



Universidad Autónoma de Madrid
Departamento de Bioquímica

TESIS DOCTORAL

“La sinapsis inmune: papel de clatrina como remodeladora del citoesqueleto de actina y posible vía de transmisión de infecciones bacterianas”

Carmen Calabia Linares

Madrid, 2012

.



Departamento de Bioquímica.
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid

TESIS DOCTORAL

“La sinapsis inmune: papel de clatrina como remodeladora del citoesqueleto de actina y posible vía de transmisión de infecciones bacterianas”

Memoria presentada por la licenciada en Medicina:

Carmen Calabia Linares
para optar al grado de
Doctora en Medicina

Directores de tesis:

Francisco Sánchez Madrid
Catedrático de Inmunología de la Universidad Autónoma de Madrid

Esteban Veiga Chacón
Científico Titular CSIC

Lugar de realización: Hospital de La Princesa, servicio de Inmunología.



CERTIFICADO DEL TUTOR Y DE LOS DIRECTORES DE TESIS

Amparo Cano García, Doctora en Ciencias Biológicas y Catedrática de Bioquímica de la Universidad Autónoma de Madrid, Francisco Sánchez-Madrid, Doctor en Ciencias Biológicas y Catedrático de Inmunología de la Universidad Autónoma de Madrid , y Esteban Veiga Chacón, Doctor en Ciencias Biológicas y Científico Titular del CSIC

CERTIFICAN: que Carmen Calabia Linares, licenciada en Medicina por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo de investigación correspondiente a su Tesis Doctoral con el título: *La sinapsis inmune: papel de clatrina como remodeladora del citoesqueleto de actina y posible vía de transmisión de infecciones bacterianas.*

Revisado este trabajo, los que suscriben consideran el trabajo realizado satisfactorio y autorizan su presentación para ser juzgado.

Y para que así conste y a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Madrid a de Octubre de 2012.

Amparo Cano García

Francisco Sánchez-Madrid

Esteban Veiga Chacón

Agradecimientos

“Cada día vamos a nuestro trabajo esperando descubrir -con la esperanza que alguien, no importa quién, descubra una solución a uno de los principales problemas- y cada día de éxito volvemos a nuestra tarea con fuerzas renovadas; e incluso en los días sin éxito, nuestro trabajo no ha sido en vano, en estos esfuerzos, hemos encontrado horas de placer inenarrable, y hemos dirigido nuestras energías al beneficio de la humanidad”

Nicola Tesla 1891

Antes de nada, agradecer a mis padres y familia el apoyo y la comprensión de estos años. No habría sido posible nada sin ellos. Son y han sido un ejemplo en el que fijarse tanto en la vida como en el trabajo.

Al Doctor Sánchez-Madrid, agradecerle haber podido realizar este trabajo en su laboratorio y formar parte de su grupo, un gran científico, director y persona, a cuyo nombre ha sido un honor haber estado ligada estos años.

Al Doctor Esteban Veiga, un gran científico y ser humano. Gracias por todo tu apoyo, más amigo que jefe, y por tu confianza y paciencia (muchacha). Y por la dedicación a mi formación, todas las horas dedicadas a aprender todo lo que aquí aparece, y a enseñarme que si se puede hacer, es obligación intentarlo sin miedo. Un maestro al que le esperan con seguridad grandes logros en su nueva etapa “Cristinera” con su Veiga Lab de galácticos: Arantxi (aún recuerdo en el citómetro una chica que se peleaba con paneles donde ponía CD69 por todos lados), Moni y Guille.

Soy la chica de las fotos, no de los nombres, así que siempre he temido el momento de escribir esto porque sé que se me escapará alguien. Todo este trabajo es el resultado de la ayuda y las enseñanzas de mucha gente de muchos sitios muchos años.

Desde los primeros días en el hospital, cuando empezaba con la ayuda de las chicas de rutina: Toñi, Pilar Cañas, Ana (sobre todo, Ana) y Cecilia coordinando todo. Aterrizando en el Pacos 1, todos bien juntitos, con Monica (un modelo a seguir en este mundillo) y Martita, junto a Javi y Manu (aun creo oír su risa a veces por el pasillo), compartiendo bench con Morlino (cachimbrella), con la ayuda inestimable de Ursa (wikipedia del labo, toda una institución). Nuestros vecinos del 2, Roman (y el agujetas), Ana U y Norman, Manolo (¡hala Madrid!) Hortensia y Amalia (orden ante todo). Los CNICeros, Vera, Fran, Cristina la prima, Almu, Olga, Danay, Gloria, Mittel, Sales,..... sin olvidar al Mymo's Lab, con la Dra Yañez-Mó (otra maestra de la ciencia, y de la vida misma), Emilio y sus historias rocambolescas, Monica (siempre risueña contando sus aventuras) y más tarde Soraya (la alegría del laboratorio), que luego serían compañeros de labo en O'Donnell. ¡¡Y las incorporaciones!!! El Norte, con Miguel y sus chicas (bueno, y Alvaro).

Que no se queden atrás ni los Cecilio, Manu (un buen tipo), Sonia en esos 1os años y mi corresi Carlos, ni los siguientes residentes que llegaron: Sara, Paco, Edu, Dani, Ali....¡Larga vida a la inmuno! Tampoco se escapan de los agradecimientos nuestros vecinos de esta comunidad: MOLES. A todos y cada uno de ellos con los que he tenido la suerte de coincidir, Ferni, Angel, Ainara, Esther, Raquel, Alicia...los que se quedaron en la price y los que me acompañaron abajo hacia O'Donnell. Y los vecinos del 9º, Marta, Maria Luisa, Samu Torpedo, Iñaki, Pedro, Paqui, Elena...A todos ellos, gracias por estos años tan maravillosos.

¡¡¡GRACIAS!!! A todos los compañeros de batallas, por estos años, por la suerte de haber podido compartirlos con vosotros, por haberos tenido de compañeros de viaje. Os llevo conmigo, en fotos y en imágenes congeladas (bueno, vitrificadas, para que no se formen cristales de hielo) en el corazón, que ahí no se borra ni entran virus. !!SOIS LOS MEJORES, NO CAMBIEIS!!

Resumen

La interacción antígeno-específica de los linfocitos T con células presentadoras de antígeno (APCs) conlleva importantes cambios morfológicos y funcionales en las células T, incluyendo una acumulación masiva de actina en la sinapsis inmune (SI) que se define como el el área de contacto entre ambas células. Este trabajo muestra, usando líneas celulares T y APC, y también células primarias, que clatrina, una proteína estudiada en procesos endocíticos, dirige la acumulación de actina en la SI. Clatrina se recluta hacia la IS con una cinética paralela a la de actina. El silenciamiento de clatrina previene la acumulación de actina y otras proteínas implicadas en la polimerización de actina en la SI, como dinamina-2 o el complejo Arp2/3; sin afectar la expresión de proteínas relacionadas con la formación de la SI. El reservorio de clatrina relacionado con la acumulación de actina en la SI está asociado a los cuerpos multivesiculares que se polarizan a la zona de contacto intercelular, pero no a la membrana plasmática o el complejo Golgi. Estos datos destacan el papel de clatrina como plataforma para el reclutamiento de proteínas que promueven la polimerización de actina en el contacto entre la célula T y la APC.

En este trabajo también exploramos la posibilidad de que la SI sea una nueva vía de diseminación bacteriana. Mostramos que el contacto entre una DC infectada y una célula T permite el paso del patógeno a la célula T. Este trabajo descubre una nueva vía de diseminación bacteriana y abre líneas de investigación en la relación patógeno hospedador.

Abstract

Antigen-specific cognate interaction of T lymphocytes with antigen-presenting cells (APCs) involves morphological and functional changes in T cells, including massive actin accumulation at the immune synapse (IS) defined as the contact area between both cells. This work shows, using APC and T cell lines as well as primary cells, that clathrin, a protein studied in endocytic processes, drives actin accumulation at the IS. Clathrin is recruited towards the IS with parallel kinetics to that of actin. Silencing clathrin prevents accumulation of actin and other proteins involved in actin polymerization, such as dynamin-2, and the Arp2/3 complex; without affecting the expression of proteins involved in the formation of the IS. The clathrin pool involved in actin accumulation at the IS is linked to multivesicular bodies that polarize to the contact zone, but not to plasma membrane or Golgi complex. These data underscore the role of clathrin as a platform for the recruitment of proteins that promote actin polymerization at the interface of T cells and APCs.

In this work we explore the possibility that the IS could be a new way of bacterial dissemination. We show that the contact between an infected DC and a T cell permits the transfer of the pathogen to the T cell. This work discovers a new way of bacteria spreading and opens research lines in the relation between pathogens and host.

Abreviaturas

2ME: beta mercaptoetanol

AcUr: acetato de uranilo

AP: proteínas adaptadoras de clatrina

AP-1: proteína adaptadora 1

AP-2: proteína adaptadora 2

APC: célula presentadora de antígeno

BHI: infusión de cerebro y corazón

CCR7: receptor 7 de quimiocinas (motivo C-C)

CHC17: isoforma 17 de cadena pesada de clatrina

CHC22: isoforma 22 de cadena pesada de clatrina

CMAC: 7-amino-clorometilcumarínico

CXCR4: Receptor 4 de quimiocinas (motivo C-X-C)

DC: célula dendrítica

DC SIGN: molécula 3 de adhesión intercelular específico de dendríticas no integrina

Drp1: proteína parecida a Dinamina 1

ERK: quinasas reguladas por señales extracelulares

ESCRT: transporte selectivo de endosomas dependiente de carga

FBS: suero fetal bovino

Fyn: proto-oncogén tirosín kinasa codificada por el gen *fyn*

GEF: factores de intercambio de nucleótido guanina

GFP: proteína fluorescente verde

GMCSF: factor estimulador de formación de colonias

HEV: vénulas de endotelio alto

HLA-DR: complejo MHC-II

Hrs: sustrato de tirosin quinasa del recetor del factor de crecimiento de hepatocitos

ICAM 1 , 2 ,3: molécula de adhesión intercelular 1, 2, 3

IL2: interleuquina 2

Itk: kinasa de célula T inducible por IL-2

kDa: kiloDalton

LAT: linker de células T activadas

LB: medio de cultivo Luria Bertani

LCa: isotipo α de la cadena ligera de clatrina

Lck: tirosin kinasa específica de linfocitos

LFA-1: antígeno asociado de función linfocitaria 1

MHC-II: complejo mayor de histocompatibilidad tipo II

MTOC: centro organizador de microtúbulos

MVB: cuerpos multivesiculares

Nck: región no catalítica tirosin kinasa

NPF: factores promotores de nucleación

OVA: péptido de ovalbúmina (323-339)

PBL: linfocitos de sangre periférica

PBMC: célula mononucleares de sangre periférica

PBS: tampón salino de fosfato

PE: ficoeritrina

PI3K: fosfatidil inositol 3 kinasa

PLC gamma: fosfolipasa C gamma

PtdINS: fosfatidil inositol

Rap1: proteína asociada a Ras

SCV: vacuola que contiene *Salmonella*

SD: desviación estándar

SDF1- α : factor derivado de células estromales alfa

SEE: Enterotoxina E de *Staphylococcus* (llamado superantígeno E)

SI: sinapsis inmune

SLC: quimiocina de ganglio linfático secundario

SLP76: proteína de linfocito de 76 kDa contenedora de dominio SH-2

SMAC: complejo supramolecular de activación

pSMAC: complejo supramolecular de activación periférico

cSMAC: complejo supramolecular de activación central

Src: tirosin quinasa src

SV: sinapsis virológica

TCR : receptor de célula T

TGN: red trans-Golgi

Vav1: factor de intercambio de nucleótido

VLA4: Integrina alfa4beta1 (antígeno muy tardío 4)

VSP4: proteína de separación vacuolar 4

WASp: proteína síndrome Wiscott Aldrich

WIP: proteína de interacción con WASp

ZAP70: quinasa asociada a la cadena Z-70

Índice

Abreviaturas

9

Introducción

1 La sinapsis inmune

1.1 Estructura de la sinapsis inmune 16

1.2 Polimerización de actina en la sinapsis inmune 18

1.3 Clatrina y citoesqueleto de actina 20

2 La presentación antigénica

2.1 Barreras defensivas frente a la infección 22

2.2 Presentación antigénica en el ganglio linfático 23

2.3 DC infectadas y linfocitos T 26

Objetivos

28

Materiales y métodos

31

Resultados

1 Papel de la clatrina en la sinapsis inmune

1.1 Clatrina se polariza hacia la sinapsis inmune 46

1.2 Clatrina es necesaria para la acumulación de actina en la sinapsis inmune 48

1.3 Clatrina es necesaria para el reclutamiento en la SI de la maquinaria molecular involucrada en la polimerización de actina. 52

1.4 La clatrina endosomal dirige la reorganización del citoesqueleto de actina en la sinapsis inmune 53

1.5 Tomografía de Rayos X para visualizar la sinapsis inmune 56

1.6 Obtención de tomogramas de los conjugados	58
1.7 Diferenciación de las estructuras celulares: Segmentación.	60
2 Transferencia bacteriana a través de la sinapsis inmune	
2.1 Los linfocitos T CD4+ primarios se infectan pobremente in vitro	62
2.2 Polarización bacteriana en DCs infectadas hacia la SI	63
2.3 Las bacterias pasan desde las DCs infectadas hacia las células T con las que contactan	65
<u>Discusión</u>	72
<u>Conclusiones</u>	78
<u>Bibliografía</u>	80
<u>Anexos</u>	94

1 La sinapsis inmune como modelo para el estudio de la acumulación de actina

1.1 Estructura de la sinapsis inmune

Los linfocitos T ejercen un papel central en la inmunidad adaptativa, tanto intensificando como suprimiendo la respuesta inmune, a través de respuestas mediadas por secreción de citoquinas antígeno-dependientes o por destrucción de la célula cargada de antígeno (Mempel et al., 2004; Lin et al., 2005). Los linfocitos T se activan por el establecimiento de contactos célula a célula con células presentadoras de antígeno (APC) como son las células dendríticas (DC), macrófagos y linfocitos B (Lanzavecchia y Sallusto, 2001; Grakoui et al, 1999; Morgan et al., 2001). Estos contactos, que incluyen el reconocimiento del antígeno en el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de las APC por el receptor de las células T (TCR), se conocen como sinapsis inmunes (SI) (Fooksman et al, 2010). La sinapsis inmune se estructura en forma de círculos concéntricos de ensamblajes de diferentes moléculas (Dustin et al., 2010). En la región central, denominada grupo central de activación supramolecular (cSMAC), se agrupan los complejos del receptor del linfocito T TCR-MHC-II, incluyendo CD3, junto a moléculas coestimuladoras como CD2, CD4, CD8 y CD28 (Yokosuka y Saito, 2008; Gomez y Billadeau, 2008; Krummel et al., 2000; Dustin et al.,1997) y las proteína kinasas PKC θ , Fyn y Lck (Ehrlich et al., 2002; Gomez y Billadeau, 2008)

Alrededor de esta estructura se organiza un anillo de moléculas de adhesión llamado grupo periférico de activación supramolecular (pSMAC) que incluye como primeros mediadores de adhesión integrinas como LFA-1 (antígeno 1 asociado a función de linfocito; α L β 2) y VLA-4 (integrina α 4 β 1) ancladas a la actina cortical por talina, una proteína de unión a actina acumulada en la zona de contacto APC-T (Grakoui et al., 1999).

Además, durante este proceso, el centro de organización de microtúbulos (MTOC) y las mitocondrias se reorientan hacia la SI (Martín-Cófreces et al., 2008; Baixauli et al, 2011). La estructura formada a partir de los contactos entre células T y APCs, que es estable durante más de 1 hora en el caso de células T helper y dura unos 20 minutos si la APC contacta con linfocitos T citotóxicos (Cannon y Burkhardt, 2002), es esencial para una respuesta inmune dirigida por las células T.

La activación del TCR mediante la sinapsis inmune conlleva cambios morfológicos y funcionales en los linfocitos T, incluyendo la acumulación masiva de actina tanto en el pSMAC, que aumenta el área de contacto entre el linfocito T y la APC, permite estabilizar las interacciones entre ambas células y el inicio de una serie de cascadas de señalización (Yokosuka y Saito, 2006; Dustin, 2009; Bunnell et al., 2002). Los defectos en la polimerización de actina resultan en una activación ineficiente de la célula T (Nolz et al, 2007) y la desregulación de secreción de citoquinas (Chemin et al., 2012), demostrando que esta reorganización de actina es absolutamente necesaria para la formación de la SI productiva y la activación del linfocito T .

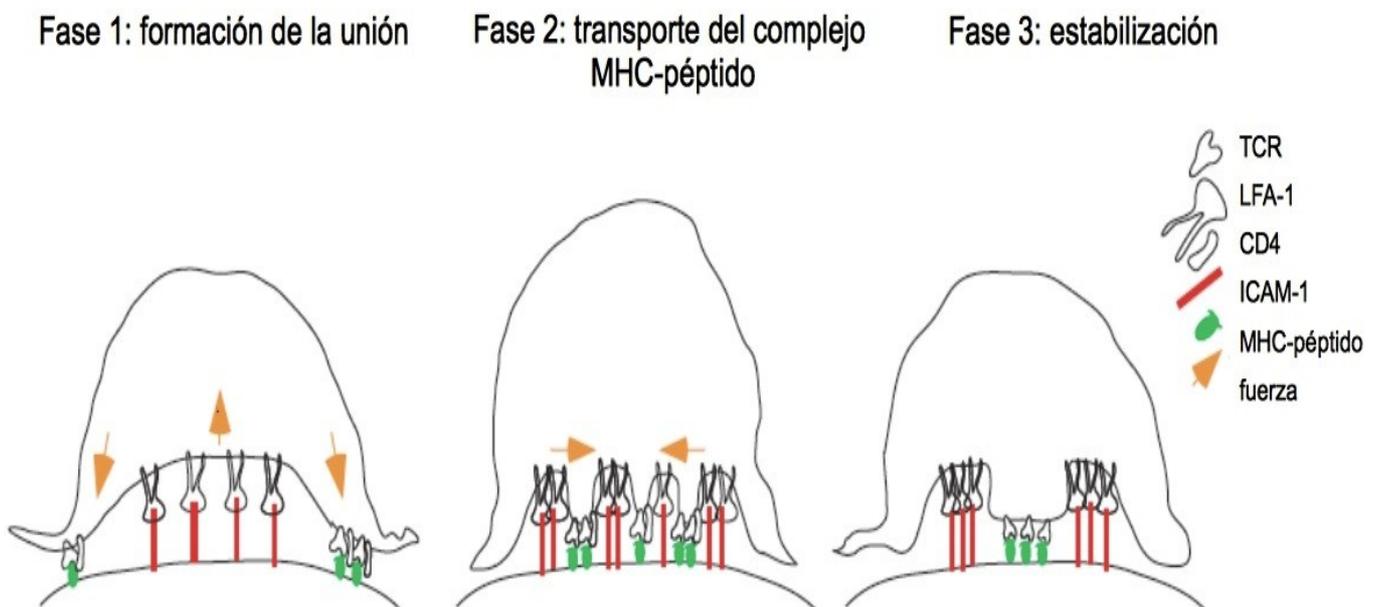


Fig 1 Esquema de la formación de la sinapsis inmune. En la fase 1 se forma la unión entre una célula T y una APC. LFA-1 ancla la parte central de la sinapsis inmune en formación a través de mecanismos de protusión del citoesqueleto que fuerza un anillo exterior en estrecho contacto con el sustrato. Esto permite la formación de complejos TCR-MHC. Fase 2 transporte de MHC unido a péptido al centro de la zona de contacto. Se produce en pocos minutos y un movimiento basado en el citoesqueleto de actina. Fase 3 de estabilización. Se organizan el complejo central cSMAC y el anillo externo de pSMAC con LFA-1.(Tomada de Grakoui et al., 1999).

El inicio de la señalización en la SI implica la acción de numerosas quinasas próximas al TCR que incluyen Fyn y Lck que reclutan a ZAP-70, una proteína citosólica que se deslocaliza hacia los dominios ITAM fosforilados del TCR (James et al., 2012). ZAP-70 fosforila LAT, que recluta hacia la sinapsis inmune a SLP-76 (proteína de linfocito de 76 kDa contenedora de dominio SH-2) (Baker et al., 2009). Juntos, SLP-76 y LAT forman un complejo multimolecular en la membrana celular para unirse a tres promotores de polimerización de actina como son Itk (kinasa de célula T inducible por

IL-2) (Fooksman et al, 2010; Varma et al, 2006; Burkhardt et al., 2008), Vav1 (factor de intercambio de nucleótidos) (Piragyte et al., 2012) y Nck (Rohatgi et al., 2001) activando Cdc42, Rho y Rac1 (Gomez y Billadeau, 2008) que promueven la polimerización de actina.

1.2 Polimerización de actina en la sinapsis inmune

La polimerización de actina es un elemento fundamental en la formación de la SI y en la activación del linfocito T (Cannon y Burkhardt, 2002). Esta proteína es la más abundante en células eucarióticas, existiendo tres isoformas: α (predominantemente muscular), β y γ (Gordón-Alonso et al., 2010). Se puede encontrar en forma de monómeros (actina G) que se van uniendo para ir formando un filamento (actina F). Los filamentos de actina son asimétricos y están constituidos por polímeros helicoidales de 2 cadenas que crecen con una dinámica distinta por cada extremo, teniendo un extremo de crecimiento rápido otro de crecimiento más lento (Chhabra y Higgs, 2007; Vicente-Manzanares y Horwitz, 2011). El proceso de polimerización de actina puede ser espontáneo por adición inicial de dímeros o trímeros de G-actina (Chhabra y Higgs, 2007), pero este el crecimiento espontáneo del filamento es inestable, y se requiere pues de diferentes activadores para una correcta polimerización de actina (Gomez y Billadeau, 2008).

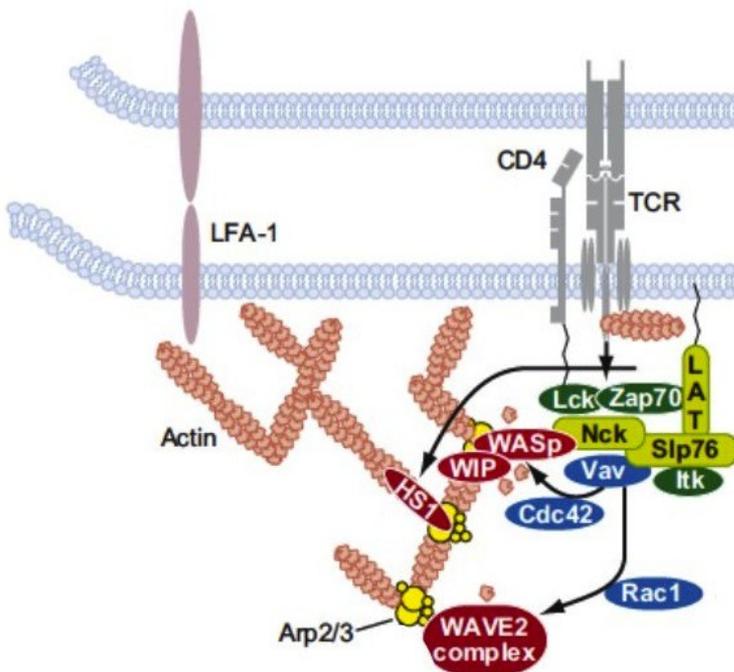


Fig 2 Esquema de a secuencia de activación del linfocito T y la polimerización de actina. Esquema de la cadena de moléculas implicadas en la cascada de activación que deriva a la polimerización de actina. Tras el contacto del TCR con el MHC-II, junto a otras moléculas coestimuladoras como CD2, CD4 y CD8 (se muestra CD4) se inicia la señalización con la fosforilación de Lck para activar ZAP-70 que continúa con la fosforilación de LAT, SLP76 e Itk. activación de Vav para terminar en la polimerización de actina controlada por diferentes Rho GTPasas y promovida por factores de nucleación que activan al complejo Arp 2/3 (tomado de Burkhardt et al., 2008).

En el crecimiento del filamento de actina intervienen varios elementos: factores promotores de

polimerización (NPF) y moléculas que intervienen sobre los NPF. Entre los primeros, el más estudiado es el complejo Arp2/3, formado por siete polipéptidos incluyendo Arp2 y Arp3 (Marchesky et al., 1994) cuya acción consiste en la adición de monómeros a un filamento preexistente generando ramificaciones con una angulación de 70° (Mullins et al., 1998). Se añade un monómero de actina a las proteínas Arp2 y Arp3, formando un trímero que será el punto de inicio para el nuevo filamento (Piragyte y Jun, 2012).

Para aumentar la actividad de este complejo, actúan favoreciendo la elongación de los filamentos de actina diferentes NPF (Gordón-Alonso et al, 2010; Kurisu y Takenawa, 2009; Padrick et al., 2011; Billadeau y Burkhardt, 2006; Huang y Burkhardt, 2007). En este grupo se incluyen:

- ◆ WASp (y su proteína de interacción WIP) (Cannon et al, 2004) es una proteína reguladora de actina en mamíferos asociada al Síndrome Wiskott-Aldrich, una inmunodeficiencia primaria ligada al cromosoma X (Derry et al., 1994). Suele encontrarse autoinhibida en el citoplasma y se activa por la familia de las Rho GTPasas, que liberan su sitio de unión a Arp2/3 (Rohatgi et al, 2001). Su acción consiste en presentar monómeros de actina a dímeros preformados del complejo Arp2/3 (Billadeau et al., 2006; Millard et al, 2004; Marchesky y Gould, 1999). El dominio de unión a Arp2/3 de WASp lo activa para que comience la elongación del filamento (Rohatgi et al, 1999). La proteína de unión a WASp, WIP, por su dominio N-terminal, se une a actina por un motivo WH2 permitiendo la estabilización del filamento de actina. Además, evita la degradación de WASp (de la Fuente et al., 2007; Billadeau et al., 2006).
- ◆ El complejo WAVE2 (WAVE/Scar) es otro activador de Arp2/3, que se une, como WASp, directamente sobre G actina y a Arp2/3 por el dominio C-terminal (Billadeau et al., 2006; Kurisu y Takenawa, 2009). Existen 3 isoformas, la 1 y 3 se localizan en células del sistema nervioso central y las isoforma 2 es hematopoyética. Tanto WASp como el complejo WAVE son potentes activadores de Arp2/3 e inician rápidamente la polimerización de actina, pero los filamentos que crean son frágiles y rápidamente se degradan (Uruno et al., 2003). A diferencia de WASp, no se encuentra autoinhibida. (Campellone y Welch, 2010).
- ◆ HS1, (homólogo de cortactina en células hematopoyéticas) (Gomez et al., 2006), también activa Arp2/3 y puede unirse directamente a F actina y actúa primordialmente estabilizando los filamentos y las ramificaciones de actina, prolongando su vida media (Uruno et al., 2003; Gordón-Alonso et al., 2010). La estabilización de las estructuras de actina en la SI por HS1 asegura una correcta activación de las cascadas de señalización.

(Gomez et al, 2005; Huang y Burkhardt, 2007).

Otros factores que influyen en el citoesqueleto de actina son:

- ✦ CD2AP: esta proteína asociada a CD2 estabiliza los contactos entre la célula T y APC, ya que se une al citoesqueleto de actina. La unión de CD2AP a CD2 se inicia tras la estimulación del TCR (Dustin et al.,1998). También se ha descrito su unión a cortactina, una de las proteínas que regula la polimerización de actina a través de su efecto sobre el complejo Arp2/3 (Lynch et al., 2003) En la sinapsis inmune, tras su unión con CD2, está descrito que interacciona con WASp (Badour et al., 2003).
- ✦ Dinamina-2 es una de las 3 isoformas de dinamina que existen en células de mamífero (Cao et al., 1998), siendo esta la única ubicua. Esta GTPasa se une con diversos factores que promueven la polimerización de actina como profilinas, Nck y cortactina (Schafer et al., 2002, Gordón-Alonso et al, 2010, Mooren et al, 2009). En la SI actúa sobre reguladores de polimerización de actina (Gu et al., 2010). También recluta hacia la SI mediante su dominio rico en prolina a HS1 (Gomez et al., 2005), estabilizando los filamentos de actina (Gomez et al., 2006; Billadeau y Burkhardt, 2006). Dinamina-2 también interviene en otros procesos como tráfico baso-apical (Huang et al., 2011), adhesión celular (Wang et al., 2011) o la remodelación de la forma celular (Kruchten y McNiven, 2006). Tiene un papel junto con actina en el proceso de endocitosis ya que se conecta con clatrina, y actúa en el proceso de invaginación de la membrana plasmática, y en el proceso de escisión de la vesícula de la membrana plasmática (Mousavi et al, 2004; Roux et al, 2006; Schmid y Frolov, 2011). Por tanto, dinamina-2 tiene un papel fundamental en la regulación de los niveles de actina en diferentes modelos que implican una acumulación masiva y local del citoesqueleto celular, incluida al SI (Gomez et al., 2005; Veiga et al., 2005; Billadeau et al, 2006).

También existen reguladores negativos de la polimerización de actina, como cofilina, que secuestra monómeros de actina en un mecanismo dependiente de calcio y cuya actividad depende también del grado de activación de otros promotores de polimerización como WAVE (Gordón-Alonso et al., 2010). Otros inhibidores impiden la polimerización mediante el bloqueo que la elongación del filamento de actina, como son gelsolina, que actúa directamente sobre la actina (Samstag et al., 2003) o coronina1 cuya actuación recae sobre Arp2/3 (Mullins et al., 1998) .

1.3 Clatrina y citoesqueleto de actina

Clatrina es una proteína ubicua en las células eucarióticas y define uno de los mecanismos

principales de endocitosis (Doherty y McMahon, 2009; Rappoport et al., 2006). Normalmente clatrina aparece como un trímero de tres cadenas pesadas (CHC) asociadas cada una a una cadena ligera (CLC), combinándose a azar las dos isoformas de la cadena ligera con la CHC (Royle et al., 2006; Mousavi et al, 2004, Wakeham et al., 2005). Existen dos isoformas de la cadena pesada: CHC17 y CHC22, que comparten el 85% de identidad de secuencia (Wakeham et al., 2005), y en este trabajo nos referiremos como CHC a CHC17. CHC17 intervienen en procesos de endocitosis y selección de carga hacia la red trans-Golgi y endosomas, y puede localizarse en el huso mitótico (Okamoto et al., 2000; Royle et al., 2012; Esk et al., 2010, Foraker et al., 2012). La isoforma CHC22 tiene una localización fundamentalmente en células musculares, donde interviene en el tráfico del transportador de glucosa GLUT4 (Vassilopoulos et al., 2009) y no se asocia a cadenas ligeras (Esk et al., 2010). Las tres cadenas pesadas convergen por su extremo proximal en una estructura similar a un trípode. A esta estructura se le conoce como triskelion y espontáneamente puede unirse a otros triskelions de clatrina y formar una superestructura conocida como “jaula”, “cage” en inglés, que va creciendo a medida que se incorporan más triskelions (Edeling et al, 2006; den Otter et al., 2012).

La jaula que envuelve las vesículas de endocitosis se arma por el ensamblaje de los triskelion en combinaciones que forman pentágonos o hexágonos envolviendo la porción de membrana que contiene la carga a endocitar (Loercke et al., 2009; Cocucci et al., 2012; Wilbur et al., 2011). La endocitosis mediada por clatrina permite la internalización de patógenos, la regulación de expresión de receptores y una selección de proteínas mediante tráfico de vesículas desde la red trans-Golgi (TGN) (Mousavi et al, 2004; Owen et al., 2000). Clatrina se detecta tanto en membrana plasmática (Owen et al., 2004) como en compartimentos intracelulares, asociada mayoritariamente al complejo de Golgi, y a endosomas tardíos conocidos como cuerpos multivesiculares (MVB) (McMahon et al, 2011); Existen adaptadores de clatrina específicos para cada compartimento celular (Kirchhausen et al., 2002; Raiborg et al., 2006). Los MVB forman estructuras características de vesículas dentro de vesículas que pueden ser detectadas por microscopía electrónica (Tjelle et al., 1996; Raiborg et al, 2001; Ritz et al, 2011).

Está establecido que la endocitosis mediada por clatrina en levaduras requiere la reorganización de actina (Weinberg et al., 2012; Boettner et al., 2012). Sin embargo, la situación en células de mamíferos es menos clara: mientras varios autores muestran datos en los que actina está involucrada en endocitosis dependiente de clatrina (Chen y Brodsky, 2005; Yarar et al., 2005), otros muestran que la depleción de actina no tiene efecto en las dinámicas de internalización de

las vesículas cubiertas de clatrina (Boucrot et al., 2006). Recientemente se ha descrito un tipo de endocitosis mediada por clatrina en células de mamíferos que se define por la internalización de grandes zonas de membrana (placas). Este proceso que es muy similar a la endocitosis clásica (de vesículas de unos 100 nm de diámetro) requiere de la reorganización del citoesqueleto de actina, además de clatrina (Saffarian et al., 2009).

También se ha descrito que clatrina participa en otros procesos que requieren una polimerización masiva y local de actina como migración celular (Ezratty et al, 2009; Samaniego et al., 2007), en la que la reducción de la expresión de esta proteína reduce la respuesta al quimioatrayente SDF1 α (factor derivado de células de estroma o CXCL12) y altera la formación de lamelipodios (Gautier et al., 2011). Clatrina también participa en procesos de polarización celular (Gonzalez et al., 2009, Deborde et al, 2008; Gravotta et al., 2012). Clatrina, además es necesaria para la internalización celular de diferentes bacterias (por ejemplo *Listeria monocytogenes*) (Veiga et al., 2007; Veiga et al., 2005) y se halla en los contactos ricos en actina entre el hospedador y *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC), conocidos como pedestales (Veiga et al., 2007).

Las cadenas ligeras de clatrina se unen a Hip1R tras reclutarla hacia la zona de endocitosis (Brady et al., 2010; Boettner et al., 2011), formando un puente entre clatrina y actina (Wilbur et al, 2008); también se ha descrito Hip1R asociada a actina a través de cortactina (Cao et al., 2003; Grassart et al., 2010). Por otro lado, la fosforilación de clatrina resulta fundamental para la estabilización de estructuras ricas en actina que se forman en la invasión celular de diferentes patógenos (Bonazzi et al., 2011).

Todos estos trabajos apuntan a que debe de existir una relación entre membranas cubiertas con clatrina y la polimerización de actina, sin embargo, este posible papel de clatrina sobre la polimerización de actina estaba por descubrir.

Basados en estos trabajos proponemos la hipótesis de que la clatrina podría servir como una plataforma molecular para el reclutamiento de la maquinaria proteica necesaria para iniciar la polimerización localizada de actina. Dado que actina se polariza y polimeriza masivamente en la región de contacto entre la APC y el linfocito T tras la presentación antigénica, el modelo de SI es idóneo para testar nuestra hipótesis trabajo.

2 La presentación antigénica.

2.1 Barreras defensivas frente a la infección

La presentación antigénica tiene lugar en el ganglio linfático (Dustin et al., 2010; Mempel et al., 2004; Allenspach et al., 2009). Los antígenos pueden proceder de patógenos intracelulares, siendo las mucosas intestinales, respiratorias, urogenital y la piel las barreras frente a los patógenos (Niedergang et al., 2004). Pero estas barreras no son siempre impermeables. Existen diferentes puntos especializados en el intestino denominados epitelios asociados a folículos, en los que hay constante exposición a la flora de la luz intestinal por medio de las células M (Nikitas et al., 2011; Bedoui et al., 2010; Kraehenbuhl y Neutra, 2000; Neutra, 1998). Estas bacterias que pasan la barrera intestinal son fagocitadas y eliminadas por los fagocitos profesionales (DCs y macrófagos) (Hooper et al., 2012;). Además de este transporte mediado por las células M, las DCs del epitelio intestinal son capaces de emitir prolongaciones para englobar microorganismos y transferirlos a través de la barrera epitelial. Existen también condiciones patológicas en las que la barrera epitelial se encuentra alterada y permite el paso con mayor facilidad del patógeno al organismo y facilita el contacto entre bacterias y células fagocíticas (Cossart et al., 2004; Nair et al., 2011, Haglund y Welch, 2011, Pizarro-Cerdá y Cossart, 2004). Sin embargo, algunos patógenos han desarrollado estrategias para evitar su destrucción y mantener infecciones con éxito (Bedoui et al., 2010) y pueden utilizar vías para escapar de la degradación por parte de las APCs y establecer infecciones crónicas (Niedergang et al., 2004).

Por ejemplo, *Listeria monocytogenes* rompe el fagosoma y escapa al citoplasma, *Shigella spp.* también escapa al citoplasma e induce apoptosis en los macrófagos. *Salmonella spp.* modifica el fagosoma, evitando su fusión con el lisosoma y creando un nicho intravesicular para una replicación más efectiva: la vacuola que contiene *Salmonella* (SCV) (Cossart y Sansonetti, 2004, Bedoui et al., 2010; Haglund y Welch, 2011). Tras cruzar la barrera epitelial y sobrevivir a fagocitosis, las bacterias pueden diseminarse sistémicamente en el interior de APCs infectadas (Niedergang et al., 2004, Sansonetti y Di Santo, 2007).

2.2 Presentación antigénica en el ganglio linfático

La presentación antigénica por parte de las DCs tiene lugar en los ganglios linfáticos, tras procesar los antígenos, los presentan a través de sus MHC clase II a las células T con las que contactan. Las DCs son muy eficientes a la hora de fagocitar, procesar y presentar antígenos a los linfocitos T, permitiendo su diferenciación a células efectoras o reguladoras (Platt et al., 2010; Allan et al., 2006; Nair et al., 2011, Mittelbrun et al., 2010). Las DCs de los epitelios expuestos a contacto con el ambiente como el respiratorio, intestinal o la piel, se encuentran en constante circulación desde

el tejido donde toman antígenos hacia el ganglio linfático más próximo (Merad y Manz, 2009; Baldazzi et al, 2009), produciéndose un cambio en la expresión de receptores: perdiendo los que reconocen citoquinas proinflamatorias como RANTES (Sozzani et al., 1997) y aumenta la expresión de receptores para CCR7 (Jang et al., 2006; Riol-Blanco et al., 2005), lo que le permite penetrar al ganglio linfático (Chan et al., 1999). Además, la interacción con patógenos por contacto con productos bacterianos como LPS o señales inflamatorias de TNF α o IL-1 produce la maduración de las células dendríticas (Scott et al, 2005) y da lugar a la expresión de moléculas coestimuladoras que potencian la activación de los linfocitos T. De este modo las DC orquestan la respuesta inmune hacia los patógenos y tienen un papel primordial durante las infecciones (Baldazzi et al, 2009).

Las DCs se pueden dividir en 2 categorías: convencionales y plasmacitoides. Las primeras están especializadas en procesamiento del antígeno, tienen alta capacidad fagocítica cuando son inmaduras y de producción de citoquinas cuando maduran (Mellman y Steinman, 2001). Tienen una vida media corta e incluyen a las residentes en tejidos linfoides y las que migran al ganglio para presentar los antígenos a las células T (Merad y Manz, 2009). Las células dendríticas plasmacitoides, por el contrario, tienen una vida media más prolongada, se localizan preferentemente en tejidos periféricos y médula ósea y, aunque también pueden actuar como presentadoras de antígeno a células T, su acción principal es actuar en respuesta a infecciones virales, produciendo interferones tipo I (Colonna et al., 2004, Merad y Manz, 2009; Geissman et al., 2010). En el ganglio en ausencia de infección los linfocitos T se encuentran en un permanente flujo de entrada y salida desde el torrente sanguíneo a través de las vénulas de endotelio alto (HEV), escanean al azar el área que les corresponde en el ganglio (paracortex) para abandonarlo pasadas 24-48h (Baldazzi et al., 2009). Cuando se produce una infección se incrementa la llegada de linfocitos por un ensanchamiento de la arteriola que llega al ganglio linfático. En las primeras horas de encuentro con las APC establecen contactos débiles con las células dendríticas, disminuyen su movilidad y aumentan la expresión de marcadores de activación (Niedergang et al., 2004).

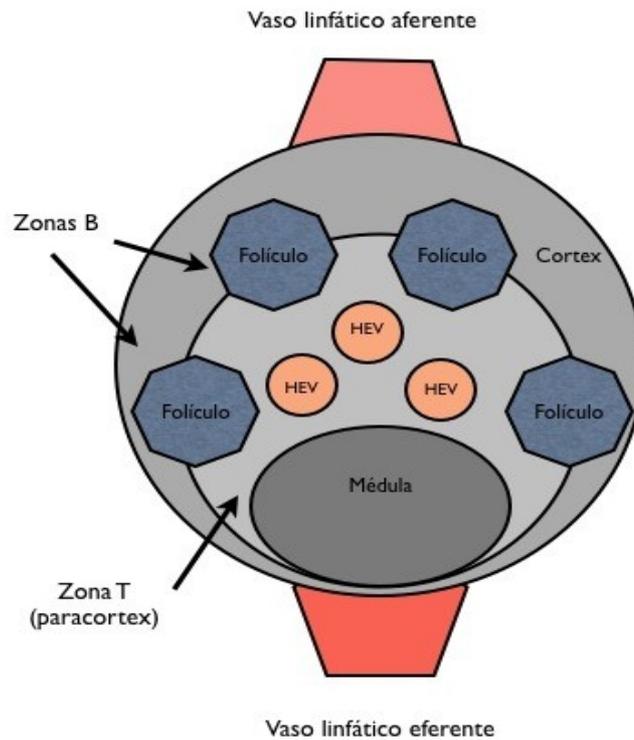


Fig 3 Esquema de ganglio linfático. Esquema de la vía de entrada al ganglio linfático en el que se muestran las zonas T (paracortex) y las B (corteza) mostrándose algunos folículos. En la zona de células T se representan algunas vénulas de endotelio alto (HEV) por las que penetran desde la sangre los linfocitos T y B entran al ganglio, saliendo del mismo por el vaso linfático eferente. La presentación antigénica por las células dendríticas a los linfocitos T tiene lugar en el paracortex. (tomada de Baldazzi et al., 2009)

En ausencia de antígeno, los contactos son breves y tras unos minutos dejan paso a otra célula T que contacte con la DC, de modo que al localizarse estas APC cerca de la HEV desde la que llegan las células T al ganglio, puede establecer contactos seriado con miles de linfocitos (Miller et al., 2004; Hommel et al., 2004). Sin embargo, si la DC presenta un antígeno reconocido por la célula T, ésta establece un contacto más estable (de varias horas de duración) con la APC (Miller et al., 2004; Stoll et al, 2002) y secreta IL-2 e interferón gamma (Smith-Garvin et al., 2012; Billadeau et al., 2006). El proceso continúa con la concentración de múltiples células T alrededor de la APC cargada de antígeno, moviéndose lentamente alrededor de la DC para continuar hacia una fase de expansión y proliferación. En esta última fase proliferativa terminan los contactos rápidos entre DC y linfocitos T, perdiendo movilidad los linfocitos T (Mempel et al, 2004; Baldazzi et al, 2009; Miller et al., 2004; Azar et al., 2010).

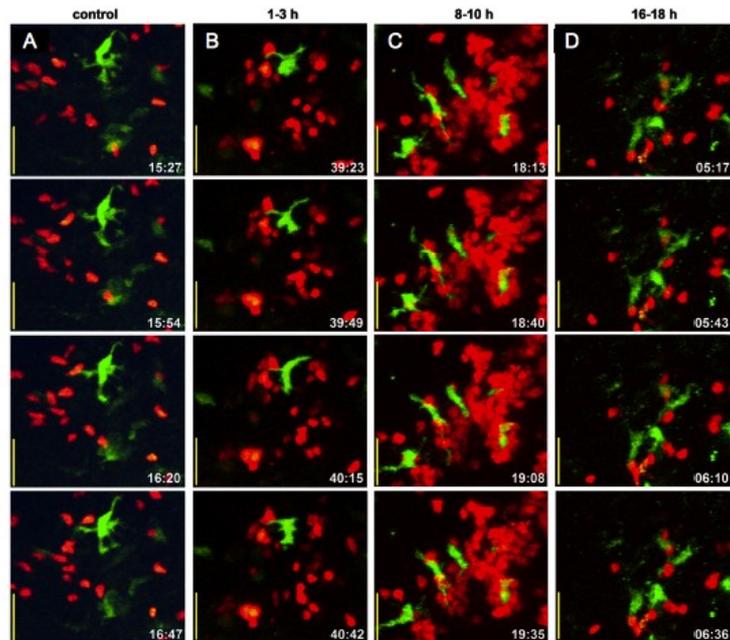


Fig 4 Imagen de microscopía de dos fotones de la activación de la célula T en el ganglio linfático. Secuencias de imágenes de vídeos de contactos entre células T (rojo) en contacto con DC (verde) en el ganglio linfático en proyección máxima del eje Z. Cada columna muestra imágenes fijas captadas a los tiempos indicados (en minutos) de una secuencia continua. (A) Secuencias de imágenes de contactos de células T con DC no cargadas con antígeno. (B-D) Secuencias de imágenes de las etapas principales de los contactos T-DC en presencia de antígeno (OVA), observada en ganglios de ratón con células T. Barra=25µm (Tomado de Miller et al., 2004).

2.3 DCs infectadas y los linfocitos T

En linfocitos murinos se ha descrito la presencia de *Listeria monocytogenes* vivas (McElroy et al., 2009). Los autores de este trabajo recuperaban más bacterias de los linfocitos (Ts) que de macrófagos y DCs tras la inyección subcutánea de la bacteria, este hecho es sorprendente, dado que las células T se infectan *in vitro* muy pobremente (ver más abajo, en resultados).

Estos datos de infección *in vivo*, junto con el hecho de que existen contactos entre DCs infectadas y linfocitos T en los órganos linfoides (Tam et al., 2008; Voedisch et al., 2009), nos llevan a proponer la hipótesis de que las bacterias patógenas a lo mejor son capaces de pasar desde la DCs infectadas a las células T a través de la SI.

Esta sería una vía nueva (desconocida hasta ahora) de diseminación bacteriana, por lo que la existencia de este mecanismo de transferencia a linfocitos T de bacteria plantea nuevos modelos de desarrollo de una respuesta inmune, posibles efectos sobre la función de los linfocitos, y estrategias de escape de los patógenos para la creación de reservorios en el organismo.

1• Estudiar si clatrina podría servir como una plataforma molecular para el reclutamiento de la maquinaria proteica necesaria para iniciar la polimerización localizada de actina en la SI

1a• Localización de clatrina durante la formación de la SI

1b• Estudiar el efecto del silenciamiento de clatrina en el reclutamiento de proteínas implicadas en la polimerización de actina.

1c• Determinar el origen de clatrina que interviene en la regulación de la polimerización de actina en la SI.

2• Explorar la posibilidad de que la SI sea una nueva vía explotada por diferentes bacterias para pasar desde DCs infectadas a linfocitos T.

2a• Localización de diferentes bacterias durante la formación de SI entre DCs infectadas y células T

2b• Generación de un método cuantitativo que nos permita analizar de forma objetiva el paso bacteriano desde DCs infectadas a células Ts.

Materiales y métodos

Células humanas

Líneas:

Como línea celular APC se utilizan células Raji derivadas de linfoma Burkitt B y como línea de linfocitos T se usan las Jurkatt J77cl20 v β 8 derivadas de leucemia aguda. Se mantienen en cultivo en medio RPMI 1640 (GIBCO) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS)(Invitrogen) y complementado con penicilina/estreptomicina. La línea celular linfoide CEM CCL-119 se mantiene en cultivo en un medio RPMI 1640 (GIBCO) suplementado con 10% FBS (Invitrogen), L-glutamina, HEPES, 50 mM 2-ME y penicillina/estreptomicina y las células Hela CCL-2 (línea epitelial derivada de adenocarcinoma) en medio DMEM (GIBCO) con 10% de FBS, penicilina/estreptomicina y 1% Glutamina

Primarias:

DCs derivadas de sangre periférica: células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se aíslan de donantes sanos por separación mediante gradiente con Lymphoprep (Nycomed). Los monocitos derivados de PBMC se purificaron tras 30 minutos de adhesión en medio RPMI suplementado con 10% de FBS. Después, las células no adheridas se descartan y las restantes se cultivan en medio RPMI 1640 completado con 10% suero y GM-CSF (200ng/ml R&D systems) junto con IL-4 (10ng/ml R&D systems). Las células se cultivan 6 días añadiendo citoquinas cada 48h. Las características fenotípicas de las células se comprueban por citometría de flujo midiendo expresión de marcadores a día 6 (HLA-DR, CD209, CD14 y CD1a).

Linfocitos T CD4+: se obtienen mediante separación negativa de las células no adherentes procedentes de PBMC y se estimulan con células B autólogas irradiadas y cargadas con 0,1mg/ml de SEE durante 48h. Se reestiman cada 2-3 días con 20 U/ml de IL-2 humana recombinante y 0,5 mg/ml de PHA. Tras 1 semana se testa mediante citometría de flujo la expresión de TCR-v β 8. Los estudios se realizaron de acuerdo a los principios de la Declaración de Helsinki y fueron aprobados por el Comité Etico local de Investigación Básica; obteniendo el consentimiento informado de todos los donantes humanos.

Células de ratón

DCs derivadas de médula ósea: se sigue el procedimiento de (Inaba et al 1992); progenitoras de médula ósea de tibias y fémures de ratones C57BL/6 de 8-20 semanas de edad se crecen en placas P150 a concentración $0,5 \times 10^6$ células/ml en RPMI 1640 (GIBCO) suplementado con 10% de FBS,

glutamina (2 mM), 2ME (5 x 10⁻⁵M), y GM-CSF (1000U/mL) (Miltenyi) . El medio se cambia cada 3 días y se utilizaron en el experimento a día 10 tras testar el grado de diferenciación con anticuerpos anti-CD11c, anti-Gr1b y anti-MHC-II por citometría de flujo. Se maduraron con 20 ng/ml de lipopolisacárido (LPS) 24h antes del experimento.

Los linfocitos T CD4+: se obtienen de suspensión ganglios de ratones C57BL/6-Tg (TcraTcrb) 425Cbn/J OTII que expresan TCR específico para el péptido 323-339 de OVA en contexto de I-A^b por separación negativa con anticuerpos biotinilados IgM, B220, CD19, MHC-II, Grb1, CD11c, CD11b, CD8 a y DX5, y seleccionados negativamente tras la unión de esferas cubiertas con estreptavidina (MACS, Miltenyi Biotec®) utilizando un auto-MACS Pro Separator (Miltenyi Biotec®)

Cepas bacterianas

En los experimentos de infección se utilizaron las siguientes cepas:

· *S. aureus* 132, *S. aureus* 132 SrtA (mutado en sortasa) y *S. aureus* 132/ pCN47-GFP (Charpentier E. et al, 2004), cedidas por el Prof. Íñigo Lasa del Laboratorio de biofilms microbianos, Idab, Universidad Pública de Navarra.

· *Salmonella Enterica* sv *enteritidis* 3934 (Solano et al., 2002) y *S. enterica* sv *enteritidis* 3934/ p-GFPmut3 (Cormack et al., 1996), cedidas por el Prof. Íñigo Lasa del Laboratorio de biofilms microbianos, Idab, Universidad Pública de Navarra.

· *L. monocytogenes* EGD (BUG:600) y *Listeria monocytogenes* EGD-cGFP (Bug:2539 GFP)(Balestrino et al., 2010), cedidas por la Prof. Pascale Cossart, (Unité des Interactions Bactéries-Cellules, Département de Biologie Cellulaire et Infection, Institut Pasteur, Paris).

· *E. coli* DH5α (Invitrogen) y *E. coli* DH5α p PNF8-GFP (Fortineau, N. et al. 2000); plásmido cedido por el Prof. Íñigo Lasa del Laboratorio de biofilms microbianos, Idab, Universidad Pública de Navarra.

L. monocytogenes y *S. aureus* se crecieron en medio de infusión de cerebro y corazón (BHI) mientras que para *S. enterica* y *E. coli* se utilizó medio de cultivo Luria Bertani (LB) y se utilizaron los antibióticos de selección correspondientes.

Plásmidos

El plásmido de Dinamina-2-GFP es obsequio de Mark A. McNiven (Clínica Mayo, Rochester). El plasmido que codifica td-Tomato-LCa obsequio de Thomas Kirchausen (Harvard Medical School, Boston). El plásmido que codifica actina GFP proviene del laboratorio de Emmanuel Lemichez.

pCN47-GFP (Charpentier E. et al, 2004), p-GFPmut3 (Cormack et al., 1996) y p PNF8-GFP (Fortineau, N. et al. 2000) cedidos por el Prof. Íñigo Lasa del Laboratorio de biofilms microbianos, Idab, Universidad Pública de Navarra.

Anticuerpos

Los anticuerpos usados son los siguientes:

Diana	Fabricante	Origen
β actina (AC15)	Sigma®	Monoclonal de ratón
γ adaptina (AP-1)	Sigma®	Monoclonal de ratón
AP-2 (AP50)	BD®	Monoclonal de ratón
CD2AP	Abcam®	Monoclonal de ratón
CD3	BD®	Monoclonal de ratón
CD3	Generado en el laboratorio	Monoclonal de ratón
CD4	BD®	Monoclonal de ratón
CD28	BD®	Monoclonal de ratón
CD69 (TP1-55)	Generado en el laboratorio Dr.Sánchez-Madrid	Monoclonal de ratón
Cadena pesada de clatrina (clon X22)	Abcam®	Monoclonal de ratón
Cadena pesada de clatrina	Abcam®	Policlonal de conejo
Dinamina-2	Abcam	Policlonal de conejo
Erk ½	Millipore®	Monoclonal de ratón
Erk ½ fosforilado	Cell Signalling®	Monoclonal de ratón
Giantina	Abcam®	Policlonal de conejo
Hip1R	Cortesía Dr. David G. Drubin, Berkeley	cobaya
Hrs	Abnova®	Policlonal de conejo
LFA-1	BD®	Monoclonal de ratón
PLC γ 1	Cell Signalling®	Policlonal de conejo
PLC γ 1 fosforilado (Y783)	Cel Signalling®	Policlonal de conejo
TCR (v β 8)	BD®	Monoclonal de ratón
Tubulina	Sigma®	Monoclonal de ratón
Vps4	Cortesía Dr. Alberto Fraile, CNB, CSIC	Monoclonal de ratón
α integrina	Generado en el laboratorio Dr.Sánchez-Madrid	Monoclonal de ratón

β integrina	Generado en el laboratorio Dr. Sánchez-Madrid	Monoclonal de ratón
Zap-70	Abcam®	Monoclonal de ratón
Zap-70 fosforilado (Y493)	Abcam®	Monoclonal de ratón
Salmonella enterica	AbD Serotec®	Policlonal de conejo
Listeria monocytogenes	AbD Serotec®	Policlonal de conejo
Escherischia coli	AbD Serotec®	Policlonal de conejo
IgM (anticuerpo biotinilado)	BD®	Monoclonal de rata
B220 (anticuerpo biotinilado)	BD®	Monoclonal de rata
CD19(anticuerpo biotinilado)	BD®	Monoclonal de rata
MHC-II (anticuerpo biotinilado)	BD®	Monoclonal de rata
Grb1 (anticuerpo biotinilado)	BD®	Monoclonal de rata
CD11c (anticuerpo biotinilado)	BD®	Monoclonal de rata
CD11b (anticuerpo biotinilado)	BD®	Monoclonal de rata
CD8 α (anticuerpo biotinilado)	BD®	Monoclonal de rata
DX5 (anticuerpo biotinilado)	BD®	Monoclonal de rata
D3/9 (CD45)	Generado en el laboratorio Dr. Sánchez-Madrid	Monoclonal de ratón
LFA-1	Generado en el laboratorio Dr. Sánchez-Madrid	Monoclonal de ratón
LFA-1	Generado en el laboratorio Dr. Sánchez-Madrid	Monclonal de ratón
Fragmento F(ab') ₂ de Inmunoglobulina unido a FITC	DakoCytomation®	Monclonal de ratón

Otros reactivos utilizados:

Faloidina conjugada con Alexa 488, 568 o 647, anticuerpos secundarios conjugados con Alexa 488, 568 y 647 (Molecular Probes), sondas celulares CMAC y CMTMR (Invitrogen), Superantígeno E (SEE) (Toxin Technologies), Citocalasina D y Glutaraldehido (Sigma), resina Dicurpan (Fluka), paraformaldehido y Tetróxido de Osmio (Electron Microscopy Science), Prolong (Invitrogen).

SiRNA

Diana	Secuencia
Clatrina	[(s)5- GGC CCA GGU GGU AAU CAU Utt-3; antisentido (as)5- AAU GAU UAC

	CAC CUG GGC Ctg-3´]
Clatrina	On Target SMART pool contra la cadena pesada de clatrina
AP-1	doble cadena de RNA secuencia [(s) 5-GUU AAG CGG UCC AAC AUU Utt-3´; as 5- AAA UGU UGG ACC GCU UAA Ctt- 3´]
AP-2	[(s) 5-GUU AAG CGG UCC AAC AUU Utt-3´, as 5-AAA UGU UGG ACC GCU UAA Ctt-3´] [(s) 5- CGC AGA GGG UAU CAA GUA Utt-3´, as 5- AUA CUU GAU ACC CUC UGC Gtt-3´]
Hrs	[(s) 5- CGA CAA GAA CCC ACA CGU Ctt-3´, as 5- GAC GUG UGG GUU CUU GUC Gtt-3´] [(s) 5- AAG CGG AGG GAA AGG CCA CUUtt-3´, as 5- AAG UGG CCU UUC CCU CCG CUUtt-3´]
Hrs	On target SMART pool (HGS)
Controles	[(s) 5- UUC UCC GAA CGU GUC ACG Utt-3, (as) 5- ACG UGA CAC GUU CGG AGA Att-3]
Controles	On target plus Sin Sentido RNA de interferencia 1
Controles	On target plus Sin Sentido RNA de interferencia 2

Todos los RNA de doble cadena proceden de Dharmacon® o Ambion®. Típicamente se electropora 1µl de RNA (0,4 nanomoles) en 400µl de OPTIMEM® para 20 millones de células. Los experimentos se realizan a las 48 horas post transfección.

Los linfoblastos T humanos requieren 2 electroporaciones con 24 horas de separación entre ambas, obteniendo máximo silenciamiento tras la segunda transfección, momento en que se realizan los experimentos.

Infecciones in vitro. Ensayo de supervivencia a gentamicina

La infección in vitro de los linfocitos T primarios se analizó por ensayos clásicos de supervivencia a gentamicina. Esta técnica se basa en el uso de un antibiótico, gentamicina, un aminoglicósido que prácticamente no atraviesa la membrana plasmática celular, matando pues a las bacterias extracelulares pero no afectando a las bacterias que han sido capaces de infectar su célula hospedadora (Vaudaux y Waldvogel, 1979). Comparamos la infección de linfoblastos de ratón y de origen humano con DCs, células epiteliales y otras líneas linfoides. Se parte de 500.000 células de

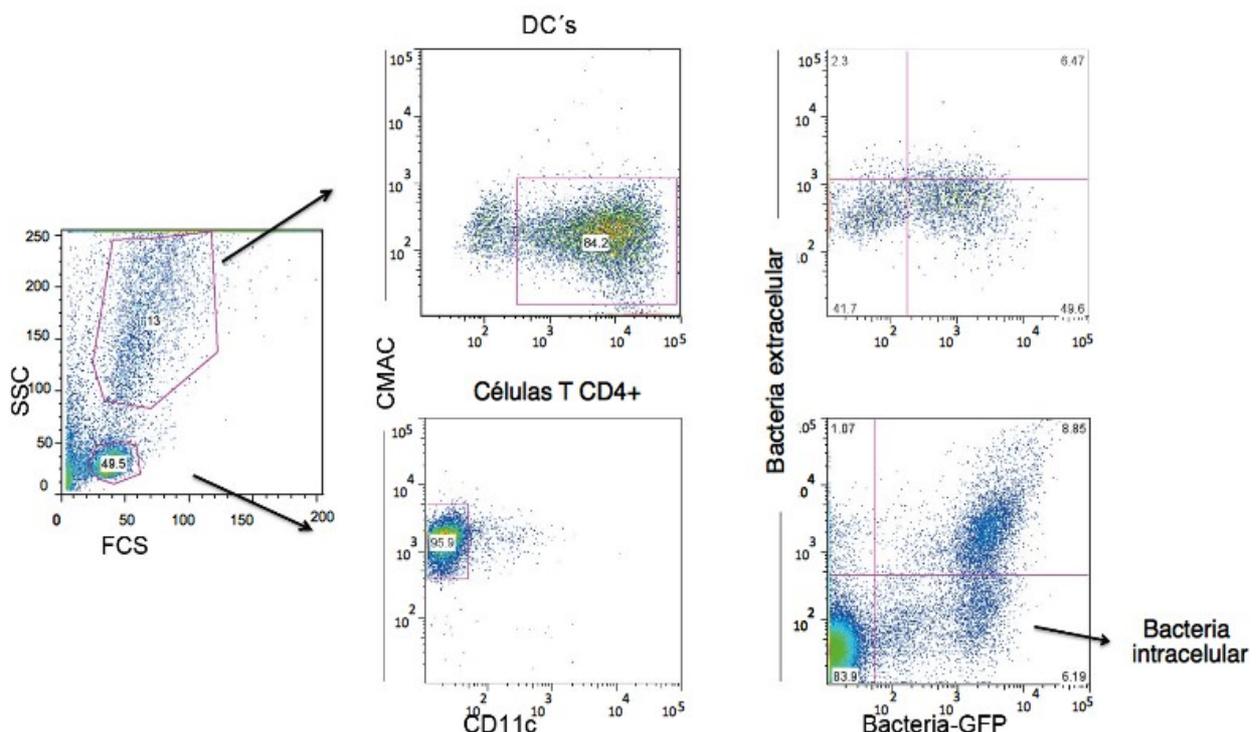
cada tipo (DCs, linfoblastos T CD4+ de ratón y humanos, T CD4+ de ratón T de ratón activados con OVA 24h antes del experimento, Hela, y CEM). Se infectan en una MOI 10:1 con cada bacteria durante 1 h a 37°C, después se añade gentamicina (50µg/ml) al medio durante otra hora. Pasado ese tiempo se lavan 3 veces las muestras con PBS para eliminar la gentamicina y se lisan las células 5 minutos en Tritón (0,05% en agua MiliQ). Se siembran diluciones seriadas de las muestras en placas de LB agar (*S. enterica*) o de BHI agar (*L. monocytogenes* y *S. aureus*) y se procede a contar colonias a las 24h (48 en el caso de *Listeria*). Cada colonia corresponde a una bacteria intracelular (unidad formadora de colonia).

Experimentos de conjugados con bacteria. Cuantificación de infección de células T desde DC infectadas mediante citometría de flujo.

Las bacterias se crecen 24 horas en medio líquido LB (*S. enterica*, *E. coli*) o BHI (*L. monocytogenes*, *S. aureus*), y se infecta con una MOI de 10:1 las DCs durante 1 hora a 37°C junto con peptido OVA en el caso de experimentos de ratón o SEE en el caso de células humanas. Para identificar la necesidad de presentación antigénica, también, y en paralelo, se usan DCs sin cargar con antígeno. Tras este periodo, las DCs infectadas se lavan 4 veces en PBS para eliminar la bacteria extracelular y se juntan 90 minutos con células T sin infectar (conjugados) en un ratio 1:1. Para identificar la necesidad de contacto directo célula a célula se procede con dos condiciones; en una de ellas se permite ese contacto directo DC-T, pero en otro caso ambos tipos celulares se separan mediante una barrera física que permite el paso de líquidos y bacterias. Esa barrera es una malla de 3 µm de diametro de poro, un transwell. En esta condición, las células dendríticas infectadas se colocan encima del filtro y las T en el pocillo inferior. Adicionalmente, y como control, se ponen en contacto células T directamente con las diferentes bacterias, con una MOI de 50. Tras la hora y media de formación de conjugados, se recogen las células de los pocillos y se separan las DCs de las células T con agitación usando de un vortex.

Para reducir las uniones inespecíficas de los anticuerpos, las muestras en el modelo de ratón se incuban con anticuerpo purificado CD16/CD32 Fc-block (BD) (2,5µg/ml). Las muestras de origen humano se incuban con gamma globulina humana (100µg/ml).

Para la detección de las bacterias extracelulares se incuban las muestras a 4°C durante 1 hora con los anticuerpos contra las diferentes bacterias antes de fijar o permeabilizar las muestras. La fijación química se ha demostrado que puede permeabilizar la membrana plasmática (Pollice et al., 1992), y los anticuerpos podrían penetrar al interior celular. Después, las muestras se lavan para eliminar el anticuerpo no unido y se fijan con PFA al 4% en PBS y se incuban con un anticuerpo secundario conjugado a un fluoróforo (Alexa 405 en el caso de experimentos en el modelo humano y Alexa 647 en el caso de experimentos con células de ratón). Para detectar las células dendríticas se usa anti-CD11c-PE en el caso de muestras de ratón y anti-DC SIGN (CD209) (BD) marcado con Alexa 647 en el caso de muestras de origen humano. Los linfocitos T CD4+ de origen murino se marcaron con CMAC antes de la formación de conjugados. Los linfocitos T CD4+ humanos se marcan con anti- $\nu\beta 8$ -PE. En algunos casos se usan bacterias que expresan la GFP en su citoplasma, en otros casos, las células se permeabilizan con Tritón X-100 al 0,1% durante 5 minutos y las bacterias se detectan con anticuerpos primarios específicos durante 30 min y con anticuerpos secundarios conjugados a Alexa 488. De esta forma seremos capaces de distinguir las DCs y las células T, así como diferenciar entre bacterias intracelulares (marcadas con un solo fluoróforo; GFP o Alexa488) de las extracelulares que se marcan con dos fluoróforos (GFP/Alexa 488 que marca a todas las bacterias y además con Alexa 405 en experimentos con células de origen humano o Alexa 647 en experimentos con células de origen murino que marca sólo las extracelulares). Las muestras marcadas se analizan mediante citometría de flujo usando un citómetro Diva de BD y los resultados obtenidos se examinan con el programa FlowJo.



Esquema del análisis de los experimentos de citometría de flujo. Seleccionamos por tamaño y complejidad los linfocitos T, de esta selección adquirimos 10.000 eventos. Los linfocitos T se seleccionan como la población positiva para CD4 o CMAC y negativa para DC-SIGN CD209 o CD11c. De esta población seleccionamos las células que son positivas para la señal GFP de la bacteria. Y de estas diferenciamos las bacterias extracelulares (marcadas con dos fluoróforos) de las intracelulares (marcadas con un fluoróforo). Analizamos el porcentaje de las células T positivas para GFP y negativas para el marcaje extracelular con anticuerpo. También se muestran a modo informativo las DCs. Nótese que típicamente los linfocitos infectados en estas condiciones lo están sólo con una bacteria.

Cuando se requiere añadir anticuerpos anti integrinas para bloquear las interacciones DC-T, estos anticuerpos; Lia3.2 en humano (Gonzalez-Amaro et al., 2005), M17/4.2 en ratón (Sánchez-Madrid et al., 1983), o un control de isotipo, se añaden 15 min antes de la formación de los conjugados. En los experimentos que requieren la adición de citocalasina D (10µM/ml) y colchicina (10µM/ml) a las células T, estas se incuban con las drogas 30 minutos antes de formar conjugados con las DC infectadas. Se utilizan como control DMSO para la citocalasina y PBS para colchicina.

Inmunofluorescencia

Los conjugados de 30 minutos entre células T y APC cargadas o no con el antígeno correspondiente son fijados con paraformaldehído al 4% en PBS durante 20 minutos y se permeabilizan con Tritón X-100 al 0.5% en PBS durante 5 minutos. Las células T son marcadas previamente con CMAC. Se incuban 20 minutos con los anticuerpos primarios frente a las bacterias correspondientes. Tras lavar en PBS se incuban los anticuerpos secundarios y la faloidina 20 minutos. Los cubreobjetos con las muestras se montan finalmente en resina ProLong. En el caso de experimentos de inmunofluorescencia diferencial, antes de fijar las muestras se añade (a 4°C) el anticuerpo contra la bacteria que corresponda. Se usan anticuerpos secundarios acoplados a fluoróforos diferentes para distinguir las bacterias extracelulares de las bacterias totales, tal y como se ha explicado en el apartado de la citometría de flujo.

Las imágenes se adquieren en un microscopio confocal Leica TCS-SP5 con objetivo 63x, controlado por Leica LAS AF. Las imágenes se analizan con el programa de software libre ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>).

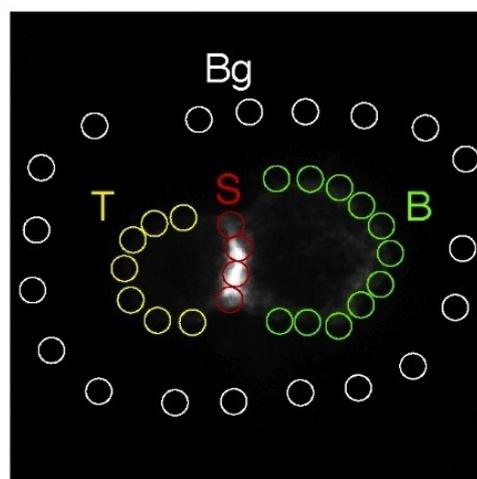
Microscopía electrónica

Los conjugados de células T-APC se fijan con glutaraldehído al 2,5% en PBS 15 minutos. Tras lavar el fijador y sustituirlo 45 minutos con tetróxido de Osmio (EMS) al 1% en PBS, se procede a deshidratar la muestra con etanol a porcentajes 5%, 25%, 50%, 75%, 95% y 100%. después se

infiltra la muestra en resina epoxi DURCUPAN durante una noche a temperatura ambiente. Después se encapsula el bloque con resina y se deja polimerizar 48 horas a 60°C. Se cortan secciones finas en un microtomo (Leica). Se tiñen las secciones con Acetato de Uranilo al 3% y, tras lavar los cortes con agua MiliQ, se dejan 1 minuto en Citrato de Plomo saturado y se observan en un microscopio JEOL JEM1010 (100kV) equipado con una cámara digital Bioscan (Gatan) monitorizadas con DigitalMicrograph 3.1 (Gatan).

Medición de sinapsis

En colaboración con el Dr. Carlos Oscar Sánchez Sorzano, de, CNB-CSIC se desarrollaron unos algoritmos y un software que nos permite cuantificar la acumulación de una proteína (fluorescente) dada en la SI, respecto al resto de la célula T. Esta cuantificación requiere solventar varias dificultades. Primero, la simple cuantificación de la relación entre la fluorescencia media de los píxeles en la SI y en el resto de la célula T no tiene en cuenta la contribución de la fluorescencia media del fondo; y segundo, parte de la fluorescencia en la sinapsis proviene de la APC (B) junto con la procedente de la célula T. Para separar estas aportaciones, medimos la intensidad media de pequeños círculos. Para medir partes que incluyen más de una región (T, B, fondo) los círculos se colocan de manera que cada región ocupa la mitad del área del círculo.



Proyección máxima de imagen de confocal donde se detecta clatrina en conjugado entre célula T y APC analizado con el programa Synapse Measures. Bg es la señal correspondiente al fondo, B es la señal de la APC, T es la señal de la célula T (no en la sinapsis) y S es la señal correspondiente a la sinapsis.

Tomando varias medidas de cada tipo se compensan las diferencias entre áreas por la colocación de los círculos. Para cada tipo de medida se computa el valor medio de cada píxel de múltiples

círculos de esa región de la misma imagen. Como resultado de la colocación del círculo la mitad de los valores de fluorescencia de la APC proviene del fondo mientras que la otra mitad es de la fluorescencia constitutiva de esa región más el fondo. La misma idea se aplica para las medidas de la célula T. La zona de sinapsis tiene aportación extra de clatrina de la célula T, célula B y fondo. Se puede expresar como:

$$\begin{pmatrix} Bg \\ B \\ T \\ S \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & \frac{1}{2} & 0 & 0 \\ 1 & 0 & \frac{1}{2} & 0 \\ 1 & \frac{1}{2} & 0 & \frac{1}{2} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \hat{B}g \\ \hat{B} \\ \hat{T} \\ \hat{T}_s \end{pmatrix},$$

Donde Bg , B , T y S son los valores medios de nuestras medidas, Bg es una estimación de la fluorescencia esperada del fondo, B es una estimación de la fluorescencia constitutiva de la célula B, T es la estimación de la fluorescencia constitutiva de la célula T fuera de la sinapsis, y T_s es la estimación de la fluorescencia constitutiva de las células T en la sinapsis. Para el modelo de las mediciones, se expresa algebraicamente como:

$$\begin{pmatrix} \hat{B}g \\ \hat{B} \\ \hat{T} \\ \hat{T}_s \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ -2 & 2 & 0 & 0 \\ -2 & 0 & 2 & 0 \\ 0 & -2 & 0 & 2 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} Bg \\ B \\ T \\ S \end{pmatrix}$$

De aquí se puede establecer la relación entre la fluorescencia de la célula T en la sinapsis y en las T fuera de sinapsis como $Z=T_s/T$. Esta proporción se establece para cada imagen.

Análisis estadístico:

Las diferencias entre grupos se analizaron con el test ANOVA y post-test de Bonferroni, si se comparan 2 grupos con el test de t de Student si las muestras son normales, en caso contrario se

analizaron usando el de Mann-Whitney, siendo significativas las diferencias con valor $P \leq 0,05$. Salvo que se indique otro valor, los experimentos se realizaron al menos 3 veces y los datos se presentan como valores de la media si las muestras son paramétricas y de la mediana en caso contrario.

Experimentos con Citocalasina:

Los linfocitos T se incubaron 30 minutos a 37°C con 10µM de citocalasina D, usando como control igual volumen de DMSO. Tras lavar el exceso de citocalasina, se procede a formar conjugados con células presentadoras cargadas o no de antígeno. Los conjugados se fijan en Paraformaldehído al 4% en PBS.

Análisis de secreción de IL-2:

Los conjugados se realizan en placas de 96 pocillos de fondo plano. El sobrenadante se recoge tras 16 horas de cultivo y se analizó la secreción de IL-2 mediante ELISA siguiendo las instrucciones del fabricante (Diacclone, Gen-Probe-TDI).

Videomicroscopía de células vivas:

Las células Jurkat J77cl20 vβ8 que expresan Actina-GFP, Dinamina-2-GFP o td-Tomato-LCa. Se resuspenden en HBSS con un 2% de FBS y se siembran sobre una placa con lentilla de cristal adherida (Matek) recubierta con 30µg/ml de fibronectina. Las células presentadoras cargadas con SEE y teñidas con CMAC se añaden y la formación de conjugados se sigue durante 15 minutos. Las imágenes se adquieren con un microscopio confocal TCS-SP5 Leica montado con un escáner resonante controlado por el software LAS AF (Leica). Tres planos focales se adquirieron aproximadamente cada segundo. Las imágenes se procesaron con el programa ImageJ.

Los conjugados formados por DCs infectadas (*Salmonella*-GFP o *Listeria*-GFP) y linfoblastos T CD4+ se procesan de la misma manera. Brevemente, las células dendríticas se infectan con una MOI de 5 y se añade OVA o SEE según sean de origen murino o humano, se resuspenden en optimem con 2% FBS y se adhieren a las placas con lentilla de cristal cubiertas con fibronectina. Sobre estas se reparten las células T marcadas con CMAC y resuspendidas también en OPTIMEM con un 2% de FBS. Las imágenes se adquieren con un microscopio de campo ancho DMIRE2 (Leica) controlado por el software Metamorph. Las imágenes se adquieren cada 2 segundos (típicamente 4 planos focales por tiempo) en un periodo total de 20 minutos.

Tomografía:

Conjugados entre células humanas de leucemia aguda Jurkat J77cl20 v β 8 y la línea celular de linfoma Burkitt B Raji cultivadas en RPMI 1640 suplementado con 10% FBS y 1% penicilina/estreptomicina.

Las células se adhieren en rejillas de oro Quantifoil R2/2 cubiertas con carbón y recubiertas, durante 1 hora, con Poli-L-Lisina 50 μ g/ml. Los conjugados se añaden sobre el lado cubierto con carbón. Las rejillas se transfieren a una placa P35 y cubiertas con PBS para la adquisición de imágenes con microscopía óptica.

Las muestras se ultracongelan de forma rápida de tal forma que el agua no forme cristales y las muestras mantienen su estructura nativa, sin los artefactos de la fijación química. Este proceso se llama vitrificación, y se realiza sobre las rejillas retirando el exceso de líquido con papel Whattman y sumergiendo de forma rápida las muestras en etano líquido usando el inmersor EMCP (Leica). Las muestras se mantienen una vez vitrificadas en nitrógeno líquido. Las muestras se visualizan en el microscopio de rayos X del Sincrotrón BESSY Beamline U41 (Berlín, Alemania). Se usa un objetivo de 40 nm y los fotones con una energía de 510 eV (esto corresponde con longitudes de onda del llamado "water window", donde el contraste de las muestras biológicas es máximo. Se usan dos magnificaciones: la más baja (CCD a 1900 mm de la muestra que se corresponde con un aumento de 1200x) para adquirir las imágenes de las células enteras, la más alta (CCD a 3400 mm de la muestra, que se corresponde a un aumento de 2300x) para adquirir imágenes de las Sinapsis Inmunológicas. Se toman imágenes, girando la muestra, a diferentes ángulos desde -60° a 60°. Se empieza con la imagen a 0°, cada imagen varía de la anterior en un grado. Cuando terminan las series, se toman una segunda imagen control a 0° y una serie de 10 imágenes vacías para la corrección flat-field.

Criosustitución:

Se ha de comprobar que las muestras, antes de mandarse al sincrotrón, están correctamente crionizadas, con las estructuras internas intactas. Para ello, se visualizan al microscopio electrónico algunas de las muestras. Como éstas no están fijadas, se ha de sustituir el agua celular por un agente químico en un proceso que se denomina criosustitución. Las rejillas Quantifoil cargadas con muestras se deshidratan con Acetato de Uranilo 0,5% en Metanol Seccosolv 100% a -90°C usando la unidad Reichert–Jung AFS freeze-substitution unit (Leica). Se realizan 2 cambios de metano/AcUr 0,5% cada día durante 3 días. Después se realizan 3 cambios de Metanol Seccosolv

100%, y se infiltra en la resina LOWICRYL con una mezcla resina/metanol 1:3, luego mezcla 1:1 y después una mezcla resina/metanol 3:1. 24 horas después, se usa ya resina 100% en 2 series, y se inicia la polimerización con luz UV durante 48 horas, tras las que se vuelve a poner la muestra a temperatura ambiente para continuar la polimerización con luz UV 24 horas. Las secciones se obtienen usando un microtomo Leica Ultracut con cortes de 70 nm. Los cortes se depositan en grupos de 5-10 sobre rejillas de Niquel con una capa de Formvar al 25% en H₂Od. Se tiñen las secciones empezando con 15 minutos de Acetato de Uranilo al 3% y, tras lavar los cortes con agua MiliQ, se dejan 1 minuto en Citrato de Plomo saturado. Una vez secas las secciones se toman imágenes a diferentes aumentos con un microscopio de transmisión JEOL JEM 1200 EXII operando a 100kV.

Procesamiento de tomogramas:

Las imágenes crudas obtenidas del sincotróon BESSY-II se alinean primero usando el programa IMOD, y posteriormente se reconstruye el tomograma utilizando el programa TOMO3D y TOMOFLOW también de código abierto obteniendo un archivo MRC.

Una vez reconstruidos estos archivos se escalan e invierten en la escala de grises, y se convierten a imágenes 8 bits en el programa ImageJ para la segmentación de cada elemento de interés utilizando el programa Amira 5.4, estableciendo una selección de cada elemento basado en el contraste de la imagen para diferenciar las estructuras.

1.1 Clatrina se polariza hacia la sinapsis inmune (SI)

Para testar la hipótesis de que clatrina podría reclutar la maquinaria encargada de la polimerización de actina empezamos usando, como modelo celular, las sinapsis formadas entre las líneas celulares Jurkat J77 cl20v β 8 (línea T derivada de leucemia, a la que nos referiremos de aquí en adelante como J77) y Raji (línea de célula B derivada de linfoma de Burkitt), ampliamente usadas en el estudio de la formación de la SI (Mittelbrunn et al., 2002; Risueño et al., 2005; Martín-Cofreces et al., 2008; Robles Valero et al., 2010; Chemin et al., 2012). Los TCRs de las J77 están formados por las cadenas v β 8, esto es una ventaja ya que la enterotoxina E de *Staphylococcus* (SEE) (comercialmente disponible) adherida al MHC-II en las células Raji es capaz de unirse a los TCRs que porten la cadena v β 8 y activar a los linfocitos T (Niedergang et al., 1997). En primer lugar estudiamos la localización de clatrina en las células T durante la formación de las sinapsis. Tras la estimulación de las células T mediante APC cargadas con SEE, la clatrina endógena se relocaliza y se acumula en la SI, como se demuestra mediante inmunofluorescencia usando anticuerpos contra la cadena pesada de la clatrina (Fig 1 A).

Para cuantificar esta acumulación de clatrina observada en una SI, nuestro colaborador Carlos O. Sánchez-Sorzano (CNB-CSIC) ha desarrollado nuevos algoritmos en una interfaz compatible con el software gratuito ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Este programa llamado "Synapse Measures" esta disponible de forma gratuita para toda la comunidad científica desde la página web de nuestro grupo, de la misma forma, los tutoriales también se pueden descargar de la misma página: <http://www.cnb.csic.es/~eveiga/>. Este programa mide de manera precisa la relación entre la señal de inmunofluorescencia de clatrina procedente del linfocito T en la SI y la correspondiente en el resto de la célula T. La concentración de clatrina en la SI se incrementó 2,6 veces cuando el TCR se estimuló con antígeno (Fig 1 B).

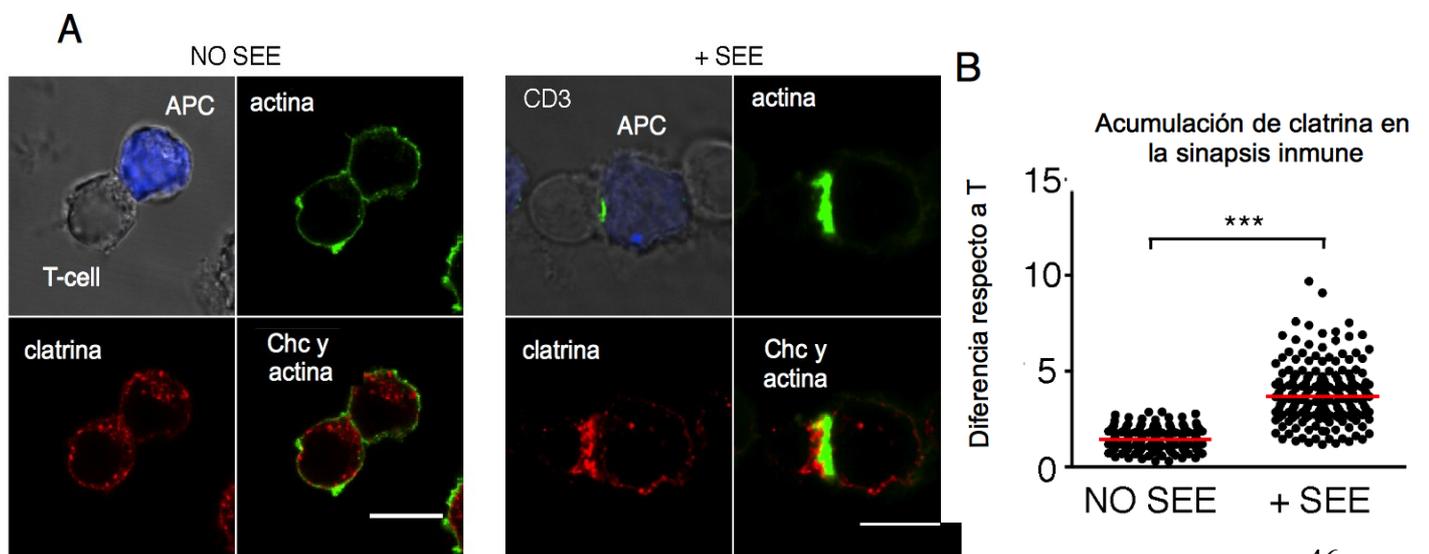


Fig 1 Clatrina se acumula en la SI. (A) Células T (no marcadas) y células Raji (marcadas en azul con el colorante CMAC) cargadas o no con SEE. CD3 (verde) se acumula en la zona de contacto célula a célula cuando la APC está cargada con SEE indicando la formación de SI. En las imágenes de inmunofluorescencia de confocal, actina se muestra en verde y clatrina (CHC) en rojo. Las imágenes combinadas muestran sólo la inmunofluorescencia de actina y CHC. (B) Acumulación de clatrina en la sinapsis inmune medida con el programa Synapse Measures. Cada punto representa la intensidad relativa de clatrina en la zona de contacto entre las células. Se analizaron más de 300 contactos celulares en 3 experimentos independientes.*** representa $P \leq 0,005$ (test Mann-Whitney). Las líneas rojas muestran los valores de las medianas. Barra=10 μ m

Posteriormente seguimos la dinámica de acumulación de clatrina y actina en la SI en células que expresaban la proteína de fusión entre la cadena ligera de clatrina LCa y td-Tomato (clatrina-tomato, td-TomatoLca) (Massol et al., 2006) y actina-GFP (Boyer et el, 2006). Esta acumulación se monitorizó mediante adquisición rápida (intervalos de aproximadamente 0,9 segundos) en imágenes de confocal de células vivas, usando un microscopio Leica TCS-SP5 equipado con un escaner resonante. Durante el periodo observado, la cinética de acumulación de clatrina en la SI fue similar a la de actina (Fig 2).

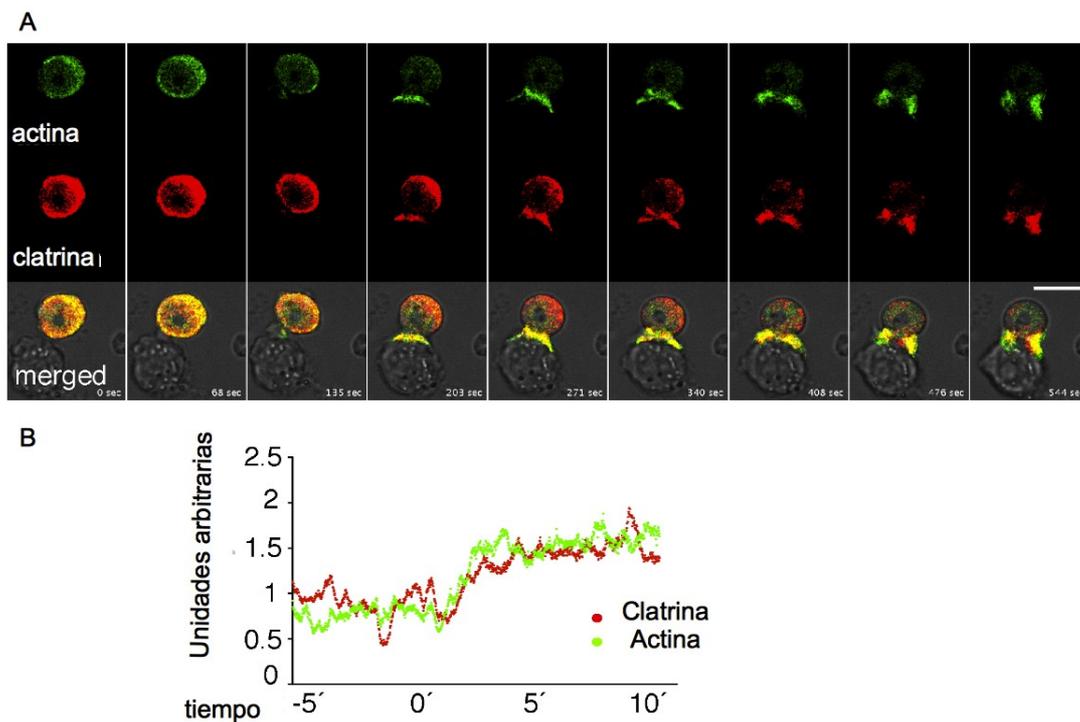


Fig 2 La dinámica de acumulación de actina y clatrina es paralela. (A) Imágenes de microscopía confocal sobre células vivas mostrando una célula T que expresa de forma transitoria td-tomato-LCA (rojo) y actina-GFP (verde) contactando una APC cargada con SEE (no coloreada) la figura muestra una de cada 70 tomas que se adquieren, con un intervalo aproximado entre cada imagen de 68 segundos. (B) La intensidad de fluorescencia de td-Tomato-LCA y actina-GFP en un región de interés de la célula T cerca de la APC. Barra de escala=10 μ m

También monitorizamos la acumulación de clatrina de linfoblastos en la SI en un marco más fisiológico. Para ello formamos conjugados entre células T primarias obtenidas de linfocitos de sangre periférica (PBL). Para enriquecer la población en origen heterogénea de linfocitos T expresando la cadena $\nu\beta 8$ en el TCR (que es capaz de reconocer el SEE), los linfocitos obtenidos de sangre periférica (PBL) se trataron con SEE, IL-2 y fitohemaglutinina (PHA). Este tratamiento expande de forma selectiva la población de células T que responde al SEE. Usamos como APC tanto las células Raji como células dendríticas (DC) primarias derivadas de monocitos de sangre periférica obtenidos de donantes humanos sanos (Fig 3 A y B).

La clatrina de células T primarias también relocalizaba y se acumulaba en la SI tras la activación de la célula T tanto por células Raji como DC primarias cargadas con SEE. La cuantificación confirmó que la acumulación de clatrina en la SI aumentó más del doble tras la estimulación de los linfocitos

T (Fig 3 C).

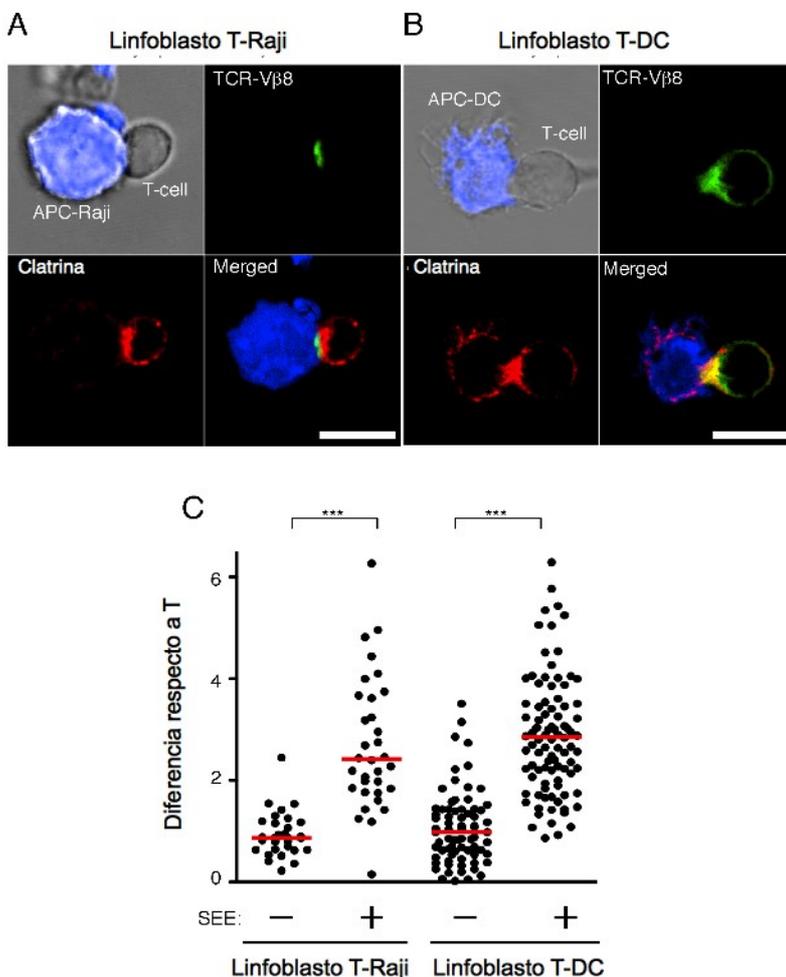


Fig 3 Clatrina se acumula en la SI en linfoblastos humanos. (A,B) Linfoblastos T conjugados con APC cargadas con SEE (Raji A, DC en B). La combinación de fluorescencia y contraste de fase muestra los linfoblastos T no coloreados y las APCs teñidas con CMAC en azul. El TCR conteniendo la cadena $\nu\beta 8$ se muestra en verde y clatrina en rojo. Las imágenes combinadas (merged) muestran la fluorescencia correspondiente a clatrina, TCR y APC. La estimulación del TCR mediante APC cargadas con SEE se confirmó por la concentración de TCR en la SI. Las barras de escala =10 μ m. (C) La acumulación de clatrina en la SI medida con el programa Synapse Measures. Cada punto representa la intensidad relativa de fluorescencia de un contacto individual entre célula T y APC. Para cada tipo de conjugado (Raji o DC) se analizaron más de 50 contactos intercelulares en 3 experimentos independientes. Los linfoblastos T se obtuvieron de 4 donantes sanos. *** representa $P < 0,005$ (test Mann-Whitney). Las líneas rojas indican los valores de la mediana.

1.2 Clatrina es necesaria para la acumulación de actina en la sinapsis inmune

El papel de clatrina en la acumulación de actina en la SI se examinó en células a las que se les

redujo la cantidad de cadena pesada de clatrina por silenciamiento mediante siRNA. La reducción de expresión de la proteína se confirmó por fluorescencia e inmunoblot (Fig 4 A y B). En presencia de APC cargada con SEE, las células deplecionadas de clatrina (CHC KD), que tienen los mismos niveles de actina total que las células con cantidad normal de clatrina, fueron incapaces de polimerizar actina en la SI (Fig 4 A y C). Sin embargo, la concentración de CD3 en el sitio de contacto entre las células T-APC no parece afectada (Fig 4 A, panel derecho), lo que sugiere que la activación de la célula T no se altera por la depleción parcial de clatrina. La frecuencia de formación de conjugados medida por inmunofluorescencia o por citometría de flujo (dobles positivos con CD3 FITC y Raji con sonda CMTMR) no fue significativamente diferente entre el control y las células CHC KD. La dinámica de la actina en estas células T CHC KD que expresan actina-GFP se monitorizó mediante microscopía sobre células vivas. Las células T CHC KD fueron incapaces de acumular actina-GFP en la SI (no se muestra), confirmando los datos obtenidos anteriormente.

La relocalización de clatrina en los contactos célula T-APC no estaba afectada por la presencia de citocalasina D, que impide la polimerización de actina (Tellam y Frieden, 1982), indicando que la acumulación de clatrina en la SI de la célula T es independiente de la polimerización de filamentos de actina (Fig 4 D).

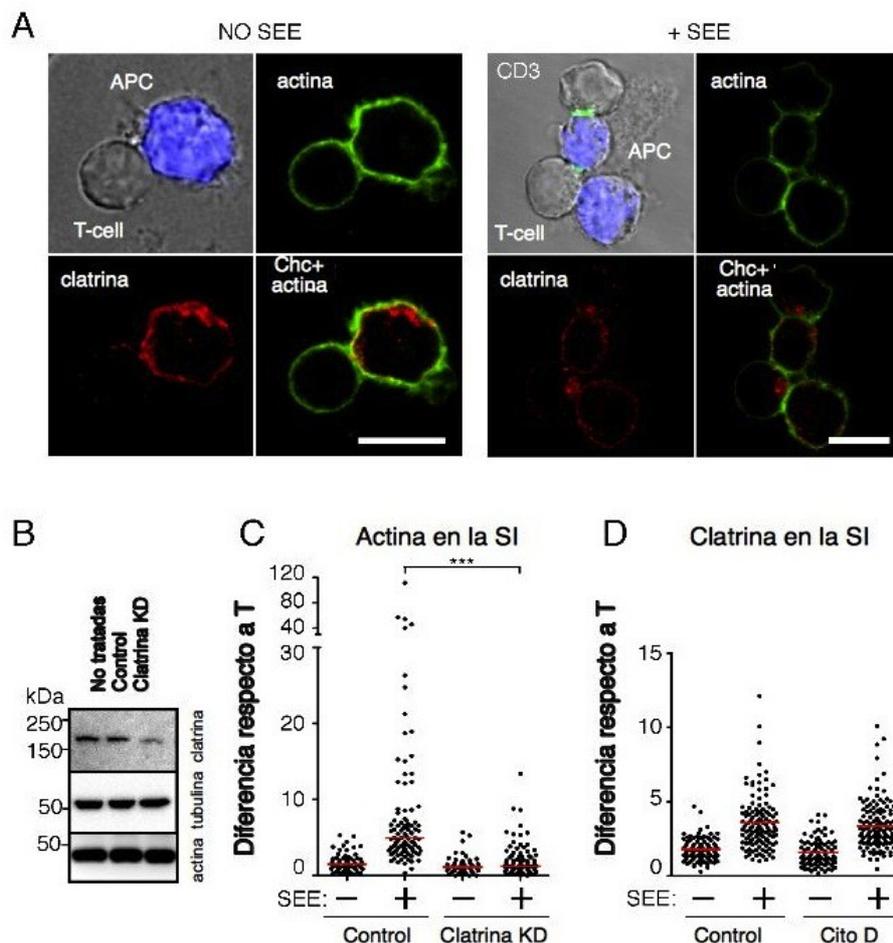


Fig 4 Clatrina es necesaria para la acumulación de actina en la SI. (A) Células T Jurkat CHC KD formando conjugados con Raji en ausencia de SEE (izquierda) o con SEE (+)(derecha). La combinación de fluorescencia y contraste de fase muestra las células T sin colorear y las APC en azul y la señal de CD3 en verde; la acumulación de CD3 en la zona de contacto no está afectada en las células deplecionadas de clatrina. Actina se muestra en verde y clatrina en rojo. Barras de escala=10µm. (B) Inmunoblot mostrando la disminución de la expresión clatrina en células T CHC KD. La actina total y tubulina se muestran como controles de carga. (C) Análisis cuantitativo de la acumulación de actina en los contactos intercelulares con el programa Synapse Measures. Las células control o CHC KD forman conjugados con APC cargadas (+) o no (-) con SEE. Cada punto representa la señal relativa de inmunofluorescencia de actina de un contacto individual T-APC. Se contaron más de 300 contactos de 3 experimentos independientes.*** representa $P < 0,005$ (test Mann-Whitney). Las líneas rojas indican los valores de la mediana. (D) Células T tratadas con DMSO (control) o citocalasina D formaron conjugados con APC cargadas (+) o no (-) con SEE, y se analizó la acumulación de clatrina en los contactos intercelulares con el programa Synapse Measures. Cada punto representa la intensidad relativa de señal de clatrina en un contacto individual T-APC. Más de 400 contactos intercelulares se midieron, de 3 experimentos independientes. No se encontraron diferencias significativas (test Mann-Whitney) entre el control y las células tratadas con Citocalasina D.

Dado que clatrina es una proteína fundamental en procesos endocíticos, la reducción observada en la polimerización de actina en la SI podría ser debida a una alteración de la expresión en superficie de receptores claves para la señalización del TCR y la formación de la SI. Para descartar este posible efecto del silenciamiento de clatrina analizamos la activación de la célula T y la expresión en superficie de marcadores implicados en la señalización. Los niveles en superficie de TCR, CD3, CD28, CD4, LFA-1 y VLA-4 (Huppa et al., 2010; Yokosuka et al., 2008; Arroyo et al., 1994; Mittelbrunn et al., 2004; Smith-Gavin et al., 2010) no estaban reducidos en las células clatrina KD (Fig 5 A). La expresión de CD3 en superficie estaba ligeramente aumentada en las células T CHC KD indicando que, al menos, parte de la población de CD3 se endocita de la membrana plasmática de manera constitutiva por endocitosis mediada por clatrina (Monjas et al., 2004). Un marcador de activación temprana del linfocito T es CD69 (Cochran et al, 2000), y no se observan diferencias en la expresión de este marcador entre las células T CHC KD y las células control (Fig 5 B). Además, el silenciamiento de clatrina no inhibe la rápida fosforilación de PLC gamma, ZAP-70 y ERK que se produce tras estimulación de TCR por anticuerpos anti CD3 y anti CD28. De hecho, sus niveles de fosforilación tras estimulación por anticuerpo estaban ligeramente aumentados en las células CHC KD. Estos controles demuestran que el efecto sobre la acumulación de actina en la SI no es debido a una menor señalización ni a una menor expresión en superficie de receptores claves en la activación de las células T (Fig 5 C y D).

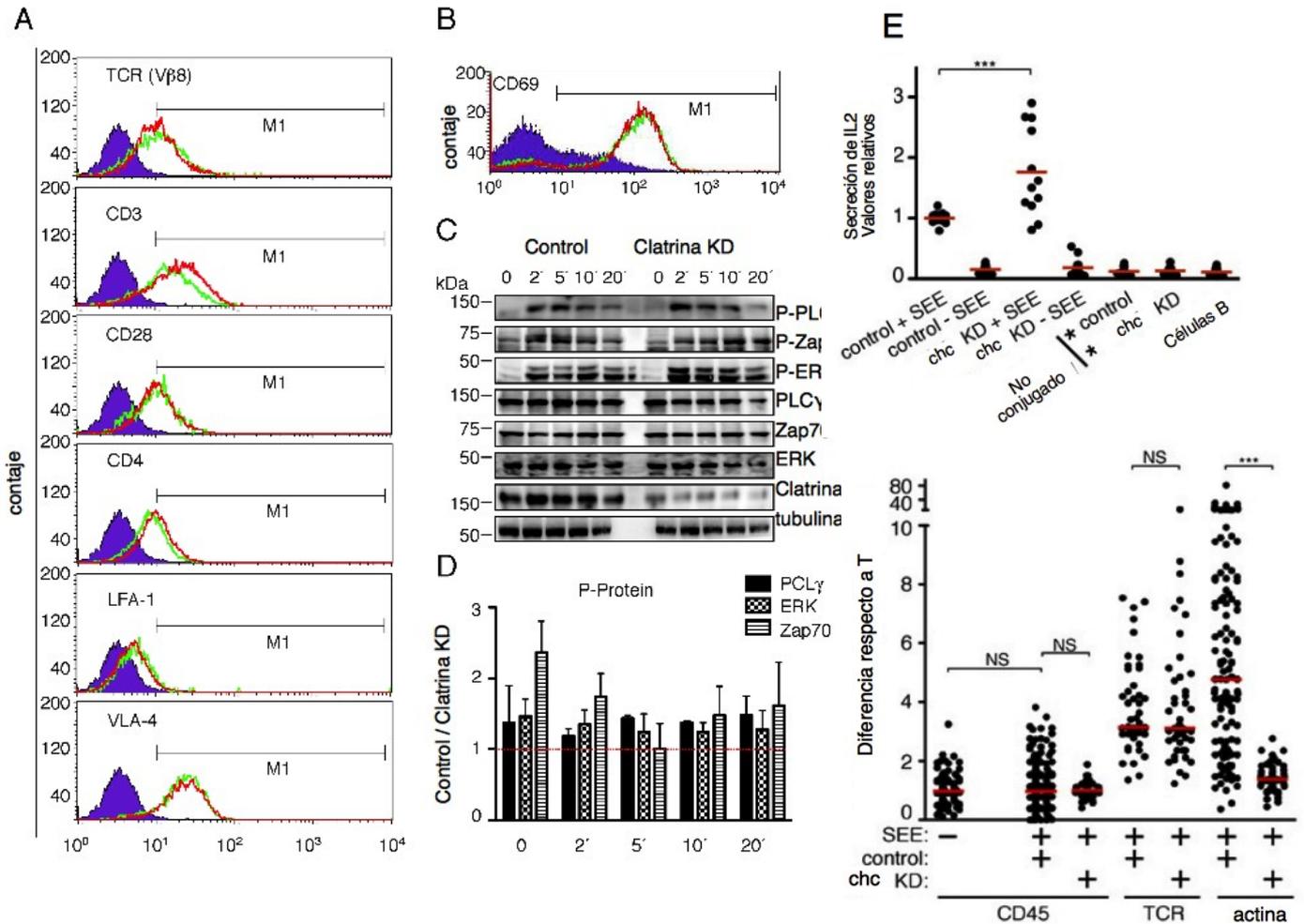


Fig 5 La depleción de clatrina no impide la señalización de la SI o la expresión en superficie de proteínas involucradas en la formación de la SI. (A y B) Expresión en superficie de las proteínas indicadas en células Jurkat no permeabilizadas usando los anticuerpos primarios correspondientes y Alexa 488 como secundario. Las líneas verdes indican la expresión en las células control y las líneas rojas la de las CHC KD. Los ensayos de citometría de flujo representan 3 experimentos independientes. M1 indica la señal por encima de fondo. (C) Inmunoblot de detección de proteínas fosforiladas en células control o CHC KD, estimuladas en los tiempos indicados con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28. (D) Relación de proteínas fosforiladas entre células clatrina KD y control en células T activadas con anti-CD3 y anti-CD28 en los tiempos indicados. La densidad de la banda se cuantifica con el programa ImageJ y la señal de la proteína fosforilada se normaliza respecto de la proteína total. Las barras de las proteínas estudiadas están por encima de 1 en casi todos los tiempos analizados, indicando mayor señalización en las células clatrina KD. Cada proteína se estudió en un mínimo de 3 experimentos y los datos se analizaron con el programa Prism. Barras error indican SD. (E) Secreción de IL-2 detectado por ELISA en el sobrenadante de cultivos de conjugados formados entre Raji cargadas con SEE (+) o no cargadas (-) con células J77 Jurkat control o CHC KD. El sobrenadante de células T no formando conjugados y el sobrenadante de Raji solas se usan como controles. Se realizaron cuatro experimentos independientes. Los datos se normalizan respecto a la señal observada en conjugados formados por células T control con Raji cargadas con SEE (F) Análisis cuantitativo con Synapse Measures de la distribución de CD45, TCR (cadena $\nu\beta 8$) y actina en el contacto intercelulares entre las células Jurkat y Raji. Células T control o CHC KD forman conjugados con APCs cargadas de SEE (+) o no (-) APCs. Cada punto corresponde a un contacto individual T/APC. Más de 250 contactos celulares se analizaron en cada caso en tres experimentos independientes. *** $P < 0.005$ (Mann-Whitney test). Las líneas rojas indican los valores de la mediana. Las diferencias no significativas (NS) $P > 0.5$ también se indican

Para evaluar las consecuencias funcionales del efecto del silenciamiento de clatrina en la fisiología de las células T, medimos la secreción de IL-2 (Smith-Garvin et al., 2012). Se ha descrito que la reducción de la polimerización de actina en la SI, tanto mediante drogas como por la depleción de proteínas de unión a actina, altera la secreción de IL-2 (Fig 5 E) (Nolz et al, 2007). La depleción de clatrina desregula la secreción de IL-2 de la misma manera que usando dosis pequeñas de citocalasina D (Nolz et al, 2007). Como controles adicionales tanto de del programa Synapse Measures como del modelo usado medimos CD45 endógena (proteína de membrana) (James et al., 2012; Alarcón et al, 2011) y GFP (proteína citoplasmática), que no se acumularon en la SI tras la estimulación con SEE en células control ni en KD de clatrina (Fig 5 F). Como era de esperar, no hubo acumulación de actina en células KD para clatrina y sí se produjo en las células control, y no hubo diferencias significativas en la acumulación de TCR entre las células control y las células KD de clatrina (Fig 5 F).

1.3 Clatrina es necesaria para el reclutamiento en la SI de la maquinaria molecular involucrada en la polimerización de actina

Para investigar la posibilidad de que clatrina sirva como plataforma molecular para el reclutamiento de proteínas implicadas en la polimerización de actina, empezamos estudiando el reclutamiento de dinamina-2, que promueve la polimerización de actina en la SI (Gomez et al, 2005; Mooren et al, 2009). El análisis de los conjugados de células T-APC en microscopía confocal en células vivas muestra que dinamina-2 y clatrina se relocalizan a la vez en la SI (Fig 6 A). En contraste, las células T CHC KD fueron incapaces de acumular dinamina-2 en la SI en células estimuladas con SEE (6 B y C). El silenciamiento de clatrina también alteró el reclutamiento hacia la SI del complejo Arp2/3, que es el factor más importante en el reclutamiento y polimerización ramificada de actina (Campellone y Welch, 2010, Gomez y Billadeau, 2008) (Fig 6 D). El silenciamiento de clatrina también impedía la acumulación de CD2AP y Hip1R (Fig 6 E y F). CD2AP interviene en la polarización y reorganización del citoesqueleto de actina hacia la SI (Dustin et al., 1998), y HIP1R es una proteína que se une directamente a las vesículas de endocitosis recubiertas de clatrina y al citoesqueleto de actina (Enqvist-Goldstein et al., 2001; Robertson et al., 2009). Para verificar que la acumulación de clatrina, actina, dinamina-2, el complejo Arp2/3, CD2AP y Hip1R era específica. Estos datos confirman la acumulación activa y específica de clatrina en la SI y su papel como plataforma de reclutamiento hacia la SI de la maquinaria necesaria para la polimerización de actina. Sin embargo, en este punto aún quedaba sin aclarar cuál era el origen

celular de la clatrina que promueve esta acumulación de actina en la SI.

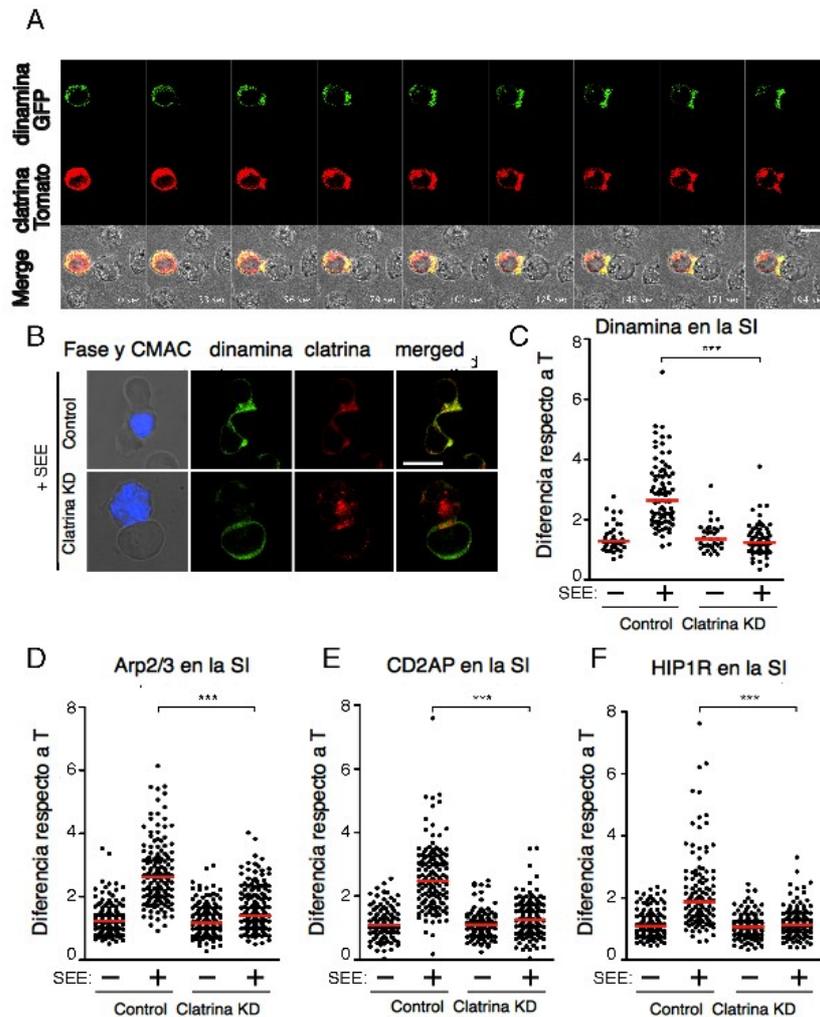


Fig 6 Clatrina es necesaria para el reclutamiento de la maquinaria molecular que promueve la polimerización de actina a la SI. (A) Serie de imágenes de confocal de células T Jurkat que expresan transitoriamente td-Tomato-LCA (rojo) y dinamina-2-GFP (verde) contactando una APC (no coloreada). La imagen muestra una de cada 23 adquisiciones en un intervalo de 60 segundos (B) Localización de clatrina (rojo) y dinamina-2 (verde) endógena en células T control o clatrina KD formando conjugados con APC cargadas con SEE. APC se tiñen en azul, las células T no están teñidas. La depleción de clatrina impide la acumulación de dinamina-2 en la SI. Barras de escala=10µm. (D-F) Análisis cuantitativo con Synapse Measures de la acumulación de dinamina-2, Arp2/3, CD2AP y HIP1R en la SI en contacto intercelular de células T control o CHC KD en conjugados con APC cargadas con y sin SEE. Cada punto corresponde a un contacto entre célula T-APC. Mas de 250 contactos celulares se contaron de 3 experimentos independientes.*** representa $P < 0,005$ (test Mann-Whitney). Las líneas rojas indican el valor de las medianas.

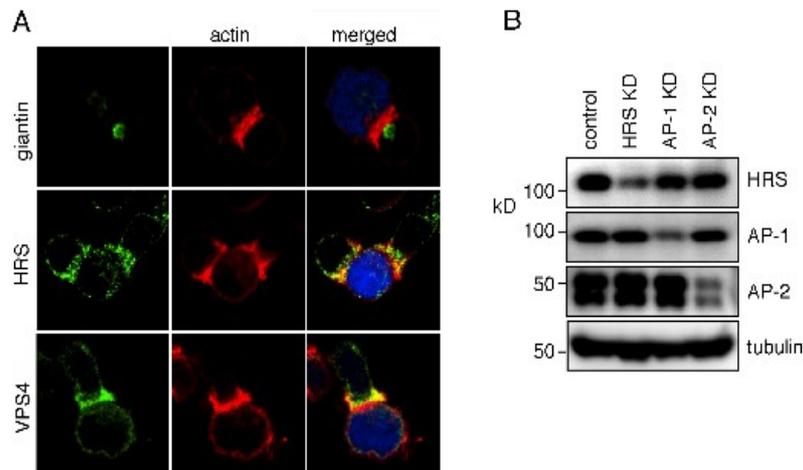
1.4 La clatrina endosomal dirige la reorganización del citoesqueleto de actina en la sinapsis inmune

Los datos de microscopía de fluorescencia mostrados sugerían que clatrina en la SI se asocia con membranas internas y no con la membrana plasmática. Clatrina se ha detectado en asociación con el complejo Golgi y Cuerpos Multivesiculares (MVB), además de en la membrana plasmática

(Rappoport, 2008; Raiborg et al., 2001; Huang et al., 2009).

Para identificar el origen de la clatrina que dirige la polimerización de actina en la SI, localizamos la actina junto con marcadores de Golgi y MVB durante la formación de la SI. Giantina, un marcador del aparato de Golgi (Linstedt y Hauri, 1993), no colocalizó con actina. Sin embargo, dos marcadores de los MVBs, Hrs y Vps4 (Hurley et al, 2006), localizaron con actina en la SI (Fig 7 A), sugiriendo que la clatrina asociada a MVB era la implicada en la acumulación de actina en la SI.

Después estudiamos el reclutamiento de clatrina a la SI en células T con AP1, AP2 o Hrs silenciadas (Fig 7 B)(proteínas adaptadoras para la asociación de clatrina con el aparato de Golgi, la membrana plasmática y MVB, respectivamente). Ninguno de los siRNA usados afectaron la expresión en superficie de TCR, CD3, CD28, CD4, LFA-1 o VLA-4 (no se muestra). El silenciamiento de Hrs, y en menor medida AP-1, alteró la acumulación de clatrina en la SI, mientras que la reducción del adaptador de membrana plasmática AP-2 no tuvo ningún efecto (Fig 7 C). Así mismo, el silenciamiento de Hrs inhibió la acumulación de actina, mientras que los silenciamiento de AP-1 o AP-2 no afectaron a la acumulación de actina en la SI (Fig 7 D). Estos experimentos indican que la clatrina asociada a MVB es la responsable del reclutamiento de proteínas que promueven la polimerización de actina durante la formación de la SI . Apoyando estos datos, una acumulación de MVBs en la SI se puede observar por microscopía electrónica (Fig 7 E).



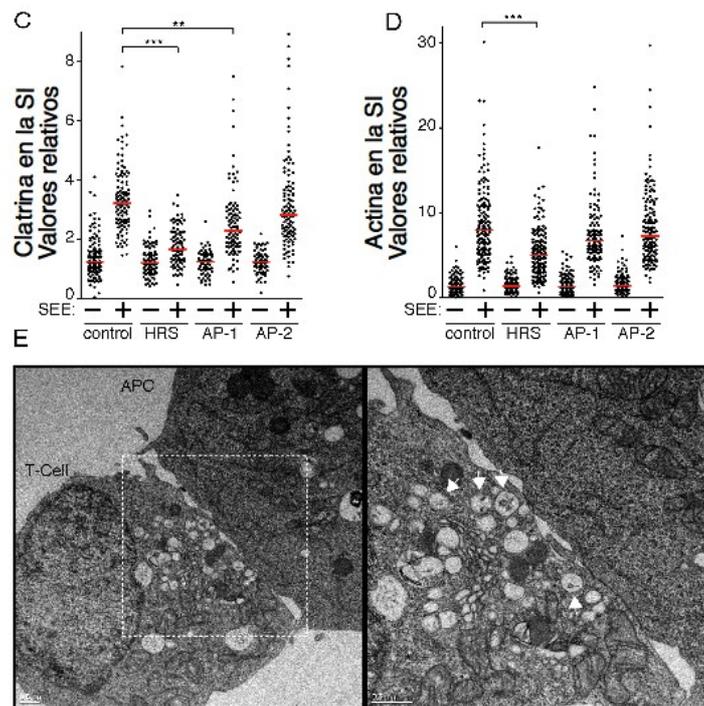


Fig 7 Los cuerpos multivesiculares se acumulan en la SI. (A) Imágenes de inmunofluorescencia de confocal mostrando la localización celular de giantina (marcador de Golgi) en los paneles superiores, Hrs y VSP4 (marcadores de cuerpos multivesiculares) en el medio e inferior respectivamente (todos en verde), actina (rojo) en la SI. APC están teñidas en azul. (B) Inmunoblot que muestra la supresión de expresión de Hrs, AP-1 y AP-2 en las células T Jurkat por reducción mediante siRNA de las proteínas indicadas. (C,D) Células T control, Hrs KD, AP-1 KD y AP-2 KD forman conjugados con APC cargadas con o sin SEE, y se cuantifica la acumulación de clatrina (C) y actina (D) en la SI mediante Synapse Measures en los contactos intercelulares. Mas de 300 (C) o 400 (D) contactos se midieron en 3 experimentos independientes, *** representa $P < 0,005$, y ** $P < 0,05$ (test Mann-Whitney) (E) Imagen de microscopía electrónica de la SI. La imagen de la derecha muestra a un aumento de la región enmarcada en la imagen de la izquierda. Las flechas indican los cuerpos multivesiculares cerca del contacto intercelular.

Para confirmar el papel de clatrina y los MVBs en la acumulación de actina en la SI en células T primarias, la expresión de la cadena pesada de clatrina y de Hrs fue reducida mediante siRNA (Fig 8 A). En presencia de APC cargadas de SEE, la actina se acumulaba claramente en la SI. El silenciamiento de clatrina o de Hrs impidió la acumulación de actina en la SI en los conjugados formados por linfoblastos T primarios tanto con células dendríticas como con Raji (Fig 8 B, C y D). Cabe destacar que las células T primarias deplecionadas de clatrina y Hrs presentan los mismos niveles de actina que las células con niveles normales de clatrina y Hrs. La acumulación de TCR (medida por inmunofluorescencia con anticuerpos contra la cadena $\nu\beta 8$) en el contacto entre la célula T y APC aparece no afectado, lo que sugiere que la activación de la célula T no está alterado por la depleción parcial de clatrina o Hrs en células T primarias, confirmando los datos obtenidos en células Jurkat.

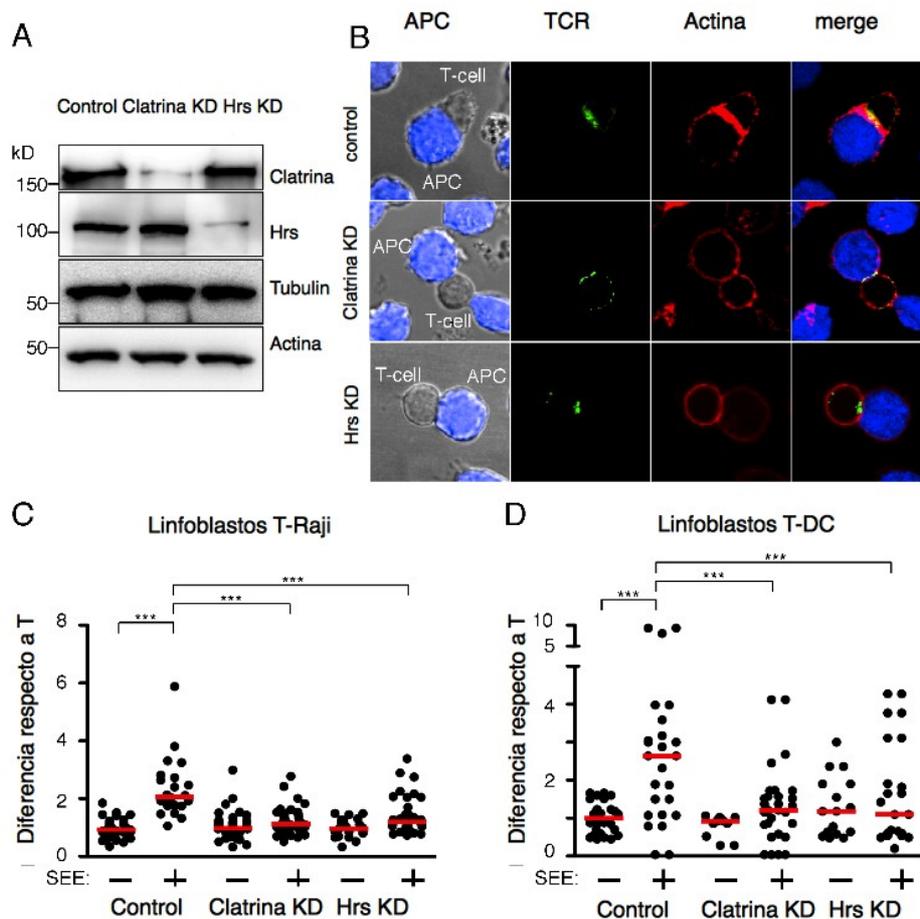


Fig. 8 Clatrina y Hrs son necesarias para la acumulación de actina en la SI en linfoblastos T primarios. (A) Inmunoblot que muestra la reducción de la expresión de clatrina y Hrs en linfoblastos T. Actina y tubulina se muestran como control de carga. (B) Imágenes de confocal de linfoblastos T formando conjugados con Raji. Las células Raji se marcan con CMAC y se muestran en azul, el TCR (cadena $\nu\beta 8$) en verde y actina en rojo. Las imágenes combinadas muestran actina, TCR y APC. Los paneles superiores muestran la SI de linfoblastos T control, y el medio e inferior muestran las formadas por linfoblastos T clatrina KD o Hrs KD, respectivamente. La depleción de clatrina o Hrs no afecta la acumulación de TCR en la SI. Barras de escala=10 μ m. (C,D) Análisis cuantitativo de la acumulación de actina en los contactos intercelulares con Synapse Measures. Los linfoblastos T control, clatrina KD y Hrs KD forman conjugados con APC Raji (C) o DC primarias (D) cargadas con o sin SEE. Cada punto representa la intensidad relativa de inmunomarcaje de actina de un contacto individual T-APC. Los linfoblastos T y las DC se obtuvieron de 3 donantes sanos y los resultados corresponden a 3 experimentos independientes.*** representa $P < 0,005$ (test Mann-Whitney). Las líneas rojas indican los valores de las medianas.

1.5 Tomografía de Rayos X para visualizar la sinapsis inmune:

Las técnicas de imagen son una herramienta fundamental para la investigación en biomedicina y biología. Mediante técnicas de alta resolución podemos observar las estructuras celulares y moleculares. Una de estas técnicas es la tomografía de rayos X, que requiere de la emisión de

fotones muy brillantes (un gran número de fotones por unidad de tiempo y de espacio) que se generan en un sincrotrón. Estos fotones se emiten en longitudes de ondas que corresponden a rayos X suaves en lo que se denomina “water-window” que se encuentra entre la longitud de absorción del carbono y la del oxígeno (284 y 517eV respectivamente) en la que el agua resulta transparente y las biomoléculas aportan mucho contraste a la imagen (McDermott et al, 2009; Larabell y Nugent, 2010; Hagen et al, 2012). Estos fotones resultan más penetrantes que los electrones y al contrario que en microscopía electrónica, permiten visualizar las muestras en condiciones nativas, sin fijación química, ni tinciones con metales pesados para contrastarlas y sin realizar cortes sobre ella (esto último en muestras de hasta 15 μm de grosor) (Larabell, 2009). Si bien es una técnica que proporciona menor resolución (30 nm) que la microscopía electrónica, tiene más contraste y permite diferenciar mejor las estructuras celulares (McDermott et al., 2012). Con estas premisas, decidimos estudiar la estructura de la SI por tomografía de Rayos X.

Las muestras se han de crionizar de forma rápida para conservar las muestras en su estado nativo y evitar que se formen cristales, el agua interna se queda en estado amorfo, a este proceso de ultra enfriamiento rápido se conoce como vitrificación (Dubochet et al., 1988, Hagen et al., 2012) y se lleva a cabo introduciendo las muestras en etano líquido, que tiene una cinética de enfriamiento más rápida que el nitrógeno líquido (Ge et al., 2008).

Una vez vitrificadas las muestras, y antes de enviarlas al sincrotron para su análisis, se ha de comprobar que las estructuras internas están bien conservadas. Esta comprobación se hace en el microscopio electrónico para lo que las muestras se han de fijar y el agua interna se sustituye por una resina que polimeriza a la temperatura de vitrificación (resina LOWICRYL HM23). Se observó al microscopio electrónico de transmisión el grado de conservación de los orgánulos celulares tras la vitrificación de conjugados formados por J77 y Raji en cortes a diferentes alturas de la célula.

A

B

C

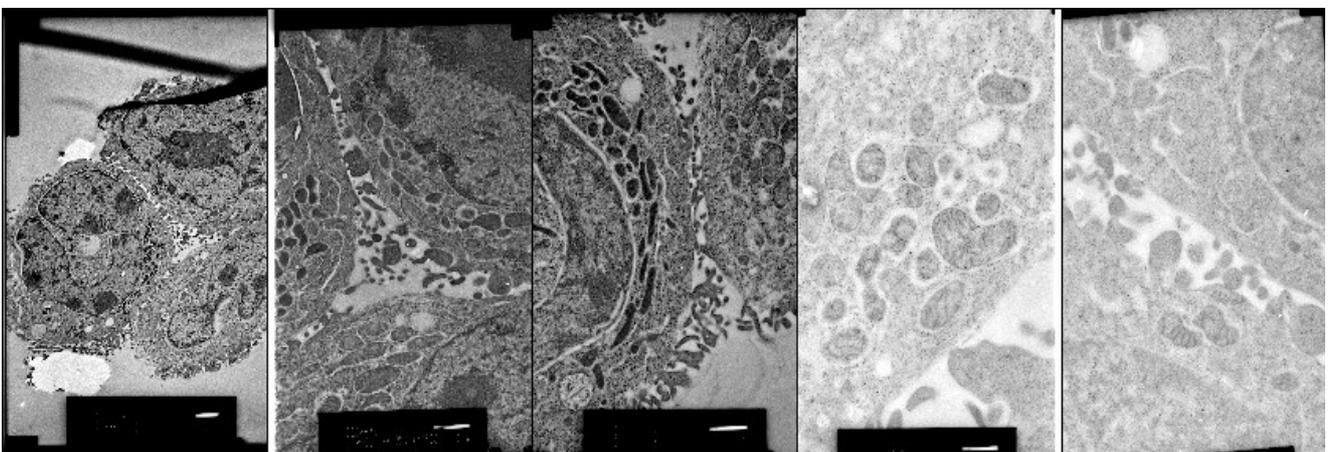


Fig 9 Las muestras se preservan correctamente tras la vitrificación. Cortes de muestras vitrificadas y posteriormente fijadas con resina LOWICRYL HM23 de un conjugado de célula Jurkat y Raji cargadas con SEE para comprobar la correcta conservación de las estructuras celulares. Una visión global del conjugado a 3.000 aumentos (A) y detalles a 7500 aumentos (B) y a 15.000 aumentos (C). Se puede observar en ellas cómo se han conservado a diferentes alturas de corte las estructuras internas de las células. A mayor aumento se observa el estado de los orgánulos y las membranas celulares. Las imágenes se adquieren en un microscopio electrónico de transmisión JEOLJEM 1200 EXII y los negativos se escanean y analizan mediante el programa ImageJ.

Las membranas externas e internas se mantienen en un correcto estado de conservación (Fig 9). Las estructuras internas no aparecen alteradas y no presentan concentración de formaciones de hielo en el interior de la célula, que conllevaría la rotura y destrucción de la ultraestructura interna de la célula. Los orgánulos como mitocondrias, vesículas y el aparato de Golgi así como núcleo, permanecen bien preservados tras la criosustitución. Se está optimizando el marcaje con anticuerpos anti-clatrina de los cortes, para identificar las vesículas recubiertas en muestras vitrificadas.

Una vez comprobado que las células se conservan correctamente por este método de congelación, el resto de rejillas conservadas en nitrógeno líquido se transportaron para visualizarlas en el sincotrón BESSY-II en Helmholtz-Zentrum de Berlin (HZB) en un contenedor seco, que mantiene la temperatura en forma de vapor de nitrógeno.

1.6 Obtención de tomogramas de los conjugados

Antes del transporte, se obtiene un mapa de la rejilla y se identifican conjugados de interés en un confocal Leica SP5. Dado que el sincotrón que se encuentra en BESSY-II tiene acoplado un microscopio óptico, es posible localizar en la rejilla, y adquirir tomogramas de los mismos conjugados que se han visualizado anteriormente en el microscopio confocal, y así llevar a cabo correlación entre microscopía óptica y de rayos X. Pero en nuestras muestras esto no fue posible dado que observamos que durante el proceso de vitrificación muchos conjugados cambiaban de posición o desaparecían de la superficie de la rejilla. Hay que tener en cuenta que trabajamos con células que no son adherentes.

Esta dificultad quedará solventada en futuros experimentos ya que hemos adquirido un sistema (criobox de Linkam) que nos permite visualizar las muestras crionizadas (después del proceso de vitrificación) en un microscopio óptico (Sartori et al., 2007). Además, permitirá localizar conjugados de interés, ya que se pueden usar en las células proteínas de fusión como clatrina-GFP, actina-GFP o CD63-GFP como marcador MVBs.

La tomografía consiste en la reconstrucción volumétrica (3D) a partir de imágenes en 2D obtenidas desde diferentes ángulos (Le Gros et al., 2005; Fernandez, 2012; Bárcena y Kostner, 2009). Esto se consigue gracias a un sistema mecánico que gira la muestra. En nuestro caso se obtuvieron imágenes con diferencias de 1° desde -60° a 60 (Fig 10). Ya en las imágenes en crudo se pueden observar estructuras que se asemejan a MVBs polarizadas hacia la zona de contacto entre las células. Estas vesículas que aparecen muy densas en los tomogramas podrían ser MVBs, ya que los lípidos aparecen como estructuras muy densas, y membranas dentro de membranas deberían aparecer como estructuras especialmente densas, que es lo que se observa en esto tomogramas. El siguiente paso es el alineamiento de las imágenes para generar un volumen 3D (Fig 11)

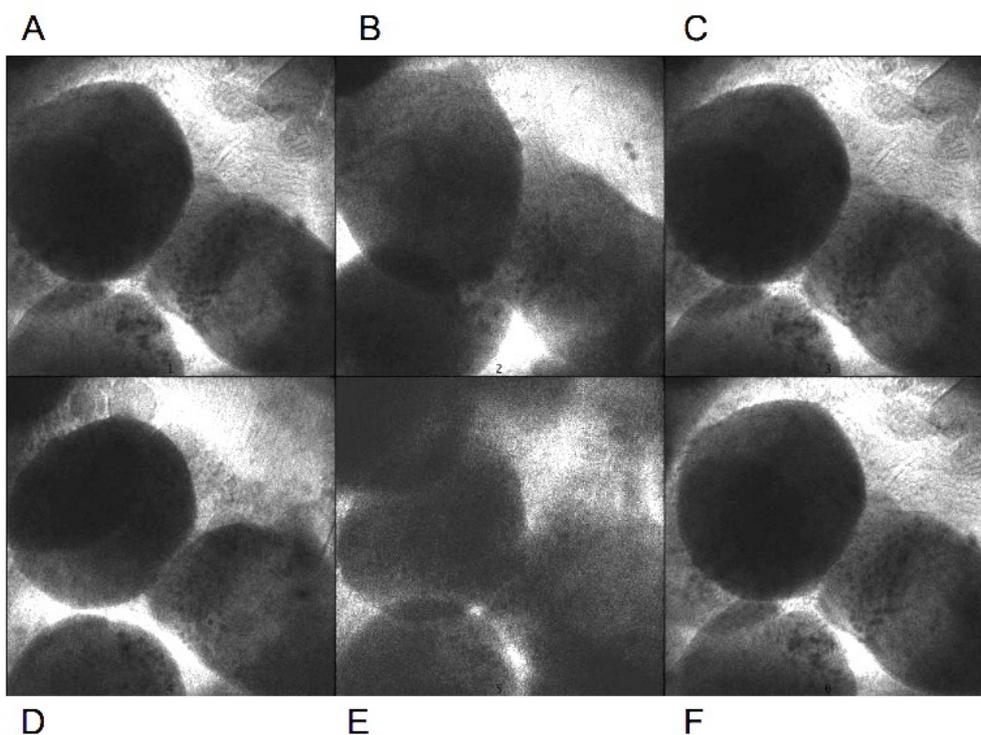


Fig 10 Imágenes de los tomogramas. Tomogramas sin tratar de un conjugado de interés. Se adquieren a distintos grados de angulación (B,C,D,E) en giros de 1° y de las posiciones 0° inicial (A) y final (F). Muestra de tomogramas no consecutivos de diferentes ángulos de la rejilla, editadas con el programa ImageJ.

Tras el alineamiento, las imágenes se procesan utilizando en programa Amira 5.4, en el que se van a seleccionar los elementos celulares a diferenciar.

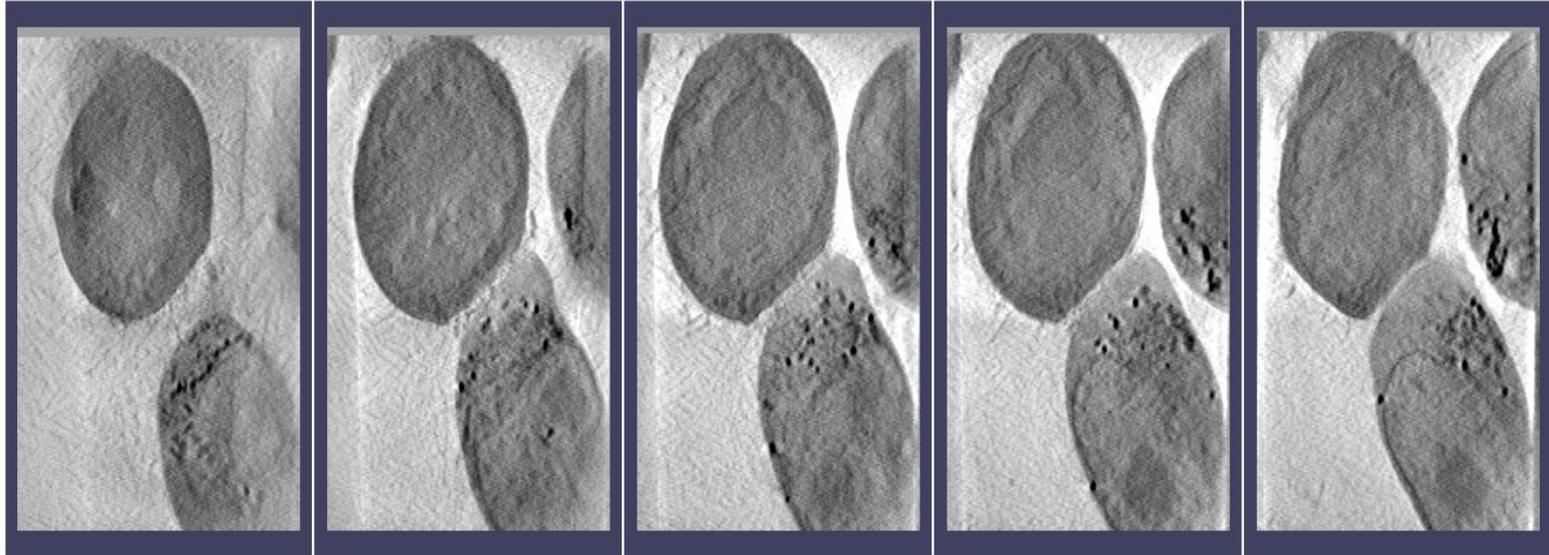


Fig 11 Alineamiento de tomogramas. Secuencia de tomogramas en el proceso de alineamiento de un conjugado utilizando IMOD. Los tomogramas se han alineado para poder generar un volumen 3D y se ha limpiado el ruido de fondo. Se pueden adivinar las estructuras más oscuras correspondientes a estructuras ricas en membranas, que absorben mayor cantidad de rayos X.

1.7 Diferenciación de las estructuras celulares: Segmentación

Los volúmenes obtenidos tras la alineación de los tomogramas se editan con ImageJ y Amira para diferenciar mediante el contraste de la señal que emiten cada uno de sus componentes. Cada material biológico tiene un coeficiente de absorción característico así que la absorción de rayos X puede ayudar en la identificación de los orgánulos dada su composición (Parkinson et al., 2008).

Usando el programa Amira, seleccionamos los componentes en función de la cantidad de señal que emiten, es decir, la cantidad de rayos X absorbidos. Las estructuras se reconstruyen en relación a la coincidencia en el volumen de la muestra de elementos con misma señal, localizando en el espacio los elementos celulares (McDermott et al., 2009). De modo que los elementos que queden englobados en los límites de contraste establecido para una determinada intensidad de señal quedan englobados como pertenecientes a igual composición y estructura (Uchida et al., 2009; McDermott et al., 2012)(Fig 12).

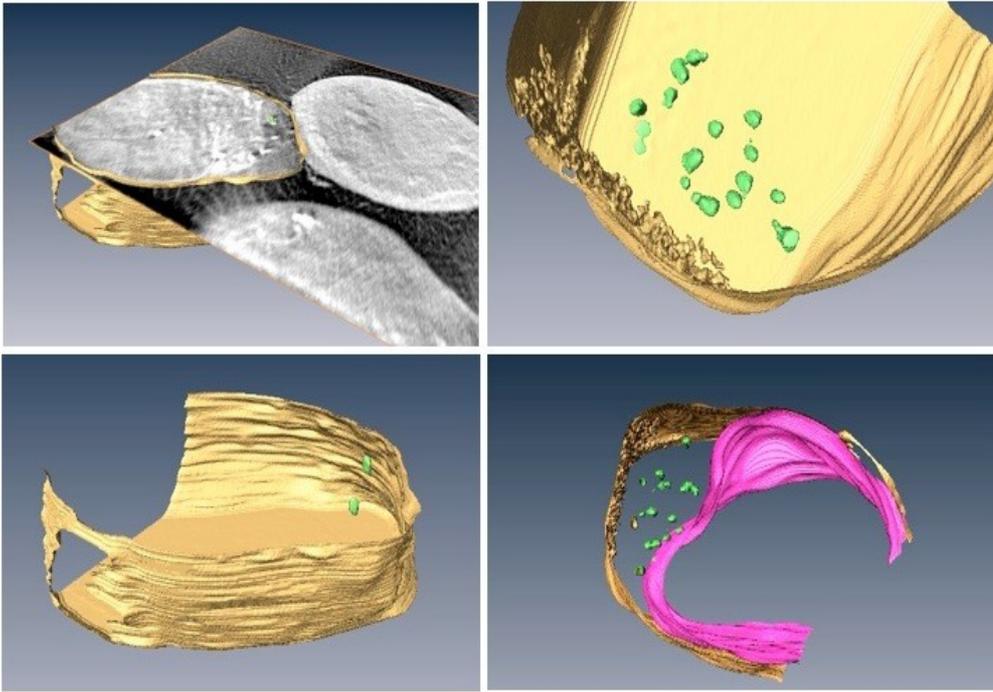


Fig 12 Reconstrucción de membrana plasmática y vesículas de un conjugado entre Raji y célula T . Serie de imágenes en el que se muestra la reconstrucción de la distribución en el mapa 3D de la célula T de las vesículas (verde), en relación a la membrana plasmática (amarillo) y membrana nuclear (rosa). Para la reconstrucción se utiliza el programa Amira® 5.4, a partir de una imagen de 600 cortes seleccionando las estructuras cada 5 cortes en función del contraste que aporta la señal de rayos X.

2.1 Los linfocitos T CD4+ primarios se infectan pobremente in vitro

Aunque la barrera intestinal impide que las bacterias de la luz del intestino se diseminen por el organismo, ésta no siempre es completamente impermeable y existen sitios especializados como los epitelios asociados a folículos que permiten una constante toma de muestras de la flora de la luz intestinal a través de las células M (Sansone et al., 1999). Las bacterias que se han trasladado se exponen a los macrófagos y DC, que las procesan y presentan los antígenos a los linfocitos (Cossart, 2004). Además de este transporte de bacterias y antígenos mediado por las células M, se ha mostrado que las DCs intestinales pueden proyectar protusiones celulares entre las células epiteliales hacia la luz intestinal y capturar bacterias del lumen (Rescigno et al., 2001). Las DCs infectadas migran a los ganglios linfáticos donde contactan con linfocitos T para la presentación antigénica (Waite et al., 2011, Edelson et al., 2011, Aoshi et al., 2001). También existen datos sobre cómo DCs infectadas llegan a contactar con linfocitos T en los ganglios linfáticos (Voedisch et al., 2009).

Por otra parte se ha mostrado que células T pueden infectarse *in vivo* (McElroy et al., 2009) sugiriendo que los linfocitos T podrían servir como reservorio para las bacterias en el transcurso de una infección. Teniendo en cuenta que los linfocitos T se infectan muy pobremente *in vitro* (ver más adelante Fig 13), la ruta por la que se pueden infectar sigue siendo desconocida. En base a estas evidencias nos decidimos a estudiar si las bacterias pueden secuestrar la interacción entre DCs y linfocitos T en el transcurso de la presentación antigénica, para pasar desde las DCs infectadas a los linfocitos T.

Como sólo existe un manuscrito, que conozcamos, que describa *in vivo* la infección bacteriana de células T (McElroy et al., 2009), empezamos confirmando esta posibilidad. Infectamos *L. monocytogenes* a ratones por vía intravenosa y 48 horas después se aislaron del bazo las células CD4+ y se testaron las unidades formadoras de colonias en un ensayo típico de supervivencia a gentamicina. Observamos que los linfocitos T CD4+ captaron bacterias *in vivo*, confirmando el trabajo previo (McElroy et al., 2009), y por lo tanto validando la base de nuestra hipótesis (no se muestra).

Testamos la tasa de infección directa de las células T *in vitro* (Fig 13) y la comparamos con la de otros tipos celulares, incluyendo DCs. Las células T primarias humanas (linfoblastos T) se infectan muy pobremente *in vitro* en comparación con las DCs e incluso al compararlas con células epiteliales (células Hela). Se usaron diferentes bacterias (*Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*) con el mismo resultado. Las células T CD4+ naïve de ratón así como las células T CD4+ activadas con OVA en el medio de cultivo 24 hora se infectan también muy débilmente en comparación con las DC derivadas de médula ósea sin OVA.

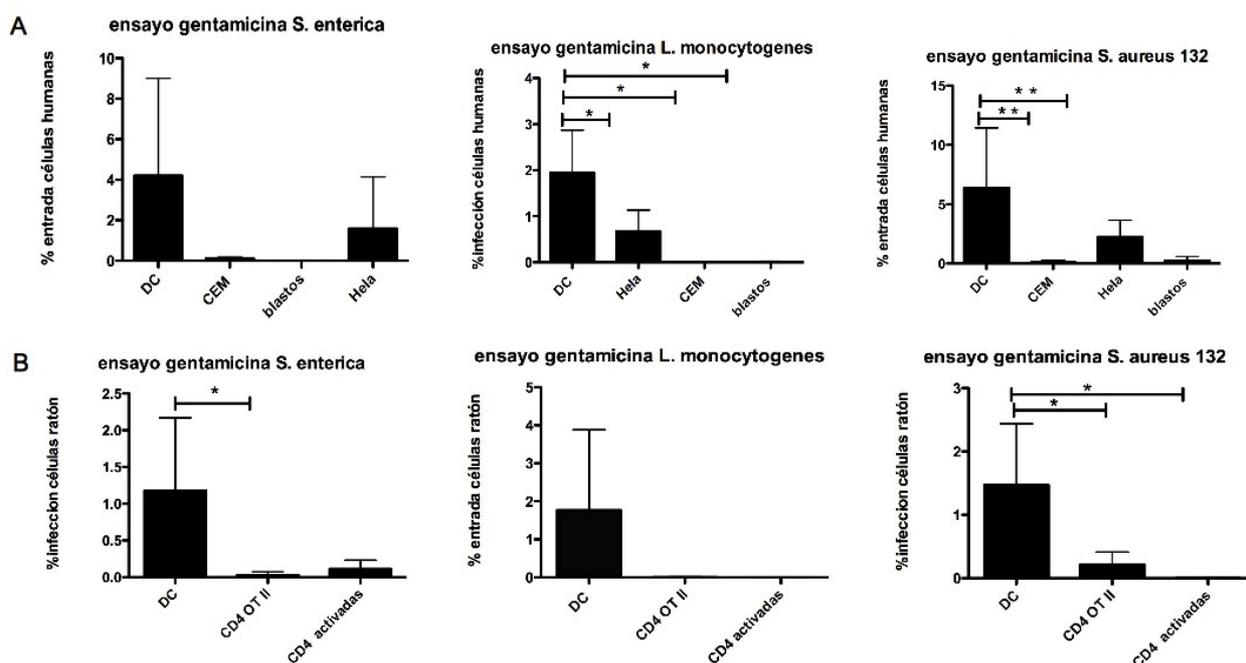


Fig 13 Internalización de diferentes bacterias en linfocitos T y otros tipos celulares. Ensayo típico de supervivencia a gentamicina sobre células primarias y líneas celulares de humanas (A) y murinas (B). Infección con *S. enterica*, *L. monocytogenes* y *S. aureus*. Tras 2 horas de infección con una MOI de 10, se les añade gentamicina (50 µg/ml) durante 1 hora para eliminar las bacterias que no se han internalizado. Luego se lisan las células y se plaquean las muestras. Las colonias se cuentan a 24 horas de crecimiento (48 horas en el caso de *L. monocytogenes*). La gráfica incluye la media y la desviación estándar, * representa $P < 0,05$ (test ANOVA con post test de Bonferroni)

2.2 Polarización bacteriana en DCs infectadas hacia la SI

Para explorar la posibilidad de que las bacterias presentes en las DCs infectadas pasen a las células T, empezamos estudiando la localización subcelular de las bacterias en los conjugados entre DCs infectadas y células T no infectadas. Usamos dos modelos para estos experimentos: murino y humano. DCs humanas derivadas de monocitos de sangre periférica se infectan durante 1 hora

con diferentes bacterias, a la vez que se cargan con SEE. Después de varios lavados, las DCs infectadas se juntan con células T (linfoblastos humanos enriquecidos en TCR $\nu\beta 8$) no infectadas obtenidas de sangre humana permitiendo la formación de conjugados durante 30 minutos. Las muestras se analizaron mediante microscopía confocal (Figs 14 A, B y C). En el modelo murino, DCs de ratones C57/BL6 derivadas a partir de células de médula ósea, se infectan con las mismas bacterias utilizadas en el modelo humano, y se cargan con OVA. Tras los correspondientes lavados, se forman conjugados con células T CD4⁺ naïve aisladas de ratones transgénicos OTII, que contienen TCRs que reconocen el péptido de la OVA (OVAp 323-339) (Figs 14 D, E y F).

Las bacterias aparecen en la DC en la zona de proximidad al contacto con la célula T. La polarización de la bacteria a la zona de contacto DC-T se observó con todas las bacterias testadas y en ambos modelos (murino y humano). En algunos casos, las bacterias se observan ya en las células T sugiriendo que las bacterias podrían pasar de la DC a la célula T (Fig 14 A).

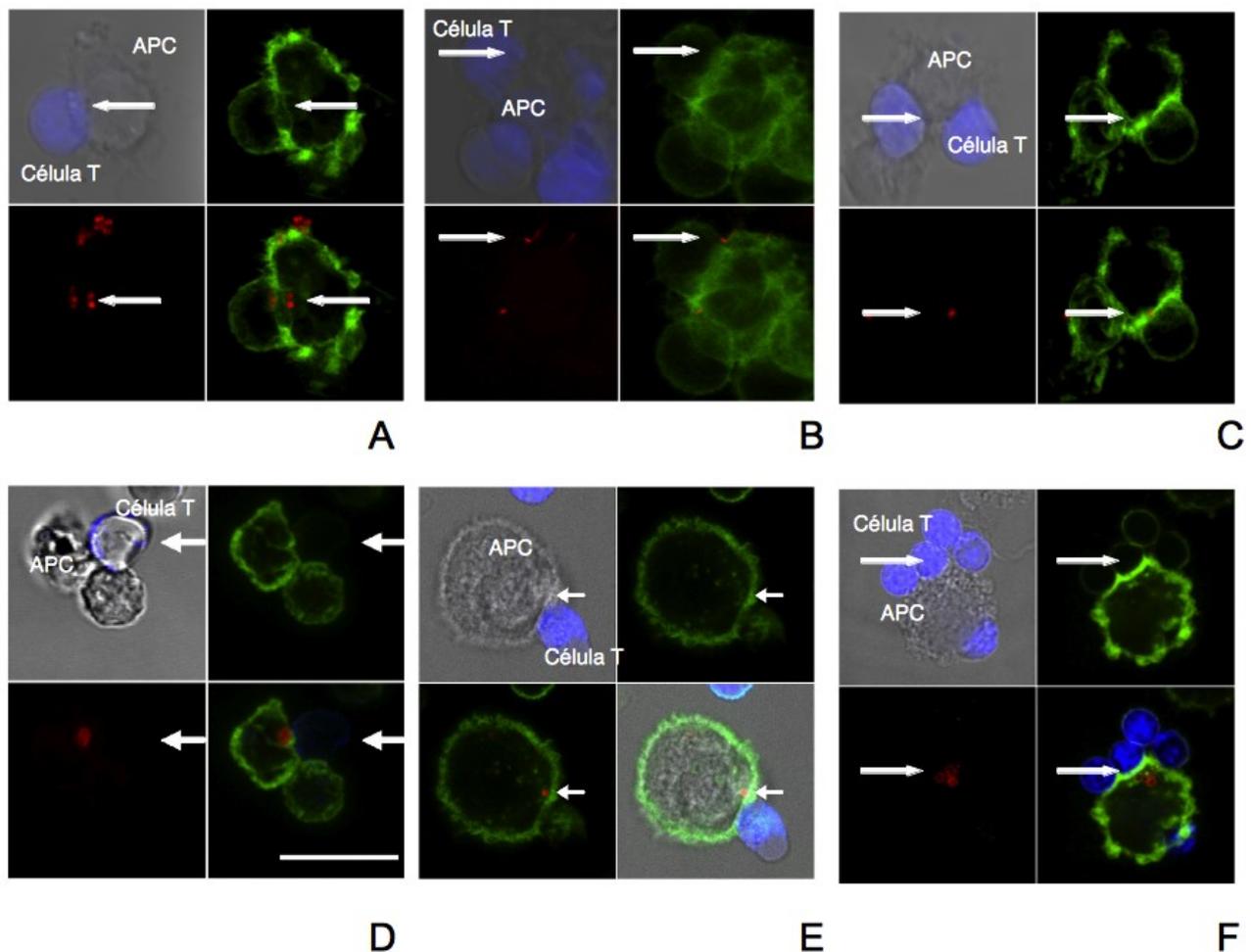


Fig 14 Las diferentes bacterias se polarizan hacia la SI en conjugados de DC y células T en presencia de SEE/OVA. Imágenes de inmunofluorescencia de confocal de conjugados a tiempos cortos (30 minutos) en las que se observa la polarización de bacteria *S*.

enterica (A y D), *L. monocytogenes* (B y E) y *S. aureus* (C y F) en la zona de proximidad a la sinapsis inmune tanto en células humanas (A, B, C) como en células de ratón (D, E, F). Las bacterias se muestra en rojo, actina en verde, las DC no tienen tinción y los linfocitos T CD4+ se marcan con CMAC y se muestran en azul.

2.3 Las bacterias pasan desde las DCs infectadas hacia las células T con las que contactan

La cuantificación del paso de las bacterias desde las DCs infectadas a las células T en las imágenes de confocal tiene algunas limitaciones. No se pueden cuantificar muchos de eventos y es fácil cometer errores en esta cuantificación dado que en muchas ocasiones no es fácil determinar si una bacteria está ya en la célula T o se mantiene en la DC (Fig 14 A).

Para cuantificar el paso bacteriano de DCs a células T de manera precisa, analizando un gran número de eventos y minimizando los posibles errores, diseñamos un protocolo basado en la citometría de flujo. Este método nos permite el análisis de un gran número de conjugados y además evita la subjetividad de las cuantificaciones de confocal. Como anteriormente, usamos los dos modelos basados en células primarias de origen murino y humano. Se infectaron DCs con diferentes bacterias y, tras lavar intensamente, se incubaron con células T durante hora y media. Para comprobar si la infección de las células T requiere del contacto físico célula/célula, los conjugados se formaron en presencia (o no) de una barrera física (transwell; con un tamaño de poro de 3 μm que permite el paso bacteriano) que impide el contacto directo entre las DCs infectadas y las células T. Además, las DCs infectadas se cargaron o no con antígeno reconocido por los TCRs de las células T, para determinar si el proceso de diseminación bacteriana se favorece por reconocimiento específico de antígeno, que aumenta la fuerza de interacción célula/célula y el tiempo en que los conjugados están formados. Después, los conjugados se separaron por agitación (vórtex) y se analizaron por citometría de flujo para cuantificar el porcentaje de células T que presentaban bacterias intracelulares. Como control, comparamos la infección bacteriana directa sobre células T, con la infección vía DCs. Dado que desconocemos número exacto de bacterias que interacciona con células T desde una DCs infectadas, forzamos el sistema añadiendo bacterias en exceso durante la infección directa de las células (la MOI sobre las DCs fue de 10, la MOI sobre las células T en infecciones directas fue de 50, salvo que se indique lo contrario). Cabe destacar que MOIs elevadas conllevan altas tasas de infección (Huang et al., 1998) Para mejor comprensión del protocolo véase esquema de la figura 15 C.

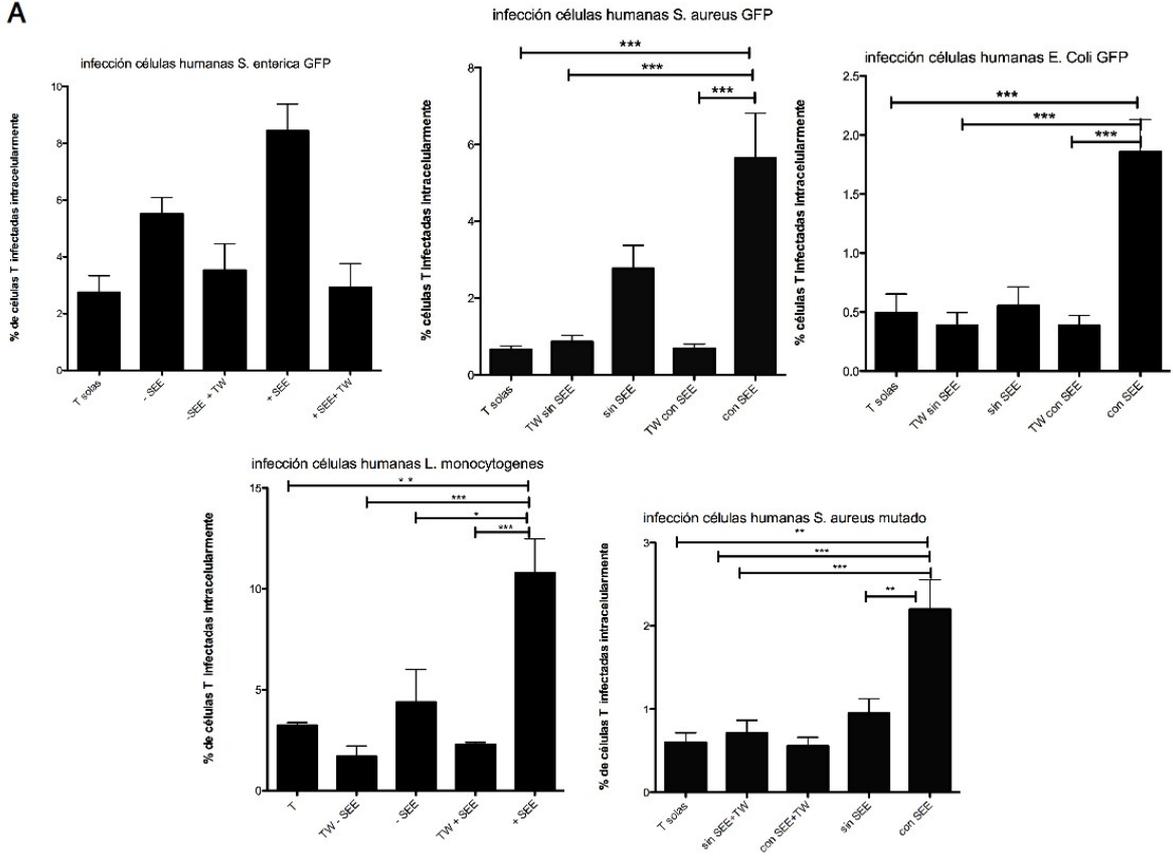
Estos experimentos (Fig 15 A y B) mostraron que a pesar de estar favorecida por una altísima MOI, la infección directa de los linfocitos T resultó mucho menor que la infección a través del contacto DC/ célula T. Esta vía nueva (desconocida hasta ahora) de diseminación bacteriana requiere de

contacto físico entre DCs y células T, ya que en presencia de una barrera física, se bloquea el paso bacteriano a las células T, y estuvo potenciada por la presencia de antígeno reconocido por el TCR de la célula T en ambos sistemas: péptido de OVA en ratón y SEE en humano. Para determinar si la formación de la SI realmente juega un papel en esta vía de transmisión bacteriana, se bloqueó la unión celular usando anticuerpos bloqueantes contra integrinas (LFA-1) necesarias para la formación de la SI (Gonzalez-Amaro et al., 2005). La presencia de estos anticuerpos anti LFA-1 redujeron significativamente la diseminación bacteriana desde las DCs a las células T en comparación con el anticuerpo control de isotipo, tanto en humano como en ratón (Fig 15 D).

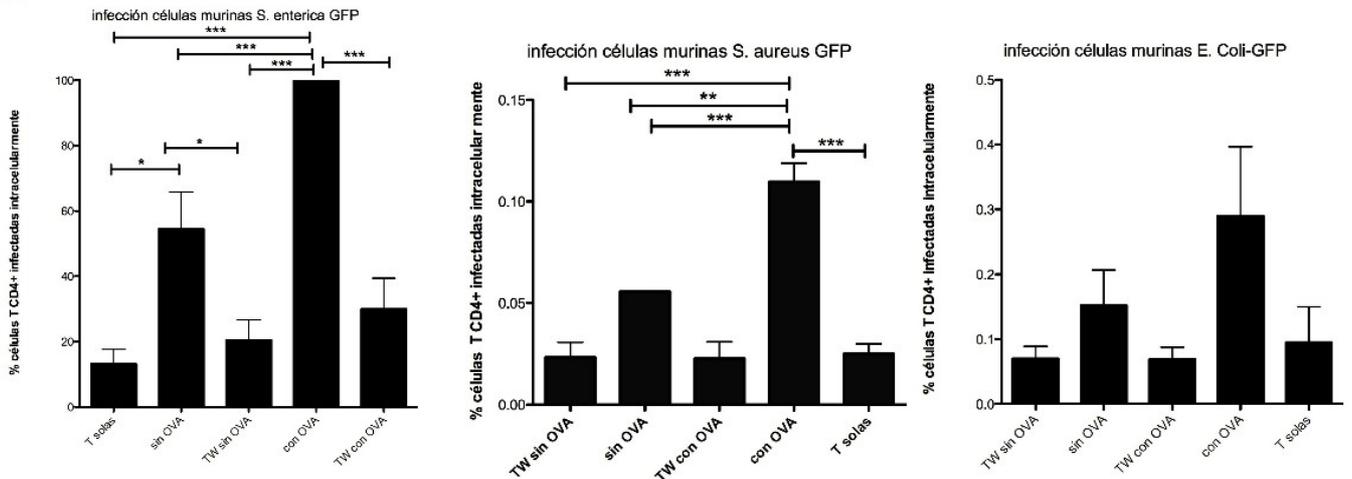
Para validar la relevancia de las interacciones específicas DC-T en esta nueva vía de diseminación bacteriana, realizamos en paralelo otro tipo de experimentos donde se formaron conjugados entre DCs infectadas y cargadas con OVA con una mezcla de células T CD4+ naïve de ratones OTII (todas las células reconocen el péptido de OVA) y células T naïve de ratones WT C57/BL6 (no hay reconocimiento específico del péptido de OVA). La infección bacteriana de las células T de ratones OT II fue mayor que la infección de las células T de ratones WT (Fig 15 E), confirmando que la especificidad antigénica en la unión DC/T tiene gran relevancia para la transferencia bacteriana. El bloqueo de las interacciones de LFA-1 reduce la transferencia de bacteria y, al contrario, la presencia de antígeno reconocido por el TCR aumenta la entrada de las diferentes bacterias estudiadas.

En resumen, nuestros datos confirman que las diferentes bacterias utilizadas en este trabajo piratean la SI en una nueva vía de diseminación desde la DC infectada a la célula T. Este mecanismo depende del contacto célula a célula y se favorece por la formación de la SI.

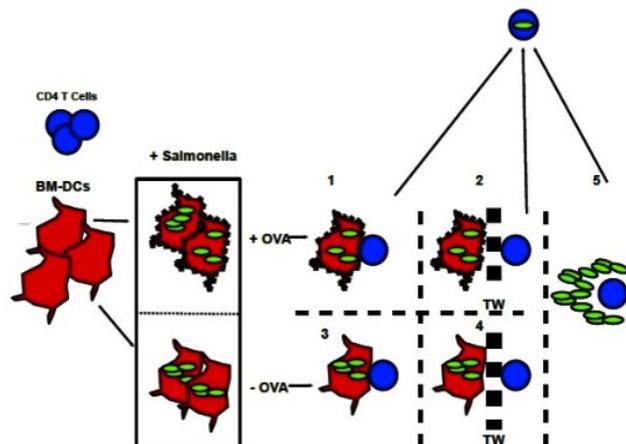
A



B



C



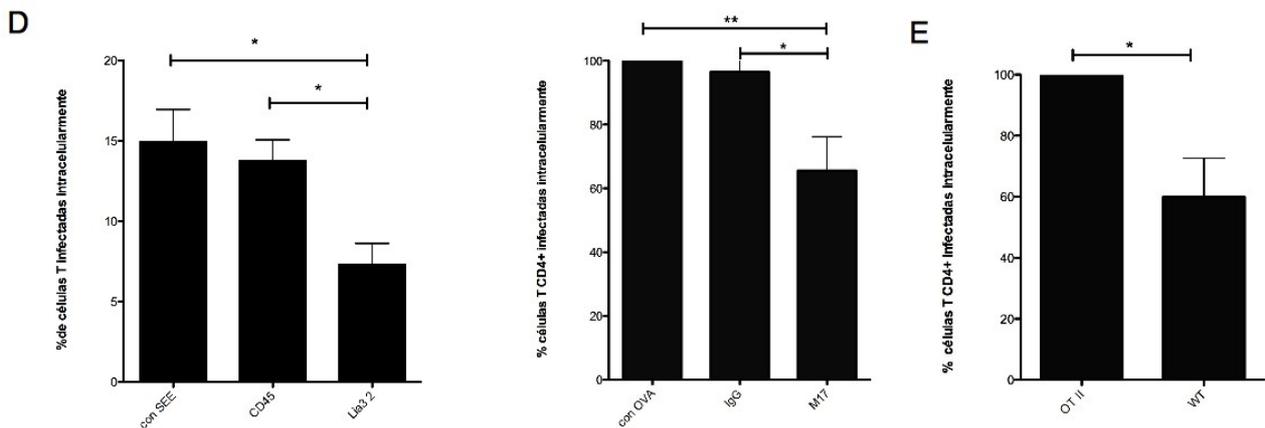
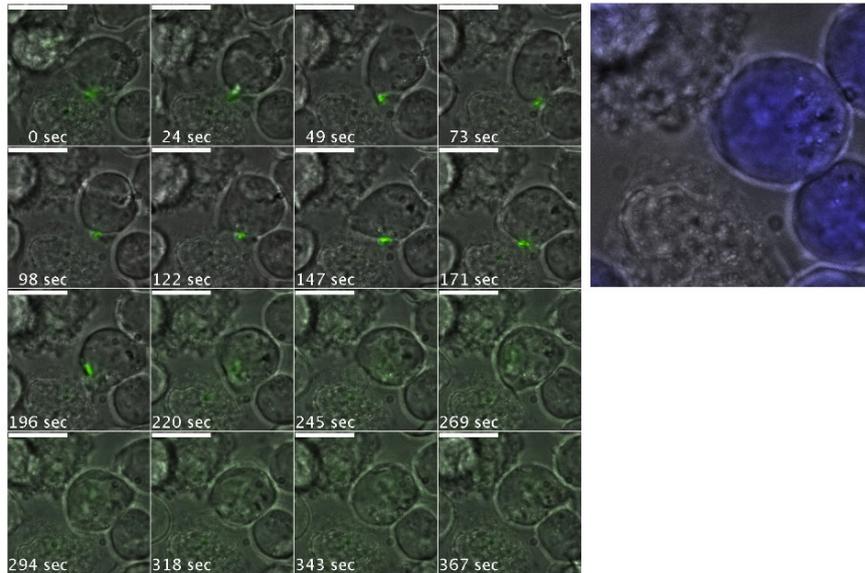


Fig 15 Bacterias presentes en DCs infectadas son capaces de pasar a células T que formen SI con estas DCs. (A y B) Gráfica con el porcentaje de infección de linfoblastos T humanos y linfocitos T CD4+ de ratones OTII con las bacterias indicadas (patógenas y no patógenas). Cada columna se refiere a una de las condiciones explicadas en el punto anterior. T solas se corresponde al control, de la infección directa sobre células T. Los demás puntos corresponden a células T que han formado conjugados con DCs infectadas con las bacterias indicadas. Estas DCs estaban (o no) cargadas con el correspondiente antígeno (OVA, o SEE), y se permite el contacto directo con las células T, o se impide este contacto usando un transwell (Tw). La presencia de una barrera física entre ambas células impide la transmisión del patógeno de las DC a las células T. La presencia de antígeno aumenta la tasa de transferencia de bacterias entre DC y células T. Los porcentajes de infección se analizaron con el programa FlowJ. Las gráficas obtenidas usando el programa Graphpad, muestran la media y desviación típica * $p < 0,05$ (test ANOVA post-test Bonferroni). (C) Esquema del experimento para citometría de flujo de células. Las DCs se infectan (MOI = 10) con las bacterias. Se dividen en dos grupos cargadas con antígeno (SEE para muestras de origen humano y OVA para las muestras de origen murino) o sin antígeno. Se añaden las células T sin infectar (ratio 1:1) permitiéndose el contacto con las DCs infectadas, o impidiéndose dicho contacto usando una barrera física (transwell) de separación. Como control, se infectan células T directamente con las bacterias con una MOI = 50. (D) Formación de conjugados entre DCs infectadas con *S. enterica* tratadas con anticuerpos anti CD45 e IgG como controles para los modelos humano y murino respectivamente o anti-LFA1 (Lia3.2 en humanos y M17 en ratón). Adicionalmente se muestran conjugados formados en ausencia de anticuerpo. Las barras muestran el porcentaje de células T infectadas medido por citometría de flujo. * representa $P < 0,05$ (test ANOVA y post-test de Bonferroni) y las gráficas muestran la media con la desviación estándar. (E) Conjugados formados por DCs infectadas con *S. enterica* simultáneamente con linfocitos T provenientes de ratones OT II y WT. Tras la formación de conjugados se separan las células y se analiza la internalización bacteriana por citometría de flujo. Las gráficas muestran la media y la desviación media. * representa $P < 0,05$ (t test)

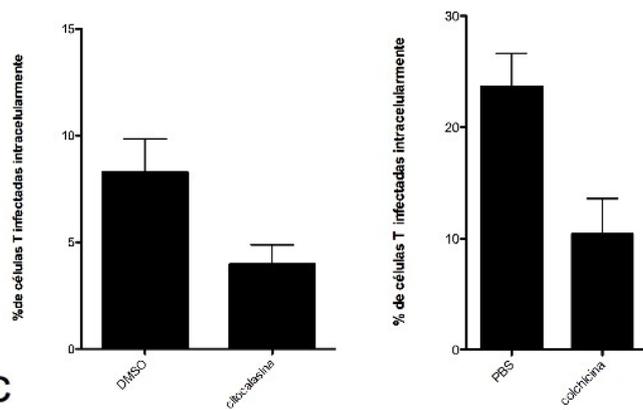
Este paso de bacterias desde DCs infectadas hacia las células T que las contactan se siguió también por microscopía de fluorescencia sobre células vivas usando bacterias que expresaban la proteína verde fluorescente (GFP) (Fig 16 A). En estos vídeos, parece que las células T tienen un papel activo en la adquisición bacteriana al emitir pseudópodos y estructuras similares a invadopodia (Ueda, 2011) hacia las DCs infectadas. Por lo tanto, para comprobar si el citoesqueleto de la célula T estaba involucrado en la transferencia de bacteria, analizamos la transferencia de bacteria en

células T tratadas con citocalasina D (un inhibidor de polimerización de actina) y colchicina (un inhibidor de crecimiento de microtúbulos). La transferencia de bacteria desde las DCs a las células T se redujo en presencia de ambos, citocalasina D (Fig 16 B) y colchicina (Fig 16 C) usando células de ratón y células primarias humanas. Estos resultados indican que el citoesqueleto de la célula T es necesario para la transferencia de la bacteria de la DC a la célula T .

A



B



C

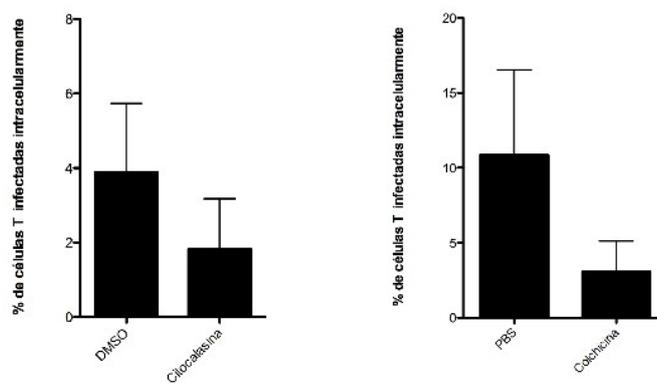


Fig 16 (A) Secuencia de vídeo en microscopía confocal sobre células vivas. Se muestran 16 imágenes adquiridas cada 25 segundos

del paso de *S. enterica* GFP desde una DC humana infectada a un linfocito T CD4+, que se marca en azul teñido con CMAC, en el cuadrante de la derecha. (B) Tasa de infección de los linfocitos T (de ratón OTII y humanos) tratados con citocalasina D. En las muestras control las células están tratadas con DMSO que es el solvente de la citocalasina (C) Tasa de infección de los linfocitos T (de ratón OTII y humanos) tratados con colchicina (o como control PBS) 30 minutos antes de la formación de conjugados con DC infectadas con Salmonella con una MOI 50:1 durante 1 h. Las DCs estaban a su vez cargadas con los antígenos SEE en el modelo humano y OVA en el modelo de ratón. * representa $P < 0,05$ t test o test de Bonferroni. muestran la media y la desviación media. * representa $P < 0,05$ (t test)

Clatrina es la proteína que define la endocitosis mediada por clatrina, donde forma una cubierta alrededor de la membrana invaginada y permite múltiples interacciones de proteínas que son necesarias para que ocurra la endocitosis (Ungewickell y Hinrichsen, 2007).

Está establecido que la endocitosis mediada por clatrina en levaduras requiere la reorganización de actina. Sin embargo, la situación en células de mamíferos es menos clara: mientras varios autores muestran datos en los que actina está involucrada en endocitosis dependiente de clatrina (Chen y Brodsky, 2005; Carreno et al., 2004; Yasar et al., 2005), otros muestran que la depleción de actina no tiene efecto en las dinámicas de internalización de las vesículas cubiertas de clatrina (Boucrot et al., 2006). Estudios con patógenos bacterianos y hongos muestran que clatrina y actina participan en la internalización de los patógenos (Moreno-Ruiz et al., 2009; Veiga y Cossart, 2005; Veiga et al., 2007), y se ha propuesto que en células de mamíferos existe un proceso de internalización de grandes placas de membrana en un proceso que incluye actina y clatrina que es muy similar a la endocitosis mediada por clatrina clásica (Saffarian et al., 2009).

Nos propusimos estudiar si clatrina formaba una plataforma molecular necesaria para el reclutamiento de las proteínas necesarias para activar la polimerización de actina. Un modelo biológico muy útil para intentar demostrar esta hipótesis es la SI, en la que la acumulación masiva de actina en la zona de contacto entre la APC y la célula T es un elemento fundamental en el proceso de activación del linfocito T.

Hay dos conexiones conocidas de clatrina y actina. Una incluye dinamina-2 y cortactina, que activa el factor de nucleación de actina Arp2/3 (McNiven et al., 2000; Uruno et al., 2001; Weaver et al., 2001). La otra es Hip1R, que contiene sitios de unión para F-actina, cortactina y las cadenas ligeras de clatrina (Enqvist-Glodstein et al., 2004; Wilbur et al., 2008). Un estudio reciente muestra que Hip1R es una proteína necesaria para el reclutamiento de actina a las zonas cubiertas de clatrina en la endocitosis de *Dictyoselium discoideum* (Brady et al., 2010). Nuestros resultados no sólo confirman que clatrina participa en eventos biológicos que requieren polimerización masiva de actina, sino que también demuestra que sirve como una plataforma molecular para reclutar en la SI las proteínas necesarias para la polimerizar actina (dinamina-2, Hip1R y Arp2/3).

En este modelo, primero demostramos que CHC de las células T está presente en el contacto con la APC. Observamos una acumulación masiva de CHC en el área de contacto entre el linfocito T y la APC cuando se presenta un antígeno reconocido por el TCR de la célula T. Además, la depleción de clatrina reduce los niveles de actina polimerizada y de proteínas fundamentales en la regulación de dicha polimerización. La polimerización de actina tras la activación del linfocito T es

consecuencia de la cascada de señalización que se inicia en el TCR. Esta cascada de señalización no disminuye en células CHC KD, confirmando que el efecto en la polimerización de actina encuentra disminuida está directamente ligado a la depleción de clatrina y no a un defecto en la activación celular. De hecho, CD3 en las células CHC KD parece aumentado respecto a las células T control. Se ha demostrado que tras la estimulación de CD3, la endocitosis de TCRs no unidos es dependiente de endocitosis por clatrina y su adaptador en membrana plasmática AP-2 en contraste con los TCR unidos a antígeno cuya endocitosis es independiente de clatrina (Monjas et al, 2004; Balagopalan et al., 2009).

Otro dato a destacar es que los niveles de IL-2 en células T CHC son similares a los observados con bajas dosis de citocalasina D (Nolz et al., 2007).

Clatrina se encuentra asociada a diferentes compartimentos celulares con un adaptador específico para cada uno de ellos. Nuestros datos muestran que el adaptador de clatrina en MVB (Hrs) tiene un papel determinante en la polimerización de actina en la SI. Esto concuerda con la polarización de MVBs observada por inmunofluorescencia y microscopía electrónica.

Estos datos encajan con datos recientes que sugieren el reclutamiento de MVB a la SI. Se ha descrito que TSG101, una proteína de unión a ubiquitina que está involucrada en el transporte selectivo hacia MVB, regula la estructura de la SI (Vardhana et al., 2010). También está descrito que el ácido liso-bis-fosfatídico, típicamente encontrado en MVB (Kobayashi et al., 1998), se puede detectar en el cSMAC (Varma et al., 2006), sugiriendo que se pueden establecer interacciones entre MVBs y la SI. La polarización de MVB hacia la membrana plasmática también ocurre durante el ensamblaje viral, otro proceso en el que clatrina tiene un papel importante (Morita and Sundquist, 2004).

Las dinámicas de reclutamiento de clatrina, actina y dinamina hacia la SI ocurren en paralelo, sugiriendo que la maquinaria necesaria para la polimerización de actina está preformada en la superficie de los MVB. Quedan por describir los mecanismos por los que los MVB se reclutan hacia la SI.

Para el estudio estructural de los MVB en la SI se hace necesario utilizar técnicas de imagen de alta resolución. La tomografía de rayos X puede usarse para estudiar el tamaño, la localización y la composición de los orgánulos celulares (Parkinson et al., 2008). Permite llegar a observar con una resolución muy alta muestras de gran tamaño sin tener que seccionar la muestra (hasta 15 μ m) (Larabell et al., 2009) lo que resulta de gran utilidad para el estudio de la SI. Las muestras se someten a un proceso de vitrificación, manteniéndolas en un estado similar al nativo manteniendo

los componentes acuosos en un estado vítreo, de modo que no se forman cristales de hielo en su interior (Knodler et al., 2010; Le Gros et al., 2005; Weiss et al., 2000). Las imágenes permiten generar un volumen 3D en el que se pueden localizar y reconstruir los componentes celulares en función del contraste que genera su composición.

La técnica de criopreservación conserva correctamente las estructuras celulares pero en su procedimiento se pierde mucha cantidad de muestra, requiriéndose un sistema de comprobación post-vitrificación o mejorando la técnica de inmersión cambiando la densidad celular o reduciendo la pérdida de líquido de la muestra. El laboratorio ha adquirido un sistema (aun no comercial) que nos permite visualizar las muestras vitrificadas en un microscopio óptico, que será de gradísima utilidad para los experimentos de tomografía de rayos X.

Añadiremos a la realización de esta técnica el inmunomarcaje de proteínas relevantes de los compartimentos a estudiar, para asegurarnos de estar reconstruyendo la estructura que nos prometimos analizar y también poder hacer colocalización en la misma muestra con distintas técnicas de imagen a diferentes resoluciones.

El segundo punto de la tesis versa sobre el estudio de una nueva vía de diseminación bacteriana entre DCs infectadas y células T que las contactan. Las bacterias usadas en este trabajo (Gram + y Gram -), que usan diferentes procesos de infección, infectan muy pobremente las células T primarias.

Por otra parte, DCs infectadas con bacterias llegan al ganglio linfático, donde contactan con los linfocitos T para proceder con la presentación antigénica (Neutra, 1998; Niedergang et al., 2004). Además, se ha descrito que *L. monocytogenes* puede aislarse de células T tras infecciones en ratones (McElroy et al., 2009).

Con estos antecedentes estudiamos la posibilidad de que las DCs infectadas transfieran bacterias a la célula T. Hemos demostrado esta nueva vía de transmisión bacteriana, que requiere contactodirecto entre la DC infectada y la célula T y además está potenciado por la formación de SI.

Queda por estudiar cuál es el destino de las bacterias dentro de las células T. ¿La célula T destruye la bacteria que ingiere, teniendo por lo tanto un papel activo en la destrucción bacteriana, o por el contrario sirve como reservorio de patógenos? Estudios previos muestran cómo las bacterias pueden evadir la acción bactericida de las células fagocíticas profesionales que representan la primera barrera defensiva frente a infecciones como los macrófagos o las DCs (Bueno et al., 2012; Bedui et al., 2010; Paschen et al., 2000), y existen numerosos patógenos en los que la reactivación

de la infección pueda deberse a que generan reservorios en el organismo. Se ha descrito en ratones la existencia de reservorios de *Salmonella typhimurinum* en tejido linfoide mesentérico que permite la reactivación de la infección a pesar de la intensa respuesta de la inmunidad innata y el tratamiento antibiótico (Griffin et al., 2011). En el caso de *S. aureus*, se ha planteado la posibilidad de la existencia de un reservorio en células no fagocíticas en los casos de recurrencia de la enfermedad y la persistencia de la bacteria en la mucosa (Clement et al., 2005). La creación de reservorios en linfocitos T del hospedador es una hipótesis que se puede sustentar en varios trabajos previos, como en los que se ha descrito la presencia de *Listeria monocitogenes* vivas en linfocitos murinos y se recuperan en bazo bacterias vivas en el interior de las células (McElroy et al., 2009), o el caso de *Shigella flexneri*, que es capaz de entrar en linfocitos T activados con PMA y no los quiescentes (Konradt et al., 2011).

Un interrogante que se plantea sobre las células T infectadas es la posibilidad que la presencia de la bacteria modifique determinadas funciones de la célula. Algunos autores (Baldari et al., 2005; Rossi Paccani et al., 2008) han mostrado que las toxinas de diferentes patógenos como *Helicobacter pylori* o *B.anthraxis*, limitan la capacidad defensiva frente su infección al interferir en diferentes puntos del proceso de la activación o de migración de los linfocitos T. Otro trabajo muestra que *Shigella* puede entrar completamente en linfocitos T activados con PMA e influir en la migración, es decir, sobre el citoesqueleto de actina y proteínas asociadas (por ejemplo Itk y la ruta de PIP2) (Konradt et al., 2011), que intervienen en la estabilización del citoesqueleto de actina y en la activación del linfocito T en la SI. El linfocito T tendría afectada la capacidad de migrar a órganos linfoides secundarios donde, con lo que la bacteria conseguiría una supresión de la respuesta defensiva del organismo infectado.

Los linfocitos T pueden captar y expresar el MHC-II de las APC a través de un mecanismo de trogocitosis (Martínez-Marín et al., 2011), y este mecanismo podría permitir la expresión de los antígenos de las bacterias degradadas por la célula T, añadiendo a un posible papel en la inmunidad innata otro como célula presentadora, que expanda la respuesta inmune al patógeno activando otros linfocitos T. Que las células T CD4+ tengan una función lítica de patógenos es una hipótesis novedosa, ya que esta función no ha sido descrita previamente. Ya que se encuentran *L. monocitogenes* vivas en linfocitos tras infecciones in vivo (McElroy et al., 2009), y *S. flexneri* (Konradt et al., 2011) se reproduce dentro de linfocitos murinos, habría que estudiar los mecanismos por los que algunas bacterias desarrollan mecanismos para evitar esta lisis en los linfocitos infectados en caso de que se produzca.

Para estudiar esta nueva vía de diseminación bacteriana recurriremos a analizar el paso bacteriano DC-célula T por tomografía de rayos X.

En resumen, hemos demostrado la existencia de una nueva vía de diseminación bacteriana desde las células dendríticas hacia las células T a través de la SI. Esta nueva vía se presume de gran relevancia tanto desde el punto de vista de la ciencia básica como aplicadas, por ejemplo estamos estudiando en colaboración con el grupo del Prof. Carlos Martín de la Universidad de Zaragoza si esta nueva ruta es usada por *M. Tuberculosis*.

Conclusiones

- ◆ Clatrina se polariza hacia la sinapsis inmune en conjugados de células primarias T y DC, y líneas linfoides T y B, con una dinámica paralela a la de actina y dinamina-2.
- ◆ Clatrina regula la acumulación de actina sirviendo de plataforma molecular para el reclutamiento de proteínas que activan la polimerización de actina. La depleción de clatrina impide la acumulación de actina en la sinapsis inmune sin afectar a la expresión de proteínas relacionadas con la formación de la sinapsis inmune.
- ◆ La tomografía por rayos X permite realizar reconstrucciones 3D de conjugados de líneas celulares linfoides y visualizar la acumulación de vesículas hacia la sinapsis inmune en la célula vitrificada, es decir, en un estado similar al nativo.
- ◆ La sinapsis inmune permite la transferencia de bacterias desde DCs infectadas a linfocitos T. El contacto célula a célula es necesario para que se produzca esta transmisión dado que interponer una barrera física entre ambas células impide la diseminación bacteriana.
- ◆ La estabilidad de la SI es importante para este proceso de diseminación bacteriana, la presencia de antígenos en el MHC de las DCs aumenta el paso bacteriano, a su vez, anticuerpos bloqueantes del contacto entre ambas células reducen este proceso.
- ◆ Existen dos vías de entrada bacteriana en las células T, una, mayoritaria, implica el paso de bacterias asociadas a las DCs, pero no internalizadas. Otra implica el paso desde el interior de las DCs al interior de las células T, pero sin etapas extracelulares.
- ◆ Los linfocitos T CD4+ destruyen las bacterias que han entrado en su interior, añadiendo una nueva función como célula encargada de eliminar patógenos intracelulares y participando directamente en la respuesta de inmunidad innata del organismo hospedador.

- Alarcón, B., Mestre, D. & Martínez-Martín, N., 2011. The immunological synapse: a cause or consequence of T-cell receptor triggering? *Immunology*, 133(4), pp.420–5.
- Allan, R.S. et al., 2006. Migratory Dendritic Cells Transfer Antigen to a Lymph Node-Resident Dendritic Cell Population for Efficient CTL Priming. *Immunity*, 25, pp.153–162.
- Allenspach, E.J. et al., 2009. Migratory and lymphoid-resident dendritic cells cooperate in lymph nodes for efficient CD4+ T cell priming. *Immunity*, 29(5), pp.795–806.
- Aoshi, T. et al., 2008. Bacterial Entry to the Splenic White Pulp Initiates Antigen Presentation to CD8 + T Cells. *Immunity*, 49, pp.476–486.
- Arroyo, A. G. et al., 1994. Induction of tyrosine phosphorylation during ICAM-3 and LFA-1-mediated intercellular adhesion, and its regulation by the CD45 tyrosine phosphatase. *The Journal of cell biology*, 126(5), pp.1277–86.
- Azar, G. a et al., 2010. Subcellular dynamics of T cell immunological synapses and kinapses in lymph nodes. *PNAS*, 107(8), pp.3675–80.
- Badour, K. et al., 2003. The Wiskott-Aldrich Syndrome Protein Acts Downstream of CD2 and the CD2AP and PSTPIP1 Adaptors to Promote Formation of the Immunological Synapse. , 18, pp.141–154.
- Baixauli, F. et al., 2011. The mitochondrial fission factor dynamin-related protein 1 modulates T-cell receptor signalling at the immune synapse. *The EMBO journal*, 30(7), pp.1238–50.
- Baker, R.G. et al., 2009. The adapter protein SLP-76 mediates “outside-in” integrin signaling and function in T cells. *Molecular and cellular biology*, 29(20), pp.5578–89.
- Balagopalan, L., Barr, V.A. & Samelson, L.E., 2009. Endocytic events in TCR signaling: focus on adapters in microclusters. *Immunological Reviews*, 232(1), pp.84–98.
- Baldari C. T, Lanzavecchia A., Telford J. L.”Immune subversion by *Helicobacter pylori*.” *Trends Immunol.* 2005, vol. 26(4), pp.199-207.
- Baldazzi, V. et al., 2009. Modeling lymphocyte homing and encounters in lymph nodes. *BMC Bioinformatics*, 11.Nov 25;10:387
- Balestrino, D. et al., 2010. Single-cell techniques using chromosomally tagged fluorescent bacteria to study *Listeria monocytogenes* infection processes. *Applied and environmental microbiology*, 76(11), pp.3625–36.
- Bárcena M., Koster A.J., 2009. Electron tomography in life science. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, pp.1-12.
- Bedoui, S. et al., 2010. Different bacterial pathogens, different strategies, yet the aim is the same: evasion of intestinal dendritic cell recognition. *Journal of immunology*, 184(5), pp.2237–42.

- Billadeau, D.D. & Burkhardt, J.K., 2006. Regulation of Cytoskeletal Dynamics at the Immune Synapse : New Stars Join the Actin Troupe. *Traffic*, pp.1451–1460.
- Boettner, D.R. et al., 2011. Clathrin light chain directs endocytosis by influencing the binding of the yeast Hip1R homologue, Sla2, to F-actin. *Molecular biology of the cell*, 22(october), pp.3699–714.
- Boettner, D.R., Chi, R.J. & Lemmon, S.K., 2012. Lessons from yeast for clathrin-mediated endocytosis. *Nature cell biology*, 14(1), pp.2–10.
- Bonazzi, M. et al., 2011. Clathrin phosphorylation is required for actin recruitment at sites of bacterial adhesion and internalization. *The Journal of cell biology*, 195(3), pp.525–36.
- Boucrot, E., 2006. Role of lipids and actin in the formation of clathrin- coated pits. *Cell*, 312(20), pp.4036–4048.
- Brady, R.J. et al., 2010. Regulation of Hip1r by epsin controls the temporal and spatial coupling of actin filaments to clathrin-coated pits. *Journal of cell science*, 123(Pt 21), pp.3652–61.
- Bueno et al., 2012. Mechanisms used by virulent Salmonella to impair dendritic cell function and evade adaptive immunity. *Immunology*. Sep;137(1), pp.28-36.
- Bunnell, S.C. et al., 2002. T cell receptor ligation induces the formation of dynamically regulated signaling assemblies. *The Journal of Cell Biology*, 158(7), pp.1263–1275.
- Burkhardt, J.K., Carrizosa, E. & Shaffer, M.H., 2008. The Actin Cytoskeleton in T Cell Activation. *Annu Rev Immunol*, 26, pp.233–59.
- Campellone, K.G. and Welch M.D., 2010. A Nucleator Arms Race: Cellular Control of Actin Assembly. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(4), pp.237–251.
- Cantrell, D.A., 2002. T-cell antigen receptor signal transduction. *Immunology*, 105, pp.369–374.
- Cannon, J.L. & Burkhardt, J.K., 2002. The regulation of actin remodeling during T-cell-APC conjugate formation. *Immunological reviews*, 186, pp.90–9.
- Cannon, J.L. & Burkhardt, J.K., 2004. Differential roles for Wiskott-Aldrich syndrome protein in immune synapse formation and IL-2 production. *Journal of immunology* 173(3), pp.1658–62.
- Cao, H., Garcia, F. & Mcniven, M.A., 1998. Differential Distribution of Dynamin Isoforms in Mammalian Cells. *Molecular Biology of the Cell*, 9(September), pp.2595–2609.
- Cao, H. et al., 2003. Cortactin Is a Component of Clathrin-Coated Pits and Participates in. *Molecular and cellular biology*, 23(6), pp.2162–2170.
- Carreno, S. et al., 2004. Actin dynamics coupled to clathrin-coated vesicle formation at the trans-Golgi network. *Journal Of Cell Biology*, pp.781–788.

- Chan, V.W. et al., 1999. Secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) is chemotactic for mature dendritic cells. *Blood*, 93(11), pp.3610–6.
- Charpentier, E. et al., 2004. Novel Cassette-Based Shuttle Vector System for Gram-Positive Bacteria. , 70(10), pp.6076–6085.
- Chhabra, E.S. & Higgs, H.N., 2007. The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures. *Nature cell biology*, 9(10), pp.1110–21..
- Chemin K. Et al., 2012. Cytokine Secretion by CD4⁺ T Cells at the Immunological Synapse Requires Cdc42-Dependent Local Actin Remodeling but Not Microtubule Organizing Center Polarity “ *The Journal of Immunology*, vol. 189, no. 5, pp. 2159-2168.
- Chen, C.-Y. & Brodsky, F.M., 2005. Huntingtin-interacting protein 1 (Hip1) and Hip1-related protein (Hip1R) bind the conserved sequence of clathrin light chains and thereby influence clathrin assembly in vitro and actin distribution in vivo. *The Journal of biological chemistry*, 280(7), pp.6109–17
- Clement, S. et al., 2005. Evidence of an intracellular reservoir in the nasal mucosa of patients with recurrent *Staphylococcus aureus* rhinosinusitis. *The Journal of infectious diseases*, 192(6), pp.1023–8.
- Cochran, J.R., Cameron, T.O. & Stern, L.J., 2000. The relationship of MHC-peptide binding and T cell activation probed using chemically defined MHC class II oligomers. *Immunity*, 12(3), pp.241–50.
- Cocucci, E., 2012. The First Five Seconds in the Life of a Clathrin-Coated Pit. *Cell*, 150, pp.495–507.
- Colonna M, et al., 2004 Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol.*, vol. 5, no.12, pp. 1219-26.
- Cormack BP, Valdivia RH, Falkow S. 1996 FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene.*;173(1 Spec No):33-8.
- Cossart, P. & Sansonetti, P.J., 2004. Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science*, 304(5668), pp.242–8.
- de la Fuente, M. a et al., 2007. WIP is a chaperone for Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(3), pp.926–31.
- Deborde S. et al., 2008. Clathrin is a key regulator of basolateral polarity *Nature*. Vol. 10;no. 452 (7188):pp. 719-23.
- den Otter, W.K. & Briels, W.J., 2011. The generation of curved clathrin coats from flat plaques. *Traffic*, 12(10), pp.1407–16.

- Derry J., et al.,1994 Isolation of a novel gene mutated in Wiskott Aldrich Syndrome, *Cell* , vol 78, pp 635-44,
- Doherty, G.J. & McMahon, H.T., 2009. Mechanisms of endocytosis. *Annual review of biochemistry*, 78, pp.857–902.
- Dubochet J. et al.,1988 Cryo-electron microscopy of vitrified specimens. *Q Rev Biophys.*, May;21(2):129-228.
- Dustin, M.L. et al., 1997. Antigen receptor engagement delivers a stop signal to migrating T lymphocytes. *PNAS*, 94(8), pp.3909–13.
- Dustin, M.L. et al., 1998. Patterning and Cytoskeletal Polarity in T-Cell Contacts. *Cell*, 94, pp.667–677.
- Dustin, M.L., 2009. The cellular context of T cell signaling. *Immunity*, 30(4), pp.482–492.
- Dustin, M.L., Chakraborty, A.K. & Shaw, A.S., 2010. Understanding the Structure and Function of the Immunological Synapse. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* Oct;2(10):a002311.
- Edelson, B.T. et al., 2011. CD8 α (+) dendritic cells are an obligate cellular entry point for productive infection by *Listeria monocytogenes*. *Immunity*, 35(2), pp.236–48.
- Ehrlich, L.I.R. et al., 2002. Dynamics of p56lck translocation to the T cell immunological synapse following agonist and antagonist stimulation. *Immunity*, 17(6), pp.809–22.
- Engqvist-goldstein, Å.E.Y. et al., 2001. The actin-binding protein Hip1R associates with clathrin during early stages of endocytosis and promotes clathrin assembly in vitro. *The Journal of Cell Biology*, 154(6), pp.1209–1223.
- Engqvist-goldstein, Å.E.Y. et al., 2004. RNAi-mediated Hip1R Silencing Results in Stable Association between the Endocytic Machinery and the Actin Assembly Machinery, 15(April), pp.1666–1679.
- Esk, C. et al., 2010. The clathrin heavy chain isoform CHC22 functions in a novel endosomal sorting step. *The Journal of cell biology*, 188(1), pp.131–44.
- Ezratty, E.J. et al., 2009. Clathrin mediates integrin endocytosis for focal adhesion disassembly in migrating cells. *Cell*, 187(5), pp.733–747.
- Fernandez, J.J., 2012. Computational methods for electron tomography. *Micron*, 43(10), pp.1010–1030.
- Fooksman, D.R. et al., 2010. Functional Anatomy of T Cell Activation and Synapse Formation. *Annu Rev Immunol*, pp.79–105.
- Foraker, A.B. et al., 2012. Clathrin promotes centrosome integrity in early mitosis through stabilization of centrosomal ch-TOG. *J Cell Biol.* Aug 20;198(4):591-605

- Fortineau N., Trieu-CUot P., Gaillot O., Pellegini E., Berche P., Gaillard J.L. 2000. Optimization of green fluorescent protein expression vectors for in vitro and in vivo detection of *Listeria monocytogenes*. *Res Microbiol*, Jun;151(5):353-60.
- Gautier, J.J. et al., 2011. Clathrin is required for Scar/Wave-mediated lamellipodium formation. *Journal of Cell Science*, 124(20), pp.3414–3427.
- Ge H, Suszynski WJ, Davis HT, Scriven LE. 2008. New controlled environment vitrification system for preparing wet samples for cryo-SEM. *J Microsc.* Jan;229(Pt 1). pp.115-26.
- Geissmann, F. et al., 2010. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*, 327(5966), pp.656–61.
- Goenka, R., 2012. B lymphocytes provide an infection niche for intracellular bacterium *Brucella abortus*. *journal of infectious diseases*, pp.1–30.
- Gomez, T.S. et al., 2005. Dynamin 2 regulates T cell activation by controlling actin polymerization at the immunological synapse. *Nature Immunology*, 6(3), pp.261–270.
- Gomez, T.S. et al., 2006. HS1 Functions as an Essential Actin-Regulatory Adaptor Protein at the Immune Synapse. *Synapse*, (June), pp.741–752.
- Gomez, T.S. & Billadeau, D.D., 2008. T Cell Activation and the Cytoskeleton: You Can't Have One Without the Other. *Advances in Immunology*. pp. 1–64.
- Gonzalez, A. & Rodriguez-Boulan, E., 2009. Clathrin and AP1B: key roles in basolateral trafficking through trans-endosomal routes. *FEBS letters*, 583(23), pp.3784–95.
- Gonzalez-Amaro, R. et al., 2005. Therapeutic anti-integrin ($\alpha 4$ and αL) monoclonal antibodies :two-edged swords?. *Immunology*, 116, pp.289–296.
- Gordón-Alonso et al., 2010. Actin dynamics at the immunological synapse. *CHC*, pp.33–47.
- Grakoui, A., 1999. The Immunological Synapse: A Molecular Machine Controlling T Cell Activation. *Science*, 285(5425), pp.221–227.
- Grassart, A. et al., 2010. Pak1 phosphorylation enhances cortactin-N-WASP interaction in clathrin-caveolin-independent endocytosis. *Traffic*, 11(8), pp.1079–91.
- Gravotta D. et al., 2012. The clathrin adaptor AP-1A mediates basolateral polarity. *Dev Cell*. Vol. 17; no. 22(4) pp. 811-23.
- Griffin, A.J. et al., 2011. Dissemination of persistent intestinal bacteria via the mesenteric lymph nodes causes typhoid relapse. *Infection and immunity*, 79(4), pp.1479–88.
- Gu, C. et al., 2010. Direct dynamin-actin interactions regulate the actin cytoskeleton. *The EMBO journal*, 29(21), pp.3593–606.

- Hagen, C. et al., 2012. Correlative VIS-fluorescence and soft X-ray cryo-microscopy/tomography of adherent cells. *Journal of structural biology*, 177(2), pp.193–201.
- Haglund, C.M. & Welch, M.D., 2011. Pathogens and polymers : Microbe – host interactions illuminate the cytoskeleton. *Journal Of Cell Biology*, 195(1).pp.7-17.
- Hommel, M., et al.,, 2004. On the dynamics of T-cell activation in lymph nodes. *Immunology and cell biology*, 82, pp.62–66.
- Hooper L. V. et al., 2012. Interactions Between the Microbiota and the Immune System. *Science*, 336, pp.1268–73.
- Huang Y. & Burkhardt J.K., 2007. T-cell-receptor-dependent actin regulatory mechanisms. *Journal of Cell Science*, 120, pp.723–730.
- Huang, C. et al., 2009. Clathrin-Mediated Post-Golgi Membrane Trafficking in the Morphogenesis of Hepatitis Delta Virus. *Journal of virology*, 83(23), pp.12314–12324.
- Huang, J. et al., 2011. Differential regulation of adherens junction dynamics during apical-basal polarization. *Journal of cell science*, 124(Pt 23), pp.4001–13.
- Huang, X. et al., 1998. Physical Limitations on Salmonella typhi Entry into Cultured Human Intestinal Epithelial Cells. *Infection and Immunity*, 66(6), pp.2928–2937.
- Huppa, J.B. et al., 2010. TCR–peptide–MHC interactions in situ show accelerated kinetics and increased affinity. *Nature*, 463(7283), pp.963–967.
- Hurley, J.H. & Emr, S.D., 2006. The Escrt Complexes: Structure and Mechanism of a Membrane-Trafficking Network. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.*, (3), pp.277–298.
- Inaba, K. et al., 1992. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *The Journal of experimental medicine*, 176(6), pp.1693–702.
- James, J.R. & Vale, R.D., 2012. Biophysical mechanism of T-cell receptor triggering in a reconstituted system. *Nature*, 487(7405), pp.64–9.
- Jang, M.H. et al., 2006. CCR7 is critically important for migration of dendritic cells in intestinal lamina propria to mesenteric lymph nodes. *Journal of immunology*, 176(2), pp.803–10.
- Kirchhausen, T., 2002. Clathrin Adaptors Really Adapt. *Cell*, 109, pp.413–416.
- Knodler, L. A. et al., 2010. Dissemination of invasive Salmonella via bacterial-induced extrusion of mucosal epithelia. *PNAS*, 107(41), pp.17733–8.
- Kobayashi T. et al.,1998. A lipid associated with the antiphospholipid syndrome regulates endosome structure and function *Nature* 392, pp.193-197.

- Konradt, C. et al., 2011. The *Shigella flexneri* type three secretion system effector IpgD inhibits T cell migration by manipulating host phosphoinositide metabolism. *Cell host & microbe*, 9(4), pp.263–72.
- Kraehenbuhl JP, Neutra MR. 2000 Epithelial M cells: differentiation and function. *Annu Rev Cell Dev Biol.*;16:pp.301-32
- Kruchten, A.E. & Mcniven, M.A., 2006. Dynamin as a mover and pincher during cell migration and invasion. *Journal of Cell Science*, 119, pp.1683–1690.
- Krummel, M.F. et al, 2000. Differential Clustering of CD4 and CD3zeta During T Cell Recognition. *Science*, 289(5483), pp.1349–1352.
- Kurusu, S. & Takenawa, T., 2009. The WASP and WAVE family proteins. *Genome biology*, 10(6), pp.226.1-226.9
- Lanzavecchia, A. & Sallusto, F., 2001. Regulation of T cell immunity by dendritic cells. *Cell*, 106(3), pp.263–6.
- Larabell, C. A., 2009. Soft X-ray Tomography and Cryogenic Light Microscopy: The Cool Combination in Cellular Imaging. *Trends in Cell Biology*, 19(11), pp.587–595.
- Larabell, C. A. Nugent K.A., 2010. Imaging cellular architecture with X-rays. *Current opinion in structural biology*, 20(5), pp.623–631.
- Le Gros, M. A. et al., 2005. X-ray tomography of whole cells. *Current opinion in structural biology*, 15(5), pp.593–600.
- Lin, J. et al., 2005. The c-SMAC: sorting it all out (or in). *The Journal of cell biology*, 170(2), pp.177–82.
- Linstedt, A. D. & Hauri, H.P., 1993. Giantin, a novel conserved Golgi membrane protein containing a cytoplasmic domain of at least 350 kDa. *Molecular biology of the cell*, 4(7), pp.679–93.
- Lynch, D.K. et al., 2003. A Cortactin-CD2-associated protein (CD2AP) complex provides a novel link between epidermal growth factor receptor endocytosis and the actin cytoskeleton. *The Journal of biological chemistry*, 278(24), pp.21805–13.
- Martin-Cófreces, N. et al., 2008. MTOC translocation modulates IS formation and controls sustained T cell signaling. *Journal Of Cell Biology*, 182(5).
- Martínez-Martín N. et al., 2011. T Cell Receptor Internalization from the Immunological Synapse Is Mediated by TC21 and RhoG GTPase-Dependent Phagocytosis. *Immunity*, 35, pp.208–222.
- Massol, R.H. et al., 2006. A burst of auxilin recruitment determines the onset of clathrin-coated vesicle uncoating. *PNAS*, 103(27), pp.10265–70.

- McDermott, G. et al., 2009. Soft X-ray Tomography and Cryogenic Light Microscopy: The Cool Combination in Cellular Imaging. *Trends in Cell Biology*, 19(11), pp.587–595.
- McDermott, G. et al., 2012. Visualizing and quantifying cell phenotype using soft X-ray tomography. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, pp.1–8.
- McElroy, D.S., Ashley, T.J. & D’Orazio, S.E.F., 2009. Lymphocytes serve as a reservoir for *Listeria monocytogenes* growth during infection of mice. *Microbial pathogenesis*, 46(4), pp.214–21.
- McNiven, M.A. et al., 2000. Cortactin Modulate Cell Shape. *Journal Of Cell Biology*, 151(1), pp.187–198.
- Mellman, I. & Steinman, R.M., 2001. Dendritic Cells: Specialized and Regulated Antigen Minireview. *Cell*, 106, pp.255–258.
- Mempel, T.R., Henrickson, S.E. & Von Andrian, U.H., 2004. T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature*, 427(6970), pp.154–9.
- Merad, M. & Manz, M.G., 2009. Dendritic cell homeostasis. *Blood*, 113(15), pp.3418–3427.
- Millard, T.H., Sharp, S.J. & Machesky, L.M., 2004. Signalling to actin assembly via the WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein)-family proteins and the Arp2/3 complex. *The Biochemical journal*, 380(Pt 1), pp.1–17.
- Miller, M.J. et al., 2004. Imaging the single cell dynamics of CD4+ T cell activation by dendritic cells in lymph nodes. *The Journal of experimental medicine*, 200(7), pp.847–56.
- Mittelbrunn, M. et al., 2002. Cutting edge: dynamic redistribution of tetraspanin CD81 at the central zone of the immune synapse in both T lymphocytes and APC. *Journal of immunology*, 169(12), pp.6691–5.
- Mittelbrunn, M. et al., 2010. Imaging of plasmacytoid dendritic cell interactions with T cells. *Blood*, pp.75–84.
- Monjas, A. & Alarco, B., 2004. Engaged and Bystander T Cell Receptors Are Down-modulated by Different Endocytotic Pathways. *Biochemistry*, 279(53), pp.55376–55384.
- Mooren, O.L. et al., 2009. Dynamin2 GTPase and cortactin remodel actin filaments. *The Journal of biological chemistry*, 284(36), pp.23995–4005.
- Moreno-Ruiz, E. et al., 2009. *Candida albicans* internalization by host cells is mediated by a clathrin-dependent mechanism. *Cellular microbiology*, 11(8), pp.1179–89.
- Morgan, M.M. et al., 2001. Superantigen-induced T cell:B cell conjugation is mediated by LFA-1 and requires signaling through Lck, but not ZAP-70. *Journal of immunology*, 167(10), pp.5708–18.

- Morita E., Sundquist W. I., 2004. Retrovirus Budding, *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 20: pp.395-425,
- Mousavi, S.A. et al., 2004. Clathrin-dependent endocytosis. *Biochem J.*, 377, pp.1–16.
- Mullins, R.D., Heuser, J. a & Pollard, T.D., 1998. The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *PNAS*, 95(11), pp.6181–6.
- Nair, P., Amsen, D. & Blander, J.M., 2011. Co-ordination of incoming and outgoing traffic in antigen-presenting cells by pattern recognition receptors and T cells. *Traffic*, 12(12), pp.1669–76.
- Neutra, M.R., 1998. Current Concepts in Mucosal Immunity V. Role of M cells in transepithelial transport of antigens and pathogens to the mucosal immune system. *American Physiological Society*, pp.785–791.
- Niedergang, F. et al., 2004. Dendritic cells : the host Achille ' s heel for mucosal pathogens ? *Trends in Microbiology*, 12(2), pp.79-88
- Nikitas, G. et al., 2011. Transcytosis of *Listeria monocytogenes* across the intestinal barrier upon specific targeting of goblet cell accessible E-cadherin. *The Journal of experimental medicine*, 208(11), pp.2263–77.
- Nolz, J.C., Fernandez-zapico, M.E. & Daniel, D., 2007. TCR/CD28-Stimulated Actin Dynamics Are Activation of c-rel leading to CD28 Response Element Required for NFAT1-Mediated Transcription. *Journal of immunology*, (179), pp.1104–1112.
- Okamoto, C.T., Mckinney, J. & Jeng, Y.Y., 2000. Clathrin in mitotic spindles. *American journal of physiology. Cell physiology*, 279, pp.369–374.
- Okkenhaug, K. et al., 2009. Antigen receptor signalling: a distinctive role for the p110 δ isoform of PI3K. *Trends in Immunology*, 28, pp.80–87.
- Owen, D.J. & Luzio, J.P., 2000. Structural insights into clathrin-mediated endocytosis. *Current Opinion in Cell Biology*, pp.467–474.
- Owen D. J. et al., 2004. Adaptors for clathrin coats: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol*; vol. 20, pp. 153-91
- Padrick, S.B. et al., 2011. Arp2/3 complex is bound and activated by two WASP proteins. *PNAS*, 108(33), pp.472–9.
- Parkinson, D.Y. et al., 2008. Quantitative 3-D imaging of eukaryotic cells using soft X-ray tomography. *Journal of structural biology*, 162(3), pp.380–6.
- Paschen A. et al., 2000. Human dendritic cells infected by *Listeria monocytogenes*: induction of

maturation, requirements for phagolysosomal escape and antigen presentation capacity. *Eur J Immunol.* Dec;30(12), pp.3447-56.

·Pierson, J. et al., 2011. Perspectives on electron cryo-tomography of vitreous cryo-sections. *Journal of electron microscopy*, 60 Suppl 1(Supplement 1), pp.S93–100.

·Piragyte, I. & Jun, C.-D., 2012. Actin engine in immunological synapse. *Immune network*, 12(3), pp.71–83.

·Pizarro-Cerdá, J. & Cossart, P., 2004. Subversion of phosphoinositide metabolism by intracellular bacterial pathogens. *Nature cell biology*, 6(11), pp.1026–33.

·Platt, C.D. et al., 2010. Mature dendritic cells use endocytic receptors to capture and present antigens. *PNAS*, 107(9), pp.1-6.

·Pollice, a a et al., 1992. Sequential paraformaldehyde and methanol fixation for simultaneous flow cytometric analysis of DNA, cell surface proteins, and intracellular proteins. *Cytometry*, 13(4), pp.432–44.

·Raiborg, C. et al., 2001. Hrs recruits clathrin to early endosomes. *EMBO Journal*, 20(17), pp.5008-5021.

·Raiborg, C. et al., 2006. Flat clathrin coats on endosomes mediate degradative protein sorting by scaffolding Hrs in dynamic microdomains. *Journal of Cell Science*, 119, pp.2414–2424.

·Rappoport, J.Z. et al., 2006. Dynamics of clathrin and adaptor proteins during endocytosis. *American journal of physiology. Cell physiology*, 291(5), pp.C1072–81.

·Rappoport, J.Z., 2008. Focusing on clathrin-mediated endocytosis. *Biochem J.*, 423, pp.415–423.

·Rescigno M. et al., 2001. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol.*, vol. 2, no. 4, pp. 361-7.

·Riol-Blanco, L. et al., 2005. The chemokine receptor CCR7 activates in dendritic cells two signaling modules that independently regulate chemotaxis and migratory speed. *Journal of immunology*, 174(7), pp.4070–80.

·Risueño, R.M. et al., 2005. Ligand-induced conformational change in the T-cell receptor associated with productive immune synapses. *Blood*, 106(2), pp.601–8.

·Ritz, D. et al., 2011. Endolysosomal sorting of ubiquitinated caveolin-1 is regulated by VCP/p97 and UBXD1 and impaired by VCP disease mutations. *Nature cell biology*, 13(9), pp.1116–1123.

·Robertson, A.S., Smythe, Æ.E. & Ayscough, K.R., 2009. Functions of actin in endocytosis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, pp.2049–2065.

·Robles-Valero, J. et al., 2010. Integrin and CD3/TCR activation are regulated by the scaffold protein AKAP450. *Blood*, 115(21), pp.4174–84.

- Rohatgi, R. et al., 1999. The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell*, 97(2), pp.221–31.
- Rohatgi, R. et al., 2000. Mechanism of N-WASP activation by CDC42 and phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. *The Journal of cell biology*, 150(6), pp.1299–310.
- Rossi Paccani, S. et al., 2007. Anthrax toxins inhibit immune cell chemotaxis by perturbing chemokine receptor signalling. *Cellular microbiology*, 9(4), pp.924–9.
- Roux A. et al., 2006. GTP-dependent twisting of dynamin implicates constriction and tension in membrane fission. *Nature*, 25; 441(7092):pp 528-31.
- Royle, S.J., 2006. The cellular functions of clathrin. *Cellular and molecular life sciences*, 63(16), pp.1823–32.
- Royle, S.J., 2012. The role of clathrin in mitotic spindle organisation. *Journal of cell science*, 125(Pt 1), pp.19–28.
- Saffarian, S. et al., 2009. Distinct dynamics of endocytic clathrin-coated pits and coated Plaques. *PLoS Biology*, 7(9).
- Samaniego, R. et al., 2007. Rho / ROCK and myosin II control the polarized distribution of endocytic clathrin structures at the uropod of moving T lymphocytes. *Journal of Cell Science*, pp.3534–3543.
- Samstag, Y. et al., 2003. Actin cytoskeletal dynamics in T lymphocyte activation and migration. *Journal of leukocyte biology*, 73, pp.30–48.
- Sánchez-Madrid, F. et al., 1983. Mapping of antigenic and functional epitopes on the alpha- and beta- subunits of two related mouse glycoproteins involved in cell interactions, LFA-1 and Mac-1. *J Exp Med*, 158(August), pp.586–602.
- Sansonetti P. J., Phalipon A., 1999. M cells as ports of entry for enteroinvasive pathogens: mechanisms of interaction, consequences for the disease process. *Semin Immunol.*, vol. 11, no.3, pp.193-203.
- Sansonetti, P.J., Di Santo, J.P., 2007. Debugging how bacteria manipulate the immune response. *Immunity*, 26(2), pp.149–61.
- Sartori A. et al., 2007. Correlative microscopy: bridging the gap between fluorescence light microscopy and cryo-electron tomography. *J Struct Biol*, 160(2):135-45.
- Schafer, D.A. et al., 2004. Dynamin2 and Cortactin Regulate Actin Assembly and Filament Organization. *Current biology* 12(02), pp.1852–1857.
- Schmid S. L., Frolov V. A., 2011 Dynamin: functional design of a membrane fission catalyst. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 10(27), pp79-105

- Scott, K. et al., 2005. Qualitatively distinct patterns of cytokines are released by human dendritic cells in response to different pathogens. *Immunology*, 116, pp.245–254.
- Smith-Garvin, J.E. et al., 2010. T Cell Activation. *Annu Rev Immunol*, pp.591–619.
- Sozzani S. et al., 1997. Receptor expression and responsiveness of human dendritic cells to a defined set of CC and CXC chemokines. *J Immunol.*,159(4), pp.1993-2000.
- Stoll, S. et al., 2002. Dynamic imaging of T cell-dendritic cell interactions in lymph nodes. *Science* , 296(5574), pp.1873–6.
- Tam, M. a et al., 2008. Early cellular responses to Salmonella infection: dendritic cells, monocytes, and more. *Immunological reviews*, 225, pp.140–62.
- Tellam R, Frieden C. 1982 Cytochalasin D and platelet gelsolin accelerate actin polymer formation. A model for regulation of the extent of actin polymer formation in vivo. *Biochemistry*. Jun 22;21(13):pp.3207-14.
- Tjelle, T.E. et al., 1996. Isolation and characterization of early endosomes, late endosomes and terminal lysosomes: their role in protein degradation. *Analysis*, 2914, pp.2905–2914.
- Uchida, M. et al., 2009. Soft X-ray tomography of phenotypic switching and the cellular response to antifungal peptoids in *Candida albicans*. *PNAS*, 106(46), pp.19375–80.
- Ueda, H. et al., 2011. CD4+ T-cell synapses involve multiple distinct stages. *PNAS*. 108(41), pp.17099–104.
- Ungewickell EJ, Hinrichsen L. 2007 Endocytosis: clathrin-mediated membrane budding. *Curr Opin Cell Biol*. 19(4):417-25.
- Urano, T. et al., 2003. Sequential interaction of actin-related proteins 2 and 3 (Arp2/3) complex with neural Wiscott-Aldrich syndrome protein (N-WASP) and cortactin during branched actin filament network formation. *The Journal of biological chemistry*, 278(28), pp.26086–93.
- Vardhana, S. et al., 2010. Essential role of Ubiquitin and TSG101 in formation and function of the central supramolecular activation cluster. *Immunity*, 32(4), pp.531–540.
- Varma R. et al., 2006. T Cell Receptor-Proximal Signals Are Sustained in Peripheral Microclusters and Terminated in the Central Supramolecular Activation Cluster. *Immunity*, 25(1), pp.117–127
- Vassilopoulos, S. et al., 2009. A Role for the CHC22 Clathrin Heavy Chain Isoform in Human Glucose Metabolism. *Science*, 324(5931), pp.1192–1196.
- Vaudaux, P. & Waldvogel, F. a, 1979. Gentamicin antibacterial activity in the presence of human polymorphonuclear leukocytes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 16(6), pp.743–9.
- Veiga E. et al., 2005. *Listeria* hijacks the clathrin-dependent endocytic machinery to invade

mammalian cells. *Nat Cell Biol.*, 7(9), pp. 894-900.

·Veiga, E. et al., 2007. Invasive and Adherent Bacterial Pathogens Co-Opt Host Clathrin for Infection. *Cell host & microbe*, 2(November), pp.340–351.

·Verjans, G.M. et al., 1994. Entrance and survival of Salmonella typhimurium and Yersinia enterocolitica within human B- and T-cell lines. *Infection and immunity*, 62(6), pp.2229–35.

·Voedisch S. et al., 2009. Mesenteric lymph nodes confine dendritic cell-mediated dissemination of Salmonella enterica serovar Typhimurium and limit systemic disease in mice. *Infection and immunity*, 77(8), pp.3170–80.

·Waite, J. C. et al., 2011. Dynamic Imaging of the Effector Immune Response to Listeria Infection In Vivo D. *PLoS Pathogens*, 7(3), p. e1001326.

·Wakeham, D.E. et al., 2005. Clathrin heavy and light chain isoforms originated by independent mechanisms of gene duplication during chordate evolution. *PNAS*, 102(20), pp.7209–14.

·Wang, Y. et al., 2011. A direct interaction between the large GTPase dynamin-2 and FAK regulates focal adhesion dynamics in response to active Src. *Molecular biology of the cell*, 22(9), pp.1529–38.

·Weaver, A. M. et al., 2001. Cortactin promotes and stabilizes Arp2/3-induced actin filament network formation. *Current biology* 11(5), pp.370–4.

·Weiss D. et al., 2000. Computed tomography of cryogenic biological specimens based on X-ray microscopic images *Ultramicroscopy*. Vol. 84 no. 3-4, pp. 185-97

·Westcott, M.M. et al., 2007. Differential susceptibility of bone marrow-derived dendritic cells and macrophages to productive infection with Listeria monocytogenes. *Cellular microbiology*, 9(6), pp.1397–411.

·Wilbur, J.D. et al., 2008. Actin binding by Hip1 (huntingtin-interacting protein 1) and Hip1R (Hip1-related protein) is regulated by clathrin light chain. *The Journal of biological chemistry*, 283(47), pp.32870–9.

·Wilbur, J.D. et al., 2011. Conformation switching of clathrin light chain regulates clathrin lattice assembly. *Developmental Cell*, 18(5), pp.841–848.

·Yarar, D., Waterman-storer, C.M. & Schmid, S.L., 2005. A Dynamic Actin Cytoskeleton Functions at Multiple Stages of Clathrin-mediated Endocytosis. *Molecular Biology of the Cell*, 16(February), pp.964 –975.

·Yokosuka, T. et al., 2008. Spatiotemporal regulation of T cell co-stimulation by TCR-CD28 microclusters through PKC θ translocation. *Immunity*, 29(4), pp.589–601.

Artículos publicados por la doctoranda

- ✦ Calabia-linares, C. et al., 2011. Endosomal clathrin drives actin accumulation at the immunological synapse. *Journal of Cell Science*, pp.820–830.
- ✦ Baixauli, F. et al., 2011. The mitochondrial fission factor dynamin-related protein 1 modulates T-cell receptor signalling at the immune synapse. *The EMBO journal*, 30(7), pp.1238–50.
- ✦ Pérez-martínez, M. et al., 2010. F-actin-binding protein drebrin regulates CXCR4 recruitment to the immune synapse. *Journal of Cell Science*, (March), pp.1160–1170.