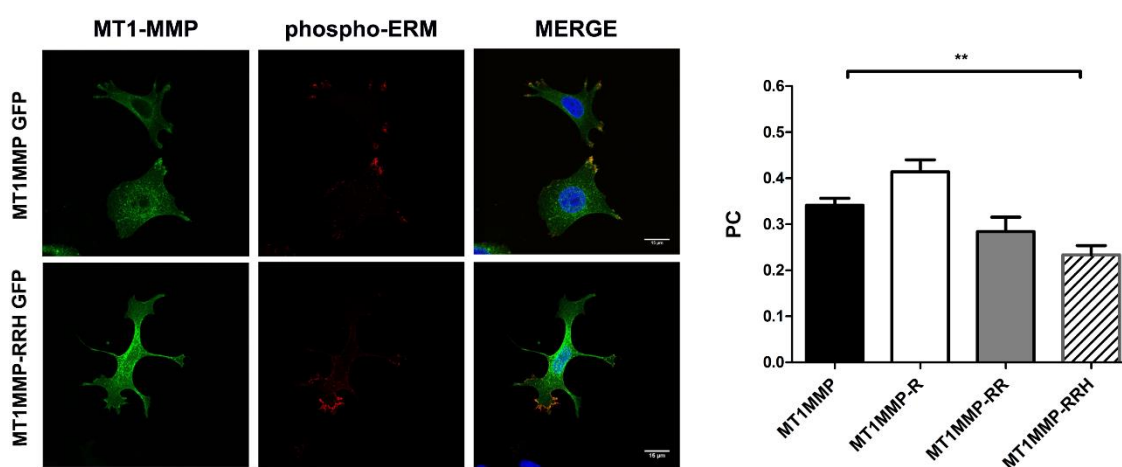


Figura 40. La ausencia de CD151 no altera la interacción con ERMs a través del dominio citosólico. Células MCF-7 CRISPR/Cas9 CD151 fueron transfectadas con la forma salvaje y los mutantes de MTI-MMP (verde) y sembradas sobre cristales recubiertos de colágeno a 20 µg/ml, se fijaron, permeabilizaron y marcaron con el anticuerpo frente a la forma fosforilada de las ERM (phospho-ERM, rojo). Se muestran las imágenes obtenidas por microscopía confocal de la forma salvaje y el mutante RRH563. A la derecha se muestra la fusión de ambos canales y del UV para el DAPI (azul) que marca el núcleo celular (MERGE). Barra de escala 15 µm. El gráfico de la derecha muestra los datos del coeficiente de Pearson (PC) de las células CRISPR/Cas9 CD151 para 10-15 células de 2 experimentos independientes. Los datos representan la media ± el error estándar. El análisis estadístico se hizo mediante ANOVA de una vía y el test de comparaciones múltiples de Tukey $**p < 0.01$.

Para los subsecuentes experimentos generamos líneas celulares que expresaran las distintas versiones de MTI-MMP de forma estable, tanto en las células salvajes como en las que no expresan CD151 (CRISPR/Cas9 CD151). Tras transfectar las células por electroporación, seleccionamos las que habían integrado la secuencia de interés en presencia de G418 en el cultivo, y además, gracias a que llevan GFP acoplada, pudimos separar mediante sorting, únicamente aquellas que expresaban la metaloproteasa. Obtuvimos poblaciones muy heterogéneas en lo que respecta a los niveles de expresión de la enzima que se puede detectar fácilmente por la intensidad de fluorescencia de la proteína GFP acoplada. Analizamos la distribución de MTI-MMP y MTIMMP-RRH en las células CRISPR/Cas9 CD151 y comprobamos que se sigue observando el aumento en la colocalización con CD63 cuando el grupo RRH563 citosólico está mutado (Figura 41 A y B). Sin embargo en las líneas

estables no se observaban diferencias en la colocalización con EEA1, (Figura 41 A y C). En el caso de LAMP1 la colocalización aumentaba tanto al mutar el residuo RRH como al delecionar el gen de la tetraspanina CD151, mientras que no se observaba un efecto aditivo al mutar el motivo RRH en las células CRISPR/Cas9 CD151 (Figura 41D).

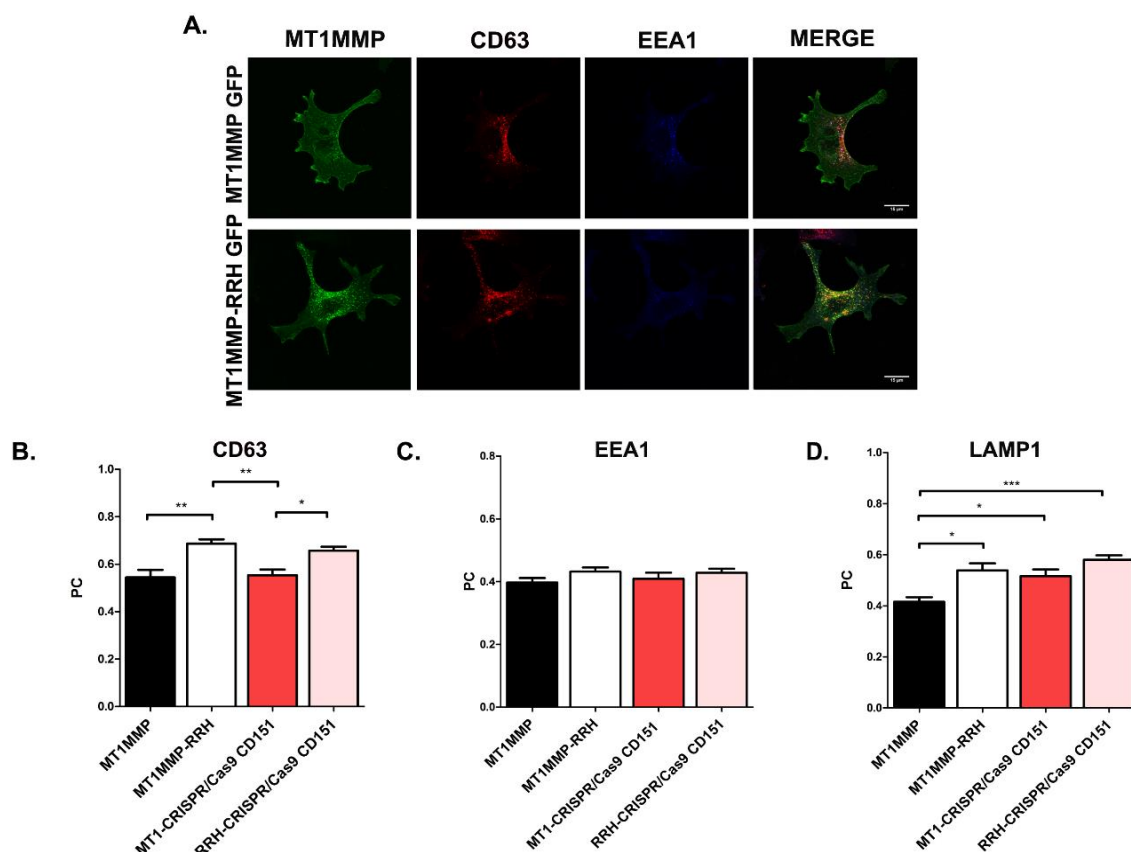


Figura 41. La ausencia de CD151 produce cambios leves en la distribución intracelular de MTI-MMP.

A. Células MCF-7 y CrisprCD151 se transfectaron con los mutantes y con la forma salvaje de MTI-MMP y se sembraron sobre cristales recubiertos de colágeno a 20 μg/ml, se fijaron y marcaron con anti-CD63 (rojo) y anti-EEA1 (azul). La fusión de los tres canales se muestra a la derecha (MERGE). **B, C y D** Análisis de la colocalización de MTI-MMP (negro) y MTIMMP-RRH (blanco) en células MCF-7; o MTI-MMP (rojo) y MTIMMP-RRH (rosa) en células CrisprCD151 (MTI-CrisprCD151 y RRH CrisprCD151), **B.** con CD63, **C.** EEA-1 y **D.** LAMP-1. El grado de colocalización se evaluó por medio del coeficiente de Pearson (PC) representado como la media ± el error estándar de 20 células de 3 experimentos independientes en **B** y **C** o de 15 células de 2 experimentos independientes en **D**. En **B, C** y **D** los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía y test de comparaciones múltiples de Dunn's * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

En cuanto a la actividad enzimática de MTI-MMP en los ensayos de degradación de gelatina, para evaluar la actividad de la forma más precisa posible y descartar las diferencias debidas simplemente a variaciones en los niveles de expresión, normalizamos el área de degradación con respecto a la intensidad de fluorescencia de la GFP como medida de los niveles de expresión de cada célula. Los resultados se muestran en la Figura 42A, donde se observa que el efecto de eliminar la interacción con moesina aumenta la gelatinólisis en ambos tipos de células (MCF-7 y CRISPR/Cas9 CD151) mientras que no se detectan diferencias al eliminar la expresión de la tetraspanina. El mismo patrón

se observó al analizar la actividad autocatalítica de la enzima, la cual se inhibía únicamente al mutar el motivo de interacción con ERMs (Figura 42B).

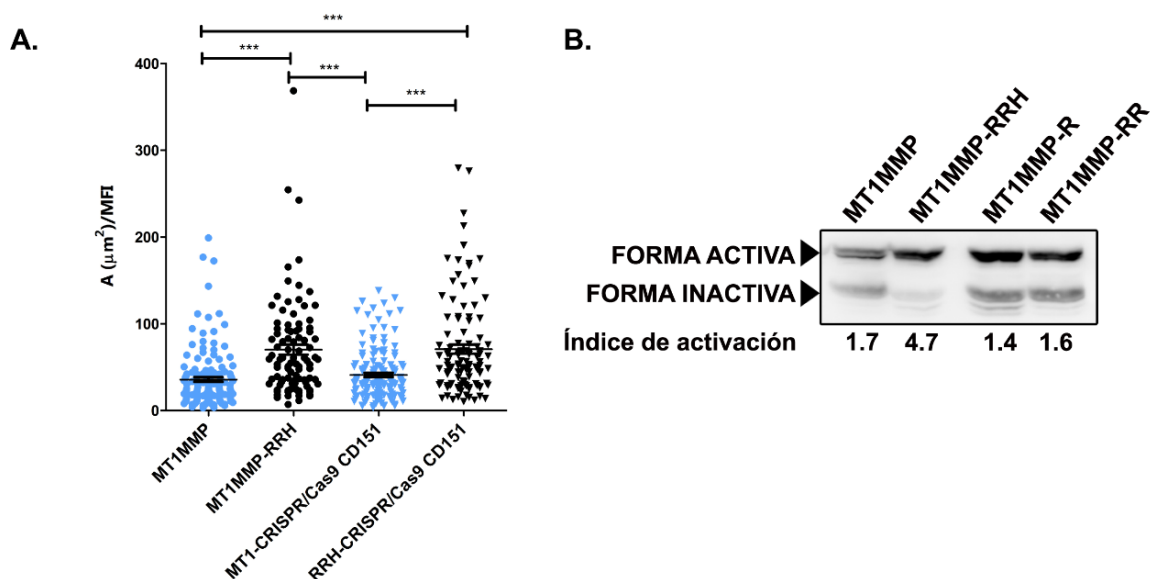


Figura 42. La ausencia de CD151 no afecta a la actividad catalítica de MTI-MMP **A.** Ensayo de degradación de matriz de las células MCF-7 y CRISPR/Cas9 CD151 transfectadas con la forma salvaje (azul) o el mutante RRH 563 (negro). El área de degradación medida mediante el software Image J se normalizó con respecto al MFI de la señal de GFP en cada célula. Los datos se representan como la media \pm el error estándar de 100-150 células de 3 experimentos independientes. El análisis estadístico se hizo mediante ANOVA de una vía y el test de comparaciones múltiples de Dunn's $***p < 0.001$. **B.** Células MCF-7 y CRISPR/Cas9 CD151 transfectadas con la forma salvaje y el mutante RRH de MTI-MMP, se lisaron y se analizaron mediante western-blot. Los números en la parte inferior indican los valores del índice de activación calculado a partir de la relación entre la intensidad de la banda de la forma activa y la inactiva.

4.3.6. TANTO LA INTERACCIÓN CON ERMS COMO LA PRESENCIA DE CD151 REGULAN LA INTERNALIZACIÓN DE MTI-MMP

Las diferencias que existen en la distribución de MTI-MMP podrían deberse a alteraciones en su transporte. Estudiamos si la internalización de la proteína podía estar afectada tanto por la ausencia de la tetraspanina como por la pérdida de la interacción con ERMs. Para ello marcamos las proteínas de la superficie con biotina y dejamos que fueran internalizadas a distintos tiempos. La cantidad de MTI-MMP internalizada por la célula fue evaluada mediante western-blot (Figura 43). Si comparamos la internalización de la forma salvaje entre las células MCF-7 y CRISPR/Cas9 CD151 vemos que a 30 minutos es mucho mayor en las MCF-7, por lo que parece que la tetraspanina es un promotor de la internalización de MTI-MMP. Por otra parte, cuando no hay interacción con ERM la internalización se reduce drásticamente y el efecto nuevamente no es aditivo con la delección de CD151 (Figura 43).

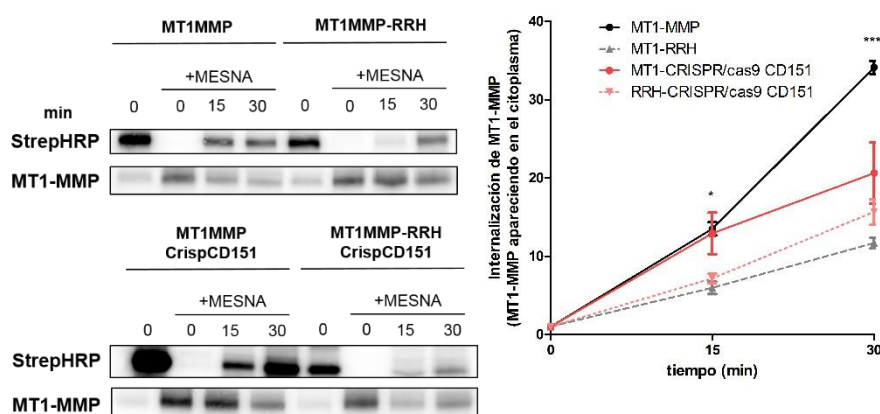


Figura 43. Tanto CD151 como las ERM_s regulan la internalización de MTI-MMP. La internalización de MTI-MMP se evaluó mediante ensayos de biotilización. En la imagen se muestran dos geles, en la parte superior el de lisados de células MCF-7 que expresan de forma estable MTI-MMP-GFP o el mutante MTI-MMP-RRH GFP, y en la parte inferior el obtenido a partir de lisados de células CRISPR/Cas9 CD151 que expresan establemente las mismas versiones de MTI-MMP. En ambos casos tras marcar las células con biotina y dejar que tuviera lugar la internalización de las proteínas biotiladas durante 0, 15 y 30 minutos (min) las células se trataron con MESNA, se lisaron y se inmunoprecipitaron usando el anticuerpo anti-GFP. El control del marcaje en células sin tratamiento con MESNA se analizó en todos los casos. Tras revelar primero con estreptavidina-HRP (StrepHRP), las membranas se sometieron a “stripping” y se incubaron con anti-GFP para detectar la presencia de MTI-MMP. En el gráfico de la derecha se representa la internalización como el incremento de la cantidad de MTI-MMP biotilada/MTI-MMP total con respecto al valor a tiempo 0 ± el error estándar en 2 experimentos representativos analizados por ANOVA de doble vía y post-test de bonferroni * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

4.3.7. LA INTERACCIÓN CON ERM_s AFECTA A LA CANTIDAD DE MTI-MMP INACTIVA INCLUIDA EN EVS

Tanto las tetraspaninas como las ERM_s son componentes muy prominentes de vesículas extracelulares, y la inclusión de MTI-MMP en exosomas se ha descrito como fundamental para la invasión en matrices tridimensionales. Quisimos analizar si alguna de estas interacciones podría ser relevante para la inclusión de la metaloproteasa en estas vesículas. Para ello aislamos las vesículas del medio de cultivo condicionado de las distintas líneas celulares mediante SEC y evaluamos mediante citometría la señal de la GFP procedente de las vesículas (Figura 44A). No se detectaron diferencias evidentes entre las distintas muestras. Se analizó la presencia de MTI-MMP en estas vesículas mediante western-blot, analizando tanto la forma salvaje como la mutante. Ambas formas se incluyen en EVs pero, al igual que ocurre en células, la forma autoprosesada es mucho más prominente en vesículas secretadas por las células con la forma salvaje de MTI-MMP (Figura 44B).

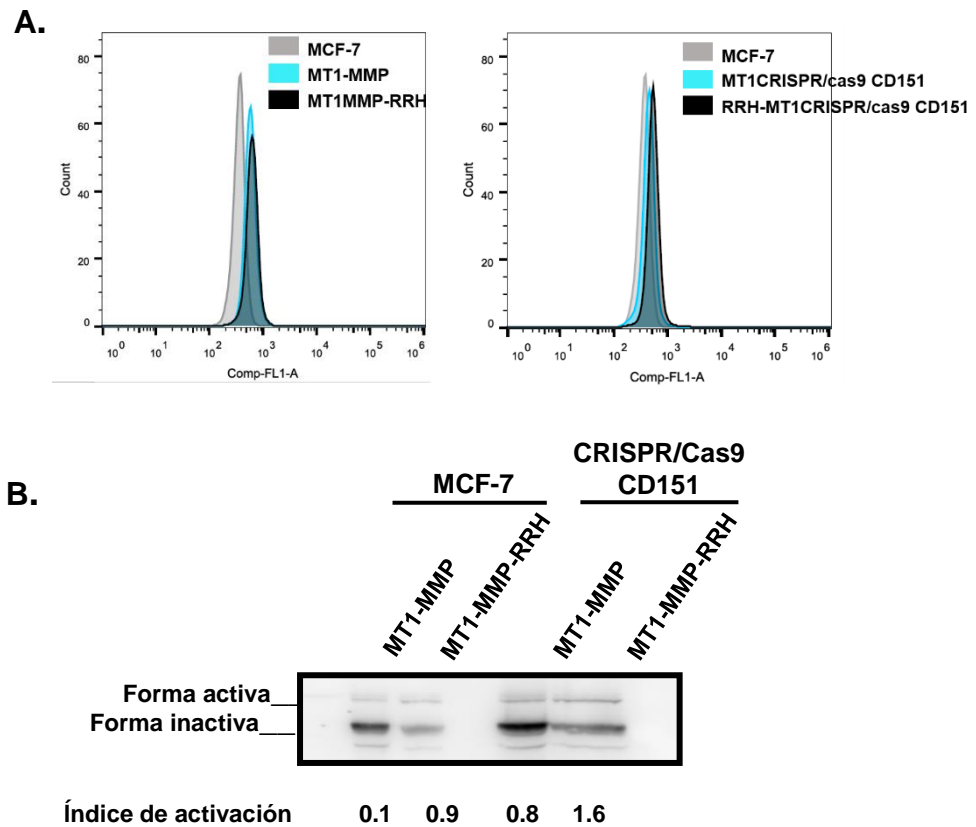


Figura 44. Las células MCF-7 secretan EVs que incluyen la forma activa e inactiva de MTI-MMP. EVs aislados de medios de cultivo condicionados por células MCF-7 y CRISPR/Cas9 CD151 que expresan la forma salvaje y el mutante del motivo RRH de MTI-MMP mediante SEC y analizados por **A.** citometría de flujo y **B.** western-blot. Se muestra el índice de activación calculado como la relación entre la intensidad de la banda de la forma activa y la inactiva.

5.

Discusión

5.1. CD8I CONTROLA LA REPLICACIÓN DEL VIH-I A TRAVÉS DE SAMHDI

En la primera parte de esta tesis hemos demostrado que CD8I interacciona con SAMHDI a través de su extremo carboxilo terminal y que al eliminar su expresión, o mediante el bloqueo con péptidos sintéticos, se reduce la replicación del VIH-I. La ausencia o bloqueo de la tetraspanina incrementa los niveles de expresión de SAMHDI, no aumentando su síntesis, sino mediante la inhibición de su degradación a través del proteasoma. Por tanto, la ausencia de CD8I favorece la actividad de SAMHDI, que reduce los niveles de dNTPs disponibles y, en último término, inhibe la retrotranscripción viral. Este efecto sin embargo es mucho más evidente a 48 horas, probablemente porque es el tiempo que se tarda en alcanzar una concentración de dNTPs lo suficientemente pequeña para que la retrotranscriptasa viral no pueda seguir funcionando tras las primeras rondas de replicación, en las que se habrán consumido los dNTPs previamente existentes. De hecho, existen trabajos que muestran que esta enzima puede funcionar con concentraciones de sustrato muy bajas (Diamond et al., 2004). Por el contrario, los efectos al sobreexpresar CD8I se hacen patentes mucho más rápido, ya que a las 24 horas post-infección podemos detectar un aumento muy alto de la replicación viral, que como pudimos corroborar mediante la medida de la concentración de dNTPs, se debía al incremento de éstos. Por tanto, para que la transcriptasa reversa se inhiba, es necesario reducir a niveles muy bajos la disponibilidad de dNTPs, mientras que aumentos pequeños de su concentración, al sobreexpresar CD8I que a su vez estimula la degradación de SAMHDI, es posible generar grandes cambios en la actividad retrotranscriptasa. A raíz de estos resultados se protegió en forma de patente el uso de CD8I como diana antiviral, no solo frente a VIH-I sino también frente a otros virus (P201700345), puesto que esta estrategia también inhibiría la síntesis de cualquier genoma viral que requiera dNTPs para replicarse lo que engloba aquellos que sean ADN como es el caso del herpes virus, o virus ARN que tengan una fase ADN, bloqueando su replicación (Hollenbaugh et al., 2013; Kim et al., 2013). Por otra parte, el comportamiento tan dependiente de sustrato de la retrotranscriptasa del VIH-I sugiere que modular los niveles de expresión de CD8I también podría ser una buena estrategia para combatir la latencia viral.

En cuanto a la localización de SAMHDI, generalmente se ha asumido que tiene una distribución exclusivamente nuclear, pero existen trabajos previos, además del nuestro, que demostraron que su forma oxidada puede localizarse en el citoplasma (Klionsky et al., 2007; Mauney et al., 2017). Nosotros además hemos probado que puede formar agregados que colocalizan parcialmente con endosomas tempranos, y que el número de estos agrupamientos aumenta en ausencia de CD8I lo que correlaciona con una menor degradación proteosomal. Esta distribución podría ser una estrategia utilizada por la célula para reclutar a SAMHDI en regiones específicas y dirigir su actividad hacia zonas concretas, o también puede ser un mecanismo de protección y estabilización de la propia enzima.

Existe mucha controversia sobre cómo y dónde ocurre la retrotranscripción viral, pero lo que sí se sabe, es que el RTC (complejo de retrotranscripción) utiliza la red de microtúbulos de la célula para transportarse desde la periferia celular, al núcleo, proceso durante el cual parece que tiene lugar el desensamblaje de la cápside. Existen trabajos que hablan de una pérdida total de la cápside inmediatamente después de la entrada, sin embargo ésta parece ser necesaria para anclar proteínas de la célula hospedadora y además aportaría protección frente a la inmunidad innata celular, dirigida principalmente contra el ADN viral (Ambrose and Aiken, 2014). Por tanto, lo más probable es que haya una pérdida parcial para permitir el acceso de ciertos factores de la célula huésped, necesarios para que tenga lugar la retrotranscripción, como por ejemplo dNTPs, y es cuando alcanza el poro nuclear, cuando tiene lugar el desensamblaje total para permitir el paso del ADN viral al interior del núcleo. Quizá el reclutamiento de SAMHDI en estos orgánulos

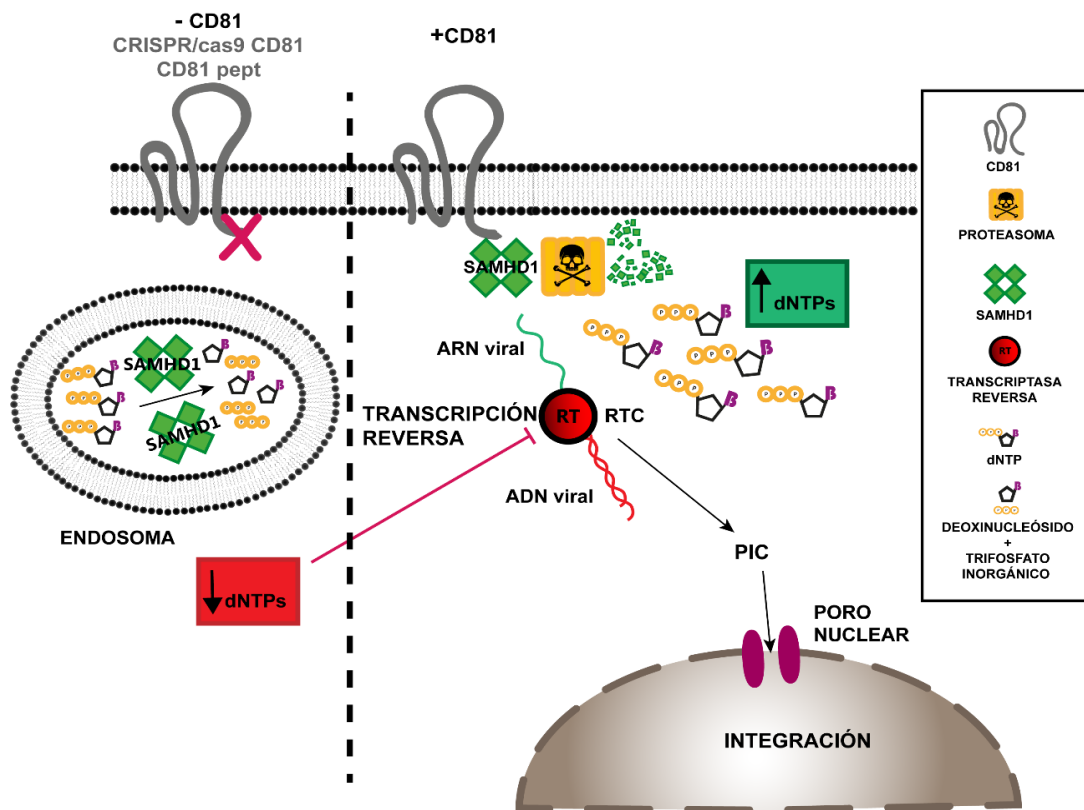


Figura 45. Esquema resumen de la actividad de CD81 sobre SAMHDI. A la derecha se muestra la situación en presencia de CD81, en la que SAMHDI interacciona con el dominio citosólico de la tetraspanina permitiendo que sea degradado por el proteasoma. Esto permite que haya una mayor concentración de dNTPs disponibles, al no ser degradados por SAMHDI, lo que estimula la actividad de la retrotranscriptasa viral (RT) incluida dentro del RTC, que sintetizará el ADN viral utilizando como molde el RNA del virus. El PIC se aproxima al núcleo para transportar la doble hebra de ADN ya formada, a través del poro nuclear que posteriormente se integrará en el genoma celular. A la izquierda se muestra la situación en ausencia de CD81 o en presencia de péptidos bloqueantes. Aquí SAMHDI no interacciona con la tetraspanina y se transloca a endosomas tempranos donde puede llevar a cabo su función, reduciendo la disponibilidad de dNTPs y la retrotranscripción viral.

membranosos sea una estrategia para incrementar su efectividad como sistema de defensa antiviral al aproximarlos al RTC lo que reduciría mucho más rápido la concentración local de dNTPs.

Los TEMs crean plataformas especializadas para la entrada viral (Hantak et al., 2019) al distribuir de manera óptima las moléculas que participan activamente en la entrada y mantienen una estequiometría correcta entre receptor y correceptor (Beck et al., 2010). Además de regular la distribución de los componentes de la superficie celular, las tetraspaninas crean una red subcortical de proteínas que participan en las fases posteriores de entrada, al reclutar proteínas como moesina o actinina que interactúan con el citoesqueleto de actina (Gordon-Alonso et al., 2012; Sala-Valdes et al., 2006). Trabajos recientes han demostrado que el uso de péptidos bloqueantes del extremo carboxilo terminal de las tetraspaninas durante la infección del HPV son capaces de inhibir la infección al bloquear su entrada y posterior desensamblaje dentro del sistema endosomal (Fast et al., 2018)

Tras demostrar que CD81 interacciona con SAMHDI, y que es capaz de regular su actividad no simplemente por una mera interacción, sino porque determina que los sistemas de degradación celular actúen sobre ella, hemos definido una nueva estrategia empleada por las tetraspaninas para regular la expresión de proteínas intracelulares. Como el efecto se observa tanto al eliminar el gen de CD81 como al bloquear su región intracelular mediante el uso de péptidos que reproducen la secuencia de su extremo carboxilo terminal, podemos postular que SAMHDI se une a esta región donde será más accesible al proteasoma. Pero lo más interesante de todo, y que puede ser extrapolado a otras tetraspaninas y procesos biológicos, es que una única tetraspanina, en este caso CD81, es capaz de intervenir en múltiples fases de la infección viral, lo cual probablemente ocurra al regular la interacción con proteínas accesorias a través de dominios alternativos. Los estudios sobre los cambios conformacionales que experimenta CD81 son tremendamente reveladores en este contexto (Zimmerman et al., 2016), ya que nos permiten empezar a dilucidar cómo pueden regular la interacción con tan diversos sustratos. En el trabajo de Zimmerman et al. además, estudian la interacción de CD81 con CD19 una de sus parejas moleculares mejor conocidas, y describen que cuando no hay interacción entre ambas, CD19 tiene tendencia a ser retirada de la membrana, algo que se puede extrapolar a lo que ocurre en nuestro modelo, donde en ausencia de CD81, SAMHDI tiende a agruparse y a situarse en endosomas tempranos.

Hemos desvelado por tanto un nuevo mecanismo de acción de las tetraspaninas, no solo porque tienen la capacidad de regular la composición de la membrana mediante el control del transporte de proteínas como ocurre con la regulación de CD63 sobre CXCR4, al desviar su tráfico desde el aparato de Golgi a endosomas y lisosomas en lugar de a la membrana plasmática (Yoshida et al., 2011), si no porque podría haber una modulación de la actividad del proteasoma sobre cualquier localización celular, algo que habrá que tener en cuenta en futuros trabajos.

Por otro lado, también hemos descrito una nueva estrategia para inhibir la replicación del VIH-1 a través del bloqueo de la región citosólica de CD81, en este caso mediante el uso de péptidos. Sin embargo, esta actuación será eficaz para combatir cualquier virus que requiera de dNTPs disponibles para completar su ciclo infeccioso, esto es, virus con genoma ADN como el virus del Herpes (HSV) o el virus de la viruela y en lentivirus como el VIH-1 (Hollenbaugh et al., 2013; Kim et al., 2013). Una vez demostrado *in vitro* que estos péptidos reducen la replicación viral, sería interesante dar un paso más y demostrar su efectividad en un modelo animal. Gracias a que estamos actuando frente a una proteína endógena, seríamos capaces de evitar cualquier resistencia al tratamiento fruto de la capacidad del virus para mutar y volverse inmune a los tratamientos convencionales. Dado que el ratón KO de CD81 no presenta alteraciones graves, podríamos esperar que este tratamiento no producirá en los pacientes graves efectos secundarios.

5.2. CD9 REGULA LA SECRECIÓN DE EXOSOMAS

Las tetraspaninas se emplean actualmente como marcadores de exovesículas debido a su gran abundancia en las mismas y por tanto es lógico pensar que deben ser importantes para su biogénesis. Sin embargo, resultados previos del laboratorio indicaban que el ratón deficiente para CD81 no presentaba defectos en la secreción de exosomas (Perez-Hernandez et al., 2013). Por ello decidimos centrarnos en el estudio de CD9, que también presenta una expresión muy amplia en diversas células y tejidos y a nivel celular se localiza tanto en la superficie como en membranas de compartimentos intracelulares y de exosomas. Lo primero que hicimos fue analizar si esta tetraspanina juega un papel importante en su secreción y biosíntesis en un modelo de melanoma humano. Para ello deletamos el gen de CD9 mediante el sistema CRISPR/Cas9 o bloqueamos su actividad mediante el uso de péptidos con la secuencia carboxilo terminal, similares a los empleados frente a CD81. En cuanto a CD9, los datos en la literatura son controvertidos, se ha descrito que al eliminar CD9 la secreción de exosomas disminuía (Chairoungdua et al., 2010), aunque también es cierto que otros trabajos no fueron capaces de reproducir estos efectos (Brzozowski et al., 2018), por lo que lo más lógico es pensar que la regulación será totalmente dependiente del tipo celular. En nuestro caso, en células de melanoma observamos el efecto contrario, un aumento en la tasa de liberación de exovesículas en las células CRISPR/Cas9 CD9 con respecto a las células control, efecto que sin embargo no fuimos capaces de reproducir con el péptido bloqueante de CD9. Esto último tiene explicación, ya que mediante esta técnica solo se actúa a nivel del extremo carboxilo terminal de la tetraspanina, y no sobre otras regiones, como el LEL, con capacidad reguladora.

La delección de CD9 reduce el tamaño de las vesículas secretadas pero no el uso de péptidos bloqueantes, sin embargo el análisis proteómico de ambas muestras reveló alteraciones importantes en el cargo. Teniendo en cuenta la clasificación que propone el grupo de Clotilde

Théry en función de su tamaño y composición (Kowal et al., 2016) (Figura 46), lo que más llama la atención de nuestros resultados es un aumento en los marcadores típicos de vesículas pequeñas de baja y alta densidad. Las de baja densidad corresponden a las de origen endosomal y por tanto lo que se considerarían auténticos exosomas, en este contexto nosotros detectamos un enriquecimiento en los correspondientes marcadores, esto es, tetraspaninas CD81 y CD63, EHD4, sintenina-1 y Tsg-101. También detectamos un aumento en la presencia de proteínas que corresponden al otro grupo de vesículas pequeñas pero de mayor densidad, representadas por componentes de la matriz extracelular; keratina colágeno ,laminina, fibronectina, serpina o, albúmina. Aunque este efecto se detectó con ambos tratamientos, el incremento era mucho más grande en las vesículas de las células tratadas con el péptido mientras que los marcadores de baja densidad eran mayores en las Células CRISPR/Cas CD9, Algo muy específico, es una caída en los niveles de la integrina $\alpha 2$ en estas células, lo que concuerda con los datos de este grupo que la detecta específicamente en vesículas que contienen CD9.

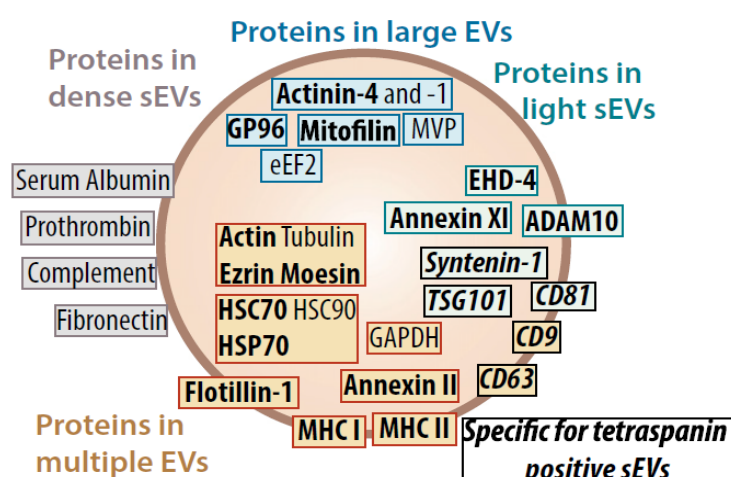


Figura 46. Caracterización de los distintos tipos de vesículas en función de su tamaño y composición. En naranja se muestran las proteínas compartidas por múltiples tipos de EVs. En verde las proteínas específicamente enriquecidas en vesículas pequeñas de baja densidad, y en cursiva las específicas de exosomas. En gris se muestran aquellos expresados en vesículas pequeñas de alta densidad. En azul proteínas enriquecidas en vesículas grandes y medianas (Kowal et al., 2016).

Otro dato relevante del análisis proteómico, es la presencia de intercambiadores de iones en estas vesículas con un patrón de expresión alterado en las células CRISPR/Cas9 CD9 y CD9pept con respecto a las células control, la V-ATPasa, Na^+/K^+ ATP-asa y CLIC-1 que es un canal de Cl^- . A lo largo de la ruta endocítica los compartimentos tienen que experimentar diversos cambios para que el transporte o la degradación de proteínas sea óptimo, siendo uno de ellos la acidificación progresiva que culminará en el lisosoma. Hay trabajos en los que se describe que el proceso de acidificación, requiere un bombeo de protones y otros iones para conseguir el pH óptimo gracias a transportadores de Cl^- y Na^+/K^+ (Huotari and Helenius, 2011) y que alteraciones en el balance

de estos iones y por tanto en el pH ya han sido descritos como perjudiciales en los fenómenos de fusión. Por otro lado, CLIC-1 también se ha reportado como fundamental para mantener el pH ácido durante la formación de los fagosomas (Jiang et al., 2012).

Como los exosomas se originan a partir de la membrana de los cuerpos multivesiculares, podemos asumir que los cambios en su expresión proteica se pueden extrapolar a estos orgánulos. Por tanto, las alteraciones en la expresión de los transportadores incluidos en los cuerpos multivesiculares de las células CRISPR/Cas9 CD9 con respecto a las control, podrían estar generando alteraciones en su pH, lo que podría explicar su acumulación intracelular que haría que desvíen hacia rutas alternativas de secreción (Hu et al., 2015).

También existen trabajos donde describen que ATG5 que forma parte de la maquinaria de autofagia promueve la disociación de $V_1 V_o$ -ATPasa de los cuerpos multivesiculares, lo que impide su acidificación y estimula su fusión con la membrana plasmática y la liberación de exosomas (Xu et al., 2018). En esta situación podemos pensar por un lado que la ausencia de CD9 o bien participa en el reclutamiento de estas proteínas y que su deficiencia provoca el aumento de la liberación, o que dicho aumento se debe a una forma de compensar el posible defecto en la degradación que existe en estas células (Xu et al., 2018). En este aspecto es interesante señalar que con ambas estrategias detectamos un descenso en una proteína integral de membrana lisosomal LIMP-2 implicada en la biogénesis y mantenimiento de lisosomas y endosomas (Gonzalez et al., 2014)

La mayor secreción de exosomas podría indicar que su biogénesis como tal no está afectada y que los cuerpos multivesiculares y la formación de vesículas intraluminales son viables y funcionales. Sin embargo, tanto por microscopía electrónica de transmisión, como por microscopía de fluorescencia pudimos observar que en las células Skmel-147 había grandes vacuolas invadiendo gran parte de su citoplasma y mayor número de cuerpos multivesiculares fusionándose con lisosomas o con vacuolas autofágicas de gran tamaño, mientras que en las CRISPR/Cas9 CD9 no aparecían esas vacuolas y, si las había, eran considerablemente más pequeñas, mientras que presentaban un mayor número de cuerpos multivesiculares intactos. Al analizar la naturaleza de estas vesículas pudimos comprobar que se marcaban positivamente con anticuerpos para CD9 y también CD63 típico de cuerpos multivesiculares y de endosomas tempranos y tardíos, HGS de endosomas y cuerpos multivesculares y Lamp-1 de lisosomas. Además, si analizábamos la autofagia de estas células transfectando la construcción de LC3-td muchas de estas supervesículas decoraban su membrana con este marcador. En conjunto, por tanto, podemos concluir que las grandes vacuolas que se observan en el citoplasma de las células Skmel-147 son fruto de la fusión de los cuerpos multivesiculares con autofagosomas o vacuolas autofágicas, y como resultado de la fusión de ambas membranas, se generan los llamados anfisomas que estarán marcados con CD9, CD63, HGS y LC3 cuyo destino final será fusionarse con el lisosoma para degradar su contenido.

Hay que tener en cuenta que las células de melanoma se caracterizan por tener una autofagia exacerbada, importante para mantener su homeostasis (Checinska and Soengas, 2011), con lo cual no es raro encontrar una expresión tan alta de LC3-td en estado basal. La cuantificación realizada usando la construcción LC3-td no parece sin embargo corroborar los datos anteriores que muestran una mayor autofagia de cuerpos multivesiculares en las Skmel-147. Para explicar esta discrepancia habría que tener en cuenta que cuando LC3 es movilizado durante la formación del fagosoma, lo que se observa mediante microscopia confocal son puntos brillantes debido a su acumulación en regiones concretas de la célula. Estas estructuras son muy pequeñas como para ser resueltas mediante esta técnica, por lo que la cuantificación proviene del conteo únicamente de estos puntos y no de las macrovesículas. Sin embargo, este dato nos permite observar que las células CRISPR/Cas9 CD9, aunque no formen vacuolas autofágicas gigantes, sí poseen una autofagia funcional. Así, en condiciones normales, y tras someterlas a una situación de ayuno para estimular la autofagia, se detectó un número mayor de puntos LC3-RFP+ (autofagolisosomas) que indica que no hay ningún bloqueo en dicho proceso. Además, mediante el uso de LysoTracker Green pudimos ver que bajo estas condiciones de estrés incrementan mucho más el número de compartimentos ácidos en comparación con las células control, y los marcadores típicos de autofagia como LC3 y p62 se comportan igual en los tres tipos celulares, lo que confirma que la célula posee aun capacidad para responder ante situaciones de estrés. Este incremento en la señal procedente del LysoTracker Green puede deberse a una necesidad de compensar el defecto en la degradación de los cuerpos multivesiculares por medio de una macroautofagia menos selectiva.

La mitofagia basal de las células CRISPR/Cas9 CD9 también está disminuida, mientras que en respuesta al ayuno aumenta. La disminución en la mitofagia se traduce en un aumento de la masa mitocondrial en las células CRISPR/Cas9 CD9, que, si bien no llega a ser significativa, podría desencadenar defectos en la energética celular por la acumulación de mitocondrias disfuncionales.

Hay que tener en cuenta que la autofagia no es un proceso único como se pensaba hace tiempo, sino que se divide en múltiples vías en función de su especificidad. Cómo la célula consigue regular esa selectividad es algo que aun no se ha conseguido determinar, pero sí es cierto que ya hay evidencias de que existen proteínas adaptadoras culpables de seleccionar el cargo que será incluido en el fagosoma (Wirth et al., 2019).

Por tanto, se puede concluir que si bien la macroautofagia no está afectada en las células sin el gen de CD9, la mitofagia y la degradación específica de cuerpos multivesiculares se reduce y aumenta su preferencia por fusionarse con la membrana plasmática y liberar su contenido al exterior en forma de exosomas.

Existe también de manera generalizada un incremento de la expresión de proteínas que forman parte de los complejos ESCRT. Existen tres complejos enumerados del 0 al III y que de forma

general, van a estar implicados en la selección del cargo y en la formación de las vesículas intraluminales al participar en la deformación de la membrana. Además de participar en la formación de cuerpos multivesiculares se han descrito su participación en la formación de partículas virales, en la división celular y en autofagia (Henne et al., 2011). La unión de estos complejos a la membrana se inicia con los componentes del complejo ESCRT0 y va a depender sobretodo de su interacción con PIP3. De nuevo CD9 puede estar formando un importante papel en la regulación del reclutamiento de estas proteínas de manera directa o indirecta a través de otras proteínas (Williams and Urbe, 2007)

CD9 se localiza tanto en la superficie como en el sistema de endomembranas (Deissler et al., 2007; Deneka et al., 2007) por tanto, al igual que puede modular los procesos de fusión célula-célula podría estar regulando la fusión entre orgánulos celulares y la preferencia por uno u otro compartimento. Otro de los mecanismos moleculares determinantes para decidir el destino de estos compartimentos son las proteínas Rab, Éstas se anclan a la membrana y se encargan de su transporte a lo largo del citoesqueleto, reclutan otras proteínas implicadas en el reconocimiento y posterior fusión con el compartimento de destino, como por ejemplo componentes del complejo ESCRT(Hume and Seabra, 2014; Zhou et al., 2019). Diferentes Rabs aparecen incluidas en estas vesículas, pero lo más remarcable es que en los exosomas secretados por las células sin CD9 o tratadas con el péptido, detectamos un aumento de Rab8 que ha sido implicada en la autofagia secretora de proteínas citosólicas como IL-1 β donde actuaría como un regulador de su

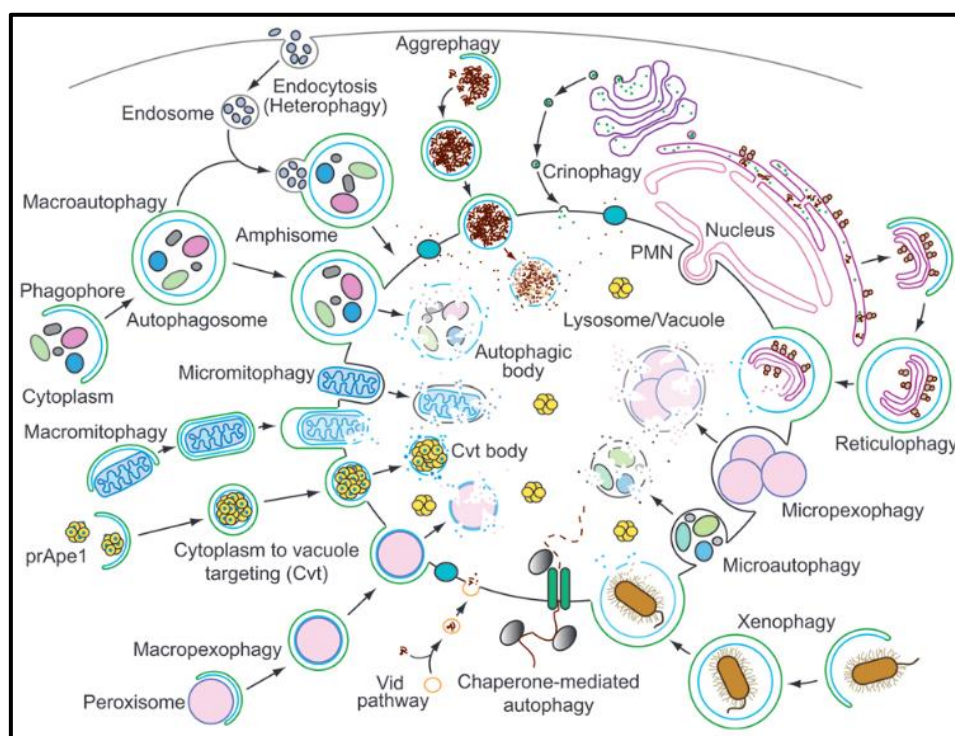


Figura 47. Esquema representativo de los distintos tipos de autofagia descritos hasta la fecha (Klionsky et al., 2007).

exocitosis (Dupont et al., 2011). Rab8 participa en el transporte de proteínas desde el aparato de Golgi a la membrana plasmática y en experimentos donde se elimina el gen de Rab8 provoca la acumulación de proteínas en lisosomas. También ha sido implicada en la fusión de los anisomas con la membrana plasmática estimulando la liberación de los exosomas que se alojan en estas estructuras (Chen et al., 2017).

Estos resultados, en el contexto en el que nos encontramos, podrían indicarnos que CD9 intervendría reclutando proteínas que favorecen la fusión de parte de los cuerpos multivesiculares con fagosomas o vacuolas autofágicas, mientras que en ausencia de la tetraspanina esta ruta está bloqueada y por el contrario se estimula su fusión con la superficie celular.

Otro trabajo relacionado con otra proteína de la misma familia, en este caso Rab7, muestra resultados sorprendentemente similares a los nuestros (Alonso-Curbelo et al., 2014). En este caso, en presencia de Rab7, las células forman grandes y numerosas vesículas a las que denominan macropinosomas porque se originan a partir de la membrana plasmática y que tendrán como destino la fusión con lisosomas para degradar su contenido. Sin embargo, cuando la expresión de Rab7 disminuye, estos macropinosomas escapan a la degradación y pasan a ser reciclados o secretados. Además los autofagosomas tampoco se fusionan con el lisosoma si no que se acumulan (Alonso-Curbelo and Soengas, 2015).

La conclusión general que podemos sacar de este estudio, es que CD9 va a regular el destino de los cuerpos multivesiculares probablemente reclutando proteínas accesorias que determinan la selectividad del proceso o que directamente intervienen en la fusión de los orgánulos intracelulares. CD9 por tanto promovería la degradación de los cuerpos multivesiculares que expresan la tetraspanina, mientras que en su ausencia se estimularía su secreción. No es un proceso todo o nada ya que las células siguen secretando exosomas en grandes cantidades en presencia de CD9, pero sí que debe ser un sensor de la producción. Hay que tener en cuenta que los autofagosomas pueden formarse a partir de membranas de otros orgánulos, en los que no podemos descartar la presencia de CD9 y su participación en el reconocimiento de los sustratos que serán degradados tanto por sí misma como a través de otras moléculas selectoras reclutadas por ella. Además, CD9 participa en la formación de ciertos subtipos de vesículas, y su eliminación estimula la formación de vesículas pequeñas y densas, con funciones probablemente distintas.

5.3. LA ESTABILIDAD DE MTI-MMP DENTRO DE LOS TEMS CONTROLA SU ACTIVIDAD

La regulación del tráfico intracelular, así como la inclusión en vesículas extracelulares juega un papel crucial en la regulación funcional de proteasas de membrana, como MTI-MMP, que también están incluidas en los microdominios ricos en tetraspaninas. En la formación de invadopodios por

las células tumorales durante un proceso invasivo, se hace muy evidente la movilización controlada de MTI-MMP, siempre como punto final a la formación completa de la protrusión (Eddy et al., 2017). El ensamblaje de estas estructuras requiere por un lado un estímulo externo, y por otro, una compleja respuesta intracelular que engloba una intensa polimerización de actina y la activación y reclutamiento secuencial de múltiples proteínas a la región de formación. Recientemente se ha descrito una secreción selectiva de vesículas que portan MTI-MMP en estas regiones (Hoshino et al., 2013). Sin embargo, MTI-MMP no solo se expresa en células invasivas (Itoh, 2015), si no que tiene otras funciones en diferentes tipos celulares. Así el ratón KO de esta proteína muestra múltiples alteraciones en el desarrollo del tejido conectivo (Holmbeck et al., 1999). En general el control de la localización subcelular de esta enzima es tremendamente crítico para modular su actividad. Datos no publicados del grupo de la Dra. Arroyo, indicaban que existían en la región citosólica de MTI-MMP una serie de aminoácidos necesarios para la interacción con ERMs, en concreto con moesina. En un trabajo cristalográfico ya se había descrito que el dominio citosólico de MTI-MMP podía interactuar con radixina a través de la secuencia 568PxøLLY y que el aminoácido R576 era también relevante al estabilizar la unión a través de enlaces de hidrógeno (Terawaki et al., 2015). En nuestros mutantes, la eliminación de este residuo no parece afectar a la interacción con ERMs, lo que probablemente indique que no es crítico para la unión, pero una vez que están próximas participaría en la estabilización del complejo. El punto débil del estudio es que utilizan cristales de radixina unida a un péptido con la secuencia carboxilo terminal de MTI-MMP. Este péptido, al no estar anclado a una membrana, no se encuentra en una situación igual a la fisiológica y los extremos del péptido tienen una flexibilidad conformacional tan alta que hace imposible determinar la conformación precisa en el complejo y se descartan del estudio. En nuestro caso, es precisamente ese extremo amino terminal yuxtamembrana el que nosotros hemos detectado como el más importante para la interacción.

En nuestro estudio nos hemos centrado en ensayos que utilizan mutantes que mantienen la proteína en su estado nativo, en un modelo celular que no tiene expresión endógena de MTI-MMP. En este modelo pudimos confirmar que la secuencia de aminoácidos RRH es fundamental para la colocalización de MTI-MMP con la forma activa de ERMs. Al mutar el motivo RRH y abolir la interacción con ERMs, por lo que se perdería el anclaje al citoesqueleto de actina, la metaloproteasa parece volverse inestable en la superficie celular, lo que favorece su localización en compartimentos intracelulares. Este hecho también podría explicar que haya una disminución del procesamiento autoproteolítico, que requeriría una concentración de enzima en la superficie celular de manera local que facilite que dos moléculas de MTI-MMP dimericen y se corten. Por esta razón, en el caso del mutante del motivo RRH, aunque existe una expresión menor en la membrana, también se impide el autoprosesamiento y el resultado neto es una mayor actividad proteolítica sobre la matriz extracelular.

Por otra parte, la concentración local de MTI-MMP también puede regularse mediante su inclusión en microdominios ricos en tetraspaninas, que por otra parte están también conectados al citoesqueleto de actina mediante ERMs. Los experimentos de FLIM-FRET con los distintos mutantes de MTI-MMP indican que la interacción con ERMs no es estrictamente necesaria para la interacción de la proteasa con CD151. Sin embargo, en el caso del mutante, la interacción está deslocalizada y distribuida a lo largo de toda la célula. En las células que expresan la construcción de MTI-MMP salvaje se detectan valores de FRET muy altos en las protrusiones celulares, donde existiría una concentración muy alta tanto de la metaloproteasa como de la tetraspanina gracias a la interacción de ambas con ERMs.

En el caso de la delección génica de CD151, observamos que no influye en el patrón de colocalización de los distintos mutantes de MTI-MMP con ERMs, y que los efectos en su actividad (tanto sobre sí misma como sobre la matriz extracelular) derivados de la ruptura con ERMs se mantenían, de forma que seguía habiendo una disminución del autoprosesamiento y un aumento en la capacidad degradativa del sustrato al mutar el motivo RRH. En células endoteliales MTI-MMP forma complejos con las integrinas receptoras de la matriz extracelular mediados por su inclusión dentro de los TEMs vía CD151 (Yanez-Mo et al., 2008). Este complejo ternario juega un papel importante en la actividad de degradación de la proteasa sobre la matriz en dicho modelo celular. En la línea tumoral empleada en este estudio, si bien hay una ligera disminución en el índice de degradación de la gelatina cuando CD151 se elimina, éste no llega a ser significativo.

Los análisis de colocalización con marcadores de endosomas tempranos y tardíos muestran que al mutar el dominio RRH aumenta la localización de MTI-MMP en endosomas tardíos identificados mediante el marcador CD63, independientemente de la ausencia o presencia de la tetraspanina, debido probablemente a su mayor inestabilidad en la membrana. También se incrementa su localización en lisosomas y este fenómeno sí se favorece cuando CD151 está ausente. Además, los ensayos de internalización sugieren que esta se enlentece tanto cuando se muta el motivo RRH, como cuando se deleciona CD151, aunque no se observó un efecto aditivo al mutar RRH en células carentes de CD151. En este momento podemos especular que la ausencia de esta tetraspanina puede incrementar la interacción con otras, como CD63, por un simple mecanismo de competición, y que esta interacción estimule su degradación por la vía lisosomal como ya se reportó anteriormente (Takino et al., 2003). Debido al incremento en compartimentos positivos para CD63 y a que MTI-MMP es un componente de exosomas en células invasivas, pensamos que estas modificaciones serían relevantes para su inclusión en estas vesículas, sin embargo, no fuimos capaces de detectar cambios en la inclusión de MTI-MMP en exosomas en nuestro modelo celular.

De los múltiples trabajos que existen hasta la actualidad, se recoge la idea general de que la actividad de MTI-MMP en la superficie celular depende por un lado de que haya un sistema

funcional de internalización y por otro lado de sistemas que mantengan la estabilidad de la proteína en la superficie. En nuestro sistema observamos que al bloquear la interacción con ERMs, su expresión en la membrana es menor pero deslocalizada, lo que incide directamente tanto en su dinámica de internalización como en su actividad autocatalítica. Este último proceso parece ser dominante en el fenotipo final de la célula en cuanto a su capacidad de degradar la matriz extracelular. En el caso de la delección de CDI51, observamos también una ralentización de la internalización, pero MTI-MMP se congrega correctamente en zonas de protrusión, lo que permitiría su autoprosesamiento, que como comentábamos parece ser el factor dominante en la capacidad gelatinolítica.

Podemos concluir por tanto, que las tetraspaninas, al regular la dinámica de compartimentos del aparato endolisosomal y el tráfico intracelular de receptores asociados, son importantes moduladores tanto de la infección viral como de procesos invasivos.

6.

Conclusiones

1. CD81 interacciona con SAMHD1 a través de su extremo carboxilo terminal y regula su localización intracelular y expresión.
2. CD81 regula la replicación del VIH-1 al inhibir la degradación de SAMHD1 por el proteasoma, lo que aumenta la disponibilidad intracelular de dNTPs y por tanto la retrotranscripción viral.
3. CD9 regula la secreción y cargo de vesículas extracelulares en células de melanoma humano.
4. La delección del gen de CD9 en células de melanoma reduce la mitofagia y la formación de vacuolas autofágicas.
5. La mutación del motivo RRH en la región citosólica de MT1-MMP, implicado en su asociación con ERMs, reduce el autoprocesamiento de la metaloproteinasa e incrementa su capacidad de degradar componentes de la matriz extracelular.
6. Ensayos de FLIM-FRET demuestran que la mutación del motivo RRH no suprime la asociación con la tetraspanina CD151 pero sí impide su relocalización a regiones protrusivas especializadas.
7. Tanto las ERMs como CD151 participan en la internalización de MT1-MMP.

7.

Bibliografía

- Albers, T., M. Maniak, E. Beitz, and J. von Bulow. 2016. The C Isoform of Dictyostelium Tetraspanins Localizes to the Contractile Vacuole and Contributes to Resistance against Osmotic Stress. *PLoS One*. 11:e0162065.
- Alonso-Curbelo, D., E. Riveiro-Falkenbach, E. Perez-Guijarro, M. Cifdaloz, P. Karras, L. Osterloh, D. Megias, E. Canon, T.G. Calvo, D. Olmeda, G. Gomez-Lopez, O. Grana, V.J. Sanchez-Arevalo Lobo, D.G. Pisano, H.W. Wang, P. Ortiz-Romero, D. Tormo, K. Hoek, J.L. Rodriguez-Peralto, J.A. Joyce, and M.S. Soengas. 2014. RAB7 controls melanoma progression by exploiting a lineage-specific wiring of the endolysosomal pathway. *Cancer Cell*. 26:61-76.
- Alonso-Curbelo, D., and M.S. Soengas. 2015. Hyperactivated endolysosomal trafficking in melanoma. *Oncotarget*. 6:2583-2584.
- Ambrose, Z., and C. Aiken. 2014. HIV-1 uncoating: connection to nuclear entry and regulation by host proteins. *Virology*. 454-455:371-379.
- Andreu, Z., and M. Yanez-Mo. 2014. Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. *Front Immunol*. 5:442.
- Audano, M., A. Schneider, and N. Mitro. 2018. Mitochondria, lysosomes, and dysfunction: their meaning in neurodegeneration. *J Neurochem*. 147:291-309.
- Baixaui, F., R. Acin-Perez, C. Villarroja-Beltri, C. Mazzeo, N. Nunez-Andrade, E. Gabande-Rodriguez, M.D. Ledesma, A. Blazquez, M.A. Martin, J.M. Falcon-Perez, J.M. Redondo, J.A. Enriquez, and M. Mittelbrunn. 2015. Mitochondrial Respiration Controls Lysosomal Function during Inflammatory T Cell Responses. *Cell Metab*. 22:485-498.
- Ballana, E., and J.A. Este. 2015. SAMHD1: at the crossroads of cell proliferation, immune responses, and virus restriction. *Trends Microbiol*. 23:680-692.
- Banse, P., R. Moeller, J. Bruening, L. Lasswitz, S. Kahl, A.G. Khan, J. Marcotrigiano, T. Pietschmann, and G. Gerold. 2018. CD81 Receptor Regions outside the Large Extracellular Loop Determine Hepatitis C Virus Entry into Hepatoma Cells. *Viruses*. 10.
- Bari, R., Q. Guo, B. Xia, Y.H. Zhang, E.E. Giesert, S. Levy, J.J. Zheng, and X.A. Zhang. 2011. Tetraspanins regulate the protrusive activities of cell membrane. *Biochem Biophys Res Commun*. 415:619-626.
- Barrero-Villar, M., J.R. Cabrero, M. Gordon-Alonso, J. Barroso-Gonzalez, S. Alvarez-Losada, M.A. Munoz-Fernandez, F. Sanchez-Madrid, and A. Valenzuela-Fernandez. 2009. Moesin is required for HIV-1-induced CD4-CXCR4 interaction, F-actin redistribution, membrane fusion and viral infection in lymphocytes. *J Cell Sci*. 122:103-113.
- Beck, Z., A. Balogh, A. Kis, E. Izsepi, L. Cervenak, G. Laszlo, A. Biro, K. Liliom, G. Mocsar, G. Vamosi, G. Fust, and J. Matko. 2010. New cholesterol-specific antibodies remodel HIV-1 target cells' surface and inhibit their in vitro virus production. *J Lipid Res*. 51:286-296.

- Belkin, A.M., S.S. Akimov, L.S. Zaritskaya, B.I. Ratnikov, E.I. Deryugina, and A.Y. Strongin. 2001. Matrix-dependent proteolysis of surface transglutaminase by membrane-type metalloproteinase regulates cancer cell adhesion and locomotion. *J Biol Chem.* 276:18415-18422.
- Bhuin, T., and J.K. Roy. 2014. Rab proteins: the key regulators of intracellular vesicle transport. *Exp Cell Res.* 328:1-19.
- Bissa, B., and V. Deretic. 2018. Autophagosome Formation: Cutting the Gordian Knot at the ER. *Curr Biol.* 28:R347-R349.
- Blanc, L., and M. Vidal. 2018. New insights into the function of Rab GTPases in the context of exosomal secretion. *Small GTPases.* 9:95-106.
- Bourgeois, R., J. Mercier, I. Paquette-Brooks, and E.A. Cohen. 2006. Association between disruption of CD4 receptor dimerization and increased human immunodeficiency virus type I entry. *Retrovirology.* 3:31.
- Brzozowski, J.S., D.R. Bond, H. Jankowski, B.J. Goldie, R. Burchell, C. Naudin, N.D. Smith, C.J. Scarlett, M.R. Larsen, M.D. Dun, K.A. Skelding, and J. Weidenhofer. 2018. Extracellular vesicles with altered tetraspanin CD9 and CD151 levels confer increased prostate cell motility and invasion. *Sci Rep.* 8:8822.
- Campbell, E.M., and T.J. Hope. 2015. HIV-1 capsid: the multifaceted key player in HIV-1 infection. *Nat Rev Microbiol.* 13:471-483.
- Cannon, J.L., P.D. Mody, K.M. Blaine, E.J. Chen, A.D. Nelson, L.J. Sayles, T.V. Moore, B.S. Clay, N.O. Dulin, R.A. Shilling, J.K. Burkhardt, and A.I. Sperling. 2011. CD43 interaction with ezrin-radixin-moesin (ERM) proteins regulates T-cell trafficking and CD43 phosphorylation. *Mol Biol Cell.* 22:954-963.
- Capalbo, G., T. Mueller-Kuller, S. Markovic, S.A. Klein, U. Dietrich, D. Hoelzer, O.G. Ottmann, and U.J. Scheuring. 2011. Knockdown of ERM family member moesin in host cells increases HIV type I replication. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 27:1317-1322.
- Cerutti, N., M. Killick, V. Jugnarain, M. Papathanasopoulos, and A. Capovilla. 2014. Disulfide reduction in CD4 domain 1 or 2 is essential for interaction with HIV glycoprotein 120 (gp120), which impairs thioredoxin-driven CD4 dimerization. *J Biol Chem.* 289:10455-10465.
- Clucas, J., and F. Valderrama. 2014. ERM proteins in cancer progression. *J Cell Sci.* 127:267-275.
- Coiras, M., M. Bermejo, B. Descours, E. Mateos, J. Garcia-Perez, M.R. Lopez-Huertas, M.M. Lederman, M. Benkirane, and J. Alcami. 2016. IL-7 Induces SAMHD1 Phosphorylation in CD4+ T Lymphocytes, Improving Early Steps of HIV-1 Life Cycle. *Cell Rep.* 14:2100-2107.

- Cribier, A., B. Descours, A.L. Valadao, N. Laguette, and M. Benkirane. 2013. Phosphorylation of SAMHD1 by cyclin A2/CDK1 regulates its restriction activity toward HIV-1. *Cell Rep.* 3:1036-1043.
- Cunha, E.S., P. Sfriso, A.L. Rojas, P. Roversi, A. Hospital, M. Orozco, and N.G.A. Abrescia. 2018. Mechanism of Structural Tuning of the Hepatitis C Virus Human Cellular Receptor CD81 Large Extracellular Loop. *Structure.* 26:181.
- Chairoungdua, A., D.L. Smith, P. Pochard, M. Hull, and M.J. Caplan. 2010. Exosome release of beta-catenin: a novel mechanism that antagonizes Wnt signaling. *J Cell Biol.* 190:1079-1091.
- Charrin, S., S. Jouannet, C. Boucheix, and E. Rubinstein. 2014. Tetraspanins at a glance. *J Cell Sci.* 127:3641-3648.
- Checinska, A., and M.S. Soengas. 2011. The gluttonous side of malignant melanoma: basic and clinical implications of macroautophagy. *Pigment Cell Melanoma Res.* 24:1116-1132.
- Cho, J.A., P. Osenkowski, H. Zhao, S. Kim, M. Toth, K. Cole, A. Aboukameel, A. Saliganan, L. Schuger, R.D. Bonfil, and R. Fridman. 2008. The inactive 44-kDa processed form of membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) enhances proteolytic activity via regulation of endocytosis of active MT1-MMP. *J Biol Chem.* 283:17391-17405.
- Davis, S., J. Wang, and S. Ferro-Novick. 2017. Crosstalk between the Secretory and Autophagy Pathways Regulates Autophagosome Formation. *Dev Cell.* 41:23-32.
- Deissler, H., E.M. Kuhn, G.E. Lang, and H. Deissler. 2007. Tetraspanin CD9 is involved in the migration of retinal microvascular endothelial cells. *Int J Mol Med.* 20:643-652.
- Delandre, C., T.R. Penabaz, A.L. Passarelli, S.K. Chapes, and R.J. Clem. 2009. Mutation of juxtamembrane cysteines in the tetraspanin CD81 affects palmitoylation and alters interaction with other proteins at the cell surface. *Exp Cell Res.* 315:1953-1963.
- Deneka, M., A. Pelchen-Matthews, R. Byland, E. Ruiz-Mateos, and M. Marsh. 2007. In macrophages, HIV-1 assembles into an intracellular plasma membrane domain containing the tetraspanins CD81, CD9, and CD53. *J Cell Biol.* 177:329-341.
- Detchokul, S., E.D. Williams, M.W. Parker, and A.G. Frauman. 2014. Tetraspanins as regulators of the tumour microenvironment: implications for metastasis and therapeutic strategies. *Br J Pharmacol.* 171:5462-5490.
- Diamond, T.L., M. Roshal, V.K. Jamburuthugoda, H.M. Reynolds, A.R. Merriam, K.Y. Lee, M. Balakrishnan, R.A. Bambara, V. Planelles, S. Dewhurst, and B. Kim. 2004. Macrophage tropism of HIV-1 depends on efficient cellular dNTP utilization by reverse transcriptase. *J Biol Chem.* 279:51545-51553.
- Duffield, A., E.J. Kamsteeg, A.N. Brown, P. Pagel, and M.J. Caplan. 2003. The tetraspanin CD63 enhances the internalization of the H,K-ATPase beta-subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:15560-15565.

- Dumas, F., P. Preira, and L. Salome. 2014. Membrane organization of virus and target cell plays a role in HIV entry. *Biochimie*. 107 Pt A:22-27.
- Eddy, R.J., M.D. Weidmann, V.P. Sharma, and J.S. Condeelis. 2017. Tumor Cell Invadopodia: Invasive Protrusions that Orchestrate Metastasis. *Trends Cell Biol*. 27:595-607.
- Egeblad, M., and Z. Werb. 2002. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*. 2:161-174.
- Endo, K., T. Takino, H. Miyamori, H. Kinsen, T. Yoshizaki, M. Furukawa, and H. Sato. 2003. Cleavage of syndecan-1 by membrane type matrix metalloproteinase-1 stimulates cell migration. *J Biol Chem*. 278:40764-40770.
- Fader, C.M., D. Sanchez, M. Furlan, and M.I. Colombo. 2008. Induction of autophagy promotes fusion of multivesicular bodies with autophagic vacuoles in k562 cells. *Traffic*. 9:230-250.
- Fan, J., G.Z. Zhu, and R.M. Niles. 2010. Expression and function of CD9 in melanoma cells. *Mol Carcinog*. 49:85-93.
- Fassati, A. 2012. Multiple roles of the capsid protein in the early steps of HIV-1 infection. *Virus Res*. 170:15-24.
- Fast, L.A., S. Mikulicic, A. Fritzen, J. Schwickert, F. Boukhallouk, D. Hochdorfer, C. Sinzger, H. Suarez, P.N. Monk, M. Yanez-Mo, D. Lieber, and L. Florin. 2018. Inhibition of Tetraspanin Functions Impairs Human Papillomavirus and Cytomegalovirus Infections. *Int J Mol Sci*. 19.
- Fehon, R.G., A.I. McClatchey, and A. Bretscher. 2010. Organizing the cell cortex: the role of ERM proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 11:276-287.
- Florin, L., and T. Lang. 2018. Tetraspanin Assemblies in Virus Infection. *Front Immunol*. 9:1140.
- Fournier, M., M. Peyrou, L. Bourgoïn, C. Maeder, I. Tchou, and M. Foti. 2010. CD4 dimerization requires two cysteines in the cytoplasmic domain of the molecule and occurs in microdomains distinct from lipid rafts. *Mol Immunol*. 47:2594-2603.
- Franz, J., B.F. Brinkmann, M. König, J. Huve, C. Stock, K. Ebnet, and C. Riethmüller. 2016. Nanoscale Imaging Reveals a Tetraspanin-CD9 Coordinated Elevation of Endothelial ICAM-1 Clusters. *PLoS One*. 11:e0146598.
- Fu, E., L. Pan, Y. Xie, D. Mu, W. Liu, F. Jin, and X. Bai. 2015. Tetraspanin CD63 is a regulator of HIV-1 replication. *Int J Clin Exp Pathol*. 8:1184-1198.
- Gingras, D., and R. Beliveau. 2010. Emerging concepts in the regulation of membrane-type 1 matrix metalloproteinase activity. *Biochim Biophys Acta*. 1803:142-150.
- Gordon-Alonso, M., M. Sala-Valdes, V. Rocha-Perugini, D. Perez-Hernandez, S. Lopez-Martin, A. Ursa, S. Alvarez, T.V. Kolesnikova, J. Vazquez, F. Sanchez-Madrid, and M. Yanez-Mo. 2012. EWI-2 association with alpha-actinin regulates T cell immune synapses and HIV viral infection. *J Immunol*. 189:689-700.

- Gordon-Alonso, M., M. Yanez-Mo, O. Barreiro, S. Alvarez, M.A. Munoz-Fernandez, A. Valenzuela-Fernandez, and F. Sanchez-Madrid. 2006. Tetraspanins CD9 and CD81 modulate HIV-1-induced membrane fusion. *J Immunol.* 177:5129-5137.
- Gutierrez-Lopez, M.D., A. Gilsanz, M. Yanez-Mo, S. Ovalle, E.M. Lafuente, C. Dominguez, P.N. Monk, I. Gonzalez-Alvaro, F. Sanchez-Madrid, and C. Cabanas. 2011. The sheddase activity of ADAM17/TACE is regulated by the tetraspanin CD9. *Cell Mol Life Sci.* 68:3275-3292.
- Hakulinen, J., L. Sankkila, N. Sugiyama, K. Lehti, and J. Keski-Oja. 2008. Secretion of active membrane type 1 matrix metalloproteinase (MMP-14) into extracellular space in microvesicular exosomes. *J Cell Biochem.* 105:1211-1218.
- Haller, C., B. Muller, J.V. Fritz, M. Lamas-Murua, B. Stolp, F.M. Pujol, O.T. Keppler, and O.T. Fackler. 2014. HIV-1 Nef and Vpu are functionally redundant broad-spectrum modulators of cell surface receptors, including tetraspanins. *J Virol.* 88:14241-14257.
- Hanson, P.I., and A. Cashikar. 2012. Multivesicular body morphogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 28:337-362.
- Hantak, M.P., E. Qing, J.T. Earnest, and T. Gallagher. 2019. Tetraspanins: Architects of Viral Entry and Exit Platforms. *J Virol.* 93.
- Hemler, M.E. 2005. Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6:801-811.
- Hemler, M.E. 2014. Tetraspanin proteins promote multiple cancer stages. *Nat Rev Cancer.* 14:49-60.
- Hernandez-Barrantes, S., M. Toth, M.M. Bernardo, M. Yurkova, D.C. Gervasi, Y. Raz, Q.A. Sang, and R. Fridman. 2000. Binding of active (57 kDa) membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) to tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 regulates MT1-MMP processing and pro-MMP-2 activation. *J Biol Chem.* 275:12080-12089.
- Holmbeck, K., P. Bianco, J. Caterina, S. Yamada, M. Kromer, S.A. Kuznetsov, M. Mankani, P.G. Robey, A.R. Poole, I. Pidoux, J.M. Ward, and H. Birkedal-Hansen. 1999. MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover. *Cell.* 99:81-92.
- Hollenbaugh, J.A., P. Gee, J. Baker, M.B. Daly, S.M. Amie, J. Tate, N. Kasai, Y. Kanemura, D.H. Kim, B.M. Ward, Y. Koyanagi, and B. Kim. 2013. Host factor SAMHDI restricts DNA viruses in non-dividing myeloid cells. *PLoS Pathog.* 9:e1003481.
- Homsy, Y., and T. Lang. 2017. The specificity of homomeric clustering of CD81 is mediated by its delta-loop. *FEBS Open Bio.* 7:274-283.
- Hong, I.K., Y.M. Kim, D.I. Jeoung, K.C. Kim, and H. Lee. 2005. Tetraspanin CD9 induces MMP-2 expression by activating p38 MAPK, JNK and c-Jun pathways in human melanoma cells. *Exp Mol Med.* 37:230-239.

- Hoshino, D., K.C. Kirkbride, K. Costello, E.S. Clark, S. Sinha, N. Grega-Larson, M.J. Tyska, and A.M. Weaver. 2013. Exosome secretion is enhanced by invadopodia and drives invasive behavior. *Cell Rep.* 5:1159-1168.
- Hu, Y.B., E.B. Dammer, R.J. Ren, and G. Wang. 2015. The endosomal-lysosomal system: from acidification and cargo sorting to neurodegeneration. *Transl Neurodegener.* 4:18.
- Hume, A.N., and M.C. Seabra. 2014. Melanoma goes on a diet to get moving: toning down phagocytic Rab7 expression helps melanoma to metastasise. *Pigment Cell Melanoma Res.* 27:1012-1013.
- Huotari, J., and A. Helenius. 2011. Endosome maturation. *EMBO J.* 30:3481-3500.
- Hurwitz, S.N., M.R. Cheerathodi, D. Nkosi, S.B. York, and D.G. Meckes, Jr. 2018. Tetraspanin CD63 Bridges Autophagic and Endosomal Processes To Regulate Exosomal Secretion and Intracellular Signaling of Epstein-Barr Virus LMP1. *J Virol.* 92.
- Imai, K., E. Ohuchi, T. Aoki, H. Nomura, Y. Fujii, H. Sato, M. Seiki, and Y. Okada. 1996. Membrane-type matrix metalloproteinase 1 is a gelatinolytic enzyme and is secreted in a complex with tissue inhibitor of metalloproteinases 2. *Cancer Res.* 56:2707-2710.
- Imai, T., M. Kakizaki, M. Nishimura, and O. Yoshie. 1995. Molecular analyses of the association of CD4 with two members of the transmembrane 4 superfamily, CD81 and CD82. *J Immunol.* 155:1229-1239.
- Imai, T., and O. Yoshie. 1993. C33 antigen and M38 antigen recognized by monoclonal antibodies inhibitory to syncytium formation by human T cell leukemia virus type I are both members of the transmembrane 4 superfamily and associate with each other and with CD4 or CD8 in T cells. *J Immunol.* 151:6470-6481.
- Ioannou, M.S., and P.S. McPherson. 2016. Regulation of Cancer Cell Behavior by the Small GTPase Rab13. *J Biol Chem.* 291:9929-9937.
- Itoh, Y. 2015. Membrane-type matrix metalloproteinases: Their functions and regulations. *Matrix Biol.* 44-46:207-223.
- Itoh, Y., N. Ito, H. Nagase, R.D. Evans, S.A. Bird, and M. Seiki. 2006. Cell surface collagenolysis requires homodimerization of the membrane-bound collagenase MT1-MMP. *Mol Biol Cell.* 17:5390-5399.
- Itoh, Y., and M. Seiki. 2004. MT1-MMP: an enzyme with multidimensional regulation. *Trends Biochem Sci.* 29:285-289.
- Ivetic, A., and A.J. Ridley. 2004. Ezrin/radixin/moesin proteins and Rho GTPase signalling in leucocytes. *Immunology.* 112:165-176.
- Izquierdo-Useros, N., J. Blanco, I. Erkizia, M.T. Fernandez-Figueras, F.E. Borrás, M. Naranjo-Gomez, M. Bofill, L. Ruiz, B. Clotet, and J. Martínez-Picado. 2007. Maturation of blood-

- derived dendritic cells enhances human immunodeficiency virus type I capture and transmission. *J Virol.* 81:7559-7570.
- Izquierdo-Useros, N., M. Naranjo-Gomez, I. Erkizia, M.C. Puertas, F.E. Borrás, J. Blanco, and J. Martínez-Picado. 2010. HIV and mature dendritic cells: Trojan exosomes riding the Trojan horse? *PLoS Pathog.* 6:e1000740.
- Jiang, L., K. Salao, H. Li, J.M. Rybicka, R.M. Yates, X.W. Luo, X.X. Shi, T. Kuffner, V.W. Tsai, Y. Husaini, L. Wu, D.A. Brown, T. Grewal, L.J. Brown, P.M. Curmi, and S.N. Breit. 2012. Intracellular chloride channel protein CLIC1 regulates macrophage function through modulation of phagosomal acidification. *J Cell Sci.* 125:5479-5488.
- Kajita, M., Y. Itoh, T. Chiba, H. Mori, A. Okada, H. Kinoh, and M. Seiki. 2001. Membrane-type I matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration. *J Cell Biol.* 153:893-904.
- Kim, E.T., T.E. White, A. Brandariz-Nunez, F. Diaz-Griffero, and M.D. Weitzman. 2013. SAMHD1 restricts herpes simplex virus I in macrophages by limiting DNA replication. *J Virol.* 87:12949-12956.
- Klionsky, D.J., K. Abdelmohsen, A. Abe, M.J. Abedin, H. Abeliovich, A. Acevedo Arozena, H. Adachi, C.M. Adams, P.D. Adams, K. Adeli, P.J. Adhietty, S.G. Adler, G. Agam, R. Agarwal, M.K. Aghi, M. Agnello, P. Agostinis, P.V. Aguilar, J. Aguirre-Ghiso, E.M. Airoidi, S. Ait-Si-Ali, T. Akematsu, E.T. Akporiaye, M. Al-Rubeai, G.M. Albaiceta, C. Albanese, D. Albani, M.L. Albert, J. Aldudo, H. Algul, M. Alirezaei, I. Alloza, A. Almasan, M. Almonte-Beceril, E.S. Alnemri, C. Alonso, N. Altan-Bonnet, D.C. Altieri, S. Alvarez, L. Alvarez-Erviti, S. Alves, G. Amadoro, A. Amano, C. Amantini, S. Ambrosio, I. Amelio, A.O. Amer, M. Amessou, A. Amon, Z. An, F.A. Anania, S.U. Andersen, U.P. Andley, C.K. Andreadi, N. Andrieu-Abadie, A. Anel, D.K. Ann, S. Anoopkumar-Dukie, M. Antonioli, H. Aoki, N. Apostolova, S. Aquila, K. Aquilano, K. Araki, E. Arama, A. Aranda, J. Araya, A. Arcaro, E. Arias, H. Arimoto, A.R. Ariosa, J.L. Armstrong, T. Arnould, I. Arsov, K. Asanuma, V. Askanas, E. Asselin, R. Atarashi, S.S. Atherton, J.D. Atkin, L.D. Attardi, P. Auberger, G. Auburger, L. Aurelian, R. Autelli, L. Avagliano, M.L. Avantaggiati, L. Avrahami, S. Awale, N. Azad, T. Bachetti, J.M. Backer, D.H. Bae, J.S. Bae, O.N. Bae, S.H. Bae, E.H. Baehrecke, S.H. Baek, S. Baghdiguan, A. Bagniewska-Zadworna, et al. 2016. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy.* 12:1-222.
- Klionsky, D.J., A.M. Cuervo, W.A. Dunn, Jr., B. Levine, I. van der Klei, and P.O. Seglen. 2007. How shall I eat thee? *Autophagy.* 3:413-416.
- Knauper, V., L. Bailey, J.R. Worley, P. Soloway, M.L. Patterson, and G. Murphy. 2002. Cellular activation of proMMP-13 by MT1-MMP depends on the C-terminal domain of MMP-13. *FEBS letters.* 532:127-130.

- Kowal, J., G. Arras, M. Colombo, M. Jouve, J.P. Morath, B. Primdal-Bengtson, F. Dingli, D. Loew, M. Tkach, and C. Thery. 2016. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 113:E968-977.
- Kulkarni, R., and A. Prasad. 2017. Exosomes Derived from HIV-1 Infected DCs Mediate Viral trans-Infection via Fibronectin and Galectin-3. *Sci Rep*. 7:14787.
- Lafleur, M.A., D. Xu, and M.E. Hemler. 2009. Tetraspanin proteins regulate membrane type-1 matrix metalloproteinase-dependent pericellular proteolysis. *Mol Biol Cell*. 20:2030-2040.
- Lambele, M., H. Koppensteiner, M. Symeonides, N.H. Roy, J. Chan, M. Schindler, and M. Thali. 2015. Vpu is the main determinant for tetraspanin downregulation in HIV-1-infected cells. *J Virol*. 89:3247-3255.
- Lazo, P.A. 2007. Functional implications of tetraspanin proteins in cancer biology. *Cancer Sci*. 98:1666-1677.
- Lee, E.J., J.H. Seo, J.H. Park, T.T.L. Vo, S. An, S.J. Bae, H. Le, H.S. Lee, H.J. Wee, D. Lee, Y.H. Chung, J.A. Kim, M.K. Jang, S.H. Ryu, E. Yu, S.H. Jang, Z.Y. Park, and K.W. Kim. 2017. SAMHD1 acetylation enhances its deoxynucleotide triphosphohydrolase activity and promotes cancer cell proliferation. *Oncotarget*. 8:68517-68529.
- Li, G., and E. De Clercq. 2016. HIV Genome-Wide Protein Associations: a Review of 30 Years of Research. *Microbiol Mol Biol Rev*. 80:679-731.
- Li, G., N. Dziuba, B. Friedrich, J.L. Murray, and M.R. Ferguson. 2011. A post-entry role for CD63 in early HIV-1 replication. *Virology*. 412:315-324.
- Li, G., M.A. Endsley, A. Somasunderam, S.L. Gbota, M.I. Mbaka, J.L. Murray, and M.R. Ferguson. 2014. The dual role of tetraspanin CD63 in HIV-1 replication. *Virol J*. 11:23.
- Lingwood, D., H.J. Kaiser, I. Levental, and K. Simons. 2009. Lipid rafts as functional heterogeneity in cell membranes. *Biochem Soc Trans*. 37:955-960.
- Liu, Z., H. Shi, L.C. Szymczak, T. Aydin, S. Yun, K. Conostas, A. Schaeffer, S. Ranjan, S. Kubba, E. Alam, D.E. McMahon, J. He, N. Shwartz, C. Tian, Y. Plavskin, A. Lindy, N.A. Dad, S. Sheth, N.M. Amin, S. Zimmerman, D. Liu, E.M. Schwarz, H. Smith, M.W. Krause, and J. Liu. 2015. Promotion of bone morphogenetic protein signaling by tetraspanins and glycosphingolipids. *PLoS Genet*. 11:e1005221.
- Magnus, C., and R.R. Regoes. 2012. Analysis of the subunit stoichiometries in viral entry. *PLoS One*. 7:e33441.
- Maib, H., E. Smythe, and K. Ayscough. 2017. Forty years on: clathrin-coated pits continue to fascinate. *Mol Biol Cell*. 28:843-847.
- Matthias, L.J., I. Azimi, C.A. Tabrett, and P.J. Hogg. 2010. Reduced monomeric CD4 is the preferred receptor for HIV. *J Biol Chem*. 285:40793-40799.

- Mauney, C.H., and T. Hollis. 2018. SAMHD1: Recurring roles in cell cycle, viral restriction, cancer, and innate immunity. *Autoimmunity*. 51:96-110.
- Mauney, C.H., L.C. Rogers, R.S. Harris, L.W. Daniel, N.O. Devarie-Baez, H. Wu, C.M. Furdui, L.B. Poole, F.W. Perrino, and T. Hollis. 2017. The SAMHD1 dNTP Triphosphohydrolase Is Controlled by a Redox Switch. *Antioxid Redox Signal*. 27:1317-1331.
- McClatchey, A.I. 2014. ERM proteins at a glance. *J Cell Sci*. 127:3199-3204.
- Menager, M.M. 2017. TSPAN7, effector of actin nucleation required for dendritic cell-mediated transfer of HIV-1 to T cells. *Biochem Soc Trans*. 45:703-708.
- Meyer-Wentrup, F., C.G. Figdor, M. Ansems, P. Brossart, M.D. Wright, G.J. Adema, and A.B. van Spriel. 2007. Dectin-1 interaction with tetraspanin CD37 inhibits IL-6 production. *J Immunol*. 178:154-162.
- Naghavi, M.H., S. Valente, T. Hatzioannou, K. de Los Santos, Y. Wen, C. Mott, G.G. Gundersen, and S.P. Goff. 2007. Moesin regulates stable microtubule formation and limits retroviral infection in cultured cells. *EMBO J*. 26:41-52.
- Ohuchi, E., K. Imai, Y. Fujii, H. Sato, M. Seiki, and Y. Okada. 1997. Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. *J Biol Chem*. 272:2446-2451.
- Parton, R.G., and K. Simons. 2007. The multiple faces of caveolae. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8:185-194.
- Perez-Hernandez, D., C. Gutierrez-Vazquez, I. Jorge, S. Lopez-Martin, A. Ursa, F. Sanchez-Madrid, J. Vazquez, and M. Yanez-Mo. 2013. The intracellular interactome of tetraspanin-enriched microdomains reveals their function as sorting machineries toward exosomes. *J Biol Chem*. 288:11649-11661.
- Pileri, P., Y. Uematsu, S. Campagnoli, G. Galli, F. Falugi, R. Petracca, A.J. Weiner, M. Houghton, D. Rosa, G. Grandi, and S. Abrignani. 1998. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science*. 282:938-941.
- Poincloux, R., F. Lizarraga, and P. Chavrier. 2009. Matrix invasion by tumour cells: a focus on MT1-MMP trafficking to invadopodia. *J Cell Sci*. 122:3015-3024.
- Ratnikov, B.I., D.V. Rozanov, T.I. Postnova, P.G. Baciú, H. Zhang, R.G. DiScipio, G.G. Chestukhina, J.W. Smith, E.I. Deryugina, and A.Y. Strongin. 2002. An alternative processing of integrin alpha(v) subunit in tumor cells by membrane type-1 matrix metalloproteinase. *J Biol Chem*. 277:7377-7385.
- Reimann, R., B. Kost, and J. Dettmer. 2017. TETRASPANINs in Plants. *Front Plant Sci*. 8:545.
- Rocha-Perugini, V., G. Martinez Del Hoyo, J.M. Gonzalez-Granado, M. Ramirez-Huesca, V. Zorita, E. Rubinstein, C. Boucheix, and F. Sanchez-Madrid. 2017a. CD9 Regulates Major Histocompatibility Complex Class II Trafficking in Monocyte-Derived Dendritic Cells. *Mol Cell Biol*. 37.

- Rocha-Perugini, V., H. Suarez, S. Alvarez, S. Lopez-Martin, G.M. Lenzi, F. Vences-Catalan, S. Levy, B. Kim, M.A. Munoz-Fernandez, F. Sanchez-Madrid, and M. Yanez-Mo. 2017b. CD81 association with SAMHDI enhances HIV-1 reverse transcription by increasing dNTP levels. *Nat Microbiol.* 2:1513-1522.
- Rosse, C., C. Lodillinsky, L. Fuhrmann, M. Nourieh, P. Monteiro, M. Irondelle, E. Lagoutte, S. Vacher, F. Waharte, P. Paul-Gilloteaux, M. Romao, L. Sengmanivong, M. Linch, J. van Lint, G. Raposo, A. Vincent-Salomon, I. Bieche, P.J. Parker, and P. Chavrier. 2014. Control of MT1-MMP transport by atypical PKC during breast-cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111:E1872-1879.
- Rowland, A.A., and G.K. Voeltz. 2012. Endoplasmic reticulum-mitochondria contacts: function of the junction. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 13:607-625.
- Ryoo, J., J. Choi, C. Oh, S. Kim, M. Seo, S.Y. Kim, D. Seo, J. Kim, T.E. White, A. Brandariz-Nunez, F. Diaz-Griffero, C.H. Yun, J.A. Hollenbaugh, B. Kim, D. Baek, and K. Ahn. 2014. The ribonuclease activity of SAMHDI is required for HIV-1 restriction. *Nat Med.* 20:936-941.
- Saint-Pol, J., E. Eschenbrenner, E. Dornier, C. Boucheix, S. Charrin, and E. Rubinstein. 2017. Regulation of the trafficking and the function of the metalloprotease ADAM10 by tetraspanins. *Biochem Soc Trans.* 45:937-944.
- Saiz, M.L., V. Rocha-Perugini, and F. Sanchez-Madrid. 2018. Tetraspanins as Organizers of Antigen-Presenting Cell Function. *Front Immunol.* 9:1074.
- Sakamoto, T., and M. Seiki. 2010. A membrane protease regulates energy production in macrophages by activating hypoxia-inducible factor-1 via a non-proteolytic mechanism. *J Biol Chem.* 285:29951-29964.
- Sala-Valdes, M., A. Ursa, S. Charrin, E. Rubinstein, M.E. Hemler, F. Sanchez-Madrid, and M. Yanez-Mo. 2006. EWI-2 and EWI-F link the tetraspanin web to the actin cytoskeleton through their direct association with ezrin-radixin-moesin proteins. *J Biol Chem.* 281:19665-19675.
- Sato, K., J. Aoki, N. Misawa, E. Daikoku, K. Sano, Y. Tanaka, and Y. Koyanagi. 2008. Modulation of human immunodeficiency virus type 1 infectivity through incorporation of tetraspanin proteins. *J Virol.* 82:1021-1033.
- Saunderson, S.C., P.C. Schuberth, A.C. Dunn, L. Miller, B.D. Hock, P.A. MacKay, N. Koch, R.W. Jack, and A.D. McLellan. 2008. Induction of exosome release in primary B cells stimulated via CD40 and the IL-4 receptor. *J Immunol.* 180:8146-8152.
- Schwartz, S.L., C. Cao, O. Pylypenko, A. Rak, and A. Wandinger-Ness. 2007. Rab GTPases at a glance. *J Cell Sci.* 120:3905-3910.
- Seigneuret, M., A. Delaguillaumie, C. Lagaudriere-Gesbert, and H. Conjeaud. 2001. Structure of the tetraspanin main extracellular domain. A partially conserved fold with a structurally variable domain insertion. *J Biol Chem.* 276:40055-40064.

- Serrador, J.M., J.L. Alonso-Lebrero, M.A. del Pozo, H. Furthmayr, R. Schwartz-Albiez, J. Calvo, F. Lozano, and F. Sanchez-Madrid. 1997. Moesin interacts with the cytoplasmic region of intercellular adhesion molecule-3 and is redistributed to the uropod of T lymphocytes during cell polarization. *J Cell Biol.* 138:1409-1423.
- Shi, Y., W. Zhou, L. Cheng, C. Chen, Z. Huang, X. Fang, Q. Wu, Z. He, S. Xu, J.D. Lathia, Y. Ping, J.N. Rich, X.W. Bian, and S. Bao. 2017. Tetraspanin CD9 stabilizes gp130 by preventing its ubiquitin-dependent lysosomal degradation to promote STAT3 activation in glioma stem cells. *Cell Death Differ.* 24:167-180.
- Singer, S.J., and G.L. Nicolson. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science.* 175:720-731.
- Skotland, T., N.P. Hessvik, K. Sandvig, and A. Llorente. 2019. Exosomal lipid composition and the role of ether lipids and phosphoinositides in exosome biology. *J Lipid Res.* 60:9-18.
- Soto-Herederó, G., F. Baixauli, and M. Mittelbrunn. 2017. Interorganelle Communication between Mitochondria and the Endolysosomal System. *Front Cell Dev Biol.* 5:95.
- Takino, T., N. Koshikawa, H. Miyamori, M. Tanaka, T. Sasaki, Y. Okada, M. Seiki, and H. Sato. 2003a. Cleavage of metastasis suppressor gene product KiSS-1 protein/metastatin by matrix metalloproteinases. *Oncogene.* 22:4617-4626.
- Takino, T., H. Miyamori, N. Kawaguchi, T. Uekita, M. Seiki, and H. Sato. 2003b. Tetraspanin CD63 promotes targeting and lysosomal proteolysis of membrane-type 1 matrix metalloproteinase. *Biochem Biophys Res Commun.* 304:160-166.
- Tam, E.M., Y.I. Wu, G.S. Butler, M.S. Stack, and C.M. Overall. 2002. Collagen binding properties of the membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) hemopexin C domain. The ectodomain of the 44-kDa autocatalytic product of MT1-MMP inhibits cell invasion by disrupting native type I collagen cleavage. *J Biol Chem.* 277:39005-39014.
- Tejera, E., V. Rocha-Perugini, S. Lopez-Martin, D. Perez-Hernandez, A.I. Bachir, A.R. Horwitz, J. Vazquez, F. Sanchez-Madrid, and M. Yanez-Mo. 2013. CD81 regulates cell migration through its association with Rac GTPase. *Mol Biol Cell.* 24:261-273.
- Terawaki, S., K. Kitano, M. Aoyama, T. Mori, and T. Hakoshima. 2015. MT1-MMP recognition by ERM proteins and its implication in CD44 shedding. *Genes Cells.* 20:847-859.
- Termini, C.M., and J.M. Gillette. 2017. Tetraspanins Function as Regulators of Cellular Signaling. *Front Cell Dev Biol.* 5:34.
- Thali, M. 2011. Tetraspanin functions during HIV-1 and influenza virus replication. *Biochem Soc Trans.* 39:529-531.
- Tsukita, S., K. Oishi, N. Sato, J. Sagara, A. Kawai, and S. Tsukita. 1994. ERM family members as molecular linkers between the cell surface glycoprotein CD44 and actin-based cytoskeletons. *J Cell Biol.* 126:391-401.

- van Deventer, S.J., V.E. Dunlock, and A.B. van Spriel. 2017. Molecular interactions shaping the tetraspanin web. *Biochem Soc Trans.* 45:741-750.
- van Vliet, A.R., T. Verfaillie, and P. Agostinis. 2014. New functions of mitochondria associated membranes in cellular signaling. *Biochim Biophys Acta.* 1843:2253-2262.
- Wandinger-Ness, A., and M. Zerial. 2014. Rab proteins and the compartmentalization of the endosomal system. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 6:a022616.
- Watanabe, A., D. Hoshino, N. Koshikawa, M. Seiki, T. Suzuki, and K. Ichikawa. 2013. Critical role of transient activity of MT1-MMP for ECM degradation in invadopodia. *PLoS Comput Biol.* 9:e1003086.
- Welbourn, S., S.M. Dutta, O.J. Semmes, and K. Strebel. 2013. Restriction of virus infection but not catalytic dNTPase activity is regulated by phosphorylation of SAMHD1. *J Virol.* 87:11516-11524.
- Wiley, R.D., and S. Gummuluru. 2006. Immature dendritic cell-derived exosomes can mediate HIV-1 trans infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:738-743.
- Wirth, M., W. Zhang, M. Razi, L. Nyoni, D. Joshi, N. O'Reilly, T. Johansen, S.A. Tooze, and S. Mouilleron. 2019. Molecular determinants regulating selective binding of autophagy adapters and receptors to ATG8 proteins. *Nat Commun.* 10:2055.
- Xu, J., R. Camfield, and S.M. Gorski. 2018. The interplay between exosomes and autophagy - partners in crime. *J Cell Sci.* 131.
- Yanez-Mo, M., O. Barreiro, P. Gonzalo, A. Batista, D. Megias, L. Genis, N. Sachs, M. Sala-Valdes, M.A. Alonso, M.C. Montoya, A. Sonnenberg, A.G. Arroyo, and F. Sanchez-Madrid. 2008. MT1-MMP collagenolytic activity is regulated through association with tetraspanin CD151 in primary endothelial cells. *Blood.* 112:3217-3226.
- Yanez-Mo, M., O. Barreiro, M. Gordon-Alonso, M. Sala-Valdes, and F. Sanchez-Madrid. 2009. Tetraspanin-enriched microdomains: a functional unit in cell plasma membranes. *Trends Cell Biol.* 19:434-446.
- Yang, X., C. Claas, S.K. Kraeft, L.B. Chen, Z. Wang, J.A. Kreidberg, and M.E. Hemler. 2002. Palmitoylation of tetraspanin proteins: modulation of CD151 lateral interactions, subcellular distribution, and integrin-dependent cell morphology. *Mol Biol Cell.* 13:767-781.
- Yoshida, N., D. Kitayama, M. Arima, A. Sakamoto, A. Inamine, H. Watanabe-Takano, M. Hatano, T. Koike, and T. Tokuhisa. 2011. CXCR4 expression on activated B cells is downregulated by CD63 and IL-21. *J Immunol.* 186:2800-2808.
- Yu, H.J., M.A. Reuter, and D. McDonald. 2008. HIV traffics through a specialized, surface-accessible intracellular compartment during trans-infection of T cells by mature dendritic cells. *PLoS Pathog.* 4:e1000134.

- Zahoor, M., and H. Farhan. 2018. Crosstalk of Autophagy and the Secretory Pathway and Its Role in Diseases. *Int Rev Cell Mol Biol.* 337:153-184.
- Zhang, L., F. Dai, L. Cui, B. Zhou, and Y. Guo. 2017. Up-regulation of the active form of small GTPase Rab13 promotes macroautophagy in vascular endothelial cells. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 1864:613-624.
- Zhou, F., Z. Wu, M. Zhao, R. Murtazina, J. Cai, A. Zhang, R. Li, D. Sun, W. Li, L. Zhao, Q. Li, J. Zhu, X. Cong, Y. Zhou, Z. Xie, V. Gyurkovska, L. Li, X. Huang, Y. Xue, L. Chen, H. Xu, H. Xu, Y. Liang, and N. Segev. 2019. Rab5-dependent autophagosome closure by ESCRT. *J Cell Biol.* 218:1908-1927.
- Zimmerman, B., B. Kelly, B.J. McMillan, T.C.M. Seegar, R.O. Dror, A.C. Kruse, and S.C. Blacklow. 2016. Crystal Structure of a Full-Length Human Tetraspanin Reveals a Cholesterol-Binding Pocket. *Cell.* 167:1041-1051 e1011.
- Zuidscherwoude, M., V.E. Dunlock, G. van den Bogaart, S.J. van Deventer, A. van der Schaaf, J. van Oostrum, J. Goedhart, J. In 't Hout, G.J. Hammerling, S. Tanaka, A. Nadler, C. Schultz, M.D. Wright, M.J.W. Adjobo-Hermans, and A.B. van Spriel. 2017. Tetraspanin microdomains control localized protein kinase C signaling in B cells. *Sci Signal.* 10.
- Zukauskas, A., A. Merley, D. Li, L.H. Ang, T.E. Sciuto, S. Salman, A.M. Dvorak, H.F. Dvorak, and S.C. Jaminet. 2011. TM4SF1: a tetraspanin-like protein necessary for nanopodia formation and endothelial cell migration. *Angiogenesis.* 14:345-354.

8.

Anexos

8.1. ANEXO I


(análisis proteómico)

Q9UQ80	14.4	99.73	1	0.75	0.97	1.03	17	7	7	43787	Proliferation-associated protein 2G4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PA2G4 PE=1 SV=3	TMT6plex; CarbamidometilTodos
O95747	2.26	93.54	1	0.75	0.98	0.95	4	2	2	58022	Serine/threonine-protein kinase OSR1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=OSR1 PE=1 SV=1	TMT6plex
P12814	5.84	209.23	1	0.75	0.99	0.84	14	26	9	103058	Alpha-actinin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACTN1 PE=1 SV=2	TMT6plex; CarbamidometilTodos
P30153	11.34	116.81	1	0.75	1.02	1.28	11	7	7	65309	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PTMT6plex; CarbamidometilTodos	
Q9NNTK5	7.82	110.69	1	0.75	1.09	0.99	17	7	7	44744	Obg-like ATPase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=OLAI PE=1 SV=2	TMT6plex; CarbamidometilTodos
J3KQ32	7.82	110.69	1	0.75	1.09	0.99	17	7	7	46938	Obg-like ATPase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=OLAI PE=1 SV=1	TMT6plex; CarbamidometilTodos
Q8N4C8	9.95	149.07	1	0.75	1.1	1.09	3	14	5	149821	Missshapen-like kinase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MINK1 PE=1 SV=2	TMT6plex; Biotinylation
P02671	6.54	41.16	1	0.75	1.26	1.23	2	5	2	94973	Fibrinogen alpha chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FGA PE=1 SV=2	TMT6plex
P00352	13.08	87.35	1	0.75	1.29	1.12	6	4	3	54862	Retinal dehydrogenase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ALDH1A1 PE=1 SV=2	TMT6plex
P15529	12.68	125.87	1	1.24	0.82	0.85	19	10	10	43747	Membrane cofactor protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CD46 PE=1 SV=3	TMT6plex; CarbamidometilTodos
AOA024R571	7.37	160.71	1	1.24	0.87	0.94	17	16	9	61927	EH domain-containing protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EHD1 PE=1 SV=1	TMT6plex
Q99816	13.02	178.27	1	1.24	0.88	0.87	49	20	20	43944	Tumor susceptibility gene 101 protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TSG101 PE=1 SV=2	TMT6plex; Oxidation (M)
P50502	7.01	133.63	1	1.24	0.9	1.1	18	7	7	41332	Hsc70-interacting protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ST13 PE=1 SV=2	TMT6plex
P61026	8.75	153.33	1	1.24	0.92	0.98	44	16	10	22541	Ras-related protein Rab-10 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAB10 PE=1 SV=1	TMT6plex
W4VSO9	2.75	44.38	1	1.24	0.97	0.81	3	2	2	67731	Cdc42-interacting protein 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TRIP10 PE=1 SV=1	TMT6plex
Q9UK41	6.74	167.76	1	1.24	1	1.06	62	13	13	25425	Vacuolar protein sorting-associated protein 28 homolog OS=Homo sapiens OX=9606 GN=VPS28 PE=1 SV=1	TMT6plex; Oxidation (M); CarbamidometilTodos
Q6BCY4	1.91	47.45	1	1.24	1.02	0.91	5	2	2	31458	NADH-cytochrome b5 reductase 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CYB5R2 PE=1 SV=1	TMT6plex
P23470	3.51	66.46	1	1.24	1.07	1.01	2	4	3	162003	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase gamma OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PTPRG PE=1 SV=4	TMT6plex
P39060	2.00	219.91	1	1.24	1.46	2.42	14	29	29	178187	Collagen alpha-1(XVII) chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=COL18A1 PE=1 SV=5	TMT6plex; CarbamidometilTodos; Deamidation (NQ); Carbamylation; O
K7EJC1	5.2	46.22	1	1.25	0.69	0.62	10	2	2	19781	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 8 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PSMD8 PE=1 SV=1	TMT6plex
Q9H444	12.77	141.66	1	1.25	0.83	0.85	40	10	10	24950	Charged multivesicular body protein 4b OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CHMP4B PE=1 SV=1	TMT6plex
Q9HAC8	8.29	94.66	1	1.25	0.87	0.88	18	4	4	25938	Ubiquitin domain-containing protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=UBT1 PE=1 SV=1	TMT6plex
O75955	7.35	127.15	1	1.25	0.92	0.91	17	8	8	47355	Flotillin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FLT1 PE=1 SV=3	TMT6plex
A114H1	1.99	49.77	1	1.25	0.92	1.02	1	2	2	165742	Soluble scavenger receptor cysteine-rich domain-containing protein SSCSD OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SSCSD PE=1 SV=1	TMT6plex; CarbamidometilTodos
O95297	7.91	86.23	1	1.25	0.94	0.81	11	3	3	29082	Myelin protein zero-like protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MPZL1 PE=1 SV=1	TMT6plex
Q13530	7.91	132.39	1	1.25	1.01	0.99	18	11	11	52581	Serine incorporator 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SERINC3 PE=2 SV=2	TMT6plex; Oxidation (M); CarbamidometilTodos
P46531	4.48	125.96	1	1.25	1.04	1.18	2	6	5	272503	Neurogenic locus notch homolog protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NOTCH1 PE=1 SV=4	TMT6plex; CarbamidometilTodos
Q14644	9.21	65.07	1	1.25	1.14	0.81	5	3	3	95699	Ras GTPase-activating protein 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RASA3 PE=1 SV=3	TMT6plex; CarbamidometilTodos
O60884	10.87	119.97	1	1.26	0.83	0.89	22	8	8	45746	Dnaj homolog subfamily A member 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DNAJA2 PE=1 SV=1	TMT6plex; CarbamidometilTodos
Q14786	8.78	141.92	1	1.26	0.88	1.01	12	9	9	103134	Neuropilin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NRP1 PE=1 SV=3	TMT6plex; CarbamidometilTodos
Q9H9H4	7.78	139.11	1	1.26	1	0.94	32	7	7	31307	Vacuolar protein sorting-associated protein 37B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=VPS37B PE=1 SV=1	TMT6plex; Oxidation (M)
P61006	5.86	144.76	1	1.26	1.08	0.93	20	14	5	23668	Ras-related protein Rab-8A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAB8A PE=1 SV=1	TMT6plex; CarbamidometilTodos
P62753	29.25	111.37	1	1.26	1.27	1.81	20	5	5	28681	40S ribosomal protein S6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS6 PE=1 SV=1	TMT6plex; CarbamidometilTodos
O00622	2.00	182.84	1	1.26	2.11	3.28	49	21	21	42027	Protein CYR61 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CYR61 PE=1 SV=1	TMT6plex; CarbamidometilTodos
Q07822	13.09	77.15	1	1.27	0.77	0.77	9	3	3	35214	Leukocyte surface antigen CD47 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CD47 PE=1 SV=1	TMT6plex
Q5T123	9.86	61.18	1	1.27	0.77	1.02	26	3	3	9381	SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SH3BGL3 PE=1 SV=1	TMT6plex
Q9HOE2	9.31	94.08	1	1.27	0.94	0.91	19	6	6	30282	Toll-interacting protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TLIP PE=1 SV=1	TMT6plex; CarbamidometilTodos
P25685	2.36	72.66	1	1.27	0.96	1	6	2	2	38044	Dnaj homolog subfamily B member 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DNAJB1 PE=1 SV=4	TMT6plex
Q16543	6.09	61.48	1	1.27	0.98	0.84	6	3	3	44468	Hsp90 co-chaperone Cdc37 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CDC37 PE=1 SV=1	TMT6plex
O95433	33.25	75.18	1	1.27	1.59	0.73	9	3	3	38274	Activator of 90 kDa heat shock protein ATPase homolog 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AHS1 PE=1 SV=1	TMT6plex
Q96DD7	4.35	57.5	1	1.28	0.88	0.81	10	2	2	21522	Protein shisa-4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SHISA4 PE=2 SV=3	TMT6plex; CarbamidometilTodos
Q9BPX5	6.23	75.7	1	1.28	0.91	1.07	18	3	3	16941	Actin-related protein 2/3 complex subunit 5-like protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ARPC5L PE=1 SV=1	TMT6plex
P00533	6.54	141.39	1	1.28	0.92	0.7	7	9	9	134277	Epidermal growth factor receptor OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EGFR PE=1 SV=2	TMT6plex; CarbamidometilTodos
Q13740	7.29	156.78	1	1.28	0.96	0.91	20	14	14	65102	CD166 antigen OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ALCAM PE=1 SV=2	TMT6plex; CarbamidometilTodos
Q9NZN3	4.8	140.64	1	1.28	0.97	0.95	6	12	3	60887	EH domain-containing protein 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EHD3 PE=1 SV=2	TMT6plex
P05556	13.34	260.72	1	1.28	1.2	1.08	50	51	49	88415	Integrin beta-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ITGB1 PE=1 SV=2	TMT6plex; Oxidation (M); CarbamidometilTodos; Deamidation (NQ); Cai
R4GN18	5.59	77.72	1	1.29	0.76	1.02	27	2	2	8511	Membrane cofactor protein (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CD46 PE=1 SV=1	TMT6plex
P13611	18.5	273.73	1	1.29	0.77	0.89	9	76	39	372821	Versican core protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=VCAN PE=1 SV=3	TMT6plex; Oxidation (M); CarbamidometilTodos; Deamidation (NQ); Cai
P08473	9.41	138.64	1	1.29	0.84	0.99	13	10	10	85514	Neprilysin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MME PE=1 SV=2	TMT6plex; CarbamidometilTodos
P21589	12.13	201.27	1	1.29	0.87	0.92	48	30	30	63368	5'-nucleotidase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NTSE1 PE=1 SV=1	TMT6plex; Oxidation (M); CarbamidometilTodos
P60953	11.05	160.31	1	1.29	0.91	0.87	49	10	9	21259	Cell division control protein 42 homolog OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CDC42 PE=1 SV=2	TMT6plex; CarbamidometilTodos
O00560	10.8	250.13	1	1.29	0.99	0.79	7	40	5	32444	Syntenin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SDCBP PE=1 SV=1	TMT6plex
Q14699	7.34	137.14	1	1.29	1.05	1.09	16	10	10	63146	Raftlin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RFTN1 PE=1 SV=4	TMT6plex
Q16555	1.76	59.39	1	1.29	1.11	1.2	3	2	2	62294	Dihydropyrimidinase-related protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DPYSL2 PE=1 SV=1	TMT6plex
AOA1C7CYX9	1.76	59.39	1	1.29	1.11	1.2	2	2	2	73503	Dihydropyrimidinase-related protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DPYSL2 PE=1 SV=1	TMT6plex
Q92738	7.5	63.93	1	1.29	1.71	0.96	3	2	2	94104	USP6 N-terminal-like protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=USP6N PE=1 SV=3	TMT6plex; CarbamidometilTodos
X6RAB3	7.5	63.93	1	1.29	1.71	0.96	3	2	2	96666	USP6 N-terminal-like protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=USP6NL PE=1 SV=1	TMT6plex; CarbamidometilTodos
Q8WUM4	18.65	273.33	1	1.3	0.86	0.87	68	76	75	96023	Programmed cell death 6-interacting protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PDCD6IP PE=1 SV=1	TMT6plex; Oxidation (M); CarbamidometilTodos; Deamidation (NQ); Cai
Q9P273	9.32	141.63	1	1.3	0.9	0.85	3	12	10	300950	Teneurin-3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TENM3 PE=2 SV=3	TMT6plex
P13591	9.85	141.32	1	1.3	0.95	0.82	13	12	12	94574	Neural cell adhesion molecule 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NCAM1 PE=1 SV=3	TMT6plex
AOA087X2G1	2.26	83.04	1	1.3	0.96	1.12	3	2	2	73975	ATP-dependent RNA helicase DDX1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX1 PE=1 SV=1	TMT6plex
P54289	8.61	105.26	1	1.31	0.94	0.82	5	6	6	124568	Voltage-dependent calcium channel subunit alpha-2/delta-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CACNA2D1 PE=1 SV=3	TMT6plex; CarbamidometilTodos
P62318	5.37	61.9	1	1.31	1.05	1.35	15	2	2	13916	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SNRNP3 D3 PE=1 SV=1	TMT6plex
P56192	11.09	106.76	1	1.31	1.2	0.92	5	5	5	101116	Methionine-tRNA ligase cytoplasmic OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MARS PE=1 SV=2	TMT6plex
Q9HAU4	16.57	112.81	1	1.31	1.8	0.99	4	5	3	86196	E3 ubiquitin-protein ligase SMURF2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SMURF2 PE=1 SV=1	TMT6plex; CarbamidometilTodos
Q5VW32	11.4	120.45	1	1.32	0.8	0.83	19	9	9	46476	BROX domain-containing protein BROX OS=Homo sapiens OX=9606 GN=BROX PE=1 SV=1	TMT6plex
B1AHL2	7.75	120.53	1	1.32	0.94	0.8	2	9	3	78329	Fibulin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FBN1 PE=1 SV=1	TMT6plex
P48060	4.86	71.11	1	1.32	1.01	0.71	10	2	2	30366	Glioma pathogenesis-related protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GLIPR1 PE=1 SV=3	TMT6plex; CarbamidometilTodos
Q15404	2.15	81.32	1	1.32	1.14	1.07	8	2	2	31540	Ras suppressor protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RSU1 PE=1 SV=3	TMT6plex
P02771	6.16	76.75	1	1.32	1.31	0.96	7	4	4	68678	Alpha-fetoprotein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AFP PE=1 SV=1	TMT6plex; CarbamidometilTodos; Mutation

Q8NFJ5	37.27	133.3	1	2.14	0.91	0.88	24	11	11	40251	Retinoic acid-induced protein 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GPRC5A PE=1 SV=2	TMT6plex; CarbamidometilTodos; Deamidation (NQ)
B7Z613	8.72	57.74	1	2.15	0.94	0.91	7	2	2	33273	Neuronal membrane glycoprotein M6-b OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GPM6B PE=1 SV=1	TMT6plex
Q6AWB1	17.45	97.84	1	2.19	1	0.91	5	5	5	98518	Dynactin subunit 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DCTN1 PE=1 SV=1	TMT6plex
Q96J02	31.18	149.4	1	2.23	0.97	0.95	9	10	6	102803	E3 ubiquitin-protein ligase Itchy homolog OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ITCH PE=1 SV=2	TMT6plex
P08253	8.29	67.13	1	2.23	1.25	1.19	3	2	2	73882	72 kDa type IV collagenase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MMP2 PE=1 SV=2	TMT6plex; CarbamidometilTodos
Q7LXB6	30.14	142.56	1	2.29	0.99	0.89	9	9	9	104255	Neuropilin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NRP2 PE=1 SV=1	TMT6plex
Q9UN70	26.52	131.66	1	2.34	1.1	0.91	11	10	9	101077	Protocadherin gamma-C3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PCDHGC3 PE=1 SV=1	TMT6plex; CarbamidometilTodos
Q9NQS3	9.52	51.71	1	2.35	1	1.22	4	2	2	61003	Nectin-3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NECTIN3 PE=1 SV=1	TMT6plex
P60033	57.06	173.74	1	2.36	1.32	0.64	31	16	16	25809	CD81 antigen OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CD81 PE=1 SV=1	TMT6plex; Oxidation (M); CarbamidometilTodos; Replacement of 2 prot
O00499	9.95	48.88	1	2.37	0.87	0.84	2	2	2	64699	Myc box-dependent-interacting protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=BIN1 PE=1 SV=1	TMT6plex
Q9UNF0	45.88	148.32	1	2.41	0.84	0.92	22	13	13	55739	Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PACSIN2 PE=1 SV=2	TMT6plex; CarbamidometilTodos
Q9Y6M1	36.41	139.54	1	2.43	1.29	0.92	9	7	5	66121	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IGF2BP2 PE=1 SV=2	TMT6plex; CarbamidometilTodos
F8W930	36.41	139.54	1	2.43	1.29	0.92	9	7	5	66786	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IGF2BP2 PE=1 SV=1	TMT6plex; CarbamidometilTodos
Q9BY9	39.38	92.01	1	2.5	0.89	0.88	7	4	4	60874	YTH domain-containing family protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=YTHDF1 PE=1 SV=1	TMT6plex
Q07955	9.86	98.45	1	2.52	1.71	2.11	8	2	2	27745	Serine/arginine-rich splicing factor 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SRSF1 PE=1 SV=2	TMT6plex; CarbamidometilTodos
J3KTL2	9.86	98.45	1	2.52	1.71	2.11	8	2	2	28329	Serine/arginine-rich-splicing factor 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SRSF1 PE=1 SV=1	TMT6plex; CarbamidometilTodos
Q8WWM7	28.27	101.91	1	2.54	0.95	0.88	5	6	6	113374	Ataxin-2-like protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATXN2L PE=1 SV=2	TMT6plex; Phosphorylation (STY)
F5H2E7	8.77	64.83	1	2.58	1.29	1.21	5	2	2	30784	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LTBR PE=1 SV=1	TMT6plex; CarbamidometilTodos
P36941	8.77	64.83	1	2.58	1.29	1.21	4	2	2	46709	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LTBR PE=1 SV=1	TMT6plex; CarbamidometilTodos
Q00610	65.9	275.5	1	2.59	0.91	0.78	38	91	67	191613	Clathrin heavy chain 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CLTC PE=1 SV=5	TMT6plex; Oxidation (M); CarbamidometilTodos; Deamidation (NQ); Ca
Q15393	31.74	91.39	1	2.61	0.9	0.96	3	4	4	135577	Splicing factor 3B subunit 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SF3B3 PE=1 SV=4	TMT6plex
Q04721	20.19	122.38	1	2.63	1.07	0.96	3	9	6	265403	Neurogenic locus notch homolog protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NOTCH2 PE=1 SV=3	TMT6plex; CarbamidometilTodos
Q6UX15	25.62	55.12	1	2.71	1.2	1.14	5	3	3	43108	Layilin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LAYN PE=2 SV=1	TMT6plex; CarbamidometilTodos
O95183	12.43	50.46	1	2.79	0.92	0.87	13	2	2	12805	Vesicle-associated membrane protein 5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=VAMP5 PE=1 SV=1	TMT6plex
Q15365	43.8	158.09	1	2.81	0.98	0.81	19	12	6	37498	Poly(rC)-binding protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PCBP1 PE=1 SV=2	TMT6plex; CarbamidometilTodos
P98179	14.92	53.44	1	3.01	0.94	1.31	9	2	2	17170	RNA-binding protein 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RBM3 PE=1 SV=1	TMT6plex
Q9UHC7	13.05	39.28	1	3.02	0.83	0.96	3	2	2	53350	E3 ubiquitin-protein ligase makorin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MKRN1 PE=1 SV=3	TMT6plex; CarbamidometilTodos
H7C4T5	11.96	44.19	1	3.02	1.1	1.09	6	2	2	35829	Muscleblind-like protein 1 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MBNL1 PE=1 SV=1	TMT6plex; CarbamidometilTodos
O95197	13.02	68.03	1	3.03	0.82	0.82	2	3	2	112611	Reticulon-3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RTN3 PE=1 SV=2	TMT6plex
Q8WV41	37.22	71.43	1	3.06	1.15	0.95	5	3	3	65265	Sorting nexin-33 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SNX33 PE=1 SV=1	TMT6plex
H0Y5F5	17.32	170.1	1	3.12	1.02	1.04	3	24	2	60252	Polyadenylate-binding protein (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PABPC4 PE=1 SV=1	TMT6plex; CarbamidometilTodos
O43854	96.62	200.89	1	3.14	0.8	0.86	50	28	28	53765	EGF-like repeat and discoidin I-like domain-containing protein 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EDIL3 PE=1 SV=1	TMT6plex; Oxidation (M); CarbamidometilTodos; Deamidation (NQ)
P09497	56.95	111.49	1	3.18	0.89	0.84	21	6	6	25190	Clathrin light chain B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CLTB PE=1 SV=1	TMT6plex
P09496	71.81	102.2	1	3.23	0.78	0.8	22	7	7	27077	Clathrin light chain A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CLTA PE=1 SV=1	TMT6plex
Q15366	68.08	176.41	1	3.28	0.93	0.77	31	19	11	38580	Poly(rC)-binding protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PCBP2 PE=1 SV=1	TMT6plex; Oxidation (M); CarbamidometilTodos; Amidation
Q99961	92.89	187	1	3.3	0.97	1.2	52	21	21	41490	Endophilin-A2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SH3GL1 PE=1 SV=1	TMT6plex; CarbamidometilTodos
P37108	69	121.14	1	3.74	0.9	1.09	46	7	7	14570	Signal recognition particle 14 kDa protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SRP14 PE=1 SV=2	TMT6plex
P11940	107.16	231.02	1	3.86	0.9	0.92	43	53	35	70671	Polyadenylate-binding protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PABPC1 PE=1 SV=2	TMT6plex; Oxidation (M); Deamidation (NQ); Dimethylation(KR)
Q92616	26.34	42.64	1	4.21	0.73	0.83	1	2	2	292756	eIF-2-alpha kinase activator GCN1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GCN1 PE=1 SV=6	TMT6plex
Q16630	20.41	62.11	1	4.28	1.17	1.3	4	2	2	59210	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CPSPF6 PE=1 SV=2	TMT6plex
P49458	93.07	88.2	1	5.22	1.01	1.6	42	4	4	10112	Signal recognition particle 9 kDa protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SRP9 PE=1 SV=2	TMT6plex; CarbamidometilTodos

8.2. ANEXO 2 (publicaciones)

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

A bead-assisted flow cytometry method for the semi-quantitative analysis of Extracellular Vesicles

Henar Suárez^{1,2,5}, Ana Gámez-Valero^{3,4}, Raquel Reyes^{5,6}, Soraya López-Martín^{1,2}, María Josefa Rodríguez⁷, José L. Carrascosa⁷, Carlos Cabañas⁵, Francesc E. Borràs^{3,4,8} & María Yáñez-Mó^{1,2,5} 

Most experimental approaches commonly employed for the characterization and quantitation of EVs are time consuming, require of specialized instrumentation and often are rather inaccurate. To circumvent the caveats imposed by EV small size, we used general and specific membrane markers in bead assisted flow cytometry, to provide a semi-quantitative measure of EV content in a given sample. EVs were isolated from *in vitro* cultured cells-conditioned medium and biological fluids by size exclusion chromatography and coupled to latex beads to allow their detection by standard flow cytometers. Our analyses demonstrate a linear correlation between EV concentration and Mean Fluorescence Intensity values in samples cleared of protein contaminants. Comparison with one of the most widespread method such as NTA, suggests a similar linear range and reliable accuracy to detect saturation. However, although detection of the different biomarkers is feasible when tested on ultracentrifugation-enriched samples, protein contamination impairs quantitation of this type of samples by bead-based flow cytometry. Thus, we provide evidence that bead-assisted flow cytometry method is an accurate and reliable method for the semiquantitative bulk analysis of EVs, which could be easily implemented in most laboratories.

Extracellular vesicles (EVs) include a variety of vesicles released to the extracellular media by most cell types as intercellular communication vehicles. EVs may transfer bioactive lipids, proteins, mRNA, miRNA or non-coding RNA, between cells^{1,2}. The term EV incorporates exosomes, microvesicles and apoptotic bodies, which differ in their size and origin. Exosomes have an endocytic origin and their diameter range between 30 and 150 nm. Microvesicles, however, originate by direct budding from the plasma membrane and are between 100 nm and 1 µm in diameter, while apoptotic bodies range from 1 µm to 5 µm and are released by dying cells².

Besides their role in cell communication, EVs have recently emerged as a novel source of potential biomarkers for several diseases, since they can be easily obtained from body fluids such as urine^{3,4}, blood⁵, saliva or breast milk⁴ and their composition may be directly dependent on the physiological and/or pathological state of the patient. In addition, the number of EVs secreted can change upon the onset of different pathologies, so detecting variations in EV numbers could be of great relevance for diagnosis, especially in cancer patients⁶. Although there is a high heterogeneity in protein composition of EVs, yet, some proteins including tetraspanins, the *Tumour susceptibility gene 101* (Tsg101), Major Histocompatibility Complex molecules (MHC) or abundant GPI-linked molecules have been classically considered as common abundantly present elements on the surface of these vesicles⁷⁻⁹.

Because of their small size and heterogeneity, detection and quantitation of EVs have become difficult tasks. Some techniques have emerged, including Nanoparticle tracking analysis (NTA), that are currently the most widely employed –i.e. “the gold standard”– for their characterization. Its main restriction lies in the discrimination

¹Instituto de Investigación Sanitaria La Princesa (IIS-IP), Madrid, Spain. ²Departamento de Biología Molecular, UAM, Madrid, Spain. ³REMAR-IVECAT Group, Health Science Research Institute Germans Trias i Pujol, Can Ruti Campus, Badalona, Spain. ⁴Department of Pathology, Hospital Universitari and Health Sciences Research Institute Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain. ⁵Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Madrid, Spain. ⁶Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, UAM, Madrid, Spain. ⁷Department of Macromolecular Structures, Centro Nacional de Biotecnología-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CNB-CSIC), Madrid, Spain. ⁸Nephrology Service, Germans Trias i Pujol University Hospital, Badalona, Spain. Francesc E. Borràs and María Yáñez-Mó contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to F.E.B. (email: feborras@igtp.cat) or M.Y.-M. (email: maria.yanez@uam.es)

between vesicles and contaminating particles or protein aggregates present in the isolated sample, thus rendering inaccurate results in polydispersed samples.

To overcome some of these limitations, we propose a method allowing a semi-quantitative assessment of EVs in homogeneous and heterogeneous samples, reasonably unexpensive and easy to implement in any lab equipped with a standard flow cytometer. Our system is based on the detection of abundant EV proteins, such as tetraspanins, CD59 or MHC molecules by flow cytometry. To allow detection of EVs in conventional cytometers, vesicles are coupled to 4 µm diameter aldehyde-sulfate latex beads^{10,11}. Bead-based flow cytometry, usually coupling the EV-marker antibody to the beads, has been previously employed for EV characterization^{12,13}. Here we report a modification of that system for semi-quantitative analyses of EV samples. We directly use aldehyde-sulfate beads, not to exert any restriction in the binding process¹⁴ so that the total population of vesicles is included in the analysis. In this context, we demonstrate that linear changes in the MFI of several markers correlate with dilution of the samples thus allowing to build standard curves for the semi-quantitative evaluation of vesicles recovered from cell line cultures or biological fluids of interest. We provide evidence of the use of this method in EV isolated from tumor or primary cells as well as from human body fluids such as urine.

Material and Methods

Antibodies. Anti-HLA-A,B (clone W6/32;¹⁵), anti-CD59 (clone VJ1/12;¹⁶), anti-CD9 (clone VJ1/20) and anti-CD63 (clone TEA3/10), previously described¹⁷ and anti-CD81 (clone 5A6), kindly provided by S. Levy (Stanford University, CA), were used for the detection of EV-markers.

Cells. SK-MEL103 human melanoma cell line was cultured in DMEM (GE Healthcare) supplemented with 10% Fetal bovine serum (FBS; GE Healthcare). Conditioned medium for EV isolation was collected twice a week. Primary T-lymphoblasts were isolated from human peripheral blood using a Ficoll (Biochrom) density gradient centrifugation as described elsewhere¹⁸. After activation with phytohaemagglutinin (PHA; Sigma) (1 µg/ml) for 24 h, 3×10^6 cells/ml were cultured in RPMI (GE Healthcare) supplemented with 10% FBS and interleukin-2 (IL2) (50 U/ml). Cells were diluted every two days to 3×10^6 cells/ml in IL-2 containing media, and conditioned media was collected after one week of culture. FBS was depleted of bovine EVs by ultracentrifugation at 100,000xg for 16 h (Sorvall AH-627 rotor, L8-70M ultracentrifuge, Beckman).

EV isolation by size exclusion chromatography (SEC). Conditioned media or urine was recovered and centrifuged at 400 g for 5 minutes and at 2,000 g for 10 minutes to remove cells and cell debris. The cleared supernatant (45 mL) was concentrated by ultrafiltration at 2,000 g for 30 min using Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units (Millipore, Billerica MA). This last step was repeated until the whole supernatant was concentrated to a final volume of 1.5 ml which was loaded onto a SEC column for EVs purification as previously described¹⁹. Briefly, Sepharose CL-2B (Sigma Aldrich) was stacked in a 20 ml syringe (BD, Plastipak), reaching a final matrix length of 4.3 cm and 2 cm in diameter and equilibrated with PBS. For EVs it has been reported that this setting will collect together particles larger than 70 nm¹⁹. Elution was performed by gravity with PBS, collecting 20 sequential fractions of 500 µl. Soluble protein elution was confirmed to be in the last fractions (15–20) using BCA assay. Detection of those fractions enriched in EVs was performed by bead-based flow cytometry analysis of each individual fraction using anti-CD63 antibody (Fig. 1). Only the three fractions with highest MFI values for this EV marker (commonly 8th–10th) were pooled for further EV downstream analyses.

EV enrichment by Ultracentrifugation. Cell culture supernatants were recovered and centrifuged at 400 g for 5 minutes and at 2,000 g for 10 minutes to remove cells and cell debris. Supernatants were centrifuged again at 17,000 g for 20 minutes and then at 100,000 g for 2 h (Sorvall AH-627 rotor, L8-70M ultracentrifuge, Beckman). The 100,000 g pellet was then washed with PBS (30 ml) and centrifuged again for 2 h at 100,000 g. EVs were resuspended in 1.5 ml of PBS.

Flow cytometry assays. 50 µl of each fraction isolated by SEC (diluted or not) or by ultracentrifugation were incubated with 0.25 µl of aldehyde/sulfate-latex beads ($\phi = 4 \mu\text{m}$; 5.5×10^6 particles/ml; Invitrogen, Carlsbad, CA) for 15 min at RT. Dilutions of the EV samples were performed with the same buffer used for their elution (PBS). Bead concentration was chosen to be large enough to be easily detected by the flow cytometer having enough events for proper statistics (over 5000), and small enough to use a small volume of sample. Then 1 ml of BCB (PBS supplemented with 0.1% BSA; Roche, and 0.01% NaN_3 ; G-Biosciences) was added and the sample incubated overnight on rotation. Bead-coupled EVs were pelleted by centrifugation at 2,000 g for 10 minutes, washed with 1 ml of BCB and centrifuged again. The pellet was resuspended with 50 µl of BCB per analysis and stained using hybridoma supernatant of anti-MHC-I (W6/32), anti-CD59 (VJ1/12), anti-CD9 (VJ1/20), anti-CD63 (TEA3/10), anti-CD81(5A6) as primary antibodies and FITC-conjugated secondary antibodies (ThermoFisher Scientific) for 30 minutes at 4 °C. Negative control was obtained by incubating the beads coupled with the undiluted EV sample, with an isotype control followed by secondary antibody, or in the absence of primary mAb. Washing steps were performed once after primary and twice after secondary Ab labelling with 150 µl of BCB and centrifugation at 2,000 g for 10 minutes. Data was acquired in conventional flow cytometers (FacsVerse and FACSCanto A, BD Biosciences, San Jose, CA) and analysed with the FlowJo software (version Tree Star, Ashland, OR). Gating of EV-decorated 4 µm in diameter beads was performed based on FCS/SSC parameters, so that unbound EVs or possible antibody aggregates are excluded from the analysis.

Protein concentration measurement. Pierce BCA Protein assay kit was used following manufacturer instructions. Detection provided by manufacturer, ranges between 5–2000 µg/ml.

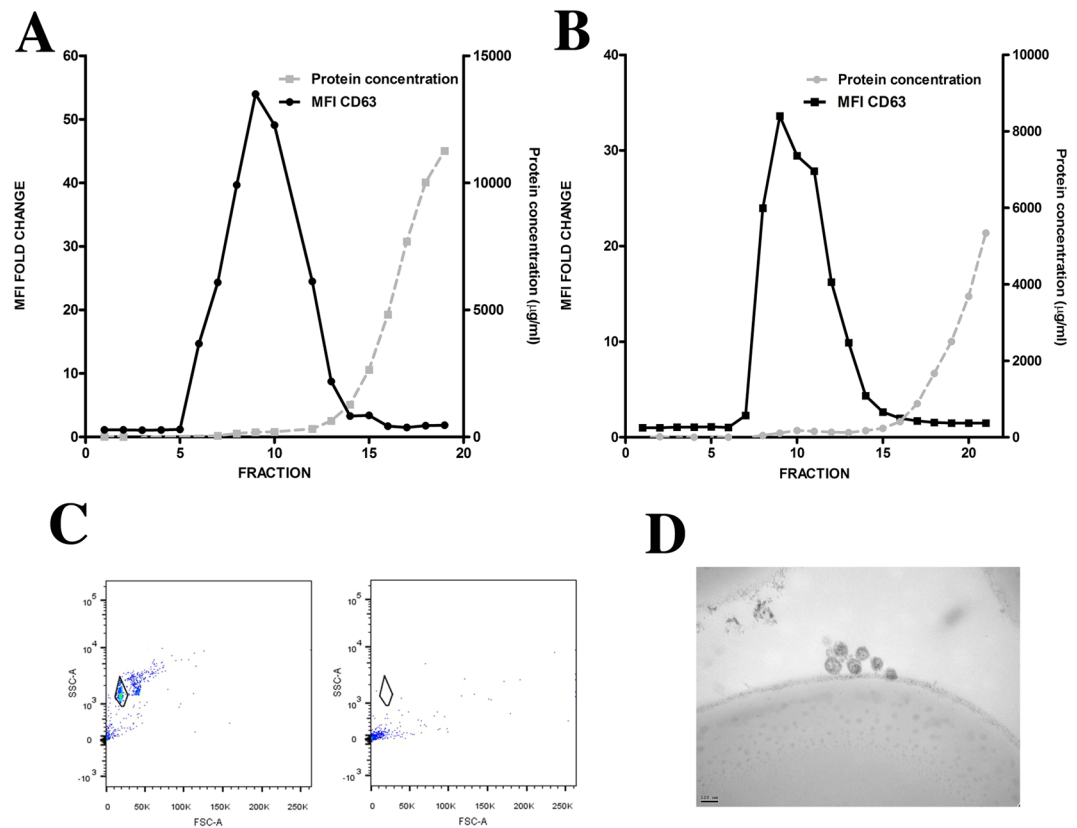


Figure 1. SEC-elution profile of EV samples. Conditioned media from melanoma cells (A) and T-lymphoblasts (B) cultures were processed using size exclusion chromatography (SEC). The obtained fractions were analysed by flow cytometry using anti-CD63 antibody after coupling EVs with aldehyde-sulfate beads. Protein concentration was also measured by BCA assay for each fraction and plotted in the right y-axis. Fold changes of mean fluorescence intensity (MFI) relative to the isotype control are plotted in the left y-axis. (C) Beads incubated with EVs (left) or EVs in solution (right) were incubated with primary and fluorochrome-labelled secondary antibodies. The flow cytometer gate used to analyse the beads is depicted in the SSC/FCS dot-plot. (D) Those beads showing CD63 positive staining were analysed by transmission electron microscopy. Bar: 100 nm.

Nanoparticle tracking analysis. Size distribution and concentration of EVs was determined using NANOSIGHT LM10 (Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK) equipped with charge-coupled device (CCD) camera (model F-033) and a 638 nm laser. Analysis was performed using the NTA 3.0 software. Detection threshold was set to 5, and blur and Max Jump Distance were set automatically. Diluted (100- to 1200-fold) fractions were loaded in the NTA device and 60 s videos were recorded in triplicate with the camera shutter at 30.02 ms and the camera gain at 650, as recommended by the manufacturer.

Sample processing for Transmission Electron Microscopy (TEM). For ultrastructural studies, a latex beads pellet was treated with a mixture of 2% formaldehyde (Ultra Pure EM Grade, Polysciences Inc., Philadelphia, USA) and 2.5% glutaraldehyde (EM Grade, TAAB Laboratories Equipment Ltd., Berks, UK) in PBS for 1 h at room temperature. The pellet was then washed with PBS and distilled water, post-fixed for 45 minutes with 1% osmium tetroxide (TAAB Laboratories Equipment Ltd.) in PBS, washed with distilled water, treated during 45 minutes with 1% aqueous uranyl acetate (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, USA), washed again and dehydrated with growing quantities (30%, 50%, 70%, 90% and 100%) of ethanol seccosolv (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) at room temperature. The sample was maintained in an eppendorf throughout the process and finally embedded in epoxy resin 812 (TAAB Laboratories Equipment Ltd.) contained in beam embedding capsule (TAAB, polythene truncated pyramid 5, 2 mm diameter). The epoxy resin was polymerized for 2 days at 60 °C after a 5 minutes-centrifugation step at 14500 rpm. Due to the properties of the latex beads, the sample remained in the opposite side of the truncated pyramid of the beam capsule. Ultrathin, 70-nm-thick sections were obtained from that side with an Ultracut UCT ultramicrotome (Leica Microsystems), transferred to buttonhole Nickel EM grids (GS2 × 1-N3, Gilder, Lincolnshire, UK) and stained with 3% aqueous uranyl acetate (10 minutes) and lead citrate (2 minutes) (Electron Microscopy Science). Sections were visualized on a JEOL JEM 1200 EXII electron microscope operating at 100 kV (JEOL Ltd., Tokyo, Japan).

Statistical analysis. Statistical analyses and linear regressions were calculated with GraphPad Prism (GraphPad Software Inc).

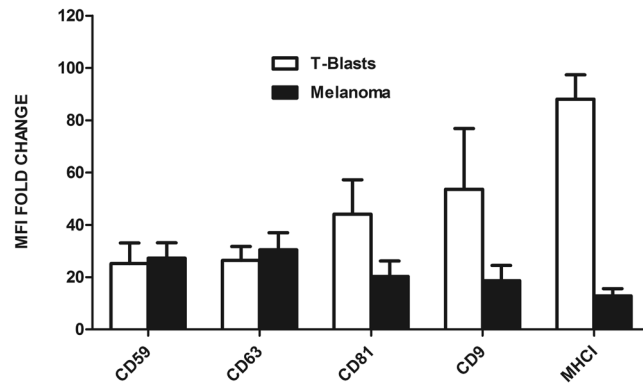


Figure 2. Characterization of EVs. T-lymphoblasts and melanoma EVs, isolated by SEC, were analysed by bead-based flow cytometry using antibodies against common EV markers. Antibodies used were anti-CD59 VJ1/12, anti-CD63 TEA3/10, anti-CD81 5A6, anti-CD9 VJ1/20, and anti-MHC-I W6/32 mAbs. Data correspond to the mean \pm SEM of the MFI fold change referred to the negative control, in 3–5 independent experiments.

Ethics statement: Experimental protocols for human samples were carried out following international regulations, including written consent by the donors, and approved by the Ethical Committee of the Hospital Universitario de la Princesa.

Results

Bead-assisted flow cytometry can be used as a highly sensitive semi-quantitative method for EV analysis.

EVs were isolated from culture supernatants of human primary T-lymphoblasts or SK-MEL103 melanoma cells, using Size Exclusion Chromatography (SEC) to remove most protein contaminants from EV samples. All 20 fractions collected were analysed for protein content by BCA assay and characterized by bead-assisted flow cytometry using antibodies against classical EV-marker CD63 (Fig. 1A,B). Bead-assisted flow cytometry was performed by incubating the samples with 4 μ m in diameter aldehyde/sulfate-latex beads. This size of the beads is such that they can be clearly detected and resolved from background signal by regular cytometers (Fig. 1C). No signal could be observed in the cytometric bead gate after incubating the EV samples with antibodies (primary and secondary), suggesting that even antibody-induced aggregates cannot be resolved from background in this kind of equipment (Fig. 1C). Electron microscopy analyses of beads incubated with the CD63 positive fractions demonstrated the presence of EV adsorbed on the surface of the beads (Fig. 1D). As previously described¹⁰, EVs detected as the CD63 positive fractions, were recovered before the elution of soluble proteins (Fig. 1A,B). Already from this initial analysis, it became apparent that the power of detection of bead-assisted flow cytometry is much higher than that of protein analyses such as the BCA assay (with detection range between 5–2000 μ g/ml), which for vesicular fractions lay close or even below its detection limit.

Given the high heterogeneity of EVs, we first assessed the most suitable markers for each EV sample, to be used in bead-assisted flow cytometry. The relative expression of EV markers in vesicles derived from two different cell cultures, SK-MEL103 melanoma cell line and primary human T-lymphoblasts, was assessed. The analysis included three different tetraspanins commonly employed as EV markers: CD9, CD81 and CD63. In addition, we assessed the expression levels of MHC-I molecules as well as the GPI-linked complement regulatory molecule CD59, which is highly expressed in most cell types²⁰ (Fig. 2). Despite being these markers conserved in samples from different origins, expression levels can differ on the plasma membrane of the producing cells as well as on EVs. In our case, these differences were remarkable for CD81, CD9 and MHC class I (Fig. 2). This preliminary profiling has to be performed in order to select the appropriate combination of markers to measure the EVs produced by a given cell line or present in a specific biological fluid.

To assess whether the output of our bead-assisted flow cytometry method is in linear relation with EV concentration, we performed a set of EVs dilutions using melanoma EVs. Each individual EV dilution was coupled to the beads, incubated with the different antibodies and finally analysed by flow cytometry (Fig. 3). In the same samples, the protein content of each dilution was determined. As shown in Fig. 3, protein measurements exhibit a linear correlation in all the samples analysed, yet at higher EV dilutions (i.e. at lower dilution factor values) the values were close to the detection limit. In contrast, the MFI values for CD63 and CD59 detection still showed a linear response with these very diluted samples, while reflected saturation in less diluted samples (Fig. 3). In these particular melanoma vesicles, the expression levels of tetraspanins CD81 and CD9 as well as of MHC-I are limited, so that their changes in MFI values are small throughout the range of sample dilutions. These data strongly suggest that a high MFI is crucial for a good dynamic range and sensitivity of the quantitation method, as is the case for anti-CD63 and anti-CD59 in melanoma-derived EVs. In the case of T-lymphoblast-derived EVs, both CD63 and MHC-I were selected among those showing higher MFI to be used in the subsequent analyses.

To estimate the range of linear detection as well as the detection limit of our measurement, we increased the range of dilutions of SEC-isolated EV samples analysed (Fig. 4). As for previous experiment, serial dilutions were coupled to beads and stained with anti-CD63 and anti-CD59 for melanoma-EVs or anti-CD63 and anti-MHC-I for T-lymphoblasts-EVs. MFI values were normalised relative to the negative control (isotype Ab-stained beads),

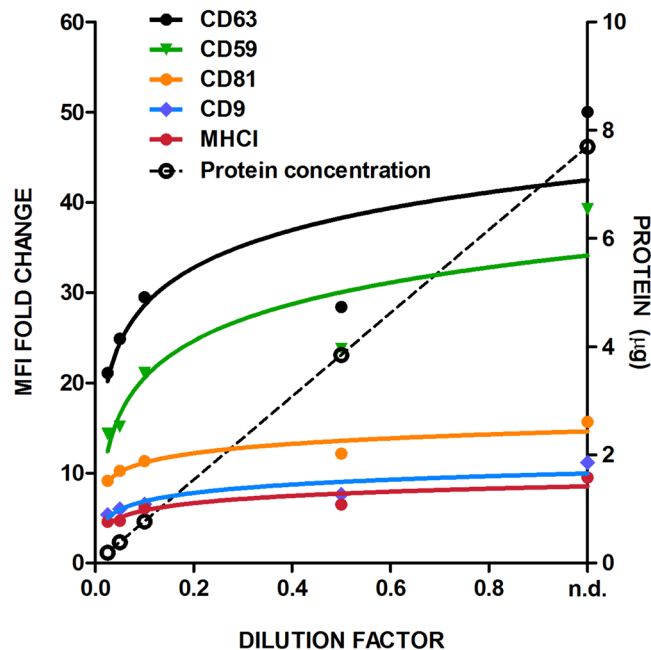


Figure 3. Analysis of antibody-staining detection of EV surface molecules in flow cytometry assays. Pooled SEC fractions containing melanoma EVs were sequentially diluted. Every dilution was analysed using a panel of antibodies: anti-CD63 (TEA3/10) in red, anti-CD59 (VJ1/12) in green, anti-CD81 (5A6) in yellow, anti-CD9 (VJ1/20) in purple and anti-MHCI (W6/32) in blue. The ratio of the MFI obtained relative to the negative control is plotted in the left y-axis. Protein content is plotted in the right y-axis and dotted line. The dilution factor of each measure is plotted on the x-axis (n.d.: non-diluted).

and plotted against the dilution factor. A typical curve showing a saturated phase was observed when plotting the MFI fold-increase against the EV sample dilution (Fig. 4A,C). The protein content of the undiluted samples was determined by BCA to be 116.85 µg/ml in the case of T-lymphoblasts-EVs and 148.16 µg/ml for melanoma-EVs. We used these values to convert the linear range of the plot to MFI versus protein content (Fig. 4B,D). These analyses revealed a good linear behaviour, with very high r^2 values and p values < 0.001 , in the range between 1 to 15 ng for melanoma-EVs using anti-CD63 and anti-CD59. In the case of T-lymphoblasts-EVs, there was a good linear response in the range between 30 and 150 ng for MHCI and CD63 labelling. The limit of detection of the measure, usually determined as the background signal + 3 times the standard deviation of the background signal, has been plotted in the figure, to determine the limit of EV detection in our assay. As shown in Fig. 4B,D, the limit of EV detection depends on the antibody used for staining, since it corresponds to the crossing point of the regression curve with the detection limit of the measure, but in all cases lay in the range of ng of vesicular proteins. The detection limit for MHCI in T-lymphoblast is really low, suggesting that we can indeed detect very few EVs with this marker. Larger dilutions should be analysed to have an accurate regression curve in this very diluted sample range, in order to obtain the exact limit of detection with this marker.

Comparison of bead-assisted flow cytometry with Nanoparticle Tracking Analysis. We next performed parallel analyses of different sample dilutions by the current “gold-standard” method in EV quantitation, NTA, and bead-assisted flow cytometry. As it can be seen in Fig. 5, the linearity of NTA measurements was clearly maintained for melanoma EV samples diluted from 10 to 200 times, that corresponded to $25\text{--}0.9 \times 10^9$ vesicles, respectively. However, at higher concentrations (0.20 dilution factor), the result provided by NTA was smaller than the 10-times dilution, with no clear indication of saturating conditions. In comparison, the linear range of bead-assisted flow cytometer was narrower (in this case ranging from 50 to 200-times dilution (0.02–0.005 dilution factor), as depicted in Fig. 5). However, saturation of the measure occurred always at the same values of MFI for each marker (~15 folds the MFI value of the negative control for anti-CD63, ~8 folds for anti-CD59). If we calculate the number of EVs detected by the flow cytometry method, based on NTA absolute numbers, our detection range corresponds to 5×10^2 to 3.5×10^3 EVs/bead, suggesting that saturation of the flow cytometry signal occurs at the point where no more vesicles can be bound to beads, so the signal is maximum. This saturation point is therefore constant for each marker and sample type since when beads are completely covered by vesicles, the signal cannot increase anymore, independently on the antibody used for staining. In addition, sensitivity of this method, taken as the change in signal with changes in concentration, is higher than for NTA, since in the detection range, the slopes of the regression curves are very pronounced, suggesting that small changes in EV content are reflected in big changes in MFI.

Thus, for an unknown sample, our method enables its semi-quantitative analysis by measuring the fluorescence signal of the sample, while the parameters of the standard curve will give the operator information on the suited range of detection, based on the maximum MFI values reached for a given marker.

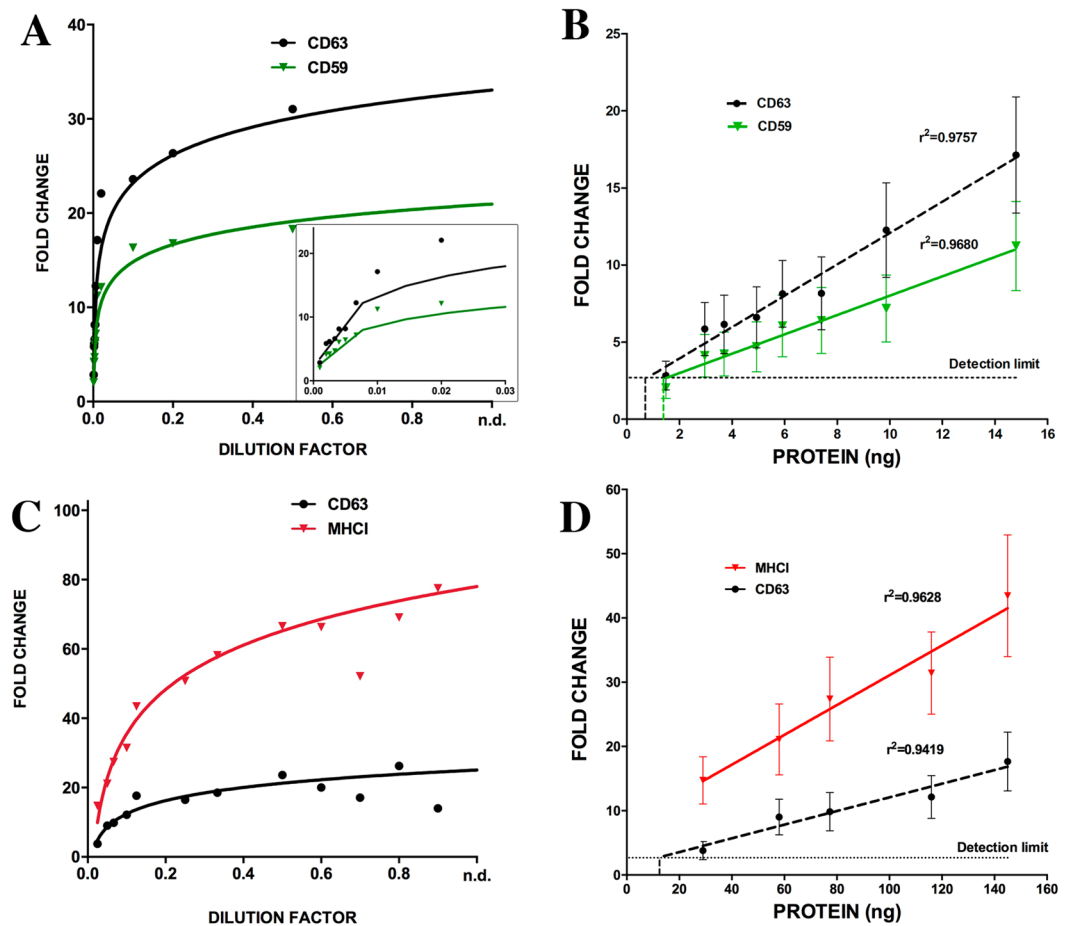


Figure 4. MFI values linearly correlate with EV content. EVs fractions were subjected to serial dilutions. Diluted EVs were coupled to beads and analysed by flow cytometry. Graphs on the top correspond to the data for melanoma-derived EVs and those on the bottom to data for T-lymphoblast-EVs. (A) and (C) EV dilution is plotted on the x-axis and fold change of MFI relative to negative control on the y-axis. Inset in A corresponds to the highest dilutions of the same graph. (B) and (D) Protein content of the undiluted fraction was measured using a BCA assay to represent MFI fold change (error bars correspond to SD values) versus protein content in the linear range (dilutions 1/100–1/1000 for melanoma-EVs and 1/8–1/40 for the T-lymphoblast-EV sample). Antibodies used were anti-CD63 TEA3/10 mAb, anti-CD59 VJ1/12 mAb and anti-MHC-I W6/32 mAb. The limit of detection of the measure, calculated as the background signal plus 3 times its SD, is shown as a horizontal dashed line. The detection limit with each marker is depicted with the corresponding colour as a vertical dashed line. The values for r^2 are depicted in the graphs. In all cases $p < 0.0001$.

Bead-assisted flow cytometry can be employed in biofluid-derived samples. Since exosomes are becoming important biomarkers for many pathologies, we were interested in testing if this relation between MFI and EVs number/concentration, could be also applied to biological fluids. EVs from human urine where isolated and purified by SEC, and thereafter submitted to sequential dilutions to be measured by flow cytometry using antibodies against tetraspanins CD63 and CD9 (Fig. 6). As shown in the plot, EVs from human fluids also maintain a strong linearity between the amount of total protein and MFI values, as reflected by the good correlation parameters for both markers.

The use of bead-assisted flow cytometry in protein-containing samples. SEC has the clear advantage of greatly reducing protein contaminants in EV samples. However, the majority of the research in the EV field is still using serial ultracentrifugation to enrich EVs from cell culture supernatant or biofluids. To assess whether the presence of protein contaminants could interfere with our bead-assisted flow cytometry assay, we coupled SEC-isolated EVs with beads in the presence of increasing amounts of “contaminant protein”. To mimic as much as possible the composition of the original fluid, this “contaminant protein” was obtained from the protein-containing fractions after SEC purification of the same samples (fractions from 18 to 20). As observed in Fig. 7A, the presence of a small amount of protein (around 1 $\mu\text{g/ml}$) during the coupling process did not impair the detection of the EV marker by flow cytometry. A good signal could still be observed with protein contamination as high as 7 $\mu\text{g/ml}$, but the MFI values decreased thereafter.

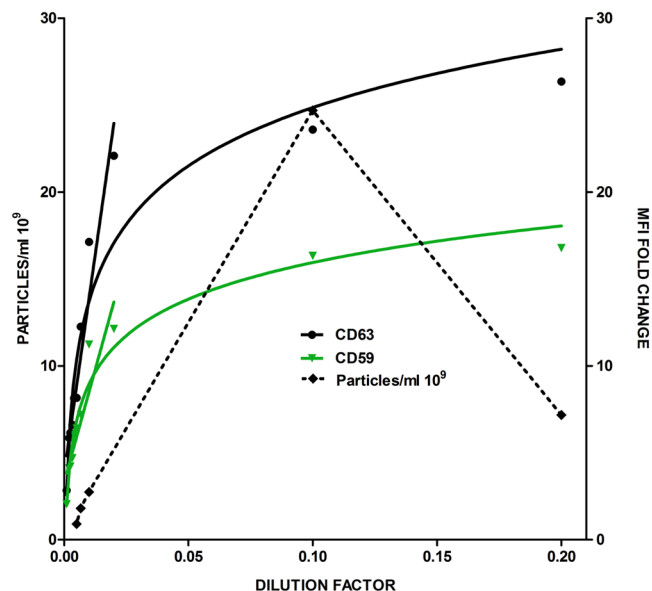


Figure 5. Comparison of flow cytometry-based and NTA quantitative analyses. A set of serial dilutions of melanoma-derived EVs were analysed NTA (particle concentration plotted on the left y-axis) and by bead-based assay (MFI folds of negative control plotted on the right y-axis as measured with anti-CD63 (TEA3/10) and anti-CD59 (VJ1/12) mAbs). The linear range of the fold change is also represented in the graph.

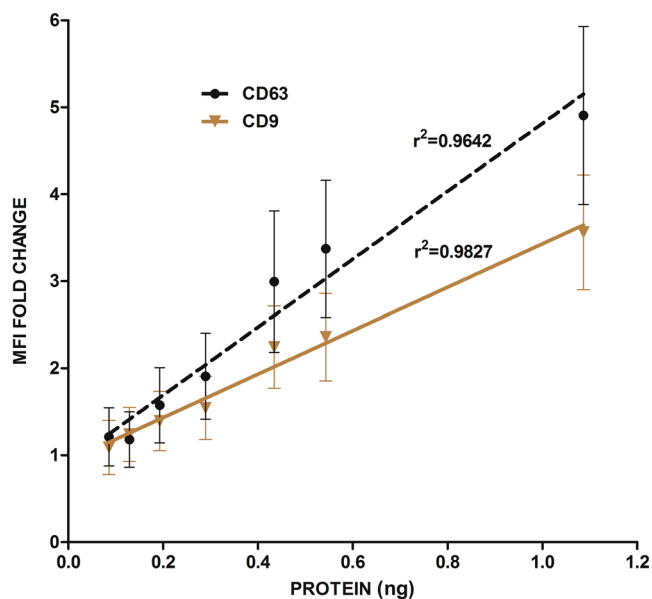


Figure 6. MFI values obtained in human urine samples also correlate with dilution factor and protein concentration. EVs isolated from urine by SEC, were submitted to sequential dilutions and analysed by flow cytometry using two antibodies: anti-CD63 (TEA3/10) in black and anti-CD9 (VJ1/20) in brown. Protein content of the undiluted SEC sample was measured by BCA assay. SD values and the values for r^2 are depicted in the graphs. In all cases $p < 0.0001$.

The presence of some protein in the coupling buffer seems to favour the coupling of EVs to the heavily charged beads or, in addition, could prevent the adherence of EVs to the plastic tube, thus we next performed the coupling either in glass or plastic tubes and in the absence of protein or in our standard conditions (0.1% BSA (BCB)). These specific experiments were performed using highly concentrated samples, in the saturation phase of the curve, in which differences in MFI should only be due to effects on the coupling efficiency. As shown in Fig. 7B, in the presence of 0.1% BSA the coupling efficiency was equal for all samples. In the absence of BSA, however, a drastic decrease in MFI could be observed in the 10-times dilution when using plastic tubes. Thus, the presence of a small amount of protein either improves or does not affect detection of EVs, being this positive effect more

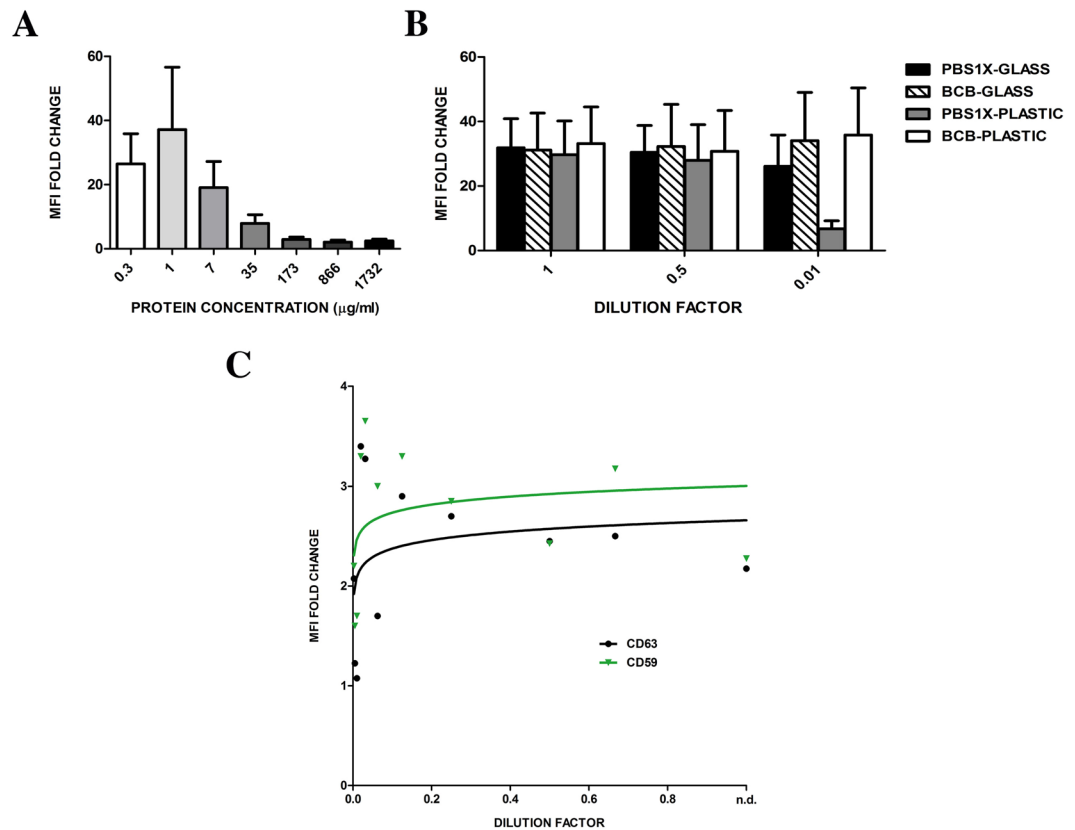


Figure 7. MFI determination is impaired by high levels of protein contamination. **(A)** EVs isolated by SEC from melanoma conditioned medium, were coupled to the beads in the presence of increasing amounts of protein from the last fractions of the SEC chromatography and analysed by flow cytometry using anti-CD63 (TEA3/10) antibody. Data correspond to the mean \pm SEM of the MFI referred to that of the negative control, in three independent experiments. **(B)** Protein contamination greatly impairs the coupling to the beads, especially when performed in plastic tubes. Data correspond to the mean \pm SEM of the MFI referred to that of the negative control, in three independent experiments. **(C)** Melanoma-EVs were concentrated by ultracentrifugation and subjected to serial dilutions before coupling to beads to be analysed by flow cytometry after staining with either anti-CD63 (TEA3/10) and anti-CD59 (VJ1/12) mAbs.

evident in samples with scarcer EVs. In addition, these results suggest that some plastic tubes may be highly adhesive for EVs avoiding their coupling to the beads.

Finally, to assess the suitability of bead-assisted flow cytometry in ultracentrifuged samples, we performed similar analyses with melanoma EV samples enriched by ultracentrifugation (UC). Serial dilutions of the UC-pellet were performed before coupling to the beads. In sharp contrast to the previous results, in this case vesicular markers could be detected at very low signal intensity in most samples, and the linearity with concentration could not be observed (Fig. 7C).

Discussion

Extracellular vesicle isolation and accurate quantification still remain as one of the main challenges in this field of research. The diverse isolation procedures described render samples with different levels of contaminants that may turn out to yield very disparate results. Lately, serial ultracentrifugation, the most commonly used EV-isolation method, is being questioned because of its lack of specificity, since it does not allow establishing a strict restriction over the presence of soluble proteins or aggregates. In this situation, SEC has emerged as an alternative advantageous method that overcomes many of the limitations of ultracentrifugation²¹, providing samples with high levels of intact vesicles and with reduced protein contamination by just appropriate selection of the pore size of the matrix.

Protein quantification has been commonly used as a fast method to determine the amount of vesicles present in a sample. However, these results have to be considered carefully; a direct correlation between the protein content and the number of vesicles in a given sample cannot be directly established, not only because of the highly heterogeneous nature of EVs, both in their size and composition, but mostly because of the high variability in the relative amount of accompanying protein contaminants co-enriched in the different isolation methods. These protein contaminants will cause an overestimation in the number of vesicles based not only on protein quantitation, but also on NTA analyses, since this latter technique cannot properly discriminate between EVs and large protein or contaminant aggregates. While SEC-based isolation may not produce completely pure EV samples²²,

it has the advantage of highly reducing protein contamination, thus permitting a more accurate and comparable quantitation of EVs.

The development of a reliable method to quantify EVs using flow cytometry requires using antibodies with a high sensitivity and a good linear response. Linearity involves a strong correlation between EV concentration and fluorescence signal. Mean Fluorescence Intensity (MFI) values depend on both the sample properties as well as on the combination of antibodies (primary/secondary) used for detection. As EVs size is under the resolution limit of any conventional cytometer, their coupling to latex beads becomes essential for their analysis using this system^{12,13}. There are now several commercially available kits of beads coupled to antibodies specific for EV markers, being CD63 the most widely used²³. However, because of the high heterogeneity of these vesicles, it is especially important to ensure that there is no preference for any subpopulation of vesicles for their quantitative assessment. In this respect, we should remark that the proposed method is based on the bulk detection of EVs. Since a given bead will accommodate several EVs potentially expressing different sets of markers, in the end, each fluorescent dot detected in the flow cytometer suppose a combination of vesicles among which there are some with the molecule recognized by the specific antibody employed for quantitation. When the sample is diluted, the number of vesicles covering each bead will be smaller and thus the signal intensity. However, in contrast with other bulk methods, flow cytometry enables the detection of small amounts of particles, because it accumulates the signal of several EVs binding to a bead, also enabling amplification by primary-secondary antibodies. It also has a very good linear response and high sensitivity so it can detect changes in concentration precisely. These advantages make the proposed flow cytometry-based method a superior alternative for the accurate EVs quantitation compared to most commonly used methods.

This quantification method depends on the specific pattern of expression of surface molecules found in the EVs of a given cell type. Therefore, a previous characterization of the EV profile of interest using the same experimental approach is needed. Here we have combined classical EV markers, such as tetraspanins, with other highly abundant membrane proteins, such as the GPI-linked regulatory protein of the complement cascade CD59, which is highly expressed in many cell types. For T-lymphoblasts, MHC-I has also proven to be a very abundant EV marker. Quantitative analysis should be rather performed using those markers with the highest expression levels, so that concentration changes are precisely reflected in changes in MFI and sensitivity of the method is increased. Dim fluorescence intensities involve small signal-to-noise ratios, which prevent the detection of relatively small variations in MFI values. In any case, because not only changes in vesicle number, but also in composition may occur, the ideal scenario will include the parallel assessment of a set of markers for each sample. If EV properties remain unaltered among different samples, quantitation of an unknown sample is very consistent even using different standard curves based on different markers. This implies that changes in EV composition will be also easily detected if within a panel of given markers there is a discrepancy in the behaviour of any of them.

It is known, that a single cell can produce vesicles with different protein content. Some emerging techniques such as immunoaffinity isolation of EVs, may be able to discriminate among different EV subpopulations, but detection limits could be poorer. Moreover, by isolating EV based on single expression marker, all the characterization of those EVs will be skewed from the beginning, being exclusively restricted to those EVs that can be bound to the antibody linked to the beads. On the contrary, aldehyde-sulfate latex beads are densely covered with high affinity binding groups. The combination of unbiased high affinity binding to the beads, with specific and bright antibody detection, rendered a capacity of detection in the range of ng of protein. Conversion of these results to vesicle numbers (based on NTA analyses) suggests that we could detect $3\text{--}12 \times 10^7$ vesicles, corresponding to a range from 5×10^2 to 3.5×10^3 EVs/bead in the experimental conditions used. These numbers suggest that the upper limit is governed by steric hindrance, so that possibly it could be overcome by using larger beads, as increasing the surface available for vesicle binding would result in higher concentration of vesicles needed to reach the saturation phase of the signal. This should be critical to expand the linear range of detection.

When compared on the same samples to the current “gold standard” in the field (NTA), the bead-based assay showed high accuracy at the lower limit range. NTA is able to give accurate results at lower concentration of vesicles (up to around 3.0×10^{10}). However, at high concentrations linearity is lost. MFI absolute numbers, in contrast, provide a clear indication of saturation of the measure. In addition, the volume of sample required is much less than for NTA, and acquisition time is shorter. Moreover, NTA cannot discriminate the nature of the particles analysed, thus being unable to distinguish EVs from protein aggregates. Since our method is based on the detection of membrane-bound markers, this drawback is also resolved.

To improve the inter-laboratory robustness of our method, we have analysed some parameters that could affect the outcome of the measurement. In this sense, we have observed that a small amount of protein (0.1% BSA was our routine incubation condition) improves detection. Importantly, performing the coupling in the presence of protein greatly reduced the adherence of EVs to some plastic tubes. Glass vials or low-protein binding plastic tubes are better suited for the coupling of EVs to beads, since they do not compete with latex beads for EV binding.

Finally, although the same methodology could also be used to characterise the composition of EV samples enriched by ultracentrifugation, our results showed that the linear response related to concentration observed with SEC samples is lost with UC samples. This effect could be probably explained by the excess of contaminant proteins in UC samples that affect coupling of EVs to the beads, thus rendering lower MFI values that ultimately hampered linearity.

In summary, here we report a simple and feasible bead-based method for the semi-quantitative characterization of EVs from homogeneous and heterogeneous samples with low protein contamination. This method could be easily adapted to most laboratories with access to basic flow cytometers, thus allowing inter-laboratory comparison and standardization of their results.

References

1. ElAndaloussi, S., Mager, I., Breakefield, X. O. & Wood, M. J. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat.Rev.Drug Discov.* **12**, 347–357 (2013).
2. Yanez-Mo, M. *et al.* Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of extracellular vesicles* **4**, 27066, doi:10.3402/jev.v4.27066 (2015).
3. Gamez-Valero, A., Lozano-Ramos, S. I., Bancu, I., Lauzurica-Valdemoros, R. & Borras, F. E. Urinary extracellular vesicles as source of biomarkers in kidney diseases. *Frontiers in immunology* **6**, doi:10.3389/fimmu.2015.00006 (2015).
4. Lasser, C. *et al.* Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: uptake by macrophages. *Journal of translational medicine* **9**, 9, doi:10.1186/1479-5876-9-9 (2011).
5. de Menezes-Neto, A. *et al.* Size-exclusion chromatography as a stand-alone methodology identifies novel markers in mass spectrometry analyses of plasma-derived vesicles from healthy individuals. *Journal of extracellular vesicles* **4**, 27378, doi:10.3402/jev.v4.27378 (2015).
6. Fais, S. *et al.* Evidence-Based Clinical Use of Nanoscale Extracellular Vesicles in Nanomedicine. *ACS Nano* **10**, 3886–3899, doi:10.1021/acsnano.5b08015 (2016).
7. Kim, D. K. *et al.* EVpedia: a community web portal for extracellular vesicles research. *Bioinformatics* **31**, 933–939, doi:10.1093/bioinformatics/btu741 (2015).
8. Kowal, J. *et al.* Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc Natl Acad Sci USA* **113**, E968–977, doi:10.1073/pnas.1521230113 (2016).
9. Mathivanan, S. & Simpson, R. J. ExoCarta: A compendium of exosomal proteins and RNA. *Proteomics* **9**, 4997–5000, doi:10.1002/pmic.200900351 (2009).
10. Lozano-Ramos, I. *et al.* Size-exclusion chromatography-based enrichment of extracellular vesicles from urine samples. *Journal of extracellular vesicles* **4**, 27369, doi:10.3402/jev.v4.27369 (2015).
11. Thery, C., Amigorena, S., Raposo, G. & Clayton, A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Current protocols in cell biology/editorial board, Juan S. Bonifacino... [et al.]* Chapter 3, Unit 3 22, doi:10.1002/0471143030.cb0322s30 (2006).
12. Cvjetkovic, A. *et al.* Detailed Analysis of Protein Topology of Extracellular Vesicles-Evidence of Unconventional Membrane Protein Orientation. *Sci Rep* **6**, 36338, doi:10.1038/srep36338 (2016).
13. Torregrosa Paredes, P. *et al.* Differences in exosome populations in human breast milk in relation to allergic sensitization and lifestyle. *Allergy* **69**, 463–471, doi:10.1111/all.12357 (2014).
14. Wahlgren, J. *et al.* Plasma exosomes can deliver exogenous short interfering RNA to monocytes and lymphocytes. *Nucleic Acids Res* **40**, e130, doi:10.1093/nar/gks463 (2012).
15. Campanero, M. R. *et al.* Down-regulation by tumor necrosis factor- α of neutrophil cell surface expression of the sialophorin CD43 and the hyaluronate receptor CD44 through a proteolytic mechanism. *European journal of immunology* **21**, 3045–3048, doi:10.1002/eji.1830211222 (1991).
16. Gomez-Gavero, M. V. *et al.* Down-regulation of L-selectin expression in neutrophils by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: role of intracellular ATP concentration. *Blood* **96**, 3592–3600 (2000).
17. Yanez-Mo, M. *et al.* Regulation of endothelial cell motility by complexes of tetraspan molecules CD81/TAPA-1 and CD151/PETA-3 with α 3 β 1 integrin localized at endothelial lateral junctions. *The Journal of cell biology* **141**, 791–804 (1998).
18. Brosseron, F., Marcus, K. & May, C. Isolating peripheral lymphocytes by density gradient centrifugation and magnetic cell sorting. *Methods Mol Biol* **1295**, 33–42, doi:10.1007/978-1-4939-2550-6_3 (2015).
19. Boing, A. N. *et al.* Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography. *Journal of extracellular vesicles* **3**, doi:10.3402/jev.v3.23430 (2014).
20. Tandon, N., Morgan, B. P. & Weetman, A. P. Expression and function of membrane attack complex inhibitory proteins on thyroid follicular cells. *Immunology* **75**, 372–377 (1992).
21. Baranyai, T. *et al.* Isolation of Exosomes from Blood Plasma: Qualitative and Quantitative Comparison of Ultracentrifugation and Size Exclusion Chromatography Methods. *PLoS One* **10**, e0145686, doi:10.1371/journal.pone.0145686 (2015).
22. Rood, I. M. *et al.* Comparison of three methods for isolation of urinary microvesicles to identify biomarkers of nephrotic syndrome. *Kidney Int* **78**, 810–816, doi:10.1038/ki.2010.262 (2010).
23. Christianson, H. C., Svensson, K. J., van Kuppevelt, T. H., Li, J. P. & Belting, M. Cancer cell exosomes depend on cell-surface heparan sulfate proteoglycans for their internalization and functional activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**, 17380–17385, doi:10.1073/pnas.1304266110 (2013).

Acknowledgements

We thank Hernando A. del Portillo (ICREA Research Professor at ISGLOBAL-IGTP) for access to NTA instrument, and Marta Monguío-Tortajada (from the IVECAT Group) for critical reading of the manuscript. This work was supported by grants BFU2014-55478-R from Ministerio de Economía y Competitividad, and from Fundación Ramón Areces to MY-M; grants PI13/00050 from the “Fondo de Investigación Sanitaria” (FIS-ISCIII), 2014SGR804 from Secretaria d’Universitats i Recerca del Departament d’Economia i Coneixement de la “Generalitat de Catalunya” and REDinREN (16/0009 Feder Funds) to FEB; BFU2014-54181-P from Ministerio de Economía y Competitividad to JLC, and by SAF2016-77096-R from Ministerio de Economía y Competitividad to CC. H.S. was supported by a FPI-UAM and GEIVEX Mobility fellowship; AGV is sponsored by a Grant (482/U/2014) from Fundació La Marató TV3; FEB is sponsored by the “Researchers Stabilization Program” from the Spanish “Sistema Nacional de Salud” (SNS-ISCIII) and “Direcció d’Estratègia i Coordinació”, Catalan Health Dept. (CES07/015) and MY-M by Ramón y Cajal contract RYC-2012-11025.

Author Contributions

H.S., A.G.-V., R.R., S.L.-M. and M.J.R. performed experiments; H.S. and M.Y.-M. wrote the main manuscript text; H.S. prepared Figures; H.S. and M.Y.-M. analysed the data, C.C., J.L.C., M.Y.-M. and F.E.B. supervised the experiments and edited the text, M.Y.-M. and F.E.B. designed the experiments.

Additional Information

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2017

CD81 association with SAMHD1 enhances HIV-1 reverse transcription by increasing dNTP levels

Vera Rocha-Perugini^{1,2}, Henar Suárez³, Susana Álvarez⁴, Soraya López-Martín³, Gina M. Lenzi⁵, Felipe Vences-Catalán⁶, Shoshana Levy⁶, Baek Kim⁵, María A. Muñoz-Fernández⁴, Francisco Sánchez-Madrid^{1,2,7} and María Yáñez-Mó^{1,3*}

In this study, we report that the tetraspanin CD81 enhances human immunodeficiency virus (HIV)-1 reverse transcription in HIV-1-infected cells. This is enabled by the direct interaction of CD81 with the deoxynucleoside triphosphate phosphohydrolase SAMHD1. This interaction prevents endosomal accumulation and favours the proteasome-dependent degradation of SAMHD1. Consequently, CD81 depletion results in SAMHD1 increased expression, decreasing the availability of deoxynucleoside triphosphates (dNTP) and thus HIV-1 reverse transcription. Conversely, CD81 overexpression, but not the expression of a CD81 carboxy (C)-terminal deletion mutant, increases cellular dNTP content and HIV-1 reverse transcription. Our results demonstrate that the interaction of CD81 with SAMHD1 controls the metabolic rate of HIV-1 replication by tuning the availability of building blocks for reverse transcription, namely dNTPs. Together with its role in HIV-1 entry and budding into host cells, the data herein indicate that HIV-1 uses CD81 as a rheostat that controls different stages of the infection.

Human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) infects mainly CD4⁺ T lymphocytes, monocytes and dendritic cells. After attachment to the CD4 receptor, viral envelope glycoproteins interact with a coreceptor protein (CXCR4 or CCR5) and trigger conformational changes that allow the fusion between the viral and cellular membranes¹. HIV-1 replication requires uncoating, reverse transcription (RT) and viral DNA insertion into the cell genome. Uncoating may occur at the plasma membrane just after fusion, triggering RT, and then the pre-integration complex (PIC) would be actively transported into the nucleus^{2,3}. Alternatively, the viral core could be transported to the perinuclear region, with gradual uncoating and RT^{2,3}. A third model proposes that, after fusion, the viral capsid would remain intact, and RT would occur during transport, being completed at the nuclear pore before PIC transfer into the nucleus^{2,3}.

Numerous cellular molecules, including tetraspanins, regulate HIV-1 infection^{4,5}. Tetraspanins interact with other tetraspanins and with transmembrane receptors, lipids and intracellular proteins, organizing tetraspanin-enriched microdomains (TEMs)⁶. By means of TEMs, tetraspanins modulate the function of their associated partners, playing important roles in physiological and pathological processes^{7–9}. In infected cells, HIV-1 assembly preferentially occurs at TEMs^{10,11}, although the role of tetraspanins as a budding co-factor is not yet well established¹². Incorporation of tetraspanins into HIV-1 particles reduces virus-to-cell and viral-induced cell–cell fusion^{13–15}. In target cells, CD63 controls CXCR4 surface expression, regulating viral entry¹⁶, and CD9 and CD81 inhibit HIV-1-induced membrane fusion¹⁷. Inhibition of membrane fusion by tetraspanins would prevent syncytia formation and support efficient viral cell–cell transfer⁴. Indeed, HIV-1 vpu protein downregulates CD81

in HIV-1 infected cells, promoting virion infectivity¹⁸. In contrast, CD63 is important for viral RT¹⁹.

SAMHD1 is a ubiquitous deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase (dNTPase) that regulates intracellular dNTP levels²⁰. SAMHD1 activity limits HIV-1 RT in resting monocytes, macrophages, dendritic cells and CD4⁺ T cells²¹. Low dNTP levels restrain viral DNA synthesis, blocking later stages of viral replication^{22,23}. In activated CD4⁺ T cells, SAMHD1 expression is reduced²⁴, and the high levels of dNTPs contribute to viral infection²². SAMHD1 knockout mice also display increased RT and higher intracellular dNTP concentrations^{25,26}. The specific mechanisms regulating SAMHD1 enzymatic function remain undefined. In cycling cells, which display no HIV-1 restriction, SAMHD1 is phosphorylated at threonine 592 (T592) by cyclin-dependent kinases^{27–29}. This phosphorylation is induced by interleukin-2 and –7 in CD4⁺ T lymphocytes³⁰. SAMHD1 also shows *in vitro* exonuclease activity against single-stranded DNAs and RNAs, displaying specificity for DNA–RNA duplexes which occur during RT³¹, and this activity is also involved in HIV-1 restriction^{32,33}. However, the control of phosphohydrolase and nuclease activities by T592 phosphorylation has been questioned^{34,35}, suggesting that additional regulatory mechanisms may be involved.

In this study, we show that SAMHD1 is a molecular partner of tetraspanin CD81, and that CD81 regulates RT by controlling SAMHD1 expression, thereby modulating the intracellular dNTP content.

Results

CD81 associates with SAMHD1. A putative interaction between CD81 and SAMHD1 was suggested by high-throughput mass

¹Servicio de Inmunología, Hospital de la Princesa, Instituto de Investigación Sanitaria La Princesa (IIS-IP), Madrid 28006, Spain. ²Vascular Pathophysiology Research Area, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III, Madrid 28029, Spain. ³Departamento de Biología Molecular, Universidad Autónoma de Madrid, Instituto de Investigación Sanitaria La Princesa (IIS-IP), Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Madrid 28049, Spain.

⁴Servicio de Inmunobiología Molecular del Hospital Universitario Gregorio Marañón, Madrid 28007, Spain. ⁵Center for Drug Discovery, Department of Pediatrics, Emory University School of Medicine, Atlanta, GA 30332, USA. ⁶Division of Oncology, Center for Clinical Sciences Research, Stanford University, Stanford, CA 94305-5151, USA. ⁷CIBER Cardiovascular, Madrid, Spain. Vera Rocha-Perugini and Henar Suárez contributed equally to this work.

*e-mail: maria.yanez@salud.madrid.org or maria.yanez@uam.es

spectrometry studies in primary human T lymphoblasts, not being validated at that time³⁶. The association between CD81 and SAMHD1 was first probed by pull-down experiments using biotinylated tetraspanin C-terminal peptides. SAMHD1 specifically bound to CD81 C-terminal peptides, whereas no association was observed with tetraspanins CD9 and CD151 (Fig. 1a). The association between endogenous molecules was then assessed by co-immunoprecipitation, and SAMHD1 was detected in CD81 immunoprecipitates and vice versa (Fig. 1b). These results indicate that SAMHD1 and CD81 directly associate through the CD81 C-terminal domain.

Since SAMHD1 is not expressed in T cell lines, like Jurkat or CEM (Supplementary Fig. 1), we have used primary T lymphoblasts and HeLa cells to investigate its cellular distribution. Different permeabilizing conditions were used to co-stain CD81, which is a transmembrane protein expressed at the plasma membrane and in intracellular vesicular compartments, and SAMHD1, which has been mainly characterized as a nuclear protein, although also

described at the cytoplasm of T lymphocytes²². Increasing concentrations of the permeabilizing agent allowed the detection of nuclear SAMHD1, but diminished the tetraspanin signal (Supplementary Fig. 2a–d). Cytoplasmic localization of the enzyme could be observed with these permeabilizing conditions, as well as in Jurkat cells transfected with SAMHD1–GFP (green fluorescent protein) (Supplementary Fig. 2a–e). Using mild permeabilizing conditions (0.5% Triton X-100 for 5 min), intracellular CD81 was co-stained with cytoplasmic and nuclear SAMHD1 in primary T lymphoblasts and HeLa–R5 cells (Fig. 1c and Supplementary Fig. 2c). However, the absence of clear co-localization in resting conditions indicates a transient interaction.

Therefore, we assessed SAMHD1 localization upon tetraspanin crosslinking in HeLa–R5 cells stably expressing CD4 and CCR5. Cells plated onto poly-L-lysine (PLL), as a control, or onto anti-CD9 antibody showed weak SAMHD1 staining (Fig. 1a). Interestingly, the hydrolase accumulated in patches at the cellular basal layer

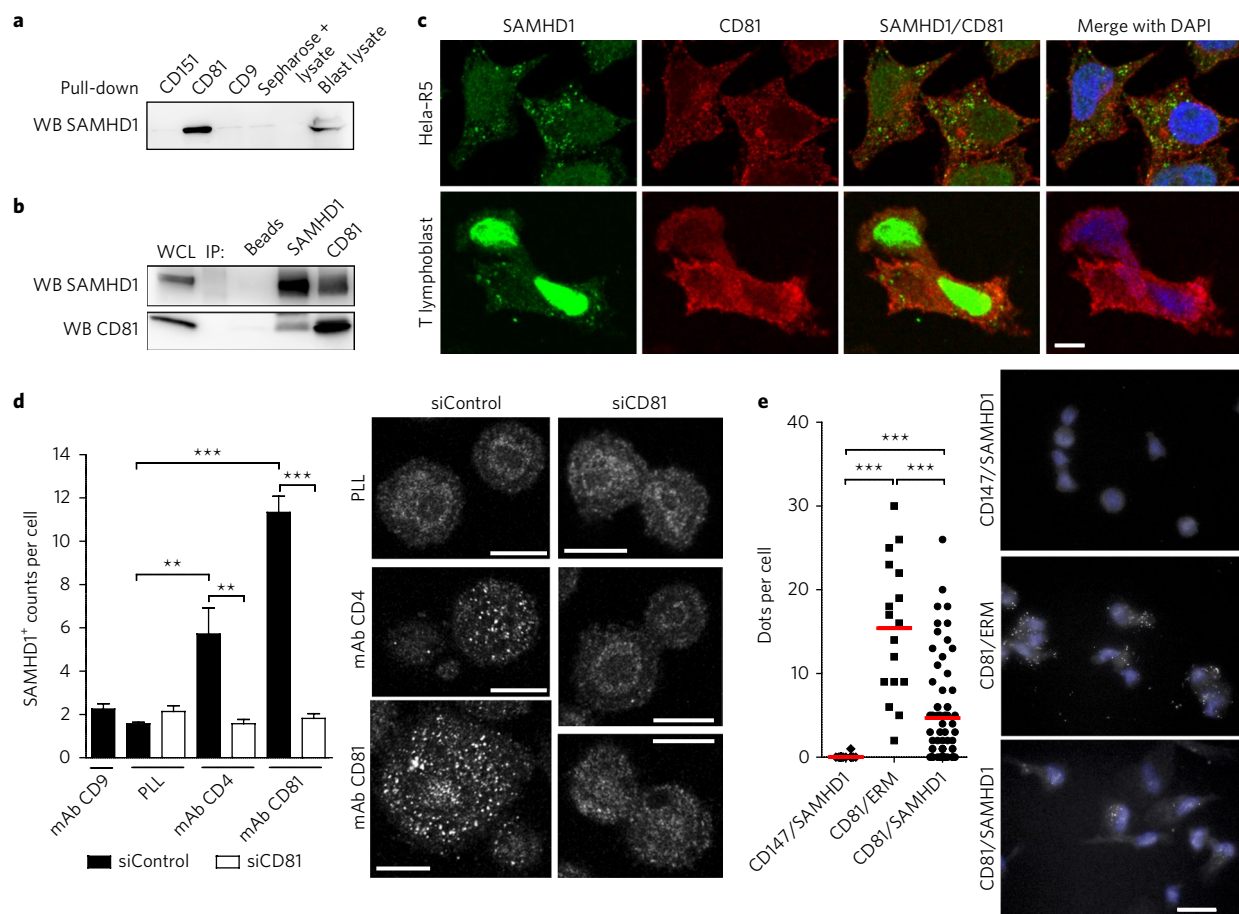


Fig. 1 | The C-terminal domain of CD81 mediates its association with SAMHD1. **a**, SAMHD1 immunoblot of primary T lymphoblast lysates pulled down with biotinylated peptides of tetraspanins CD81, CD9 and CD151 C-terminal domains. A sepharose-negative control and whole cell lysate are shown. **b**, Primary T lymphoblast lysates were immunoprecipitated and immunoblotted with SAMHD1 or CD81 antibodies. Control beads incubated with cell lysate and whole cell lysate (WCL) are shown. **c**, HeLa–R5 cells or primary T lymphoblasts were plated onto PLL, fixed, permeabilized in PBS 0.5% Triton X-100 for 5 min, stained for CD81 (red) and SAMHD1 (green) and analysed by confocal microscopy. One single confocal plane is shown; nuclei are in blue. Scale bar, 10 μ m. **d**, HeLa–R5 cells transfected with control siRNA (siControl) or CD81 siRNA (siCD81) were plated onto PLL (10 μ g ml⁻¹), anti-CD9 (VJ1/20, 10 μ g ml⁻¹), anti-CD4 (HP2/6, 10 μ g ml⁻¹) or anti-CD81 (5A6, 10 μ g ml⁻¹) monoclonal antibodies (mAbs) for 2 h, fixed, permeabilized in 0.5% Triton X-100 for 5 min and stained for SAMHD1 (polyclonal antibody). The images show a single confocal plane at a ventral position. Scale bars, 10 μ m. The graph shows the means \pm s.e.m. of the number (counts per cell) of SAMHD1⁺ clusters ($n=50$ cells, 3 independent experiments), analysed by one-way ANOVA with Tukey's post test. **e**, Duo-link immunoassay of primary T lymphoblasts plated onto PLL, permeabilized in PBS 0.5% Triton X-100 for 5 min and stained for SAMHD1 and CD81. SAMHD1/CD147 and CD81/ERM were used as negative and positive controls respectively. Scale bar, 10 μ m. The graph shows the number of dots per cell; each dot represents a single cell and the bars denote the mean of scatter plots; the data were analysed using one-way ANOVA with Dunn's post test. Statistical significance values for Figs. 1–6 are provided in the Methods (see section 'Statistical analysis').

upon CD81 or CD4 (a CD81 partner⁷) crosslinking (Fig. 1d). This clustering was abrogated by siRNA depletion of CD81 (siCD81) (Fig. 1d). Moreover, *in situ* proximity ligation assays revealed SAMHD1-CD81 interactions in a significant number of primary T lymphoblasts (Fig. 1e). We used SAMHD1/CD147 as a negative control, since CD147 is a membrane receptor with higher expression than CD81, and CD81/ERM (ezrin, radixin and moesin) as a positive control, corroborating that proximity ligation signal could be attained between a membrane-bound molecule and an intracellular connector that were previously shown to interact at the uropod of T-lymphoblasts³⁷.

CD81 positively regulates HIV-1 reverse transcription. Since SAMHD1 regulates HIV-1 RT, we assessed the role of CD81 in this step of the viral cycle. Hela-R5 cells were transfected with GFP, GFP-tagged CD81 (CD81GFP) or a CD81 mutant lacking the C-terminal cytoplasmic region (CD81 Δ cytGFP)³⁸, and infected with wild-type R5-tropic HIV-1 (BaL strain). Early and late viral RT products were measured by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) analysis. CD81GFP expression increased HIV-1 RT, and this effect was dependent on the CD81 C-terminal domain (Fig. 2a, HIV-1 BaL). CD81GFP overexpression also highly increased RT of VSV-G-pseudotyped HIV-1 (HIV-VSV-G) (Fig. 2a, HIV-VSV-G), which enters the cells via attachment of the VSV glycoprotein G, ruling out any effect of CD81 in HIV-1 entry, assembly or release^{10,17}. Moreover, CD81 positively regulated HIV-1 replication of single-cycle luciferase (Luc) reporter virus (pseudotyped with HIV-1 or VSV-G envelopes), through a process mediated by its C-terminal domain (Fig. 2b).

Conversely, CD81 knockdown using siRNA (Supplementary Fig. 3a), or full knockout using the CRISPR-Cas9 technology (CRISPR-Cas9-CD81; Fig. 2c) in Hela-R5 cells reduced RT of both HIV-1 wild type and HIV-VSV-G (Supplementary Fig. 3a-b). CD81 deficiency also diminished the luciferase activity after infection with single-cycle HIV-1-R5-Luc or HIV-VSV-G-Luc reporter viruses (Fig. 2c). The expression levels of CD4, CCR5 or tetraspanins CD82, CD9, CD151 or CD63 were not affected by CD81 knockdown or knockout (Supplementary Fig. 3c-d). In addition, pre-treatment of Hela-R5 cells with fluorescently labelled cytopermeable peptides corresponding to the sequence of the CD81 C-terminal region (CD81pept), which functionally mimics the effects of CD81 knockdown in different models^{38,39}, significantly reduced RT of wild-type HIV-1 and HIV-VSV-G (Fig. 2d), further corroborating the involvement of CD81 C-terminal domain in the regulation of viral RT.

In a more physiological setting, pre-treatment of primary T lymphoblasts with CD81pept clearly impaired RT of wild-type HIV-1 (NL4-3 strain) or HIV-VSV-G (Fig. 3a). Importantly, CD81 knockdown with siRNA in primary T lymphoblasts also specifically decreased RT (Fig. 3b). Together, our results suggest that CD81 positively regulates HIV-1 RT of both R5- and X4-tropic viruses.

CD81 regulates intracellular dNTP levels via SAMHD1. To determine whether the function of CD81 in RT relied on the regulation of SAMHD1, we analysed the effect of CD81 knockdown in Jurkat cells, which do not express SAMHD1 (Supplementary Fig. 1). In these cells, CD81 knockdown or treatment with CD81pept did not alter the levels of RT products in comparison with control cells (Fig. 4a,b), indicating that CD81 does not affect HIV-1 RT in the absence of SAMHD1.

SAMHD1 dNTPase activity was then directly analysed by quantification of the intracellular dNTP content in cell lysates after CD81 overexpression or depletion. In parallel to the effects observed on viral RT, the dNTP pool was significantly reduced in both Hela-R5 cells and primary T lymphoblasts depleted for CD81 (Fig. 4c) or treated with CD81pept (Supplementary Fig. 3e). Conversely, CD81GFP overexpression in Hela-R5 cells increased the dNTP content, which remained unaffected by CD81 Δ cytGFP expression

(Fig. 4d). These results indicate that CD81 regulates the intracellular dNTP content by associating with SAMHD1 through its C-terminal domain.

CD81 controls SAMHD1 degradation by the proteasome and its subcellular localization. We next investigated the mechanism by which CD81 could regulate SAMHD1. Interestingly, CD81 deficiency increased the expression of SAMHD1, both in primary T lymphoblasts transfected with CD81 siRNA and in Hela-R5 CRISPR-Cas9-CD81 cells (Fig. 5a,b). However, no differences were observed in the levels of SAMHD1 phosphorylation (Fig. 5a). Although SAMHD1 has a predicted molecular weight of ~70 kDa, additional bands with different molecular weights could be detected, suggesting cleavage, splicing variants⁴⁰ or post-translational modifications of the enzyme^{27,28,41}. Specificity of the antibody was confirmed using whole cell lysates from cells expressing SAMHD1-GFP or transfected with SAMHD1 siRNA (Supplementary Fig. 4). To assess whether the increase in SAMHD1 expression was related to altered protein degradation, cells were treated with MG132, which prevents proteasome function, or with ammonium chloride (NH₄Cl), which blocks the acidification of lysosomes. SAMHD1 expression was twofold higher in Hela-R5 control cells upon treatment with MG132 (Fig. 5c), but it was only slightly affected by increasing concentrations of NH₄Cl (Fig. 5d), indicating that the proteasome is the main route for SAMHD1 turnover. In CRISPR-Cas9-CD81 cells, despite the expected higher SAMHD1 basal levels in cells treated with the vehicle, the increase in the expression of the enzyme after MG132 treatment was completely abolished (Fig. 5c), suggesting that CD81 is essential for SAMHD1 degradation by the proteasome. Treatment of CRISPR-Cas9-CD81 cells with NH₄Cl slightly increased SAMHD1 expression, suggesting that lysosomal degradation was unaffected or slightly favoured on proteasomal blockade by CD81 (Fig. 5d).

Since CD81 deletion increases SAMHD1 expression by protecting the enzyme from proteasomal degradation (Fig. 5) and CD81 crosslinking triggers SAMHD1 accumulation beneath the plasma membrane (Fig. 1d), we investigated whether CD81 could regulate the subcellular distribution of SAMHD1. In the absence of CD81, SAMHD1 accumulated in cytoplasmic speckles, which displayed increased number and size with respect to control cells (Fig. 6a and Supplementary Fig. 5a,b). Similar results were obtained when cells were treated with CD81pept (Fig. 6b and Supplementary Fig. 5a,b). Accordingly, the presence and area of these SAMHD1 circular cytoplasmic structures was conversely reduced in CD81GFP-expressing cells, while no differences were observed between cells expressing CD81 Δ cytGFP or GFP (Fig. 6c and Supplementary Fig. 5c).

To characterize these intracellular structures, Hela-R5 cells were co-stained with antibodies against SAMHD1 and markers of different intracellular compartments. We could not observe any co-localization between SAMHD1 cytoplasmic speckles and markers of late endosomes (HGS-HRS), multivesicular bodies (CD63) or lysosomes (LAMP-1) (Fig. 6d and Supplementary Fig. 6). Interestingly, the circular intracellular structures that accumulated SAMHD1 partially co-localized with EEA1, a marker of early endosomes. SAMHD1-EEA1 co-localization was increased in CD81 knocked down cells, as quantified by Pearson's coefficient and the frequency of SAMHD1 co-localizing with EEA1 when compared with the total SAMHD1 signal (Fig. 6d).

Altogether, our results suggest that CD81 deletion controls SAMHD1 expression by protecting the enzyme from proteasomal degradation via its subcellular compartmentalization in early endosomes.

Discussion

In this study, we show that tetraspanin CD81 regulates HIV-1 RT through its molecular association with SAMHD1, and the control of the expression and subcellular localization of the hydrolase. We

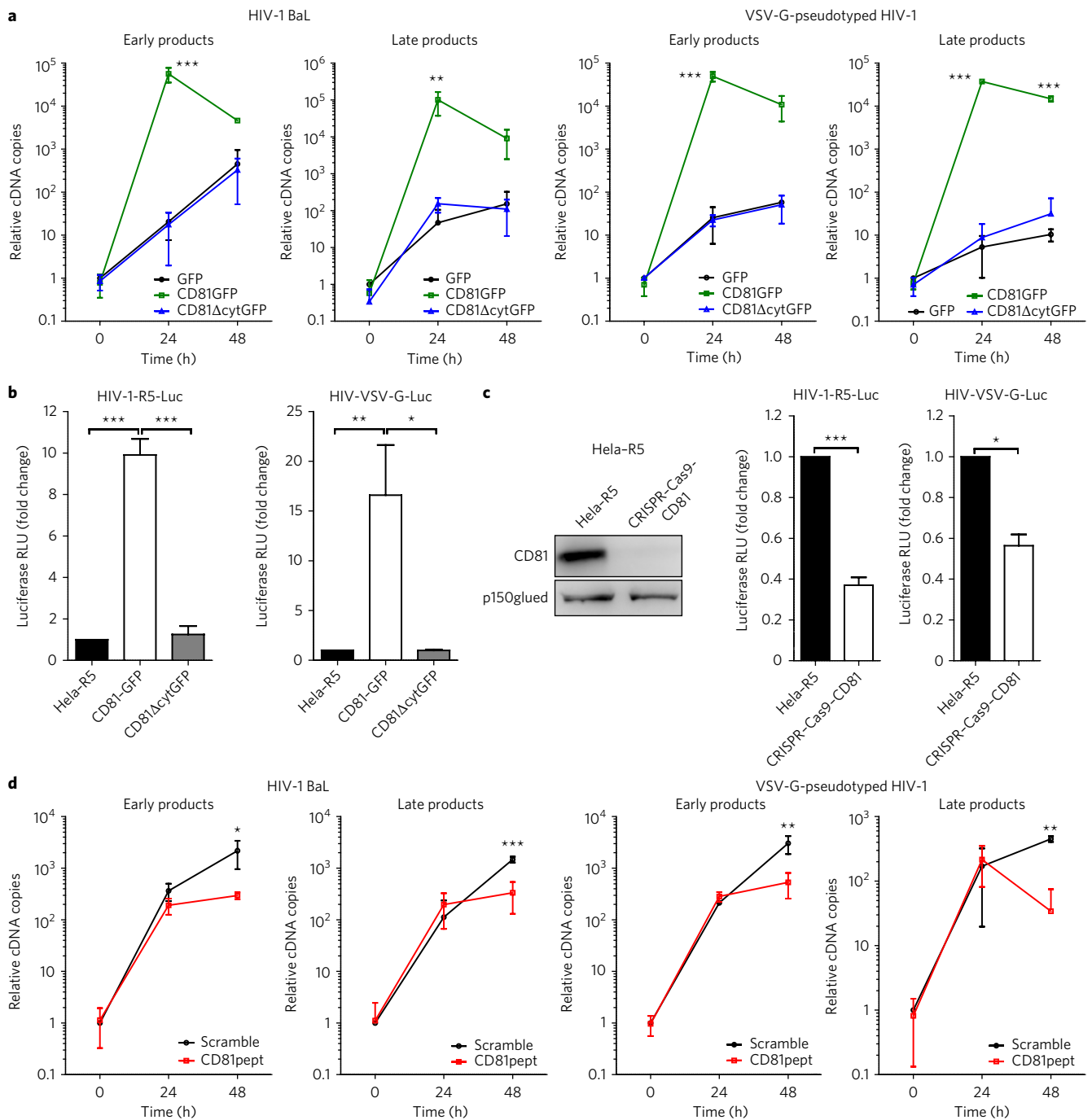


Fig. 2 | CD81 expression supports R5-tropic HIV-1 RT. **a**, Time course of HIV-1 RT measured by qPCR of early or late RT products at 24 or 48 h post infection. HeLa-R5 expressing GFP, CD81GFP or CD81ΔcytGFP were infected with HIV-1 (BaL) or HIV-VSV-G. Data are mean fold change \pm s.e.m. from four independent experiments performed in triplicate and analysed by two-way ANOVA with Bonferroni's post test. **b**, HeLa-R5 cells expressing GFP, CD81GFP or CD81ΔcytGFP were infected with single-cycle HIV-1-R5-Luc or HIV-VSV-G-Luc. Data are mean fold induction \pm s.e.m. of luciferase activity from three independent experiments performed in triplicate and analysed by one-way ANOVA with Tukey's post-test. RLU, relative light unit. **c**, HeLa-R5 cells transfected with CRISPR-Cas9-CD81 or left untreated were infected and analysed as in **b**. Data are mean fold change \pm s.e.m. from three independent experiments performed in triplicate and analysed using the paired Student's *t*-test, *** $P < 0.0001$ (left) and * $P = 0.0157$ (right). Left immunoblots show whole cell lysates probed for CD81, and p150 as loading control. **d**, HeLa-R5 cells pre-incubated for 5 days with 2 μ M cytopermeable peptides containing the CD81 C-terminal sequence (CD81pept) or a scrambled version were infected and analysed as in **a**.

provide strong evidence of CD81 association with SAMHD1 in primary T lymphoblasts by (1) pull-down with synthetic peptides containing the CD81 C-terminal sequence but not of other tetraspanins; (2) co-immunoprecipitation of endogenous CD81 and SAMHD1 using detergent lysis conditions (0.5% NP-40) that mostly disrupt TEMs,

thus impairing indirect connections; and (3) in situ proximity ligation assay, which provides strong evidence that the CD81-SAMHD1 molecular association occurs in vivo. Moreover, crosslinking with monoclonal antibodies against CD81 and CD4 triggers SAMHD1 juxta-membrane clustering in a CD81-dependent manner.

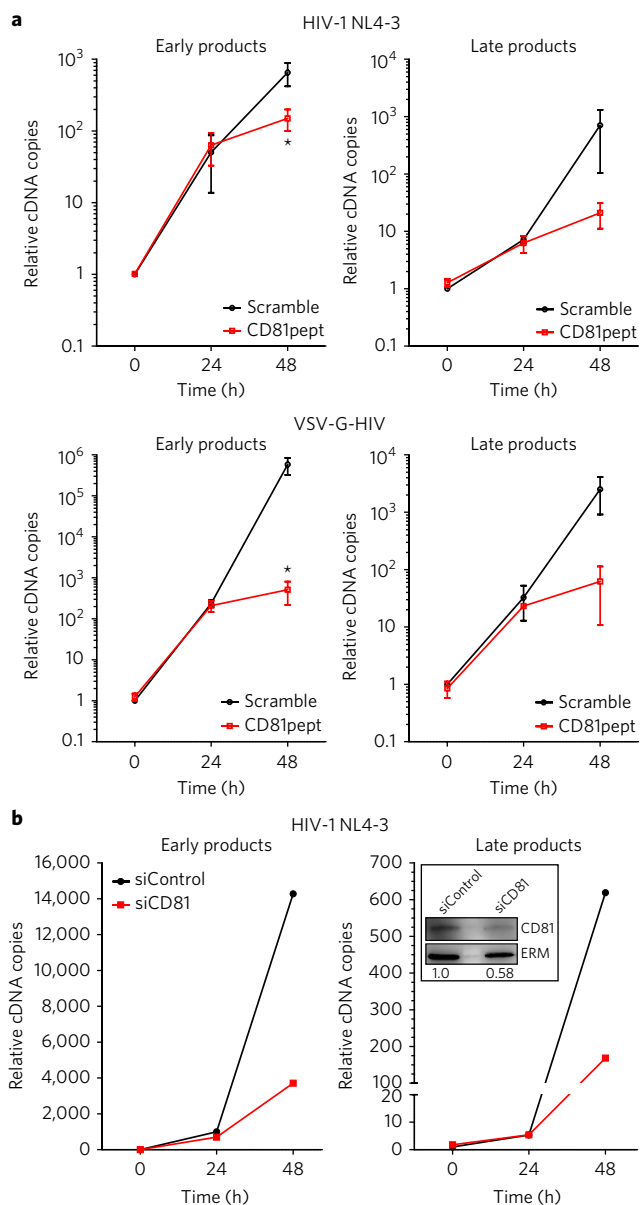


Fig. 3 | CD81 regulates X4-tropic HIV-1 RT. **a**, Primary T lymphoblasts pre-treated with 2 μ M of scramble or CD81pept for 5 days were infected with HIV-1 NL4-3 strain or HIV-VSV-G. Early or late RT products were measured as in Fig. 2a. Data are mean fold change \pm s.e.m. of two independent experiments performed in triplicate and analysed by two-way ANOVA with Bonferroni's post-test. **b**, Primary T lymphoblasts transfected with control or CD81 siRNA were infected with NL4-3 strain, and RT was measured as in Fig. 2a. Data are from a representative experiment out of two performed. The inset shows immunoblots of whole cell lysates from the represented experiment probed for CD81, and ERM as loading control. The CD81/ERM signal ratio is indicated.

SAMHD1 is a cellular inhibitor of HIV-1 RT in resting cells. Although widely studied in past years, the mechanisms that control this enzyme are not yet fully understood^{21,42}. SAMHD1 phosphorylation at T592 was shown to be important for the control of SAMHD1 RNase³³ and dNTPase^{29,43} activities. However, it was recently suggested that this phosphorylation cannot fully explain the restriction effect³⁵. The SAMHD1 exonuclease activity is also controversial, with recent studies indicating that viral restriction is not related to this enzymatic activity^{34,44}, which could even derive from

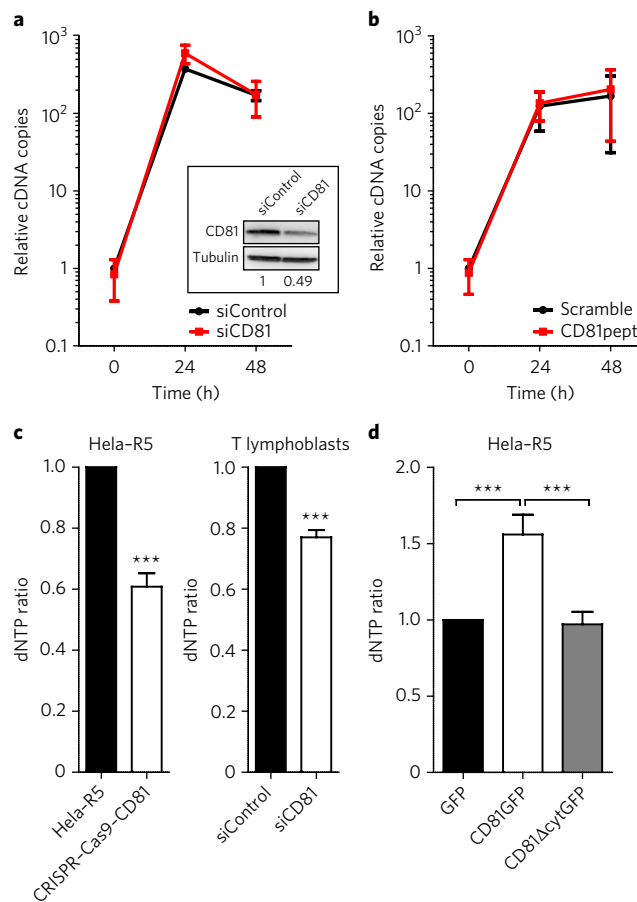


Fig. 4 | CD81 negatively regulates cellular dNTP content through SAMHD1. **a**, Jurkat T cells transfected with control or CD81 siRNA were infected with HIV-1 NL4-3 strain, and early RT products were measured by qPCR at the indicated times. Data are mean fold change \pm s.e.m. of two independent experiments performed in triplicate. The inset shows representative immunoblots of CD81 and tubulin as loading control, and the CD81/tubulin signal ratio is indicated. **b**, Jurkat T cells pre-treated with 2 μ M scramble or CD81pept for 5 days were infected with NL4-3 strain, and RT was analysed as in **a**. **c**, Mean fold change \pm s.e.m. of the dNTP content of HeLa-R5 or HeLa-R5 CRISPR-Cas9-CD81 cells (left graph, four independent experiments) and primary T lymphoblasts transfected with control or CD81 siRNA (right graph, two independent experiments) measured by a HIV RT-based dNTP assay. Analysis was performed using the paired Student *t*-test; ****P* < 0.0001 (left) and ****P* < 0.0001 (right). **d**, dNTP content of HeLa-R5 cells overexpressing GFP, CD81GFP or CD81 Δ cytGFP measured as in **c**. Data are mean fold change \pm s.e.m. from three independent experiments analysed by one-way ANOVA with Tukey's post test.

contaminants in the sample⁴⁵. In the absence of CD81, SAMHD1 expression is induced and its dNTPase activity is increased, without noticeable differences in its phosphorylation levels.

Our results clearly indicate that CD81 is an important player in the regulation of SAMHD1-dependent restriction of HIV-1 replication, through a mechanism dependent on its C-terminal domain. When CD81 is depleted, SAMHD1 expression is increased and the subsequent reduction in the intracellular pool of dNTPs impairs viral RT and replication. The effects of CD81 depletion on RT are observed only 48 h post infection, probably because during the first 24 h, despite increased SAMHD1 activity, the remaining intracellular pool of dNTPs would be sufficient to allow initial viral replication until exhaustion observed at 48 h. Accordingly, HIV-1 reverse

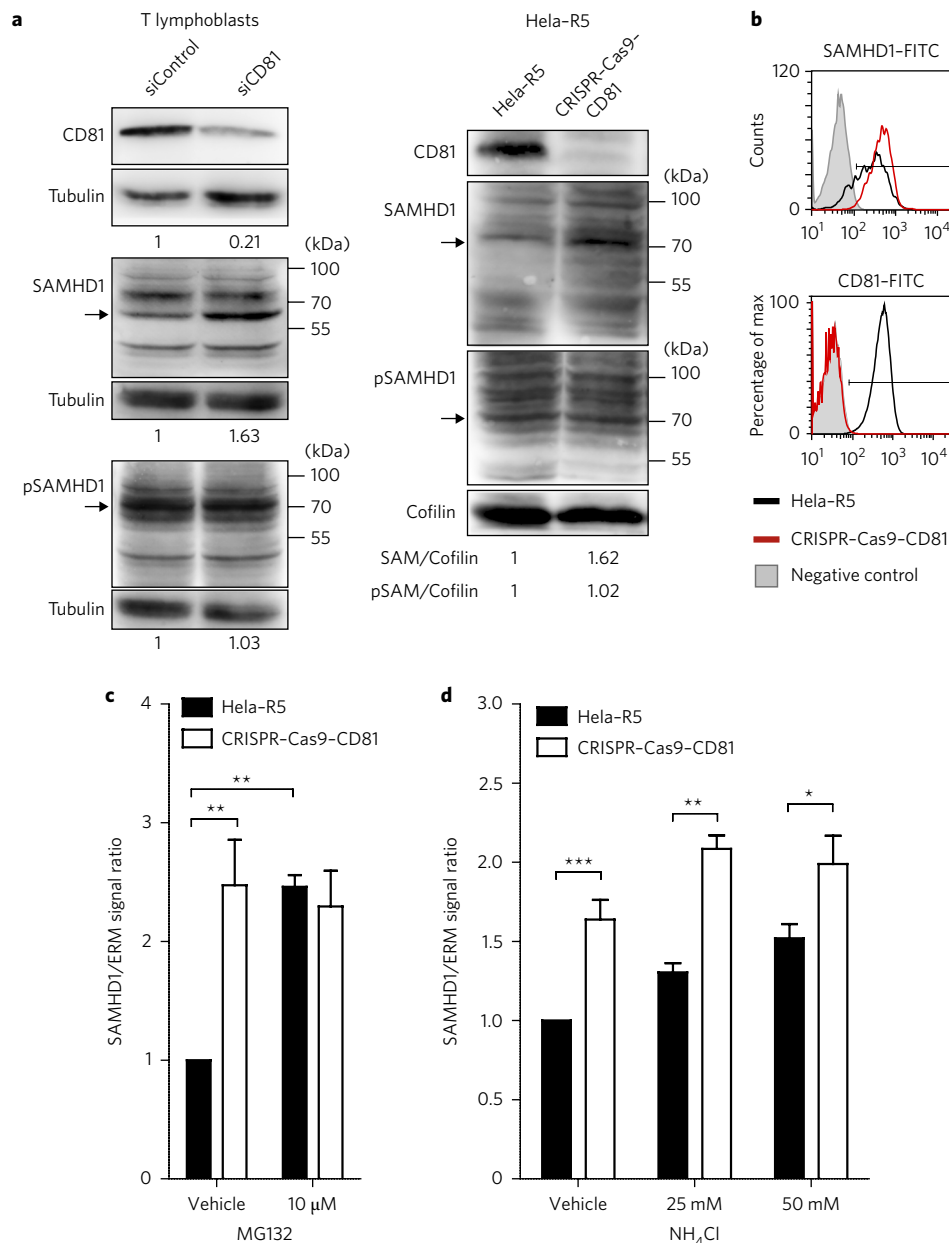


Fig. 5 | CD81 regulates SAMHD1 expression. **a**, Primary T lymphoblasts transfected with control or CD81 siRNA and HeLa-R5 cells transfected or not with CRISPR-Cas9-CD81 were lysed and immunoblotted for CD81, SAMHD1 and phosphorylated SAMHD1. Tubulin or cofilin were used as loading controls. Blots are from representative experiments out of two (lymphoblasts) and three (HeLa-R5) performed. Signal ratios in relation to the loading controls are depicted. Arrows indicate the SAMHD1 band that has the predicted molecular weight (~70 kDa). **b**, HeLa-R5 cells transfected or not with CRISPR-Cas9-CD81 were fixed, permeabilized, immunolabelled for SAMHD1 and CD81, and analysed by flow cytometry. Histograms show a representative experiment out of three performed. The negative control corresponds to cells stained only with secondary antibody. **c-d**, CRISPR-Cas9-CD81 or control HeLa-R5 cells were treated for 6 h with the vehicle or with the depicted concentrations of MG132 (**c**) or NH_4Cl (**d**). Cells were lysed and immunoblotted for SAMHD1, and ERM as loading control. The graph shows the mean fold change \pm s.e.m. of the SAMHD1/ERM signal ratio from three (**c**) or two (**d**) independent experiments analysed by one-way ANOVA with Bonferroni's post test.

transcriptase can efficiently synthesize viral DNA in the presence of low dNTP concentrations⁴⁶. On the contrary, when CD81 is over-expressed, SAMHD1 expression is reduced and the cellular dNTP content is higher, allowing a huge increase in HIV-1 RT even at 24 h. The observed increase in dNTP levels in these cells was not as impressive as the increase in RT, further indicating that the viral reverse transcriptase is very sensitive to slight changes in the intracellular availability of dNTPs. Thus, even a small increase in the levels of these nucleotides is sufficient for the huge increase in viral genome replication.

The precise subcellular site where viral RT takes place remains to be determined^{2,3}. Although SAMHD1 has been mainly described as a nuclear protein, we and others²² could detect this enzyme in the cytoplasm. In this regard, it has been recently shown that oxidized SAMHD1 is specifically located at the cytoplasm⁴¹. Tetraspanins, which are transmembrane proteins present in both the plasma membrane and intracellular compartments, can either promote or inhibit HIV-1 transmission, playing negative or positive roles in different steps of the viral cycle⁴. The involvement of tetraspanins in RT would imply that the virus hijacks intracellular membranes

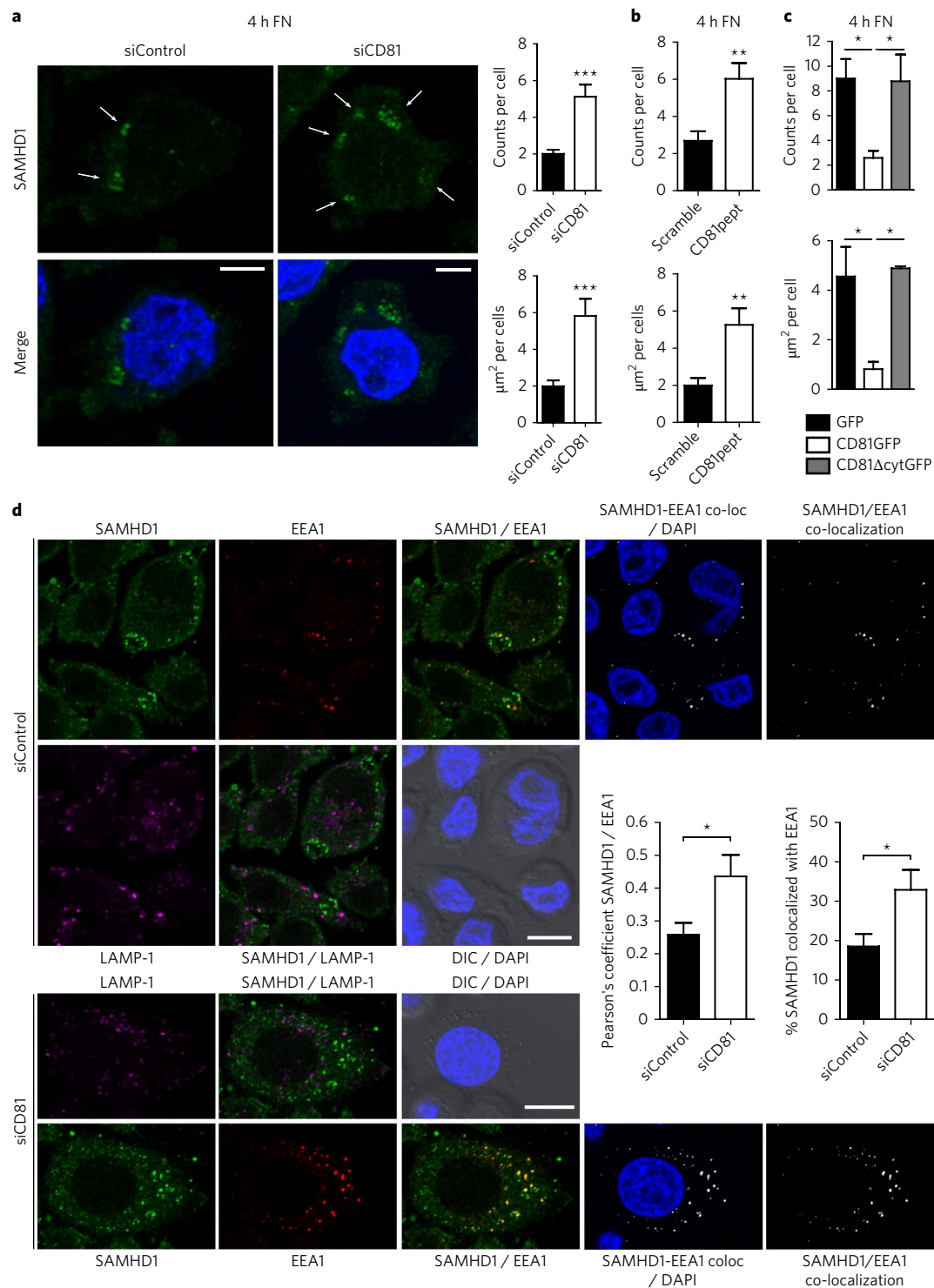


Fig. 6 | SAMHD1 is partially enriched at early endosomes. **a**, HeLa-R5 cells were transfected with control or CD81 siRNA, adhered for 4 h onto fibronectin (FN), fixed, permeabilized in PBS 0.1% Triton X-100 for 5 min and immunolabelled for SAMHD1. The images show one single confocal plane; the nuclei are blue. The arrows indicate SAMHD1 accumulation in circular intracellular structures. Scale bars, 10 μm . The graphs show the means \pm s.e.m. of the number (counts per cell) and area (μm^2 per cell) of the cytoplasmic structures observed ($n=230$ cells, 4 independent experiments analysed by Student's *t*-test, $***P=0.0005$ (upper) and $***P=0.0006$ (bottom)). **b**, HeLa-R5 cells treated with 2 μM scramble or CD81pept were analysed as in **a** ($n=400$ cells, 4 independent experiments analysed by Student's *t*-test; $**P=0.0063$ (upper) and $**P=0.0054$ (bottom)). **c**, HeLa-R5 cells transfected with GFP, CD81GFP or CD81 Δ cytGFP were analysed as in **a** ($n=20$ cells, 2 independent experiments analysed by one-way ANOVA with Tukey's post-test). **d**, HeLa-R5 transfected with control or CD81 siRNA were treated as in **a**. The images show SAMHD1 (green), EEA1 (red), LAMP-1 (magenta), nuclei (blue), DIC, SAMHD1-EEA1 co-localization channel (white) and merged images. One single confocal plane is shown. Scale bars, 10 μm . Graphs represent the quantification of SAMHD1-EEA1 co-localization performed in 3D stack confocal microscopy images, showing means \pm s.e.m. of the Pearson coefficient and of the percentage of SAMHD1 signal co-localized with EEA1 signal with respect to the total SAMHD1 signal in the cell ($n=200$ cells, 3 independent experiments analysed by Student's *t*-test, $*P=0.0262$ (left) and $*P=0.0479$ (right)).

to support its early replication. Interestingly, CD81 crosslinking triggers SAMHD1 enrichment beneath the plasma membrane, and CD81 knockdown increases SAMHD1 permanence in an early endosomal compartment, with partial SAMHD1 and EEA1 colocalization. Our results indicate that degradation of the hydrolase can partially occur through lysosomes but it is mostly dependent on the proteasome. CD81 does not affect SAMHD1 degradation by acidic compartments, but it clearly controls the degradation of the hydrolase by the proteasome. Therefore, CD81 regulation of SAMHD1 subcellular localization seems to be important for the turnover of the enzyme. Other cellular proteins have been described to regulate SAMHD1 degradation by the proteasome. Cyclin L2 interacts with SAMHD1 at the nucleus, driving its proteasomal degradation through a mechanism dependent on the ubiquitin ligase adaptor DCAF1⁴⁷. Interaction with the eukaryotic elongation factor 1A1 (eEF1A1) at the cytoplasm also targets SAMHD1 for proteasomal turnover, through the association with Cullin4A and Rbx1⁴⁸. Interestingly, we also detected eEF1A1 as a putative molecular partner of CD81 in our previous proteomic study³⁶.

In summary, CD81 regulates HIV-1 early replication via direct association with SAMHD1, modulating the intracellular dNTP content through the control of SAMHD1 expression and subcellular localization. The evidence that SAMHD1 is included in TEMs highlights the importance of these membrane microdomains during HIV-1 replication, not only in the entry and assembly phases of the viral cycle, but also in RT. More detailed knowledge on how SAMHD1 blocks HIV-1 infection will provide insights to reinforce its restriction activity and prevent HIV-1 progression and AIDS. Moreover, the regulation of cellular dNTP levels by CD81 might be important in other physiological and pathological processes, like the autoimmune disorder Aicardi–Goutières syndrome or even in tumour progression.

Methods

Cells. The HeLa P4 MAGI CCR5⁺ cells (Hela–R5)³⁷ were obtained through the NIH AIDS Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH: P4R5 MAGI from N. Landau, and were cultured in DMEM (Sigma) supplemented with 10% FCS (Invitrogen) and 1 µg ml⁻¹ puromycin (Sigma). Vβ8 Jurkat T cell (J77 c20), human T cell line CEM 1.3, and human kidney cell line HEK293T (ATCC) were cultured in RPMI 1640 or DMEM (Sigma) supplemented with 10% FCS. Cell lines from ATCC were authenticated by ATCC and were not further validated in our laboratory. Cells from the NIH were not validated further in our laboratory. Cell lines were routinely tested for mycoplasma contamination and were mycoplasma free. Peripheral blood lymphocytes were isolated from Buffy coats of healthy donors, and maintained as described³⁹. Buffy coats were received from the Blood Transfusion Center of Comunidad de Madrid, and all donors signed their consent for the use of samples for research purposes. All the procedures using primary human cells were approved by the Ethics Committee of the Hospital Universitario de la Princesa.

Hela–R5 cells (8 × 10⁶), human T lymphoblasts (2 × 10⁷) or Jurkat cells (2 × 10⁷) were washed twice with HBSS (Lonza), and transiently transfected by electroporation with siRNA (1 µM) or plasmids (20 µg) in OPTIMEM (Gibco, Invitrogen) at 240 V and 34 ms (Gene Pulser II, Bio-Rad). Overexpression, knockdown or gene deletion were confirmed by flow cytometry or western blotting.

Reagents and constructs. Tetramethylrhodamine (TAMRA) N-terminal-labelled peptides with the sequences RRRRRRCCGIRNSSVY (CD81) or RRRRRRRYSVNICRGCS (Scrambled) were purchased from LifeTein. N-terminally biotinylated peptides containing a SGSG linker sequence connected to the cytoplasmic C-terminal domains of the proteins of interest were purchased from Ray Biotech, and have been previously described^{36,38}. The constructs CD81GFP and CD81CytGFP were previously described³⁸; and SAMHD1–GFP was kindly provided by N. Landau (New York). Control siRNA and siRNA for CD81 CAATTGTGTCCCTCGGGC (siCD81) were purchased from Eurogentec. We have validated three different sequences to knockdown CD81 obtaining similar phenotypes in other systems^{38,39}. siRNA for SAMHD1 was purchased from Dharmacon (SMARTpool ON-TARGETplus containing four different siRNA sequences).

Pull-down, immunoprecipitation and immunoblot assays. For immunoprecipitation, primary T lymphoblasts (2 × 10⁷) were lysed in PBS 0.5% NP-40

containing protease and phosphatase inhibitors. Lysates were precleared for 2 h at 4 °C with protein G-Sepharose (Amersham Biosciences), and incubated for 2 h at 4 °C with anti-CD81 5A6 monoclonal (S. Levy, Stanford) or mouse polyclonal anti-SAMHD1 (Sigma) antibodies immobilized on protein G-Sepharose beads. After rinsing with lysis buffer, complexes were eluted in Laemmli buffer, and resolved by SDS–PAGE.

N-terminally biotinylated peptides (30 nmol) were conjugated to 40 µl of streptavidin sepharose (GE Healthcare). Pull-down assays were carried out as previously described³⁸. Briefly, cells were washed once with ice-cold PBS and lysed in PBS 1% NP-40 containing protease and phosphatase inhibitors (Complete, PhosSTOP; Roche). Lysates were precleared for 2 h at 4 °C with streptavidin sepharose (GE Healthcare) and incubated for 2 h at 4 °C with biotinylated peptides immobilized on streptavidin sepharose beads.

For immunoblotting, untreated cells or cells incubated with different concentrations of ammonium chloride (NH₄Cl, Sigma) or MG132 (Sigma) for 6 h at 37 °C were lysed in PBS 1% Triton X-100 containing protease and phosphatase inhibitors. All blots were revealed with FUJIFILM LAS-4000 after membrane incubation with specific antibodies and peroxidase-conjugated secondary antibodies (Pierce). Primary antibodies were against: SAMHD1 (polyclonal antibody; Sigma), CD81 (5A6), α-tubulin (clone DM1A, Sigma), p150glued (BD Biosciences), cofilin (Abcam), and ERM (90.3; kindly provided by H. Furthmayr, Stanford). Band intensities were quantified using ImageGauge (FUJIFILM) and results normalized with respect to the intensity signal of the loading controls.

Flow cytometry. Cells were fixed in 2% paraformaldehyde (PFA; Electron Microscopy Sciences), permeabilized using the BD Cytofix/Cytoperm kit when observing intracellular proteins, and stained with primary antibodies followed by species-matching secondary antibodies (Invitrogen). Primary antibodies were anti-CCR5 (Santa Cruz), anti-SAMHD1 (polyclonal antibody; Sigma), anti-CD82 (TS82b, kindly provided by E. Rubinstein, Villejuif), and antibodies produced in our laboratory (anti-CD9 (VJ1/20), anti-CD151 (LJA1/1), anti-CD63 (Tea3/18) and anti-CD4 (HP2/6))^{49,50}. Data were acquired with a FACSCantoII flow cytometer (BD) and analysed with BD FACSDIVA (BD) or FlowJo (FlowJo LLC) software.

Fluorescence confocal microscopy. Cells were adhered onto PLL (Sigma), CD4, CD81 or CD9 monoclonal antibodies (10 µg ml⁻¹) for 2 h, or onto fibronectin (FN)-coated coverslips (20 µg ml⁻¹, Sigma) for 2, 4 or 18 h at 37 °C, fixed in 4% PFA, permeabilized with PBS 0.1%, 0.5% or 1% Triton X-100 for 5 min or 30 min, stained with primary antibodies followed by species-matching secondary antibodies coupled to Alexa Fluor fluorochromes (Invitrogen) and mounted in Prolong antifading medium (Invitrogen). Primary antibodies were anti-CD81 (5A6), anti-SAMHD1 (monoclonal or polyclonal antibodies; Sigma), anti-EEA1, CD63 and LaminA (Santa Cruz), anti-HGS/HRS (Abcam) and Alexa-647-labelled anti-LAMP-1 (BioLegend). Duolink in situ proximity ligation assay (Sigma) was performed following the instructions provided with the kit. Primary antibodies were SAMHD1 (polyclonal antibody), CD81 (5A6), ERM (90.3) or CD147 (VJ1/9)¹⁷; produced in our laboratory).

Confocal images were obtained with a Zeiss LSM700 confocal scanning laser unit attached to an inverted epifluorescence microscope (Observer.Z1) fitted with a Pan APO Chromat 63×/1.4 oil immersion objective, using ZEN 2009 acquisition software (Carl Zeiss Microscopy GmbH). Images were analysed with ImageJ (NIH) software, using the Particle Analysis plugin. Measurement of Pearson's coefficient and the percentage of co-localized SAMHD1 and EEA1 was performed using Imaris (Bitplane), analysing three-dimensional stack confocal microscopy images. The SAMHD1 nuclear signal was excluded from the analysis.

HIV-1 viral preparation and infection. Preparation of wild-type HIV-1 NL4-3 (X4-tropic) or BaL (R5-tropic), and VSV-G-pseudotyped HIV recombinant virus (HIV-VSV-G), which allows the analysis of replication independently of HIV entry, was performed as described⁵⁰. Pseudotyped viruses with a luciferase reporter gene were produced by co-transfection of HEK293T cells with an equal mixture of the pNL4-3.LucR^{-E-} reporter plasmid (N. Landau, NIH AIDS Reagent Program), and HIV-1 envelope expression plasmid (NIH AIDS Reagent Program) or pcDNA3-VSV plasmid (encoding the vesicular stomatitis virus G-protein) using calcium phosphate (Sigma). The pNL4-3.LucR^{-E-} has frameshift mutations in *Env* (E⁻) and *Vpr* (R⁻), and a luciferase reporter gene inserted into the *Nef* gene. After 24 h of transfection, the medium was replaced, and 2 h later pseudotyped viruses were harvested, filtered (0.45 µm), aliquoted and frozen at –80 °C until further use. The viral titre was quantified using a Gag p24 ELISA kit (INNOTEST HIV-1 Antigen mAb; Innogenetic).

For analysis of HIV-1 RT, HeLa–R5 cells were infected with 100 ng per 24 well of HIV-1 BaL or with 50 ng per 24 well of HIV-VSV-G, and primary T lymphoblasts or Jurkat cells were infected with 100 ng per 10⁶ cells with HIV-1 NL4-3 or 200 ng per 10⁶ cells with HIV-VSV-G. After 2 h of infection, cells were extensively washed and incubated at 37 °C for 24 or 48 h and lysed in 0.2% NP-40; total genomic DNA was extracted using a QiAmp DNA mini kit (Qiagen). qPCR analysis for the measurement of HIV reverse transcription was performed by amplifying genomic DNA using a Power SYBR Green PCR master mixture (Applied Biosystems):

forward primer 5'-CAGGATTCTGCGCTGGAGCTG-3' and reverse primer 5'-GGAGCAGCAGGAAGCACTATG-3' for early reverse transcription products, and forward primer 5'-TGTTGCCCGTCTGTTGTGT-3' and reverse primer 5'-CGAGTCCTGCGTTCGAGAGAT-3' for late reverse transcription products. The β -actin gene was amplified to measure DNA concentration and used for normalization. Each reaction was performed in triplicates.

For single-cycle infection assay, HeLa-R5 cells were plated on a 24 well plate and infected with 50 ng HIV-1 p24Gag/10⁶ cells. After 2 h of infection, cells were extensively washed and incubated at 37°C for 48 h. Then cells were washed with PBS, and lysed with a Steady Glo luciferase assay buffer (Promega Corporation, WI, USA). The light intensity of each sample was measured on a luminometer 1450 Microbeta Luminescence Counter.

Intracellular dNTP measurement. For dNTP analysis and quantification, cells were harvested, lysed in ice cold 65% methanol and vigorously vortexed for 2 min. Extracts were incubated at 95°C for 3 min, then supernatants were collected and dried in a speed vacuum. Samples were processed in a blinded manner for the single nucleotide incorporation assay as described⁴⁶. Each dNTP (dATP, dCTP, dGTP and dTTP) was detected separately, and for the analysis their levels in cells overexpressing or depleted for CD81 were normalized to the levels in control cells.

Statistical analysis. All statistical analyses were performed with GraphPad Prism (GraphPad Software Inc.). *P* values were calculated using two-tailed Student's *t*-test, one-way ANOVA with Tukey's or two-way ANOVA with Bonferroni's post hoc multiple comparison tests. When indicated, one-way ANOVA with Dunn's post-test was used. Statistical significance was assigned at **P* < 0.05, ***P* < 0.01 and ****P* < 0.001.

Data availability. The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon request. Complete blots for all the figures and supplementary figures are shown in Supplementary Figs. 7 and 8.

Received: 25 October 2016; Accepted: 1 August 2017;

Published online: 04 September 2017

References

- Blumenthal, R., Durell, S. & Viard, M. HIV entry and envelope glycoprotein-mediated fusion. *J. Biol. Chem.* **287**, 40841–40849 (2012).
- Arhel, N. Revisiting HIV-1 uncoating. *Retrovirology* **7**, 96 (2010).
- Ambrose, Z. & Aiken, C. HIV-1 uncoating: connection to nuclear entry and regulation by host proteins. *Virology* **454–455**, 371–379 (2014).
- Thali, M. The roles of tetraspanins in HIV-1 replication. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **339**, 85–102 (2009).
- Rocha-Perugini, V., Gordon-Alonso, M. & Sanchez-Madrid, F. FIP: choreographer of actin-adapter proteins in the HIV-1 dance. *Trends Microbiol.* **22**, 379–388 (2014).
- Yanez-Mo, M. et al. Tetraspanin-enriched microdomains: a functional unit in cell plasma membranes. *Trends Cell Biol.* **19**, 434–446 (2009).
- Levy, S. & Shoham, T. The tetraspanin web modulates immune-signalling complexes. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 136–148 (2005).
- van Spruiel, A. B. & Figdor, C. G. The role of tetraspanins in the pathogenesis of infectious diseases. *Microbes Infect.* **12**, 106–112 (2010).
- Rocha-Perugini, V., Sanchez-Madrid, F. & Martinez Del Hoyo, G. Function and dynamics of tetraspanins during antigen recognition and immunological synapse formation. *Front. Immunol.* **6**, 653 (2015).
- Grigorov, B. et al. A role for CD81 on the late steps of HIV-1 replication in a chronically infected T cell line. *Retrovirology* **6**, 28 (2009).
- Ono, A. Relationships between plasma membrane microdomains and HIV-1 assembly. *Biol. Cell* **102**, 335–350 (2010).
- Thali, M. Tetraspanin functions during HIV-1 and influenza virus replication. *Biochem. Soc. Trans.* **39**, 529–531 (2011).
- Krementsov, D. N. et al. Tetraspanins regulate cell-to-cell transmission of HIV-1. *Retrovirology* **6**, 64 (2009).
- Sato, K. et al. Modulation of human immunodeficiency virus type 1 infectivity through incorporation of tetraspanin proteins. *J. Virol.* **82**, 1021–1033 (2008).
- Weng, J. et al. Formation of syncytia is repressed by tetraspanins in human immunodeficiency virus type 1-producing cells. *J. Virol.* **83**, 7467–7474 (2009).
- Yoshida, T. et al. A CD63 mutant inhibits T-cell tropic human immunodeficiency virus type 1 entry by disrupting CXCR4 trafficking to the plasma membrane. *Traffic* **9**, 540–558 (2008).
- Gordon-Alonso, M. et al. Tetraspanins CD9 and CD81 modulate HIV-1-induced membrane fusion. *J. Immunol.* **177**, 5129–5137 (2006).
- Lambele, M. et al. Vpu is the main determinant for tetraspanin downregulation in HIV-1-infected cells. *J. Virol.* **89**, 3247–3255 (2015).
- Li, G. et al. A post-entry role for CD63 in early HIV-1 replication. *Virology* **412**, 315–324 (2011).
- Franzolin, E. et al. The deoxynucleotide triphosphohydrolase SAMHD1 is a major regulator of DNA precursor pools in mammalian cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **110**, 14272–14277 (2013).
- Ballana, E. & Este, J. A. SAMHD1: at the crossroads of cell proliferation, immune responses, and virus restriction. *Trends Microbiol.* **23**, 680–692 (2015).
- Baldauf, H. M. et al. SAMHD1 restricts HIV-1 infection in resting CD4⁺ T cells. *Nat. Med.* **18**, 1682–1687 (2012).
- Lahouassa, H. et al. SAMHD1 restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 by depleting the intracellular pool of deoxynucleoside triphosphates. *Nat. Immunol.* **13**, 223–228 (2012).
- Ruffin, N. et al. Low SAMHD1 expression following T-cell activation and proliferation renders CD4⁺ T cells susceptible to HIV-1. *Aids* **29**, 519–530 (2015).
- Behrendt, R. et al. Mouse SAMHD1 has antiretroviral activity and suppresses a spontaneous cell-intrinsic antiviral response. *Cell Rep.* **4**, 689–696 (2013).
- Rehwinkel, J. et al. SAMHD1-dependent retroviral control and escape in mice. *EMBO J.* **32**, 2454–2462 (2013).
- Cribier, A. et al. Phosphorylation of SAMHD1 by cyclin A2/CDK1 regulates its restriction activity toward HIV-1. *Cell Rep.* **3**, 1036–1043 (2013).
- White, T. E. et al. The retroviral restriction ability of SAMHD1, but not its deoxynucleotide triphosphohydrolase activity, is regulated by phosphorylation. *Cell Host Microbe* **13**, 441–451 (2013).
- Yan, J. et al. CyclinA2-cyclin-dependent kinase regulates SAMHD1 protein phosphohydrolase domain. *J. Biol. Chem.* **290**, 13279–13292 (2015).
- Coiras, M. et al. IL-7 Induces SAMHD1 phosphorylation in CD4⁺ T lymphocytes, improving early steps of HIV-1 life cycle. *Cell Rep.* **14**, 2100–2107 (2016).
- Beloglazova, N. et al. Nuclease activity of the human SAMHD1 protein implicated in the Aicardi-Goutieres syndrome and HIV-1 restriction. *J. Biol. Chem.* **288**, 8101–8110 (2013).
- Choi, J. et al. SAMHD1 specifically restricts retroviruses through its RNase activity. *Retrovirology* **12**, 46 (2015).
- Ryoo, J. et al. The ribonuclease activity of SAMHD1 is required for HIV-1 restriction. *Nat. Med.* **20**, 936–941 (2014).
- Antonucci, J. M. et al. SAMHD1-mediated HIV-1 restriction in cells does not involve ribonuclease activity. *Nat. Med.* **22**, 1072–1074 (2016).
- Bhattacharya, A. et al. Effects of T592 phosphomimetic mutations on tetramer stability and dNTPase activity of SAMHD1 can not explain the retroviral restriction defect. *Sci. Rep.* **6**, 31353 (2016).
- Perez-Hernandez, D. et al. The intracellular interactome of tetraspanin-enriched microdomains reveals their function as sorting machineries toward exosomes. *J. Biol. Chem.* **288**, 11649–11661 (2013).
- Sala-Valdes, M. et al. EWI-2 and EWI-F link the tetraspanin web to the actin cytoskeleton through their direct association with ezrin-radixin-moesin proteins. *J. Biol. Chem.* **281**, 19665–19675 (2006).
- Tejera, E. et al. CD81 regulates cell migration through its association with Rac GTPase. *Mol. Biol. Cell* **24**, 261–273 (2013).
- Rocha-Perugini, V. et al. CD81 controls sustained T cell activation signaling and defines the maturation stages of cognate immunological synapses. *Mol. Cell Biol.* **33**, 3644–3658 (2013).
- Welbourn, S. et al. Identification and characterization of naturally occurring splice variants of SAMHD1. *Retrovirology* **9**, 86 (2012).
- Mauney, C.H. et al. The SAMHD1 dNTP triphosphohydrolase is controlled by a redox switch. *Antioxid. Redox Signal.* <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2016.6888> (2017).
- Ahn, J. Functional organization of human SAMHD1 and mechanisms of HIV-1 restriction. *Biol. Chem.* **397**, 373–379 (2016).
- Pauls, E. et al. Cell cycle control and HIV-1 susceptibility are linked by CDK6-dependent CDK2 phosphorylation of SAMHD1 in myeloid and lymphoid cells. *J. Immunol.* **193**, 1988–1997 (2014).
- Welbourn, S. & Strebel, K. Low dNTP levels are necessary but may not be sufficient for lentiviral restriction by SAMHD1. *Virology* **488**, 271–277 (2016).
- Seamon, K. J. et al. SAMHD1 is a single-stranded nucleic acid binding protein with no active site-associated nuclease activity. *Nucleic Acids Res.* **43**, 6486–6499 (2015).
- Diamond, T. L. et al. Macrophage tropism of HIV-1 depends on efficient cellular dNTP utilization by reverse transcriptase. *J. Biol. Chem.* **279**, 51545–51553 (2004).
- Kyei, G. B., Cheng, X., Ramani, R. & Ratner, L. Cyclin L2 is a critical HIV dependency factor in macrophages that controls SAMHD1 abundance. *Cell Host Microbe* **17**, 98–106 (2015).
- Morrissey, C. et al. The eukaryotic elongation factor eEF1A1 interacts with SAMHD1. *Biochem. J.* **466**, 69–76 (2015).
- Yanez-Mo, M. et al. Regulation of endothelial cell motility by complexes of tetraspan molecules CD81/TAPA-1 and CD151/PETA-3 with $\alpha 3 \beta 1$ integrin localized at endothelial lateral junctions. *J. Cell Biol.* **141**, 791–804 (1998).

50. Gordon-Alonso, M. et al. Actin-binding protein drebrin regulates HIV-1-triggered actin polymerization and viral infection. *J. Biol. Chem.* **288**, 28382–28397 (2013).

Acknowledgements

The authors thank M. Vicente-Manzanares (Hospital de la Princesa, UAM, Spain) for critical reading of the manuscript. Microscopy was performed at CNIC Microscopy & Dynamic Imaging Unit. This work was supported by grants to S.L. (Translational Cancer Award from Stanford Cancer Institute, SPARK at Stanford, and the Breast Cancer Research program from the Department of Defense grant W81XWH-14-1-0397); to B.K. (R01 GM104198; R01 AI049784); to M.A.M.-F. (RD16/0025/0019; PI16/01863; CYTED 214RT0482); to F.S.-M. (SAF2014-55579-R; INDISNET-S2011/BMD-2332; ERC-2011-AdG 294340-GENTRIS; PIE13/00041) and to MY-M (BFU2014-55478-R; Fundación Ramón Areces; RYC-2012-11025); and was co-funded by Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). The CNIC is supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO) and the Pro CNIC Foundation. FV-C was supported by The American Association of Immunologist through a Careers in Immunology Fellowship; and HS by a FPI-UAM Fellowship.

Author contributions

V.R.P., F.S.M. and M.Y.M. conceived and designed research. V.R.P., H.S., S.A., S.L.M., G.L. and M.Y.M. performed experimental work. S.A., F.V.C., S.L., B.K., M.A.M.F., F.S.M. and M.Y.M. provided reagents. V.R.P. and M.Y.M. analysed the data. V.R.P. wrote the paper.

Competing interests

The authors declare no competing financial interests.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at doi:[10.1038/s41564-017-0019-0](https://doi.org/10.1038/s41564-017-0019-0).

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Correspondence and requests for materials should be addressed to M.Y.M.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Life Sciences Reporting Summary

Nature Research wishes to improve the reproducibility of the work that we publish. This form is intended for publication with all accepted life science papers and provides structure for consistency and transparency in reporting. Every life science submission will use this form; some list items might not apply to an individual manuscript, but all fields must be completed for clarity.

For further information on the points included in this form, see [Reporting Life Sciences Research](#). For further information on Nature Research policies, including our [data availability policy](#), see [Authors & Referees](#) and the [Editorial Policy Checklist](#).

► Experimental design

1. Sample size

Describe how sample size was determined.

For quantification of HIV-1 reverse transcription by qPCR, each experiment was performed in triplicate (biologicals) and qPCRs were done in triplicates (technical). Methods, page 18; Legends of Figures 2, 3 and 4, pages 25-26; Legend of Supplementary Figure 3.

For the quantification of the luciferase activity after infection with single-cycle luciferase pseudotyped reporter virus, three independent experiments were performed in triplicates (biologicals). Methods, page 19; Legend of Figure 2, page 25.

For quantification of number and size of fluorescent SAMHD1+ spots in HeLa/R5 cells, or SAMHD1/EEA1 co-localization, two or three independent experiments were performed, and the number of cells analyzed in confocal microscopy images ranged from 20 to 400, depending on the experiment. In each independent experiment the number of cells analyzed for each condition was similar. Methods, page 17. Legends of Figure 1, page 24; and Figure 6, page 27; Legend of Supplementary Figure 5.

For the quantification of the dNTP intracellular content, three independent experiments were performed. Methods, page 19. Legend of Figure 4, page 26; Legend of Supplementary Figure 3.

For quantification of immunoblot signals, two or three independent experiments were performed. In each experiment, results were normalized with respect to the loading control. Methods, page 16; Legend of Figure 5, page 26.

2. Data exclusions

Describe any data exclusions.

no data were excluded from the analyses.

3. Replication

Describe whether the experimental findings were reliably reproduced.

each experiment was performed two or three independent times, as stated in the Figure Legends, and data from all the experiments were pooled. All attempts of replication were successful.

4. Randomization

Describe how samples/organisms/participants were allocated into experimental groups.

Not applicable. Our experimental groups were: 1- control cells compared with cells overexpressing CD81GFP or the mutant CD81dcytGFP; 2- or control cells compared with cells knocked-down for CD81 by siRNA or CD81 knock-out with the CRISPR/Cas9 technology; 3- or control cells compared with cells treated with cell-permeable peptides with the sequence of the C-terminal region of CD81.

5. Blinding

Describe whether the investigators were blinded to group allocation during data collection and/or analysis.

Measurement of cellular dNTP content was performed on blinded samples.

Note: all studies involving animals and/or human research participants must disclose whether blinding and randomization were used.

6. Statistical parameters

For all figures and tables that use statistical methods, confirm that the following items are present in relevant figure legends (or in the Methods section if additional space is needed).

- n/a | Confirmed
- The exact sample size (n) for each experimental group/condition, given as a discrete number and unit of measurement (animals, litters, cultures, etc.)
 - A description of how samples were collected, noting whether measurements were taken from distinct samples or whether the same sample was measured repeatedly
 - A statement indicating how many times each experiment was replicated
 - The statistical test(s) used and whether they are one- or two-sided (note: only common tests should be described solely by name; more complex techniques should be described in the Methods section)
 - A description of any assumptions or corrections, such as an adjustment for multiple comparisons
 - The test results (e.g. P values) given as exact values whenever possible and with confidence intervals noted
 - A clear description of statistics including central tendency (e.g. median, mean) and variation (e.g. standard deviation, interquartile range)
 - Clearly defined error bars

See the web collection on [statistics for biologists](#) for further resources and guidance.

► Software

Policy information about [availability of computer code](#)

7. Software

Describe the software used to analyze the data in this study.

All statistical analyses were performed with GraphPad Prism (GraphPad Software Inc). Statistical significance was assessed by two-tailed Student's t test, one-way ANOVA with Tukey's or Dunn's multiple comparison post-test, or two-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison post-test, as required. Methods, page 19; and Legends of Figures and Supplementary Figures.

For manuscripts utilizing custom algorithms or software that are central to the paper but not yet described in the published literature, software must be made available to editors and reviewers upon request. We strongly encourage code deposition in a community repository (e.g. GitHub). *Nature Methods* [guidance for providing algorithms and software for publication](#) provides further information on this topic.

► Materials and reagents

Policy information about [availability of materials](#)

8. Materials availability

Indicate whether there are restrictions on availability of unique materials or if these materials are only available for distribution by a for-profit company.

All unique materials used are readily available from the authors, or from standard commercial sources, as indicated in the Methods section, page 20.

9. Antibodies

Describe the antibodies used and how they were validated for use in the system under study (i.e. assay and species).

alpha-tubulin (DM1A) mAb - Sigma T6199; p150 glued mAb - BD Biosciences 610473; cofilin mAb - Abcam 42824; EEA1 (N-19) Ab - Santa Cruz sc-6415; CD63 (H-193) Ab - Santa Cruz sc-15363; HGS/HRS Ab - Abcam ab72053; LAMP1-647 (H4A3) mAb - Biolegend 328612; LaminA/C (N-18) - Santa Cruz sc-6215; SAMHD1 mAb - Sigma SAB4100235;

CD81 mAb (5A6) - provided by Dr. S. Levy (Methods, page 15). Described in Takahashi et al, *J Immunol*, 1990;
ERM 90:3 - provided by Dr. H Furthmayr (Methods, page 16). Described in Amieva & Furthmayr; *Exp Cell Res*, 1995;
CD82 (TS82b) mAb - provided by Dr. E. Rubinstein (Methods, page 16). Described in Charrin et al, *J Biol Chem*, 2001;
CD9 (VJ1/20), CD151 (LIA1/1), CD63 (Tea3/18), and CD4 (HP2/6) - references 17, 49, 50 (Methods, page 16);
CD147 (VJ1/9) - reference 17 (Methods, page 17);

SAMHD1 (366-380) polyclonal Ab - Sigma SAB1101454. This antibody was further validated in this study by immunoblot of HeLa/R5 cell lysates (Supplementary Figure 4), in which it recognizes SAMHD1-GFP, and knock-down of SAMHD1 by siRNA.

10. Eukaryotic cell lines

a. State the source of each eukaryotic cell line used.

Source of cells are stated in Methods, page 14.

Hela P4.R5 MAGI cells (Hela/R5) were obtained through the NIH AIDS Reagent Program; Human kidney cell line HEK293T, Vb8 Jurkat T cells (J77 Cl20), CEM T cells and Raji B cells were obtained from ATCC.

b. Describe the method of cell line authentication used.

Since cell lines were obtained from the NIH AIDS Reagent Program and ATCC they were not further authenticated, as stated in Methods, page 14.

c. Report whether the cell lines were tested for mycoplasma contamination.

All cell lines are routinely tested for mycoplasma contamination and tested negative, as stated in Methods page 14.

d. If any of the cell lines used are listed in the database of commonly misidentified cell lines maintained by [ICLAC](#), provide a scientific rationale for their use.

No commonly misidentified cell lines were used.

► Animals and human research participants

Policy information about [studies involving animals](#); when reporting animal research, follow the [ARRIVE guidelines](#)

11. Description of research animals

Provide details on animals and/or animal-derived materials used in the study.

No animals were used.

Policy information about [studies involving human research participants](#)

12. Description of human research participants

Describe the covariate-relevant population characteristics of the human research participants.

This study did not involve human research participants.



Tetraspanins, Another Piece in the HIV-1 Replication Puzzle

Henar Suárez¹, Vera Rocha-Perugini^{2,3}, Susana Álvarez⁴ and María Yáñez-Mó^{1,5*}

¹Departamento de Biología Molecular, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain, ²Servicio de Inmunología, Hospital de la Princesa, Instituto de Investigación Sanitaria La Princesa (IIS-IP), Madrid, Spain, ³Vascular Pathophysiology Research Area, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III, Madrid, Spain, ⁴Servicio de Inmunobiología Molecular, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain, ⁵Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Instituto de Investigación Sanitaria La Princesa (IIS-IP), Madrid, Spain

Despite the great research effort placed during the last decades in HIV-1 study, still some aspects of its replication cycle remain unknown. All this powerful research has succeeded in developing different drugs for AIDS treatment, but none of them can completely remove the virus from infected patients, who require life-long medication. The classical approach was focused on the study of virus particles as the main target, but increasing evidence highlights the importance of host cell proteins in HIV-1 cycle. In this context, tetraspanins have emerged as critical players in different steps of the viral infection cycle. Through their association with other molecules, including membrane receptors, cytoskeletal proteins, and signaling molecules, tetraspanins organize specialized membrane microdomains called tetraspanin-enriched microdomains (TEMs). Within these microdomains, several tetraspanins have been described to regulate HIV-1 entry, assembly, and transfer between cells. Interestingly, the importance of tetraspanins CD81 and CD63 in the early steps of viral replication has been recently pointed out. Indeed, CD81 can control the turnover of the HIV-1 restriction factor SAMHD1. This deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase counteracts HIV-1 reverse transcription (RT) in resting cells *via* its dual function as dNTPase, catalyzing deoxynucleotide triphosphates into deoxynucleosides and inorganic triphosphate, and as exonuclease able to degrade single-stranded RNAs. SAMHD1 has also been related with the detection of viral nucleic acids, regulating the innate immune response and would promote viral latency. New evidences demonstrating the ability of CD81 to control SAMHD1 expression, and as a consequence, HIV-1 RT activity, highlight the importance of TEMs for viral replication. Here, we will briefly review how tetraspanins modulate HIV-1 infection, focusing on the latest findings that link TEMs to viral replication.

Keywords: tetraspanins, HIV, entry, assembly, budding, reverse transcription

THE CELLULAR PLASMA MEMBRANE AS THE FIRST MODULATOR OF HIV-1 INFECTION

HIV-1 virus belongs to Lentivirus within the RNA family *Retroviridae*. It carries two identical molecules of positive ssRNA that are converted to dsRNA intermediate by viral RNA-dependent DNA polymerase (reverse transcriptase). HIV genome encodes for 16 proteins participating in several phases during the HIV life cycle, the structural polyproteins Gag [consisting of matrix, capsid,

Abbreviations: ADAM, a disintegrin and metalloprotease; CA, capsid; dNTPs, deoxynucleotide triphosphates; ERMs, ezrin, moesin, and radixin; ICD, intracellular domain; MA, matrix MA; NC, nucleocapsid; NLS, nuclear localization signal; NPC, nuclear pore complex; PIC, pre-integration complex; PIP2, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; RT, reverse transcription; RTC, reverse transcription complex; TEMs, tetraspanin-enriched microdomains.

OPEN ACCESS

Edited by:

Ken J. Ishii,
National Institutes of Biomedical
Innovation, Health and
Nutrition, Japan

Reviewed by:

Mickael Mathieu Menager,
INSERM U1163 Institut
Imagine, France
José Mordoh,
Leloir Institute Foundation
(FIL), Argentina

***Correspondence:**

María Yáñez-Mó
maria.yannez@uam.es

Specialty section:

This article was submitted
to Vaccines and
Molecular Therapeutics,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 20 February 2018

Accepted: 23 July 2018

Published: 03 August 2018

Citation:

Suárez H, Rocha-Perugini V,
Álvarez S and Yáñez-Mó M (2018)
Tetraspanins, Another Piece in
the HIV-1 Replication Puzzle.
Front. Immunol. 9:1811.
doi: 10.3389/fimmu.2018.01811

nucleocapsid (NC), and p6 proteins], Pol (consisting of protease, reverse transcriptase, and integrase), and envelope (Env; gp120 and gp41); regulatory proteins (Tat and Rev); and accessory proteins (Vif, Vpr, Vpu/Vpx, and Nef) (1).

The HIV-1 envelope glycoprotein (Env) facilitates viral attachment and entry into host cells (2). Three spikes form the Env trimeric complex, each spike consisting of the association of a gp120 subunit on the surface and a transmembrane gp41 molecule (3). Gp120 interacts with CD4, the cellular transmembrane receptor expressed on the membrane of the target cell; and this induces a conformational change in gp120 that exposes new sites for co-receptor binding. There are two types of HIV-1 viruses regarding co-receptor preference, either CCR5 and/or CXCR4. After this second interaction, a hydrophobic region in gp41 is exposed and inserted into the plasma membrane, so that viral and cellular membranes get close enough to create the fusion pore (2, 4). Besides the receptor and co-receptor, other cell surface molecules expressed on dendritic cells (DC) can act as attachment factors, although they do not trigger viral fusion. Most attachment factors are C-type lectins, or calcium-dependent glycan-binding proteins such as DC-SIGN, Siglec-1, mannose, langerin, or DCIR (5–7).

The plasma membrane is not a homogeneous surface but contains specialized microdomains that can be differentiated by their composition and function: lipid rafts, tetraspanin-enriched microdomains (TEMs), caveolae, and clathrin-coated pits (8, 9). Lipid rafts, enriched in cholesterol and saturated lipids with long hydrocarbon chains and hydroxylated ceramide backbones (10–12), provide an environment that favors the inclusion of oligomeric proteins such as flotillins and caveolins, or proteins with lipid modifications such as palmitoylation or GPI anchors (13–15). While lipid rafts properties rely mainly on their lipid content, TEMs are organized around protein–protein interactions nucleated by tetraspanins (9). Tetraspanins, a superfamily of ubiquitous four transmembrane proteins, laterally interact with other membrane molecules establishing specialized domains or platforms called TEMs. The most common partners of tetraspanins are integrins, proteins of the immunoglobulin superfamily, metalloproteinases, membrane receptors, and other tetraspanins (9). TEMs also include cholesterol and gangliosides. Lipid–protein and protein–protein interactions are facilitated by multiple palmitoylation sites in both tetraspanins and their partners (16).

Given the complex structure of the plasma membrane, it is not surprising that the CD4 receptor and CCR5/CXCR4 co-receptors are not randomly distributed on the cell surface, but show a controlled segregation pattern into defined membrane clusters (17). This enrichment in specialized microdomains has been also reported for attachment factors such as DC-SIGN, in the surface of DCs (18). Inclusion of HIV-1 receptors and co-receptors in lipid rafts, caveolae microdomains, or TEMs tightly regulate viral entry. Since the presence of cholesterol is a common feature of these different microdomains, its depletion or the use of antibodies that specifically recognize clustered cholesterol on the cell surface induces a reorganization of the plasma membrane, disrupts receptor clustering and membrane dynamics, and inhibits virus entry (19, 20). These antibodies do

not appear to mask CD4 and CXCR4 interaction sites, but rather seem to affect CXCR4 membrane diffusion, triggering an excess of CD4-CXCR4 clustering, which prevents proper attachment of the viral envelope proteins (19). CD4 and CCR5 co-receptor interact with each other under basal conditions, and addition of gp120 protein bring them closer (17, 21). Tetraspanins CD81 and CD82 also associate with the CD4 receptor on T-cells (22, 23), and gp120 attachment to CD4 induce co-clustering of CD81 (24). CD81 modulates CD4 dimerization and clustering, and it decreases CD4 ability to bind to gp120 (25). All these results support the notion that membrane microdomains are critical regulators of HIV-1 receptors diffusion, allowing proper clustering and efficient protein–protein interactions required for viral entry (26) (**Figure 1B**). Under resting conditions, lipid rafts and TEMs are mainly independent domains at the cell surface, recognized by the presence of specific markers. However, after viral infection, Gag can induce the coalescence of the two types of domains (27).

Other studies suggest that these microdomains may also be important to regulate receptor recycling and trafficking to the plasma membrane. Thus, the tetraspanin CD63 regulates CXCR4 expression on the plasma membrane of T-lymphocytes and activated B cells. Moreover, CD63 glycosylation sites are critical for the interaction with CXCR4 (28) and promote CXCR4 trafficking from the Golgi apparatus to late endosomes and lysosomes for its degradation (29, 30) (**Figure 1B**).

CYTOSKELETON, A SECOND BARRIER FOR THE VIRUS?

Successful HIV-1 entry and infection depends on two sequential events, proper clusterization of the CD4 receptor and co-receptors after viral attachment, and subsequent polymerization and depolymerization of the cortical F-actin meshwork beneath the plasma membrane.

Although the cortical actin web was first described as a barrier for viral entry (21) (**Figure 1A**), inhibition of the actin nucleation regulator ARP2/3 was shown to inhibit viral Env-induced fusion, highlighting the importance of an early actin polymerization phase that stabilizes viral attachment and subsequent fusion with the plasma membrane (31). In addition, the tetraspanin TSPAN7 has been recently identified as an effector of actin nucleation (32), necessary for the formation of actin-rich dendrites in DCs that capture, present, and transfer viruses to T-lymphocytes (33), in the process called trans-enhancement or trans-infection (**Figure 1A**).

Gp120 binding to CXCR4 regulates actin dynamics through the switch off and on of the actin-binding protein cofilin (21), which is inactivated by LIMK-1-dependent phosphorylation, promoting actin polymerization and receptor clustering (34). LIMK-1 is activated by CXCR4 *via* two different pathways: the Rac1/PAK and the RhoA/ROCK pathways. The activation of the latter depends on filamin-A, an actin adaptor protein that binds to CD4, CXCR4, and CCR5 (35). Although the primary activator of both pathways has not been addressed yet, tetraspanins CD82 or CD81 could be good candidates.

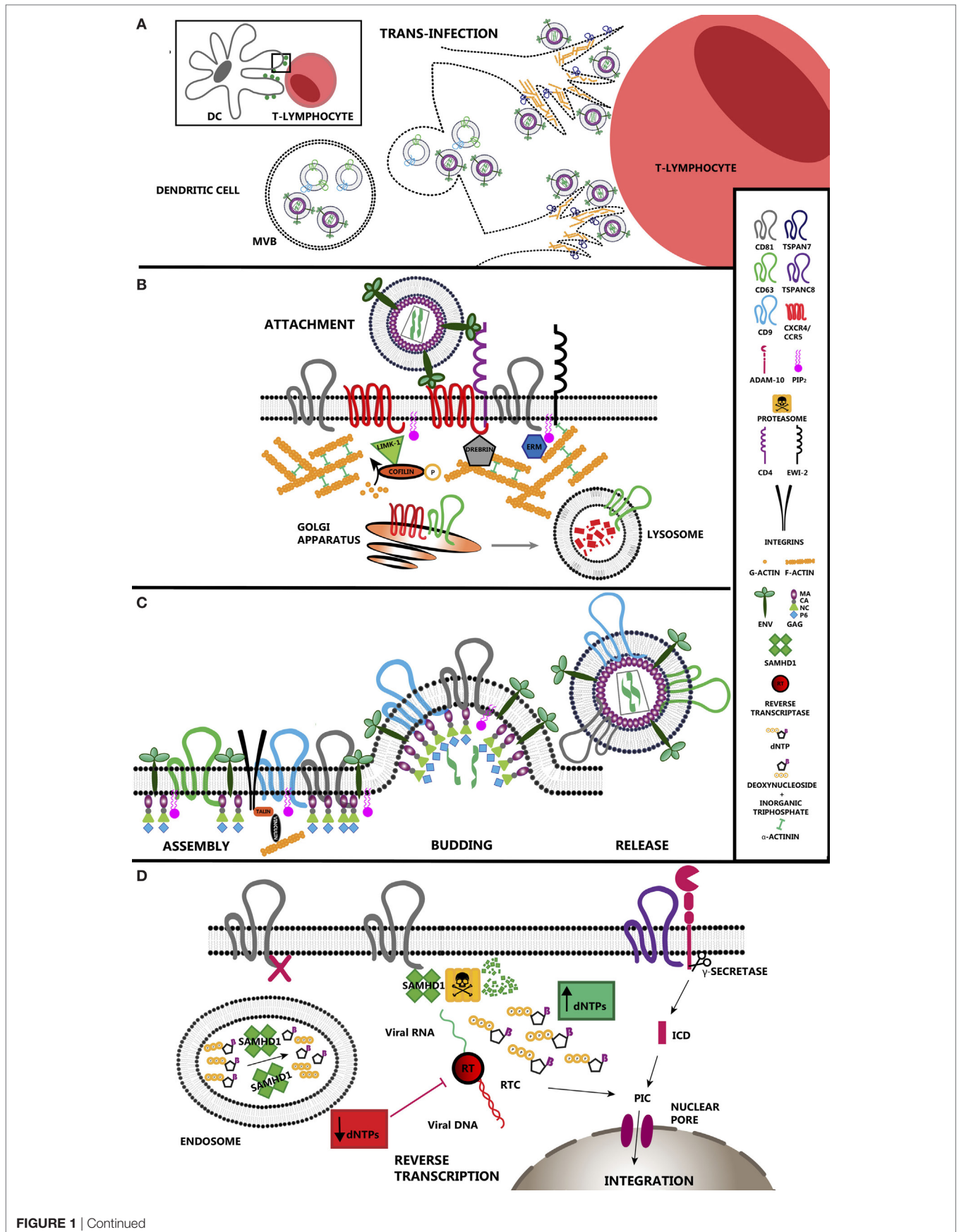


FIGURE 1 | Continued

FIGURE 1 | Tetraspanin roles during HIV-1 infection. **(A)** Tetraspanins regulate transinfection of T-lymphocytes. Dendritic cells establish contacts with T-lymphocytes during antigen presentation. HIV-1 takes advantage of immune synapses to enhance the infection of T-lymphocytes, the main target cells for the virus. This strategy is called trans-enhancement or transinfection and takes place through two different pathways. One involves the endocytosis of viral particles by DCs, which gives them access to endosomal compartments. As happens with exosomes, viral particles accumulate in multivesicular bodies that finally fuse with the plasma membrane releasing those particles together with exosomes into the intercellular space. The second pathway involves TSPAN7, which inhibits viral endocytosis and promotes formation of actin rich protrusions in DCs. In this scenario, viral particles are sequestered on the surface of these cells, allowing virus exposure and transfer to T-lymphocytes. **(B)** TEM regulation of HIV-1 entry. CD4 and co-receptors CCR5/CXCR4 segregate within tetraspanin-enriched microdomains (TEMs), which control their proper distribution and dynamics enhancing HIV-1 attachment efficiency and subsequent entry. CD63 regulates the expression of CXCR4 on the cell surface by stimulating its degradation through the lysosomal pathway. Env binding to its receptor and co-receptor brings them closer and triggers several intracellular pathways where actin polymerization is the main response. Active LIMK1 phosphorylates and inactivates cofilin, stimulating actin polymerization. Proteins such as moesin or α -actinin have a structural function as they link receptors and tetraspanins to the subcortical actin network. Other proteins such as drebrin control the stability of the actin web. TSPAN7 is also a positive regulator of actin polymerization, although the effectors downstream have not been addressed yet. **(C)** HIV-1 assembly occurs at TEMs. Viral protein Gag interacts with the inner leaflet of the plasma membrane via its myristoylation, which increases the affinity for cholesterol-enriched areas. Gag also interacts with the positively charged PIP2 and the inner loop of different tetraspanins such as CD81 and CD82. Gag induces CD9 clusterization. However, there is no direct evidence indicating an essential requirement for tetraspanins during HIV-1 budding. Recruitment of all these components into restricted areas may involve the presence of the subcortical actin web for their stabilization, where talin and vinculin would act as a link. **(D)** HIV-1 reverse transcription (RT) is regulated by tetraspanins. SAMHD1 is a negative regulator of viral RT as it decreases the concentration of deoxynucleotide triphosphates available in the cell. CD81 regulates SAMHD1 activity by stimulating its degradation via proteasome. CD81 depletion induces the relocation of SAMHD1 inside early endosomes. ADAM-10 activity is regulated by tetraspanin TSPANC8 subfamily. The resulting intracellular domain when cleaved by a γ -secretase has been identified recently as a component of the PIC. When RT is completed, viral DNA is transported into the nucleus where it integrates in the cell genome.

CD82 can interact with CD4 and regulates actin dynamics in both T-lymphocytes and cancer cells through the modulation of RhoA and Rac1 signaling (36, 37), while CD81 regulates Rac activity turnover (38).

Besides Rho GTPase activity, the membrane lipid phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) facilitates viral infection by controlling the activity of several actin-binding proteins (31). Among them, ERMs (ezrin, moesin, and radixin), whose activation requires the interaction with PIP₂ at the plasma membrane (39). Gp120 binding to CD4 receptor activates moesin, which triggers the reorganization of subcortical F-actin and stimulates CD4-CXCR4 clustering in T-lymphocytes (40) (Figure 1B). However, other studies performed in HeLa cells described moesin as a negative regulator of viral infection (41), through the control of microtubule stability that could affect viral transport to the nucleus (42, 43). Moesin also interacts directly with CD81, or indirectly with either CD9 or CD81 through EWI-2, a TEM component member of the immunoglobulin family (44). EWI-2 is also linked to the actin cytoskeleton via α -actinin, an actin-binding protein negatively regulated by PIP₂ that induces a restrictive conformation for HIV entry on the cortical actin network (45, 46). Another CXCR4 interactor, drebrin, stabilizes actin in a process dependent on the viral envelope, so that drebrin silencing increases HIV-1 entry again supporting the idea of a need for a later actin depolymerization step for viral access into the cell (47) (Figure 1B).

This later step of depolymerization is also promoted by CXCR4 through the activation of cofilin via G α i signaling (48). Alteration in the levels of gelsolin, another actin regulatory molecule, also impairs HIV-1 infection (49). In this stage, destabilization of the actin network at later phases of viral entry would provide access of the virus to microtubules, which will transport the RTC [reverse transcription (RT) complex] toward the nucleus (31, 50). Studies using nocodazole (an inhibitor of microtubule polymerization), or kinesin and dynein inhibitors delay HIV-1 uncoating and promote the accumulation of viral particles far

away from the nucleus. Kinesin and dynein may contribute to the uncoating process by applying opposite forces that could destabilize and disrupt the structure of the capsid while it travels through the cytoplasm (51).

Tetraspanins and the actin cytoskeleton are also crucial for DC-mediated trans-infection by which the virus is retained at or near the cell surface of a DC and transmitted to a T-lymphocyte via the close contact of both cells. TSPAN7 expressed in DCs is important for the formation of actin rich spikes that are able to retain viral particles on their surface (32) (Figure 1A). In addition, DCs can trap viral particles in large intracellular vesicles staining for tetraspanins CD81 and CD63 (52), although these structures may not be completely closed and remain connected with the extracellular space allowing a quick release of viral particles (53) during DC-T cell contacts. The exosome secretion pathway has been proposed as an alternative transmission route between cells without fusion events. Indeed, HIV-1 can directly use the endosomal pathway to enter DCs and be thereafter released together with exosomes after the fusion of multivesicular bodies with the plasma membrane (54, 55) (Figure 1A). In addition, recent studies suggest that in top of that, exosomes from DC are loaded with molecules that could enhance viral replication and release, such as CCR5 or CXCR4, which facilitate T-lymphocyte infection, miRNAs or viral proteins, such as Nef (56).

HIV-1 PROMOTES PLASMA MEMBRANE REMODELING

Upon successful infection, HIV-1 virus can modify the cell surface of infected cells to facilitate the release of new viral particles. Vpu and Nef are the viral proteins involved in this modulation. Both of them can control CD4 expression at the cell surface by different mechanisms. Nef is synthesized during the early steps of the infection, interacting with the plasma membrane through myristoylation modifications and

with the C-terminal domain of the CD4 receptor (57, 58). Nef forms a complex with AP-2, promoting CD4 endocytosis and subsequent transport to the lysosomal pathway for its degradation (59). Nef can also control MHC-I levels to protect the infected cell from the immune system, by stimulating its endocytosis from the cell surface and by inducing its accumulation at the trans-Golgi network (60). In contrast, Vpu is a transmembrane viral protein that is transcribed during the late steps of the viral cycle, blocking CD4 transport from the endoplasmic reticulum to the membrane and stimulating CD4 degradation by the endoplasmic-reticulum-associated protein degradation pathway (61).

Tetraspanins CD9, CD81, CD82, CD63, and CD231 are included in HIV-1 particles negatively regulating viral infectivity (62). How the virus regulates their inclusion into virions remains unknown, but it does not seem to be an uncontrolled process since L6, a transmembrane protein with similar topology is excluded (62). Remarkably, HIV-1 viral proteins also control tetraspanin expression on the plasma membrane. Vpu and Nef downregulate a wide variety of tetraspanins inducing their enrichment at the perinuclear region of the cell (63). T-lymphocytes from HIV-1 patients showed a reduced expression of CD82 and CD81 (64), while the expression of the latter was increased in B-lymphocytes (65). CD81 and CD82 downregulation was attributed to Vpu, and to a lesser extent to Nef. Vpu was shown to directly bind CD81, stimulating its degradation by either the proteasome or the lysosomal pathways. Although CD82 does not directly interact with Vpu, the viral protein also drives its degradation, probably through the association with CD81 (63). Therefore, downregulation of tetraspanin expression seems to be essential for virus spread. In addition, CD81 and CD9 play a negative role in viral-induced syncytia formation (24).

Viral assembly and budding is driven by Gag polyprotein, which is formed by matrix (MA), capsid (CA), NC, p6 domains, and two spacer peptides, named SP1 and SP2 (66) (**Figure 1C**). The initial evidence that suggested that assembly takes place in specialized microdomains came from the presence of high levels of cholesterol and sphingolipids in the HIV-1 envelope (67–69). After synthesis in the cytoplasm, Gag interacts with two molecules of viral RNA through its NC domain (70). Gag association with the cell surface then is driven by a cluster of positive amino acids in the MA domain, with affinity for negatively charged PIP₂ in the inner leaflet of the plasma membrane. Myristoylation of the N-terminal region of the MA domain contributes to its association to membrane areas enriched in cholesterol and sphingolipids, like lipid rafts or TEMs (26, 70). Env and Gag colocalize with tetraspanins CD63, CD81, and CD9 at the plasma membrane of T-cells and direct coimmunoprecipitation of CD81 with Gag has been reported (68, 71) (**Figure 1C**). Moreover, in both T-cells and macrophages, there is a relocalization of CD63 from intracellular compartments to viral assembly sites; however, its depletion does not affect viral release (72) (**Figure 1C**). In macrophages, viral assembly takes place in vacuoles that originate from invaginations of the plasma membrane (73), and present focal-adhesion-like domains more abundant in cells infected with the virus (74). These domains

are enriched in integrin β 2, focal adhesion components, tetraspanins CD9, CD53, CD81 and CD82, and in PIP₂ and AP-2, common components of clathrin-coated pits (75). After the budding of new virions, Gag is processed by the viral protease into the mature proteins enabling the formation of the capsid that contains the viral RNA genome and the enzymes needed for its replication (10, 70).

Further studies will be required to clarify the specific role of tetraspanins during the assembly and budding of new virions. All existing evidences support that tetraspanins are located at the exit sites and are incorporated in newly formed virions; however, future research should decipher whether they are functionally important for the organization and recruitment of all the components needed for budding (10).

INTRACELLULAR EVENTS OF HIV-1 INFECTION ARE SURPRISINGLY ALSO DEPENDANT ON MEMBRANE MICRODOMAINS

The binding to the viral receptor and co-receptor triggers an intracellular response that prepares the host cell for HIV-1 RT. After the fusion of the viral and the cell membranes, the capsid of the virus is released into the cytoplasm. RT occurs in a complex called RTC (RT complex), which is formed by viral proteins (reverse transcriptase, integrase, matrix protein and Vpr), the RNA genome, and host proteins needed to complete the cDNA synthesis (3, 76, 77). When the RNA genome is completely transformed into cDNA, this complex, still composed by a combination of viral and cellular proteins, is named PIC (pre-integration complex) (78). One surprising component of the HIV-1 PIC is the intracellular domain of the transmembrane A Disintegrin And Metalloprotease-10 (ADAM10) (79); so, when ADAM10 expression is inhibited, a decrease in HIV-1 RT has been reported (**Figure 1D**). Tetraspanins could be also involved in this event, since ADAM10 localization, trafficking, and substrate specificity is regulated by a subfamily of tetraspanins characterized for having eight Cys residues in their large extracellular loops (TspanC8) (80) (**Figure 1D**).

The role of the RTC in the RT process and how the uncoating process takes place is still a matter of debate. The first theory, no longer accepted, proposed that the capsid was lost immediately after membrane fusion and viral entry (81). Many studies have proven that the capsid is required for the RT process since it may provide protection against the host cell defense, as well as anchorage for the needed host factors (76). Another theory proposes that uncoating takes place while the RTC gets to the nucleus. The third one, however, claims that the whole capsid might travel along the cytoplasm until it reaches the nuclear pore complex where it is disassembled (77). There are different pieces of evidence that show that the capsid remains stable for some time after viral entry, and mutations that increase or decrease the stability of the capsid all have a negative effect on HIV-1 infection (81). Most results suggest that uncoating may occur during HIV-1 RT (82), and it should not involve a complete breakdown of the capsid but

a progressive disassembly along the trip through the cytoplasm (77). Destabilization of its structure would allow the access of the nucleotides, and host proteins needed for the viral RT (83). Before nuclear entry, however, the core has to be disrupted as it is too large to cross the nuclear pore (82).

Interestingly, some data suggest that membrane-bound tetraspanins also regulate after-entry events in HIV-1 infection. CD63 has been shown to regulate HIV-1 RT, nuclear transport, and integration; however, the mechanisms involved remain unsolved (84–86). RT is also modulated by tetraspanin CD81, *via* the regulation of SAMHD1 expression (87). SAMHD1 is a deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase that controls the availability of deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) through their conversion into deoxynucleoside and inorganic triphosphate (88). Recent studies have identified an additional role of SAMHD1 in DNA repair and genome stability (89, 90). Others suggest that it may also have RNase activity over ssRNA or DNA/RNA duplexes (91), although these later results remain controversial (92). Because of its relevance, the cell has developed several mechanisms for SAMHD1 regulation. Related to its quaternary structure (93), SAMHD1 monomers associate in dimers, and these dimers organize in tetramers. The organization of SAMHD1 monomers into the active tetrameric form depends on the presence of dNTPs for its stabilization (94). Regarding posttranslational modifications, SAMHD1 can be phosphorylated by cyclin A2/CDK1 at T592 after T cell activation (95), or by tyrosine kinases downstream IL-2 and IL-7 stimulation of CD4+ T cells (96). These modifications decrease its dNTPase activity, increasing viral RT (96). Acetylation at K405 has the opposite effect, stimulating SAMHD1 dNTPase activity, and promoting the transition from G1 into S phase in cancer cells (97). SAMHD1 oxidation status is another important regulatory mechanism. Three different cysteines of the enzyme can be oxidized, changing the nucleotide binding site conformation, preventing its tetramerization and subsequent activation (98). SAMHD1 has a nuclear and cytoplasmic distribution (87, 99). Nuclear localization is mainly determined by its NLS sequence (100), and the oxidation status seems to be critical for its accumulation in the cytoplasm (98). Once in the cytoplasm, tetraspanin CD81 seems to regulate the enzyme subcellular localization into endosomes (87) (Figure 1D).

SAMHD1 expression levels are also tightly regulated. Reduced levels of SAMHD1 increase the amount of dNTPs available for viral RT. Thus, SAMHD1 is a major regulator of HIV-1 infection as it restricts the availability of dNTPs necessary for HIV-1 RT in resting monocytes, macrophages, CD4+ T cells, and DC. HIV-2 virus, but not HIV-1, expresses an accessory protein called Vpx that tags SAMHD1 for its degradation by the proteasome (93, 101). SAMHD1 interaction with the C-terminal domain of the tetraspanin CD81 also stimulates its proteasomal degradation. Depletion of CD81 abolishes

SAMHD1 degradation, which is translocated into early endosomal compartments where it exerts its dNTPase activity (87) (Figure 1D). Although it is reported that HIV-1 downregulates CD81 expression at the cell surface (64), this event might only occur late in the viral cycle, after RT has been completed.

CONCLUDING REMARKS

Tetraspanins are important regulators of HIV-1 cycle. They would have a dual role in HIV-1 infection. Tetraspanins would inhibit infectivity by actively participating in viral entry. They would modulate cell surface dynamics and the proper distribution of receptors and co-receptors, both in the host cell and in the viral membrane inhibiting viral entry and induced membrane fusion (24, 62). In contrast, CD81 can enhance viral RT by promoting SAMHD1 degradation through the proteasome, thus increasing the availability of dNTPs in the host cell (87). These opposite functions concur with a first round of active viral entry and replication to produce new viral particles in the cell, followed by a second round of viral latency to avoid recognition by the immune system so it can persist within the organism (102). HIV-1 possesses the tools to control tetraspanin expression by the host cell, avoiding undesirable effects on viral infection. As important membrane organizers, tetraspanins regulate multiple cellular proteins that control the different steps of HIV-1 infection cycle, and thus represent an interesting target for the development of new drugs against viral infection. Finally, it has been reported that peptides against the intracellular region of CD81 can block its activity over SAMHD1 and reduce viral RT (87). This result leaves open the possibility of using specific peptides against tetraspanins as an interesting strategy to restrict HIV-1 infection.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

HS wrote the manuscript and designed the figures. VR-P conceived and edited the manuscript. SA commented and edited the manuscript. MY-M conceived and edited the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Cabañas for critical reading of the manuscript.

FUNDING

This work was supported by grants BFU2014-55478-R; BIO2017-86500-R; Fundación Ramón Areces and RYC-2012-11025 to MY-M; and was co-funded by Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). HS was supported by a FPI-UAM Fellowship.

REFERENCES

- Engelman A, Cherepanov P. The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. *Nat Rev Microbiol* (2012) 10(4):279–90. doi:10.1038/nrmicro2747
- Wilen CB, Tilton JC, Doms RW. HIV: cell binding and entry. *Cold Spring Harb Perspect Med* (2012) 2(8):a006866. doi:10.1101/cshperspect.a006866
- Li G, De Clercq E. HIV genome-wide protein associations: a review of 30 years of research. *Microbiol Mol Biol Rev* (2016) 80(3):679–731. doi:10.1128/MMBR.00065-15

4. Power RA, Davaniah S, Derache A, Wilkinson E, Tanser F, Gupta RK, et al. Genome-wide association study of HIV whole genome sequences validated using drug resistance. *PLoS One* (2016) 11(9):e0163746. doi:10.1371/journal.pone.0163746
5. Kijewski SD, Gummuluru S. A mechanistic overview of dendritic cell-mediated HIV-1 trans infection: the story so far. *Future Virol* (2015) 10(3):257–69. doi:10.2217/fvl.15.2
6. McDonald D. Dendritic cells and HIV-1 trans-infection. *Viruses* (2010) 2(8):1704–17. doi:10.3390/v2081704
7. Izquierdo-Useros N, Lorizate M, Puertas MC, Rodriguez-Plata MT, Zangger N, Erikson E, et al. Siglec-1 is a novel dendritic cell receptor that mediates HIV-1 trans-infection through recognition of viral membrane gangliosides. *PLoS Biol* (2012) 10(12):e1001448. doi:10.1371/journal.pbio.1001448
8. Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2000) 1(1):31–9. doi:10.1038/35036052
9. Yáñez-Mó M, Barreiro O, Gordon-Alonso M, Sala-Valdés M, Sánchez-Madrid F. Tetraspanin-enriched microdomains: a functional unit in cell plasma membranes. *Trends Cell Biol* (2009) 19(9):434–46. doi:10.1016/j.tcb.2009.06.004
10. Ono A. Relationships between plasma membrane microdomains and HIV-1 assembly. *Biol Cell* (2010) 102(6):335–50. doi:10.1042/BC20090165
11. Simons K, Sampaio JL. Membrane organization and lipid rafts. *Cold Spring Harb Perspect Biol* (2011) 3(10):a004697. doi:10.1101/cshperspect.a004697
12. Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* (1997) 387(6633):569–72. doi:10.1038/42408
13. Langhorst MF, Reuter A, Stuermer CA. Scaffolding microdomains and beyond: the function of reggie/flotillin proteins. *Cell Mol Life Sci* (2005) 62(19–20):2228–40. doi:10.1007/s00018-005-5166-4
14. Parton RG, Simons K. The multiple faces of caveolae. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2007) 8(3):185–94. doi:10.1038/nrm2122
15. Resh MD. Covalent lipid modifications of proteins. *Curr Biol* (2013) 23(10):R431–5. doi:10.1016/j.cub.2013.04.024
16. Yang X, Claas C, Kraeft SK, Chen LB, Wang Z, Kreidberg JA, et al. Palmitoylation of tetraspanin proteins: modulation of CD151 lateral interactions, subcellular distribution, and integrin-dependent cell morphology. *Mol Biol Cell* (2002) 13(3):767–81. doi:10.1091/mbc.01-05-0275
17. Baker AM, Saulière A, Gaibelet G, Lagane B, Mazères S, Fourage M, et al. CD4 interacts constitutively with multiple CCR5 at the plasma membrane of living cells. A fluorescence recovery after photobleaching at variable radii approach. *J Biol Chem* (2007) 282(48):35163–8. doi:10.1074/jbc.M705617200
18. Cambi A, de Lange F, van Maarseveen NM, Nijhuis M, Joosten B, van Dijk EM, et al. Microdomains of the C-type lectin DC-SIGN are portals for virus entry into dendritic cells. *J Cell Biol* (2004) 164(1):145–55. doi:10.1083/jcb.200306112
19. Beck Z, Balogh A, Kis A, Izsépi E, Cervenak L, László G, et al. New cholesterol-specific antibodies remodel HIV-1 target cells' surface and inhibit their in vitro virus production. *J Lipid Res* (2010) 51(2):286–96. doi:10.1194/jlr.M000372
20. Mañes S, del Real G, Lacalle RA, Lucas P, Gómez-Moutón C, Sánchez-Palomino S, et al. Membrane raft microdomains mediate lateral assemblies required for HIV-1 infection. *EMBO Rep* (2000) 1(2):190–6. doi:10.1093/embo-reports/kvd025
21. Spear M, Guo J, Wu Y. The trinity of the cortical actin in the initiation of HIV-1 infection. *Retrovirology* (2012) 9:45. doi:10.1186/1742-4690-9-45
22. Imai T, Kakizaki M, Nishimura M, Yoshie O. Molecular analyses of the association of CD4 with two members of the transmembrane 4 superfamily, CD81 and CD82. *J Immunol* (1995) 155(3):1229–39.
23. Imai T, Yoshie O. C33 antigen and M38 antigen recognized by monoclonal antibodies inhibitory to syncytium formation by human T cell leukemia virus type 1 are both members of the transmembrane 4 superfamily and associate with each other and with CD4 or CD8 in T cells. *J Immunol* (1993) 151(11):6470–81.
24. Gordón-Alonso M, Yáñez-Mó M, Barreiro O, Alvarez S, Muñoz-Fernández MA, Valenzuela-Fernández A, et al. Tetraspanins CD9 and CD81 modulate HIV-1-induced membrane fusion. *J Immunol* (2006) 177(8):5129–37. doi:10.4049/jimmunol.177.8.5129
25. Fournier M, Peyrou M, Bourgoïn L, Maeder C, Tchou I, Foti M. CD4 dimerization requires two cysteines in the cytoplasmic domain of the molecule and occurs in microdomains distinct from lipid rafts. *Mol Immunol* (2010) 47(16):2594–603. doi:10.1016/j.molimm.2010.06.010
26. Florin L, Lang T. Tetraspanin assemblies in virus infection. *Front Immunol* (2018) 9:1140. doi:10.3389/fimmu.2018.01140
27. Hogue IB, Grover JR, Soheilian F, Nagashima K, Ono A. Gag induces the coalescence of clustered lipid rafts and tetraspanin-enriched microdomains at HIV-1 assembly sites on the plasma membrane. *J Virol* (2011) 85(19):9749–66. doi:10.1128/JVI.00743-11
28. Yoshida T, Ebina H, Koyanagi Y. N-linked glycan-dependent interaction of CD63 with CXCR4 at the Golgi apparatus induces downregulation of CXCR4. *Microbiol Immunol* (2009) 53(11):629–35. doi:10.1111/j.1348-0421.2009.00167.x
29. Yoshida T, Kawano Y, Sato K, Ando Y, Aoki J, Miura Y, et al. A CD63 mutant inhibits T-cell tropic human immunodeficiency virus type 1 entry by disrupting CXCR4 trafficking to the plasma membrane. *Traffic* (2008) 9(4):540–58. doi:10.1111/j.1600-0854.2008.00700.x
30. Yoshida N, Kitayama D, Arima M, Sakamoto A, Inamine A, Watanabe-Takano H, et al. CXCR4 expression on activated B cells is downregulated by CD63 and IL-21. *J Immunol* (2011) 186(5):2800–8. doi:10.4049/jimmunol.1003401
31. Rocha-Perugini V, Gordon-Alonso M, Sanchez-Madrid F. PIP2: choreographer of actin-adaptor proteins in the HIV-1 dance. *Trends Microbiol* (2014) 22(7):379–88. doi:10.1016/j.tim.2014.03.009
32. Menager MM, Littman DR. Actin dynamics regulates dendritic cell-mediated transfer of HIV-1 to T cells. *Cell* (2016) 164(4):695–709. doi:10.1016/j.cell.2015.12.036
33. Menager MM. TSPAN7, effector of actin nucleation required for dendritic cell-mediated transfer of HIV-1 to T cells. *Biochem Soc Trans* (2017) 45(3):703–8. doi:10.1042/BST20160439
34. Vorster PJ, Guo J, Yoder A, Wang W, Zheng Y, Xu X, et al. LIM kinase 1 modulates cortical actin and CXCR4 cycling and is activated by HIV-1 to initiate viral infection. *J Biol Chem* (2011) 286(14):12554–64. doi:10.1074/jbc.M110.182238
35. Jiménez-Baranda S, Gómez-Moutón C, Rojas A, Martínez-Prats L, Mira E, Ana Lacalle R, et al. Filamin-A regulates actin-dependent clustering of HIV receptors. *Nat Cell Biol* (2007) 9(7):838–46. doi:10.1038/ncb1610
36. Rocha-Perugini V, Sanchez-Madrid F, Martínez Del Hoyo G. Function and dynamics of tetraspanins during antigen recognition and immunological synapse formation. *Front Immunol* (2015) 6:653. doi:10.3389/fimmu.2015.00653
37. Liu WM, Zhang F, Moshiaich S, Zhou B, Huang C, Srinivasan K, et al. Tetraspanin CD82 inhibits protrusion and retraction in cell movement by attenuating the plasma membrane-dependent actin organization. *PLoS One* (2012) 7(12):e51797. doi:10.1371/journal.pone.0051797
38. Tejera E, Rocha-Perugini V, López-Martín S, Pérez-Hernández D, Bachir AI, Horwitz AR, et al. CD81 regulates cell migration through its association with Rac GTPase. *Mol Biol Cell* (2013) 24(3):261–73. doi:10.1091/mbc.E12-09-0642
39. Fievet BT, Gautreau A, Roy C, Del Maestro L, Mangeat P, Louvard D, et al. Phosphoinositide binding and phosphorylation act sequentially in the activation mechanism of ezrin. *J Cell Biol* (2004) 164(5):653–9. doi:10.1083/jcb.200307032
40. Barrero-Villar M, Cabrero JR, Gordón-Alonso M, Barroso-González J, Alvarez-Losada S, Muñoz-Fernández MA, et al. Moesin is required for HIV-1-induced CD4-CXCR4 interaction, F-actin redistribution, membrane fusion and viral infection in lymphocytes. *J Cell Sci* (2009) 122(Pt 1):103–13. doi:10.1242/jcs.035873
41. Capalbo G, Mueller-Kuller T, Markovic S, Klein SA, Dietrich U, Hoelzer D, et al. Knockdown of ERM family member moesin in host cells increases HIV type 1 replication. *AIDS Res Hum Retroviruses* (2011) 27(12):1317–22. doi:10.1089/aid.2010.0147
42. Naghavi MH, Valente S, Hatzioannou T, de Los Santos K, Wen Y, Mott C, et al. Moesin regulates stable microtubule formation and limits retroviral infection in cultured cells. *EMBO J* (2007) 26(1):41–52. doi:10.1038/sj.emboj.7601475
43. Haedicke J, de Los Santos K, Goff SP, Naghavi MH. The Ezrin-radixin-moesin family member ezrin regulates stable microtubule formation and retroviral infection. *J Virol* (2008) 82(9):4665–70. doi:10.1128/JVI.02403-07
44. Sala-Valdés M, Ursa A, Charrin S, Rubinstein E, Hemler ME, Sánchez-Madrid F, et al. EWI-2 and EWI-F link the tetraspanin web to the actin

- cytoskeleton through their direct association with ezrin-radixin-moesin proteins. *J Biol Chem* (2006) 281(28):19665–75. doi:10.1074/jbc.M602116200
45. Corgan AM, Singleton C, Santos CB, Greenwood JA. Phosphoinositides differentially regulate alpha-actinin flexibility and function. *Biochem J* (2004) 378(Pt 3):1067–72. doi:10.1042/bj20031124
 46. Gordón-Alonso M, Sala-Valdés M, Rocha-Perugini V, Pérez-Hernández D, López-Martín S, Ursa A, et al. EWI-2 association with alpha-actinin regulates T cell immune synapses and HIV viral infection. *J Immunol* (2012) 189(2):689–700. doi:10.4049/jimmunol.1103708
 47. Gordón-Alonso M, Rocha-Perugini V, Álvarez S, Ursa A, Izquierdo-Useros N, Martínez-Picado J, et al. Actin-binding protein drebrin regulates HIV-1-triggered actin polymerization and viral infection. *J Biol Chem* (2013) 288(39):28382–97. doi:10.1074/jbc.M113.494906
 48. Yoder A, Yu D, Dong L, Iyer SR, Xu X, Kelly J, et al. HIV envelope-CXCR4 signaling activates cofilin to overcome cortical actin restriction in resting CD4 T cells. *Cell* (2008) 134(5):782–92. doi:10.1016/j.cell.2008.06.036
 49. García-Expósito L, Ziglio S, Barroso-González J, de Armas-Rillo L, Valera MS, Zipeto D, et al. Gelsolin activity controls efficient early HIV-1 infection. *Retrovirology* (2013) 10:39. doi:10.1186/1742-4690-10-39
 50. Gaudin R, de Alencar BC, Arhel N, Benaroch P. HIV trafficking in host cells: motors wanted! *Trends Cell Biol* (2013) 23(12):652–62. doi:10.1016/j.tcb.2013.09.004
 51. Lukic Z, Dharan A, Fricke T, Diaz-Griffero F, Campbell EM. HIV-1 uncoating is facilitated by dynein and kinesin 1. *J Virol* (2014) 88(23):13613–25. doi:10.1128/JVI.02219-14
 52. Izquierdo-Useros N, Blanco J, Erkizia I, Fernández-Figueras MT, Borrás FE, Naranjo-Gómez M, et al. Maturation of blood-derived dendritic cells enhances human immunodeficiency virus type 1 capture and transmission. *J Virol* (2007) 81(14):7559–70. doi:10.1128/JVI.02572-06
 53. Yu HJ, Reuter MA, McDonald D. HIV traffics through a specialized, surface-accessible intracellular compartment during trans-infection of T cells by mature dendritic cells. *PLoS Pathog* (2008) 4(8):e1000134. doi:10.1371/journal.ppat.1000134
 54. Wiley RD, Gummuluru S. Immature dendritic cell-derived exosomes can mediate HIV-1 trans infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2006) 103(3):738–43. doi:10.1073/pnas.0507995103
 55. Izquierdo-Useros N, Naranjo-Gómez M, Erkizia I, Puertas MC, Borrás FE, Blanco J, et al. HIV and mature dendritic cells: Trojan exosomes riding the Trojan horse? *PLoS Pathog* (2010) 6(3):e1000740. doi:10.1371/journal.ppat.1000740
 56. Kulkarni R, Prasad A. Exosomes derived from HIV-1 infected DCs mediate viral trans-infection via fibronectin and galectin-3. *Sci Rep* (2017) 7(1):14787. doi:10.1038/s41598-017-14817-8
 57. García JV, Alfano J, Miller AD. The negative effect of human immunodeficiency virus type 1 Nef on cell surface CD4 expression is not species specific and requires the cytoplasmic domain of CD4. *J Virol* (1993) 67(3):1511–6.
 58. Grzesiek S, Stahl SJ, Wingfield PT, Bax A. The CD4 determinant for down-regulation by HIV-1 Nef directly binds to Nef. Mapping of the Nef binding surface by NMR. *Biochemistry* (1996) 35(32):10256–61. doi:10.1021/bi9611164
 59. Ren X, Park SY, Bonifacino JS, Hurlley JH. How HIV-1 Nef hijacks the AP-2 clathrin adaptor to downregulate CD4. *Elife* (2014) 3:e01754. doi:10.7554/eLife.01754
 60. Dirk BS, Pawlak EN, Johnson AL, Van Nynatten LR, Jacob RA, Heit B, et al. HIV-1 Nef sequesters MHC-I intracellularly by targeting early stages of endocytosis and recycling. *Sci Rep* (2016) 6:37021. doi:10.1038/srep37021
 61. Sugden SM, Bego MG, Pham TN, Cohen EA. Remodeling of the host cell plasma membrane by HIV-1 Nef and Vpu: a strategy to ensure viral fitness and persistence. *Viruses* (2016) 8(3):67. doi:10.3390/v8030067
 62. Sato K, Aoki J, Misawa N, Daikoku E, Sano K, Tanaka Y, et al. Modulation of human immunodeficiency virus type 1 infectivity through incorporation of tetraspanin proteins. *J Virol* (2008) 82(2):1021–33. doi:10.1128/JVI.01044-07
 63. Haller C, Müller B, Fritz JV, Lamas-Murua M, Stolp B, Pujol FM, et al. HIV-1 Nef and Vpu are functionally redundant broad-spectrum modulators of cell surface receptors, including tetraspanins. *J Virol* (2014) 88(24):14241–57. doi:10.1128/JVI.02333-14
 64. Lambel M, Koppensteiner H, Symeonides M, Roy NH, Chan J, Schindler M, et al. Vpu is the main determinant for tetraspanin downregulation in HIV-1-infected cells. *J Virol* (2015) 89(6):3247–55. doi:10.1128/JVI.03719-14
 65. Meroni L, Milazzo L, Menzaghi B, Mazzucchelli R, Mologni D, Morelli P, et al. Altered expression of the tetraspanin CD81 on B and T lymphocytes during HIV-1 infection. *Clin Exp Immunol* (2007) 147(1):53–9. doi:10.1111/j.1365-2249.2006.03250.x
 66. Sundquist WI, Krausslich HG. HIV-1 assembly, budding, and maturation. *Cold Spring Harb Perspect Med* (2012) 2(7):a006924. doi:10.1101/cshperspect.a006924
 67. Murakami T. Roles of the interactions between Env and Gag proteins in the HIV-1 replication cycle. *Microbiol Immunol* (2008) 52(5):287–95. doi:10.1111/j.1348-0421.2008.00008.x
 68. Jolly C, Sattentau QJ. Human immunodeficiency virus type 1 assembly, budding, and cell-cell spread in T cells take place in tetraspanin-enriched plasma membrane domains. *J Virol* (2007) 81(15):7873–84. doi:10.1128/JVI.01845-06
 69. Nydegger S, Khurana S, Kremontsov DN, Foti M, Thali M. Mapping of tetraspanin-enriched microdomains that can function as gateways for HIV-1. *J Cell Biol* (2006) 173(5):795–807. doi:10.1083/jcb.200508165
 70. Freed EO. HIV-1 assembly, release and maturation. *Nat Rev Microbiol* (2015) 13(8):484–96. doi:10.1038/nrmicro3490
 71. Grigorov B, Attuil-Audenis V, Perugi F, Nedelec M, Watson S, Pique C, et al. A role for CD81 on the late steps of HIV-1 replication in a chronically infected T cell line. *Retrovirology* (2009) 6:28. doi:10.1186/1742-4690-6-28
 72. Ruiz-Mateos E, Pelchen-Matthews A, Deneka M, Marsh M. CD63 is not required for production of infectious human immunodeficiency virus type 1 in human macrophages. *J Virol* (2008) 82(10):4751–61. doi:10.1128/JVI.02320-07
 73. Deneka M, Pelchen-Matthews A, Byland R, Ruiz-Mateos E, Marsh M. In macrophages, HIV-1 assembles into an intracellular plasma membrane domain containing the tetraspanins CD81, CD9, and CD53. *J Cell Biol* (2007) 177(2):329–41. doi:10.1083/jcb.200609050
 74. Pelchen-Matthews A, Giese S, Mlčochová P, Turner J, Marsh M. β 2 integrin adhesion complexes maintain the integrity of HIV-1 assembly compartments in primary macrophages. *Traffic* (2012) 13(2):273–91. doi:10.1111/j.1600-0854.2011.01306.x
 75. Marsh M, Theusner K, Pelchen-Matthews A. HIV assembly and budding in macrophages. *Biochem Soc Trans* (2009) 37(Pt 1):185–9. doi:10.1042/BST0370185
 76. Fassati A. Multiple roles of the capsid protein in the early steps of HIV-1 infection. *Virus Res* (2012) 170(1–2):15–24. doi:10.1016/j.virusres.2012.09.012
 77. Campbell EM, Hope TJ. HIV-1 capsid: the multifaceted key player in HIV-1 infection. *Nat Rev Microbiol* (2015) 13(8):471–83. doi:10.1038/nrmicro3503
 78. Jayappa KD, Ao Z, Yao X. The HIV-1 passage from cytoplasm to nucleus: the process involving a complex exchange between the components of HIV-1 and cellular machinery to access nucleus and successful integration. *Int J Biochem Mol Biol* (2012) 3(1):70–85.
 79. Endsley MA, Somasunderam AD, Li G, Oezguen N, Thivyanathan V, Murray JL, et al. Nuclear trafficking of the HIV-1 pre-integration complex depends on the ADAM10 intracellular domain. *Virology* (2014) 45(4–455):60–6. doi:10.1016/j.virol.2014.02.006
 80. Matthews AL, Szyroka J, Collier R, Noy PJ, Tomlinson MG. Scissor sisters: regulation of ADAM10 by the TspanC8 tetraspanins. *Biochem Soc Trans* (2017) 45(3):719–30. doi:10.1042/BST20160290
 81. Arhel N. Revisiting HIV-1 uncoating. *Retrovirology* (2010) 7:96. doi:10.1186/1742-4690-7-96
 82. Hilditch L, Towers GJ. A model for cofactor use during HIV-1 reverse transcription and nuclear entry. *Curr Opin Virol* (2014) 4:32–6. doi:10.1016/j.coviro.2013.11.003
 83. Iordanskiy S, Bukrinsky M. Reverse transcription complex: the key player of the early phase of HIV replication. *Future Virol* (2007) 2(1):49–64. doi:10.2217/17460794.2.1.49
 84. Li G, Dziuba N, Friedrich B, Murray JL, Ferguson MR. A post-entry role for CD63 in early HIV-1 replication. *Virology* (2011) 412(2):315–24. doi:10.1016/j.virol.2011.01.017
 85. Fu E, Pan L, Xie Y, Mu D, Liu W, Jin F, et al. Tetraspanin CD63 is a regulator of HIV-1 replication. *Int J Clin Exp Pathol* (2015) 8(2):1184–98.
 86. Li G, Endsley MA, Somasunderam A, Gbota SL, Mbaka MI, Murray JL, et al. The dual role of tetraspanin CD63 in HIV-1 replication. *Virol J* (2014) 11:23. doi:10.1186/1743-422X-11-23

87. Rocha-Perugini V, Suárez H, Álvarez S, López-Martín S, Lenzi GM, Vences-Catalán F, et al. CD81 association with SAMHD1 enhances HIV-1 reverse transcription by increasing dNTP levels. *Nat Microbiol* (2017) 2(11):1513–22. doi:10.1038/s41564-017-0019-0
88. Franzolin E, Pontarin G, Rampazzo C, Miazzi C, Ferraro P, Palumbo E, et al. The deoxynucleotide triphosphohydrolase SAMHD1 is a major regulator of DNA precursor pools in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2013) 110(35):14272–7. doi:10.1073/pnas.1312033110
89. Daddacha W, Koyen AE, Bastien AJ, Head PE, Dhere VR, Nabeta GN, et al. SAMHD1 promotes DNA end resection to facilitate DNA repair by homologous recombination. *Cell Rep* (2017) 20(8):1921–35. doi:10.1016/j.celrep.2017.08.008
90. Cabello-Lobato MJ, Wang S, Schmidt CK. SAMHD1 sheds moonlight on DNA double-strand break repair. *Trends Genet* (2017) 33(12):895–7. doi:10.1016/j.tig.2017.09.007
91. Ryoo J, Choi J, Oh C, Kim S, Seo M, Kim SY, et al. The ribonuclease activity of SAMHD1 is required for HIV-1 restriction. *Nat Med* (2014) 20(8):936–41. doi:10.1038/nm.3626
92. Welbourn S, Strebel K. Low dNTP levels are necessary but may not be sufficient for lentiviral restriction by SAMHD1. *Virology* (2016) 488:271–7. doi:10.1016/j.virol.2015.11.022
93. Ballana E, Este JA. SAMHD1: at the crossroads of cell proliferation, immune responses, and virus restriction. *Trends Microbiol* (2015) 23(11):680–92. doi:10.1016/j.tim.2015.08.002
94. Hansen EC, Seamon KJ, Cravens SL, Stivers JT. GTP activator and dNTP substrates of HIV-1 restriction factor SAMHD1 generate a long-lived activated state. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2014) 111(18):E1843–51. doi:10.1073/pnas.1401706111
95. Cribrier A, Descours B, Valadão AL, Laguette N, Benkirane M. Phosphorylation of SAMHD1 by cyclin A2/CDK1 regulates its restriction activity toward HIV-1. *Cell Rep* (2013) 3(4):1036–43. doi:10.1016/j.celrep.2013.03.017
96. Coiras M, Bermejo M, Descours B, Mateos E, García-Pérez J, López-Huertas MR, et al. IL-7 induces SAMHD1 phosphorylation in CD4+ T lymphocytes, improving early steps of HIV-1 life cycle. *Cell Rep* (2016) 14(9):2100–7. doi:10.1016/j.celrep.2016.02.022
97. Lee EJ, Seo JH, Park JH, Vo TTL, An S, Bae SJ, et al. SAMHD1 acetylation enhances its deoxynucleotide triphosphohydrolase activity and promotes cancer cell proliferation. *Oncotarget* (2017) 8(40):68517–29. doi:10.18632/oncotarget.19704
98. Mauney CH, Rogers LC, Harris RS, Daniel LW, Devarie-Baez NO, Wu H, et al. The SAMHD1 dNTP triphosphohydrolase is controlled by a redox switch. *Antioxid Redox Signal* (2017) 27(16):1317–31. doi:10.1089/ars.2016.6888
99. Baldauf HM, Pan X, Erikson E, Schmidt S, Daddacha W, Burggraf M, et al. SAMHD1 restricts HIV-1 infection in resting CD4(+) T cells. *Nat Med* (2012) 18(11):1682–7. doi:10.1038/nm.2964
100. Brandariz-Núñez A, Valle-Casuso JC, White TE, Laguette N, Benkirane M, Brojatsch J, et al. Role of SAMHD1 nuclear localization in restriction of HIV-1 and SIVmac. *Retrovirology* (2012) 9:49. doi:10.1186/1742-4690-9-49
101. Laguette N, Sobhian B, Casartelli N, Ringeard M, Chable-Bessia C, Ségéral E, et al. SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature* (2011) 474(7353):654–7. doi:10.1038/nature10117
102. Bruner KM, Hosmane NN, Siliciano RF. Towards an HIV-1 cure: measuring the latent reservoir. *Trends Microbiol* (2015) 23(4):192–203. doi:10.1016/j.tim.2015.01.013

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Suárez, Rocha-Perugini, Álvarez and Yáñez-Mó. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.