
Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular

FUNCIÓN DEL DIACILGLICEROL
EN EL DESARROLLO, ACTIVACIÓN
Y HOMEOSTASIS DE LAS CÉLULAS T
Tesis doctoral

Memoria presentada por
María Almena Carrasco
para optar al título de Doctor

Madrid, Noviembre 2010

El trabajo presentado en esta memoria se realizó en el Departamento de Inmunología y Oncología del Centro Nacional de Biotecnología (CSIC), bajo la dirección de la Dra. Isabel Mérida de San Román.

La realización de esta tesis ha sido posible gracias a una beca de Formación de Profesorado Universitario del Ministerio de Ciencia e Innovación.

Índice

ABREVIATURAS	9
SUMMARY	13
INTRODUCCIÓN	15
1. Tolerancia inmunológica.....	15
2. El timo: la tolerancia comienza con la educación.....	17
3. Mecanismos moleculares de señalización en el timo.....	20
▪ Primeras etapas de desarrollo: Notch e IL-7.....	20
▪ Señalización del preTCR y el TCR: diversidad y funcionalidad celular.....	21
○ Selección β y exclusión alélica.....	21
○ Selección positiva y negativa.....	21
○ Elección de linaje CD4 y CD8.....	24
▪ Reguladores negativos y umbrales de señalización.....	25
4. El DAG como segundo mensajero en la transmisión de señales del TCR.....	25
▪ Producción y degradación de DAG por el TCR.....	26
○ Actividad fosfolipasa C.....	26
○ Actividad fosfolipasa D.....	26
○ Diacilglicerol Quinasas.....	27
▪ Respuestas desencadenadas por DAG.....	28
○ Dominios C1.....	28
○ Proteínas reguladas por DAG en células T.....	28
▪ Proteínas Quinasas C.....	29
▪ Proteínas Quinasas D.....	30
▪ Quimerinas.....	31
▪ RasGRP.....	31
5. DAG y el control de la respuesta inmune.....	32
OBJETIVOS	pag 35
MATERIALES Y MÉTODOS	pag 37

RESULTADOS	47
1. Generación del DAG tras la activación de linfocitos: desarrollo de nuevas herramientas para su detección.....	47
• Detección de DAG en linfocitos activados de órganos periféricos.....	47
• Generación de una sonda sensor de DAG en timocitos.....	50
2. Efectos de la disminución de DAG en el desarrollo y activación de linfocitos T.....	53
• Elaboración de una herramienta que disminuya los niveles de DAG en la membrana plasmática.....	53
• Efectos de la disminución de DAG en la reorganización del citoesqueleto y la movilización de calcio intracelular.....	56
• Dinámicas de generación y distribución de DAG en linfocitos que sobreexpresan caDGK.....	56
• Efecto de la disminución de DAG en la activación de las PKCs.....	58
• Función del DAG en la activación de Ras/Erk/CD69.....	59
• Regulación del DAG sobre la activación de Akt.....	61
• Estudio de la regulación del DAG en la activación de tirosinas quinasas del TCR.....	62
3. Expresión en transgénesis de caDGK en linaje T.....	63
• Caracterización de poblaciones tímicas en ratones caDGK.....	65
• Selección positiva y negativa en ratones caDGK.....	68
• Estudio de poblaciones preseleccionadas: DN e ISP.....	70
• Efecto de la expresión en transgénesis de caDGK en órganos periféricos.....	74
 DISCUSIÓN	 79
1. Generación de DAG en las sinapsis de linfocitos.....	80
2. DAG en las cascadas de señalización del TCR.....	80
3. Función del DAG en desarrollo y homeostasis de células T.....	82
• Señalización del preTCR e IL-7 y efecto de la sobre-expresión de caDGK.....	84
• Señalización del TCR en células DP: efecto de la disminución de DAG en selección y linaje.....	86
• Homeostasis de linfocitos periféricos en ratones caDGK.....	87
 CONCLUSIONES	 89
REFERENCIAS	91
ANEXO	119



Abreviaturas

- Aa:** Aminoácido
- ADAP:** Proteína adaptadora que promueve la adhesión y degranulación
- ADN:** Ácido desoxirribonucleico
- ALN:** Ganglios linfáticos axilares
- AP-1:** Proteína activadora-1
- APC:** Célula presentadora de antígeno
- ARN:** Ácido ribonucleico
- Bcl:** Proteína de linfoma B
- BCR:** Receptor de células B
- BIM:** Bis-indoilmaleimida
- BSA:** Albúmina Bovina Sérica
- c-Cbl:** Proteína de linfoma Casitas B
- CCL:** Ligando de Quimioquina tipo C-C
- CCR7:** Receptor de Quimioquina tipo C-C
- CD:** Grupo de diferenciación
- CFSE:** Carboxifluoresceína succinimidil éster
- CMAC:** 7-amino-4-clorometilcoumarina
- Cnb:** Calcineurina B
- CRD:** Dominio rico en cisteína
- Csk:** Proteína C-Src Quinasa
- cSMAC:** Complejo de activación supramolecular central
- cTEC:** Célula epitelial tímica cortical
- CTL:** Linfocito T citolítico
- CXCR4:** Receptor de Quimioquina tipo C-X-C
- DAG:** Diacilglicerol
- DC:** Célula dendrítica
- DGK:** Diacilglicerol quinasa
- DN:** Timocito doble negativo
- DP:** Timocito doble positivo
- Egr:** Factor de respuesta temprana al crecimiento
- Erk:** Quinasa regulada por señales extracelulares
- ETP:** Progenitor de linfocito T temprano
- FACS:** Separación celular basada en la fluorescencia
- FBS:** Suero fetal bovino
- Gads:** Proteína adaptadora relacionada con Grb2 por debajo de Shc
- GAP:** Proteína activadora de GTPasas
- GDP:** Guanosín-difosfato
- GEF:** Factor intercambiador de nucleótidos de guanina
- Gfi1:** Factor independiente de crecimiento 1
- GFP:** Proteína verde fluorescente
- GRAIL:** Gen relacionado con anergia en linfocitos
- Grb2:** Proteína de unión al receptor de factor de crecimiento-2
- GST:** Glutathion S-transferasa
- GTP:** Guanosín-trifosfato
- GTPasa:** Guanosina-trifosfatasa
- HBSS:** Solución salina balanceada de Hepes
- HDAC7:** Histona deacetilasa 7
- Hi:** Alto
- HMG:** Grupo de alta movilidad
- HSA:** Antígeno estable al calor
- ICAM:** Molécula de adhesión intercelular
- IEL:** Linfocito intraepitelial
- IFN γ :** Interferón gamma
- IL:** Interleuquina
- IL-7R α :** Cadena α del receptor de interleuquina 7
- IP₃:** Inositol-1,4,5-trifosfato
- ISP:** Célula inmadura simple positiva
- ITAM:** Motivo de activación basado en las tirosinas del inmunorreceptor
- Itk:** Proteína quinasa de células T inducible por IL-2
- JAK:** Proteína quinasa activadora de Janus
- Jnk:** Proteína quinasa N-terminal c-jun
- Kb:** Kilobase
- KDa:** Kilodalton
- KI:** "Knock-in" o ratón con expresión regulada de...
- KO:** "Knock-out" o ratón deficiente en...
- LAT:** Proteína de unión para la activación de

células T

Lck: Quinasa específica de linfocitos

LEF: Factor potenciador de linfocito

LFA-1/2: Antígenos asociados a la función linfocitaria-1/2

Lo: Bajo

Med: Medio

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad

MLN: Ganglios linfáticos mesentéricos

MRCK: Quinasa relacionada con miotona que une Cdc42

mTEC: Célula T epitelial medular

MTOC: Centro organizador de microtúbulos

mTOR: Proteína diana de rapamicina en mamíferos

Munc: Proteína *uncoordinated* de mamífero

NF-AT: Factor nuclear de células T activadas

NF-KB: Factor nuclear κ B

NK: Célula asesina natural

NKT: Célula asesina natural T

OVA: Ovoalbúmina

PA: Ácido fosfatídico

PAP: Fosfohidrolasa del ácido fosfatídico

PBL: Linfocito periférico de la sangre

PC: Fosfatidilcolina

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PFA: Para-formaldehído

PGE: Programa de expresión génica promiscua

PI3K: Fosfatidilinositol-3-quinasa

PIP₂: Fosfatidilinositol-bisfosfato

PKC: Proteína quinasa C

PKD: Proteína quinasa D

PLC: Fosfolipasa C

PLD: Fosfolipasa D

PLN: Ganglios linfáticos poplíteos

PMA: Forbol-12-miristato-13-acetato

pMHC: Complejo péptido unido al complejo mayor de histocompatibilidad

PTEN: Proteína homóloga de fosfatasa y tensina

qRT-PCR: Retrotranscripción y reacción en

cadena de la polimerasa en tiempo real

RAG: Gen activador de la recombinación

RasGRP: Proteína liberadora de nucleótidos de guanina de Ras

RBD: Dominio de unión a Ras

REM: Dominio de intercambio de Ras

S1P₁: Receptor de esfingosina fosfato-1

SAP: Proteína accesoria del factor de respuesta al suero

SDS-PAGE: Electroforesis en geles de poli-acrilamida en presencia de SDS

SDS: Sodiodecilsulfato

SEE: Enterotoxina E de *Staphylococcus*

SH2: Dominio de homología a Src,2

SHP: Fosfatasa de homología a Src

SIT: Proteína adaptadora transmembrana que interacciona con la fosfatasa de homología a Src

SKAP55: Fosfoproteína asociada a Src Quinasa

SLAM: Molécula de activación de señalización en linfocitos

SLE: Lupus eritematoso sistémico

SLP-76: Proteína de leucocitos que contiene dominios SH2 de 76KDa

SP: Timocitos simples positivos

STAT: Proteína traductora de la señal y activadora de la transcripción

Syk: Proteína tirosina quinasa de bazo

TCF: Proteína factor de transcripción

TCR: Receptor de células T

TLC: Cromatografía en capa fina

TOX: Proteína HMG asociada a selección tímica

Treg: Célula T reguladora

TRIM: Molécula de interacción con el TCR

TSA: Antígeno restringido de tejido

WB: *Western blot*

WT: *Wild type*, ratón salvaje

ZAP-70: Proteína asociada a la cadena ζ de 70 Kda

Summary

Discrimination between self and non-self antigens is essential for the immune system to control its own response. T cells achieve this self-tolerance acquisition during development, where pre-TCR (T cell receptor) and TCR functions promote thymocytes to survive, mature and choose a cell fate. The mechanisms controlling these events are based on signal intensity after receptor stimulation; thus positive and negative regulators of TCR signaling are important in generating gradual intensities that dictate the cell output. One of the factors implied in this control downstream of the TCR is the extent and duration of Ras-Erk activation, as addressed by numerous studies.

Diacylglycerol is a lipid second messenger generated after TCR stimulation by Phospholipase C γ (PLC γ) and consumed by Diacylglycerol Kinases (DGK). DAG binds to C1 domain containing proteins to activate them. RasGRP1, one of these DAG-regulated proteins, is responsible of Ras-Erk activation during T cell development. It is known that RasGRP1 activity depends, *in vitro*, on DAG binding to its C1 domain, but the relevance of this fact *in vivo* has not been shown. Furthermore, little is known about DAG accumulation during receptor stimulation, which could be a key event in controlling Ras-Erk signal intensity or duration. Thus, we decided to generate tools to study these aspects of T cell biology.

Firstly, we developed a method to sense DAG production and localization, in both thy-

mocytes and peripheral T cells. We generated GFP or GST tagged C1 domains to monitor DAG dynamics during antigen recognition. The use of these bio-probes in transgenic TCR primary cells allowed us to manipulate the strength of the stimulus given. Our data show that different pools of DAG exist in T cells: reservoir DAG remains at internal membranes and receptor-induced DAG is produced at the immune synapse. In this last situation, lipid accumulation is strictly controlled by the affinity of the peptide-MHC-TCR interaction.

Finally, we have analyzed the impact that DAG metabolism plays in T cell tolerance *in vivo*. To that aim we generated a constitutive active DGK located at the plasma membrane (caDGK), thus diminishing the lipid levels in this specific location after TCR stimulation. Our results have shown a general attenuation of TCR signaling when caDGK is overexpressed in cell lines. The consequences of this fact in T cell selection and homeostasis were evaluated in transgenic mice expressing caDGK in T cell lineage. T cell subsets in thymus were altered at the ISP (immature simple positive cells) level and defects in selection of CD4 and CD8 SP (simple positives cells) were evident. Analysis of peripheral T cells showed general lymphopenia, unbalanced ratio of CD4 and CD8 populations and hyperactivation phenotype of both lineages. Regarding these results, DAG concentration at the plasma membrane is a critical parameter in the development, activation and homeostasis of T cells.

Introducción

“Toda dominación social está basada en la asimetría de la información”

Los linfocitos T son células centrales en el sistema inmune, capaces de coordinar y generar diversas respuestas adaptativas en función de la situación patológica que se encuentran. Las diversas subpoblaciones de células T reconocen distintos patógenos que producen su activación y función efectora, y cooperan y regulan a otras células del sistema inmune, como macrófagos y células B, para producir una respuesta conjunta.

Las subpoblaciones de linfocitos T se generan en el timo, a partir de precursores tempranos comunes, y son células CD8 o citolíticas, células CD4 efectoras, linfocitos T $\gamma\delta$, células NKT y células T reguladoras. Todas estas células expresan en su superficie receptores para antígeno producidos mediante procesos de recombinación en el desarrollo. La funcionalidad de estos receptores es comprobada en el timo durante la

maduración de estas células. De esta manera se origina una gran diversidad clonal de células T con potencialidad elevadísima de reconocimiento de antígenos y con una gran versatilidad en las respuestas a ellos (65,397).

Gran parte de este proceso de desarrollo así como la función efectora de los linfocitos se lleva a cabo gracias al reconocimiento por parte del receptor de las células T (TCR) de péptidos o antígenos presentados por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) presentes en células presentadoras de antígeno (APCs). Esta interacción estable y firme entre el linfocito y la APC se conoce como sinapsis inmunológica, y colabora en la regulación de los procesos de señalización en la célula T (revisado en (121, 126, 189, 551))

Tolerancia inmunológica

La gran diversidad de reconocimiento por las células T requiere de un estricto

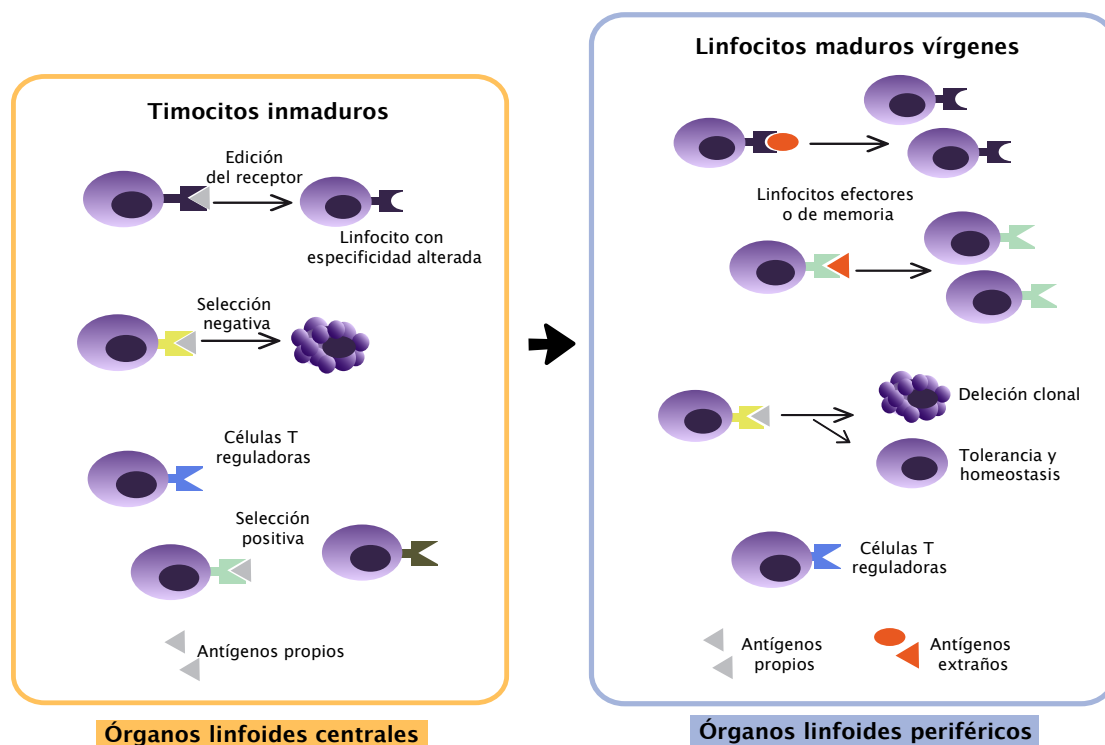


Fig 11: Principales mecanismos de control que establecen la tolerancia de células T en timo y órganos secundarios periféricos.

control al mismo tiempo. Los linfocitos se enfrentan a una gran cantidad de antígenos susceptibles de activarlos; cuando esto ocurre su potencial de expansión es enorme. Además estos linfocitos activados poseen capacidad de migrar y extravasarse a otros tejidos; todo esto hace imprescindible que las células T adquieran capacidad de discernir entre lo propio y lo ajeno y de regular las propias respuestas generadas. Estos mecanismos de control constituyen la tolerancia inmunológica y son esenciales en la prevención de autoinmunidad.

Existen mecanismos de control de tolerancia centrales, que ocurren en el timo durante el desarrollo de los linfocitos, y periféricos, que regulan la reactividad de las poblaciones maduras ⁽¹⁴⁶⁾ (fig I1).

En el timo se producen procesos de edición de receptores autorreactivos, cuyas cadenas son reemplazadas por otras o cuya expresión diluida ⁽³¹⁴⁾ y mecanismos de delección clonal o selección negativa ^{(321, 438, 448,}

⁴⁵⁸⁾, que eliminan también linfocitos con TCR autorreactivos. Además en el timo se generan las células T reguladoras, esenciales en la modulación de las respuestas efectoras del resto de células T ^(183, 323, 403).

En los órganos periféricos se controla el número y la inmunocompetencia de los clones de linfocitos que llegan del timo, mediante señales de supervivencia mediadas por la IL-7, presentación de antígenos propios y competencia clonal entre las propias células T ^(10, 199, 469, 478). Los clones autorreactivos que han evadido el proceso de control del timo son eliminados mediante delección clonal ⁽⁴⁶¹⁾ o mediante la acción supresora de células T reguladoras. Además de esto, los linfocitos de memoria, que ya han visto antígeno y poseen una alta capacidad de respuesta en un segundo encuentro con antígenos específicos, son controlados en caso necesario en sus funciones efectoras mediante mecanismos de ausencia de activación denominados anergia ^(19, 79, 277, 354, 396, 398).

Alteración gen/proteína	Defecto desarrollo	Patología
ZAP70		
Mutación W613C SH2 (ratón) ^{184,396,432}	Sel positiva y negativa; céls Treg	Artritis autoinmune (AR) crónica
Mutación Y315/319A (ratón) ^{184,432}	Sel positiva y negativa; céls Treg	Susceptibilidad autoinmunidad
Mutación locus zap70 (hum) ^{23,84,107}	Ausencia céls CD8; CD4 no respuesta	SCID
LAT		
Mutación Y136F unión PLC (ratón) ^{443,445}	Sel positiva y negativa; céls Treg	Linfoproliferación y autoinmunidad
RasGRP1		
Mutación espontánea/KO (ratón) ^{86,240}	Sel positiva; céls Treg	Autoinmunidad similar a SLE
Tránscrios aberrantes ARNm (hum) ⁵³⁹	N.D.	SLE
Desequilibrio ligamiento locus (hum) ³⁵⁷	N.D.	Diabetes tipo 1
CTLA-4		
KO: interrupción locus (ratón) ^{192,470}	Sel negativa; función Tregs	Diabetes tipo 1
Interrupción locus (humano) ⁴⁹⁴	N.D.	Tiroiditis autoin, sind Grave, diabetes 1
Cbl		
KO c-Cbl/Cbl-b (ratón) ^{27,307}	Selección positiva aumentada	Autoinmunidad espontánea
PTEN		
KO: interrupción locus (ratón) ⁴⁶³	Sel negativa afectada	Autorreactividad periferia
B7		
Bloqueo farmacológico (ratón) ²³⁴	Selección negativa	Autoinmunidad e inflamación
Aire		
KO: interrupción locus (ratón) ^{237,314,364}	Selección negativa	Autoinmunidad, síndrome Sjogren
Mutación espontánea (humano) ^{304,363,505}	N.D.	Autoinmunidad; sind APECED, APS1
FoxP3		
Mutación espontánea (ratón) ²⁷⁰	Función reguladora ineficiente	Autoinmunidad
Mutaciones espontáneas (hum) ^{133,519}	N.D.	Síndrome IPEX, autoinmunidad

Fig I2: Inmunodeficiencias causadas por defectos en desarrollo tímico en ratones y humanos.

Aunque estos mecanismos de tolerancia periféricos colaboran en el control de las respuestas inmunes y la autorreactividad de los clones de linfocitos, el timo es el órgano central y clave en la educación de éstos para que discriminen entre lo “reactivo” y lo “tolerogénico”. Los defectos en desarrollo de los linfocitos generan patologías en humanos y ratones que difícilmente se compensan por los mecanismos de tolerancia periféricos.

El timo: la tolerancia empieza con la educación

Al mismo tiempo que genera gran diversidad en linajes (funciones efectoras) y en receptores (diversidad y especificidad de los mismos), el timo se ha especializado en mecanismos que controlan la funcionalidad de los linfocitos que produce, “educándolos” en el reconocimiento y comprobando que transmiten señales de activación de manera adecuada y controlada. Esto se realiza gracias a un proceso de rastreo altamente riguroso y selectivo de las células, por el que tan sólo el 5% de ellas llegarán a ser linfocitos maduros. El resto son eliminadas, lo que provoca que el timo posea una elevadísima tasa de muerte celular.

Estructuralmente el timo consta de un córtex rico en células epiteliales tímicas corticales (cTECs) y una médula con células epiteliales medulares (mTECs) (15, 345, 346). Otros tipos celulares como macrófagos y células dendríticas residen en el timo y colaboran en los procesos de presentación. El epitelio tímico ha desarrollado mecanismos específicos de presentación antigénica para mostrar un repertorio de péptidos propios alterado que educarán a los precursores linfoides para el reconocimiento ajeno futuro.

Así por ejemplo las células epiteliales corticales poseen un proteasoma específico (timoproteasoma) que genera péptidos esenciales para la selección de células CD8; este timoproteasoma es distinto al existente en el resto de tejidos (317) y al inmunoprotea-

soma modulado por el IFN- γ en situaciones de inflamación (332). En paralelo, para la selección de CD4s mediada por estas cTECs, se han desarrollado mecanismos de autofagia (311) y proteasas específicas de timo como catepsina o TSSP (144, 179, 309).

De la misma manera la médula ha generado mecanismos específicos de presentación; las mTECs se han especializado en la selección negativa y generación de linaje T regulador gracias a la elevada expresión de MHC de clase II y moléculas de co-estimulación, por un lado (16, 261), y a una expresión génica de antígenos diferencial, por otro (PGE, *promiscuous gene expression*) (96, 129). Este último proceso se basa en la presentación de antígenos específicos de otros tejidos (TSA, *tissue-specific antigens*), como insulina, y está regulado por el factor de transcripción Aire (16, 23, 261).

Los precursores linfoides entran en oleadas al timo gracias a señales de CCR9, CCR7 y P-selectina (77, 318, 388), donde comienzan su proceso de desarrollo (fig 13). Las diversas etapas se pueden diferenciar gracias a la expresión en superficie de los co-receptores CD4 y CD8, que colaboran en el reconocimiento de los complejos péptido-MHC y el TCR. Los timocitos comienzan siendo células dobles negativas, sin co-receptores (DN CD4-CD8-), para expresar ambos y progresar al estadio doble positivo (DP CD4+CD8+). Finalmente extinguen la expresión de uno de los dos y se convierten en células especializadas cooperadoras o citolíticas; mientras permanecen en timo se denominan simples positivas (SP CD4+ ó CD8+).

En las primeras etapas los progenitores ETPs (*early thymocyte precursors*) progresan desde la unión cortico-medular a la zona subcapsular por la señalización de las quimiocinas CXCR4 y CCR7 (299, 352). En esta etapa las células no expresan ningún co-receptor (DN) y diferencian gracias a las señales de las moléculas Notch e IL-7, distinguiéndose cuatro estadios de desarrollo (DN1-4) en función de la expresión de los marcadores de superficie c-Kit, CD44 y CD25 (141). Los DN1

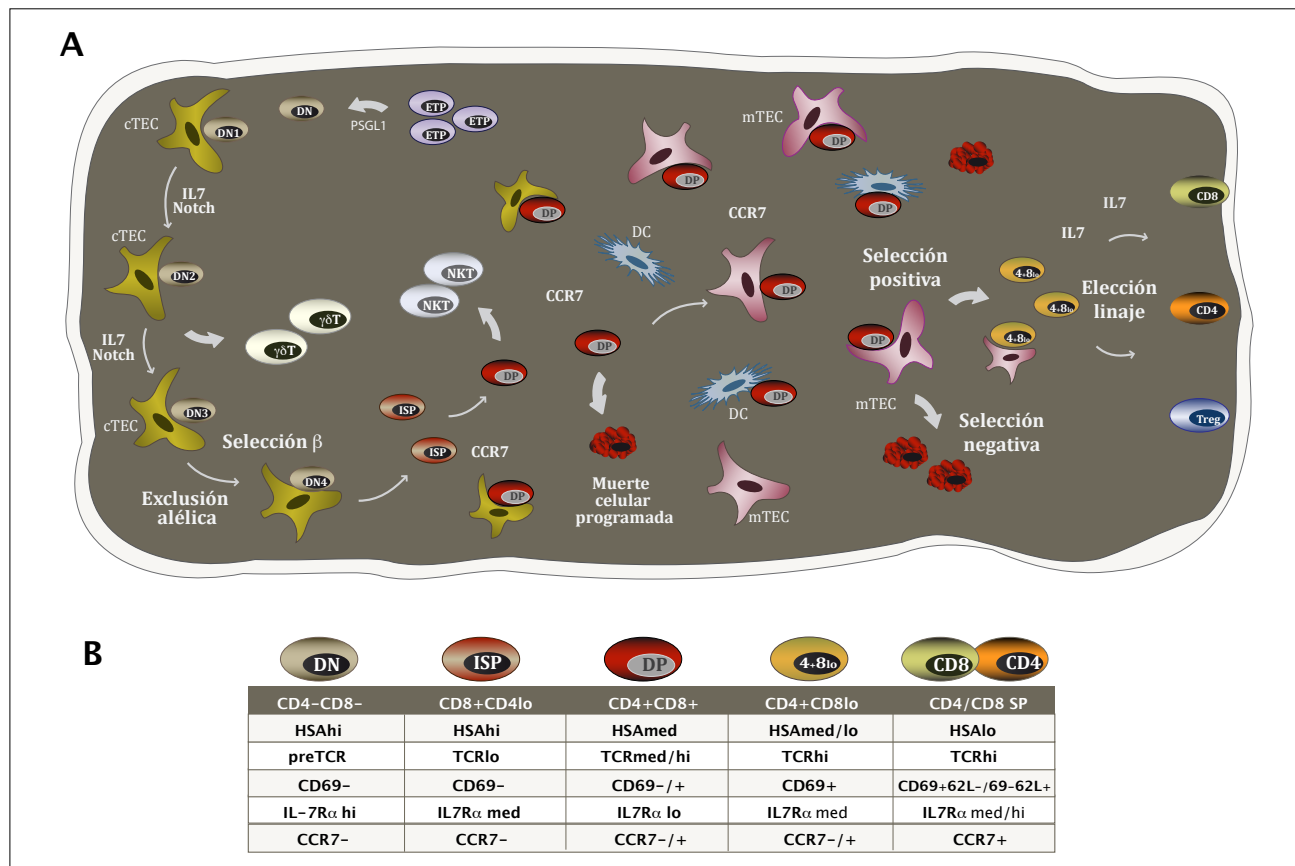


Fig 13: Esquema de desarrollo de los linfocitos T.

(A) Progreso en el timo durante el proceso de desarrollo desde el estadio ETP hasta los linfocitos SP CD4, CD8 o Treg. Las células avanzan desde el córtex hacia la médula recibiendo señales del entorno y madurando a través de las distintas etapas descritas.

(B) Expresión de los distintos marcadores en cada estadio del desarrollo linfocitario.

(c-Kit+CD44+CD25-) proliferan y diferencian hacia DN2 (c-Kit+CD44+CD25+), en los que se induce la expresión de RAG (*recombination activating gene*) (326, 416) y comienza la reorganización de los genes TCR γ , δ y β . En este momento los timocitos pierden toda su pluripotencialidad y se encuentran plenamente comprometidos a linaje T (197, 390, 465).

A partir de este estadio DN2 se generan también las células T $\gamma\delta$, con funciones importantes como primera línea de defensa y que se localizarán en la piel y en epitelio intestinal (78). Sus mecanismos de actuación están empezando a descifrarse (46, 47). Su modo de generación es también desconocido en gran medida, aunque se cree que la intensidad de la señal del TCR es esencial en la elección de linaje $\gamma\delta$ y en la reorganización de sus cadenas (157, 168) y se ha implicado a proteínas como Notch, y factores de transcripción como PLZF, Id3 y ThPOK en estos procesos (167, 233).

Las células que progresan a linaje $\alpha\beta$ alcanzan el estadio DN3 (c-Kit-CD44-CD25+) en el cual expresan una cadena β reorganizada y una cadena pre- α formando el preTCR (102). Este preTCR es capaz de señalizar de manera autónoma e independiente de antígeno. Este paso constituye el **primer punto de control** en el desarrollo: los timocitos cuyas cadenas β han sido reorganizadas adecuadamente y son funcionales, capaces de responder eficientemente a las señales del receptor, avanzan en el proceso (**selección β**) (248, 249). Las señales del preTCR en este punto provocan la proliferación y supervivencia de los timocitos para aumentar el número de células generadas, produciendo la **exclusión alélica**, que elimina la posibilidad de reorganización del otro locus β y garantiza la existencia de un sólo TCR $\alpha\beta$ por clon (234). Finalmente los timocitos progresan en el desarrollo hasta DN4, perdiendo la expresión de los tres marcadores antes mencionados (c-Kit-, CD44-, CD25-).

Los timocitos que superan este control en el desarrollo comienzan la expresión de co-receptores para llegar a ser células dobles positivas (DP), que tendrán capacidad de detectar antígenos presentados en el contexto de MHC de clase I ó II. Este paso de DN a DP se realiza a través de un estadio intermedio de diferenciación llamado ISP (*immature simple positive cells*). Se induce la expresión de ambos co-receptores, aunque en ratones se detecta CD8 antes que CD4 debido a los mecanismos que controlan la transcripción de ambas moléculas. En esta transición de DN a DP son importantes los factores de transcripción TCF-1, LEF-1, ROR γ y Runx1, implicados en la expresión de TCR, CD4, CD8 y en la supervivencia de los timocitos (161, 187, 236, 414, 488, 505, 529, 531, 552).

Finalmente se generan células DP con un TCR $\alpha\beta$ funcional y co-receptores CD4 ó CD8 disponibles para detectar cualquier tipo de antígeno. Estas células migran desde el córtex a la médula gracias a señales de la quimioquina CCR7 (237, 239, 299). Previamente al progreso de los DP a SP sucede también la selección de otro linaje celular; las células NKT. Estas células constituyen un porcentaje pequeño del total generado en timo pero tienen gran importancia funcional al mediar entre la inmunidad innata y la adaptativa. Se activan por antígenos glicolípidicos y secretan IL-4 e IFN- γ . Son linfocitos con TCR $\alpha\beta$ que derivan de timocitos DP pero se desarrollan por restricción de CD1d mediada por interacciones homotípicas con otras células DP (134, 140). Hasta el momento se sabe que intervienen en su desarrollo los receptores SLAM que reclutan a los adaptadores SAP, la Src quinasa Fyn y las Tec quinasas Itk y Rlk (36, 109).

El resto de células que siguen el proceso desde DP hacia SP CD4 o CD8 van a sufrir el **segundo control** en su desarrollo, esta vez dependiente del reconocimiento de antígeno. La mayoría (aproximadamente un 90%) no encuentra antígeno mostrado por células presentadoras o su reconocimiento es ineficiente: estos linfocitos son eliminados en un proceso conocido como *“death by neglect”*

(muerte por falta de estimulación) (226). De esta manera se descartan células con cadenas mal reorganizadas o cuyos TCRs transmiten señales por debajo del umbral necesario (3, 4, 14).

Si el reconocimiento del complejo péptido-MHC por parte del TCR es adecuado este último transmite señales que producirán el progreso del timocito en el desarrollo en un proceso denominado **selección positiva** (138, 215, 219, 459, 479): se aumenta la expresión de TCR $\alpha\beta$ en superficie y se induce la expresión de marcadores como CD69 ó CD5. Al mismo tiempo estas células DP eligen linaje, para convertirse en timocitos simples positivos. A continuación se lleva a cabo en la médula un rastreo de todos los linfocitos que han pasado eficientemente este proceso de selección positiva, y se les somete a un último control en el que aquellos clones potencialmente autorreactivos o cuyos TCRs muestran excesiva afinidad por los pMHC se eliminarán. Esta limpieza final del repertorio de células T se conoce como **selección negativa** (336, 448, 459). Tanto la selección positiva como la negativa generan la inmunocompetencia final de los linfocitos en su reconocimiento de antígenos posterior en los órganos periféricos.

Al final de proceso de maduración de las células DP se produce la generación de células T reguladoras naturales (nTreg o Treg generadas en timo), seleccionadas por células mTECs y DCs (23, 129, 518). Las Tregs son linfocitos CD4+CD25+ que expresan el factor de transcripción Foxp3, esencial en el desarrollo del programa supresor que llevan a cabo (118-120, 180, 221). En la periferia constituyen entre un 5 y un 10% del total de linfocitos CD4 y son las encargadas de la eliminación de clones autorreactivos que han escapado al control del timo (136, 258, 403, 561).

Tanto la selección negativa como la generación de células reguladoras son hechos imprescindibles en el mantenimiento de la tolerancia y prevención o susceptibilidad a la autoinmunidad (fig I2).

Finalmente las células SP afrontan el último paso de maduración, disminuyendo la

expresión de CD69 y aumentando la de L-selectina (CD62L) y gracias a las señales del receptor $S1P_1$ (*sphingosine-1-phosphate receptor*), que media la salida final del timo, se dirigen a los órganos linfoides secundarios (64, 287).

La señalización mediada por el receptor Notch y sus efectores es clave en desarrollo en estadios embrionarios y adultos de numerosos tipos celulares. En timo Notch1 es la principal isoforma expresada, con niveles de ARN mensajero altos desde el estadio de ETPs hasta DN3 (476, 545), aunque la proteína

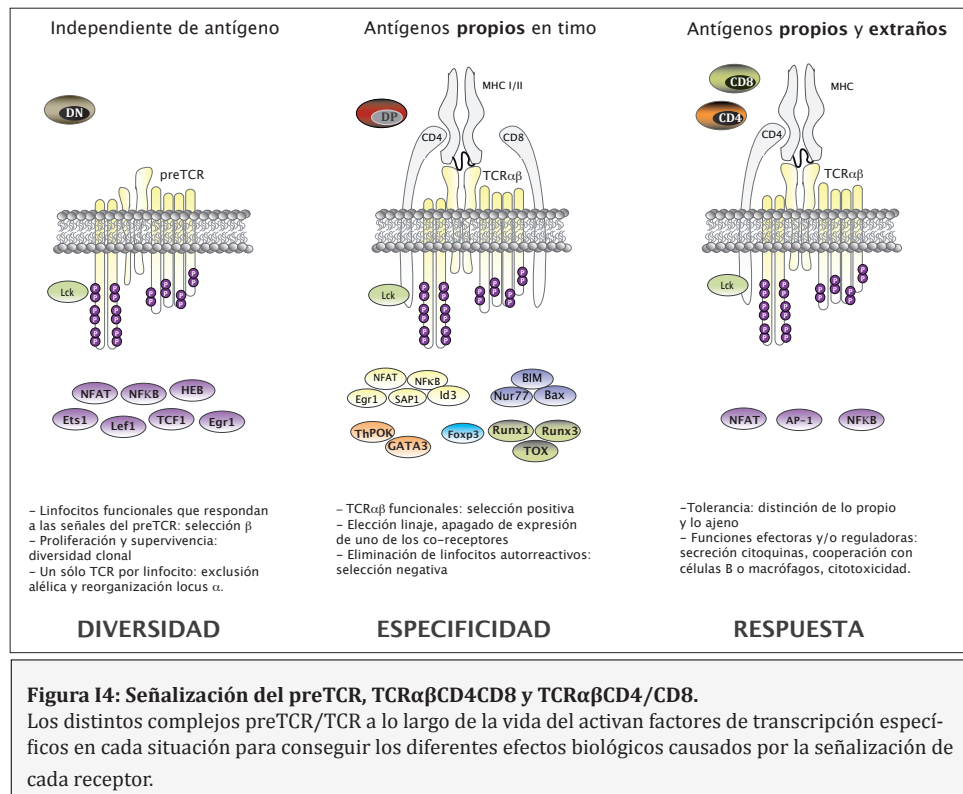


Figura 14: Señalización del preTCR, TCRαβCD4CD8 y TCRαβCD4/CD8.

Los distintos complejos preTCR/TCR a lo largo de la vida del activan factores de transcripción específicos en cada situación para conseguir los diferentes efectos biológicos causados por la señalización de cada receptor.

Mecanismos moleculares de señalización en timo

La generación de todos los linajes T descritos así como de la diversidad clonal en ellos se consigue gracias no solamente a los distintos microambientes del timo, especializados espacio-temporalmente en generar las señales adecuadas en cada proceso, sino también a los mecanismos de transducción de señales de los timocitos, que activan diferentes programas génicos en cada situación.

Las primeras etapas del desarrollo: señalización por Notch e IL-7

Durante este proceso las señales provenientes de IL-7 y de Notch son esenciales para la supervivencia, viabilidad y expansión de los timocitos.

es detectable hasta el estadio de ISPs (80, 110). Durante estas etapas es esencial para asegurar el programa génico que induce linaje T y para dar señales de supervivencia durante la selección β (revisado en (546)), mediante su interacción con su ligando Delta4, expresado con preferencia en córtex (182). Tras su interacción con el ligando y liberación del dominio intracelular al núcleo, Notch induce la expresión de HES-1, Deltex 1, CD25, preTα y c-myc (230).

Otro de los factores esenciales de supervivencia en las primeras etapas de maduración de los linfocitos es la señalización por la citoquina IL-7; su receptor está formado por una cadena común a otras citoquinas, IL-2Rγ/CD132, y una cadena IL-7Rα/CD127 específica para IL-7 y altamente regulada en su expresión durante el desarrollo (203, 463). La unión de IL-7 a su receptor provoca la di-

merización de las cadenas CD132 y CD127 y el reclutamiento de JAK1 y JAK3, que transmiten la señal a través de STAT5 principalmente, el cual se transloca al núcleo para activar la transcripción de genes implicados en supervivencia (123); además la cadena α fosforilada sirve de sitio de reclutamiento de otras moléculas como PI3K, Src quinasas o la proteína Bcl-2 (203), que también contribuyen a transmitir señales de proliferación o supervivencia celular.

Los niveles de IL-7R α son elevados durante las fases DN1-2 (97, 495), disminuyendo después su expresión desde DN3 hasta el mínimo en las células ISPs y DP, para permitir la transmisión de señales de supervivencia/selección en estas etapas únicamente por el preTCR y TCR (463, 504).

Además la IL-7 tiene un papel fundamental en la homeostasis de los linfocitos maduros en periferia transmitiendo señales de supervivencia (203, 469, 478).

Señalización del preTCR y el TCR: generación de la diversidad y funcionalidad de las células T

El preTCR expresado por los timocitos DN y el complejo TCR $\alpha\beta$ /CD4/CD8 expresado por las células DP son los responsables de la transmisión de señales en los puntos de control del desarrollo: la selección β y la selección positiva/negativa. La eficiencia y cinética en la transmisión de señales en estos puntos tiene gran relevancia fisiológica en la generación de tolerancia y diversidad clonal. Aunque los primeros eventos de las cascadas de señalización del preTCR, TCR $\alpha\beta$ en timo y TCR $\alpha\beta$ de un linfocito periférico son similares, los mecanismos de transducción de señales generarán diferencias en los factores de transcripción activados, provocando así respuestas biológicas distintas entre unos receptores y otros (fig I3).

La señalización eficiente del preTCR provoca la proliferación de los timocitos, prevención de apoptosis, exclusión alélica y finalmente diferenciación al estado DP, en el que las células expresan un TCR funcional y

los co-receptores CD4 y CD8.

Por su parte, el TCR $\alpha\beta$ de los timocitos DP tiene como misión dar señales que finalicen el proceso de maduración y provoquen la elección de un linaje u otro (CD4, CD8, célula T reguladora).

Selección β y exclusión alélica

El preTCR se expresa en la células DN y transmite señales de manera independiente de antígeno, se cree que quizá debido a su localización constitutiva en balsas lipídicas (401). Consta de una cadena preT α invariable con una cola citoplásmica más extendida que las cadenas TCR α y una cadena TCR β reorganizada; la molécula preT α no se alinea de la misma manera que las cadenas TCR α con su pareja β , sino de forma más ineficiente (400, 496), pero con una sensibilidad más alta que hace que el umbral de activación de las células DN sea menor (156, 537).

El preTCR requiere de CD3 ϵ , Lck y Fyn, Syk y ZAP-70, LAT y SLP-76 para su señalización adecuada (revisado en (538)). Además se ha demostrado el papel específico y esencial de la vía PDK1-PI3K-Akt para el progreso de los timocitos DN3 (174, 210, 411) así como del receptor de quimioquinas CXCR4 (493). En la señalización del preTCR está implicada también la vía de Ras-Raf-Erk (135, 195). Los factores de transcripción finales así como su función específica dentro de todos los procesos que media la activación del preTCR está siendo objeto aún de intenso estudio, aunque se conoce la participación de TCF-1 (148), Ikaros (527), NF-AT y NF- κ B (2) y E2A, HEB e Id3 (107).

Selección positiva y negativa

Ambos procesos están controlados por el TCR y sus cascadas de señalización, aunque las proteínas y factores de transcripción finales activados en cada caso difieren.

En la selección positiva son esenciales el complejo TCR-CD3 (267, 522), las proteínas tirosina quinasas Lck y ZAP-70 (312, 494), los adaptadores LAT y SLP-76 (208, 450), la PLC γ 1 (127), la señalización por calcio-calmodulina-calci- neurina (131, 313, 368) y, sobre todo con un papel

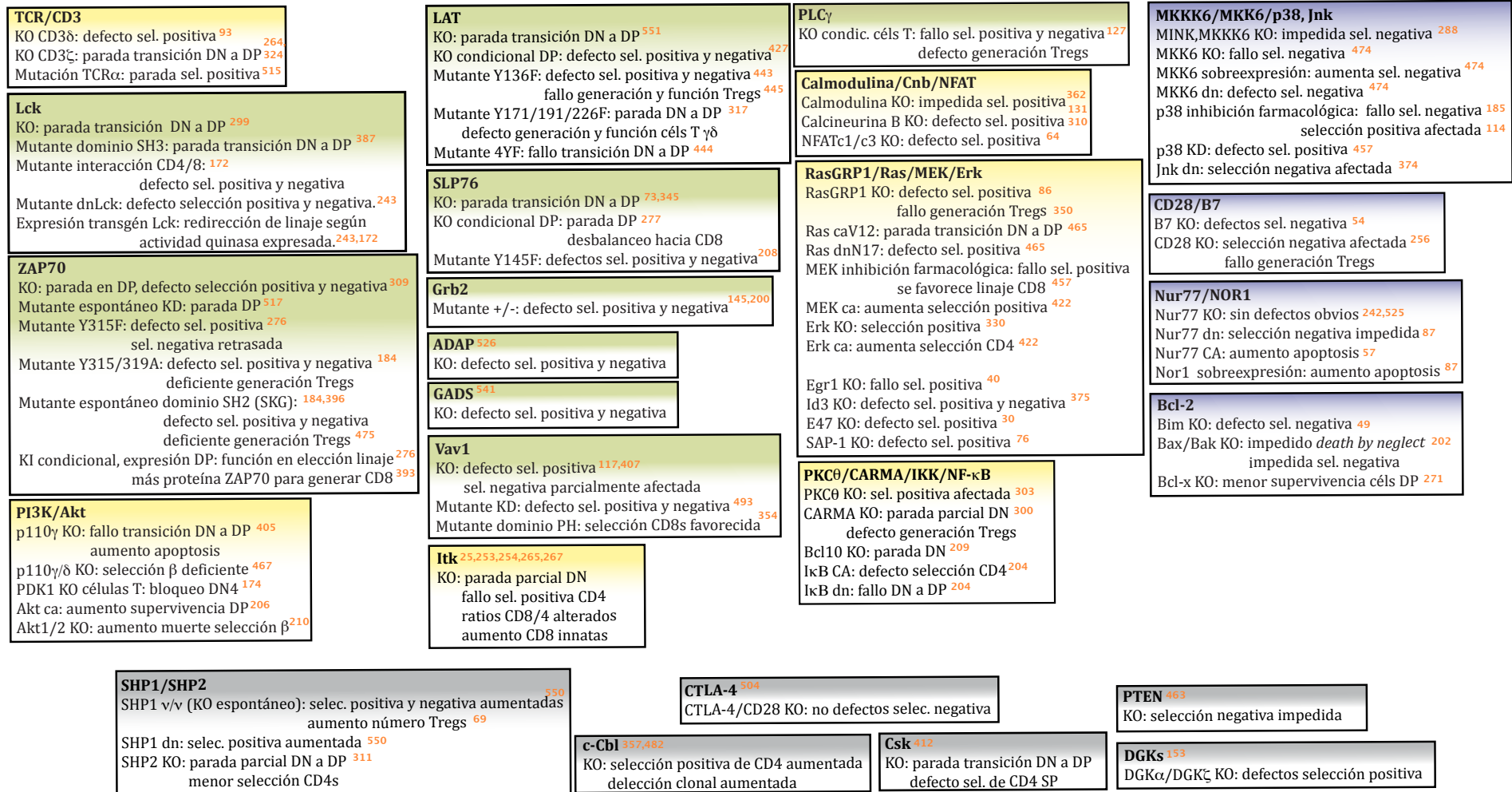


Figura I6: Proteínas implicadas en la señalización en selección.

Los defectos en señalización durante los procesos de selección positiva y negativa se han demostrado con modelos animales o cultivos ex vivo. Se muestra un resumen de las proteínas principales implicadas y las funciones descritas en selección positiva (amarillo), selección negativa (malva), en ambos procesos (verde) o como reguladores negativos de la señal (gris).

central, la vía de RasGRP1-Ras-Erk (115, 335, 359, 464, 472), como han revelado numerosos modelos animales. Otras muchas proteínas centrales en la señalización contribuyen a este proceso de selección (fig 15, 16). Finalmente se activan los factores de transcripción NFAT (63) y NF- κ B (204) así como SAP-1/Elk4 (84), Egr-1 (39, 426) e Id3 (381), regulados estos últimos directamente por la activación de Erk.

Muchas de estas moléculas hasta ahora mencionadas son importantes también para la selección negativa debido a su papel central en la señalización del TCR. Esto ocurre, por ejemplo, en el caso de Lck, ZAP-70, LAT, SLP-76 y PLC γ 1 (127, 208, 279, 450, 494). Sin embargo, existen proteínas que juegan un papel específico en la señalización negativa, como son las MAPK Jnk y p38 (145, 185, 380, 464, 481), las proteínas pro-apoptóticas Bcl-2, Bax y Bak (48, 373), la histona deacetilasa HDAC7 (94) y el factor de transcripción Nur77 (532). Recientemente se ha descrito una posible conexión directa entre el TCR y sus proteínas asociadas y Jnk y las proteínas Bcl-2, a través de la MAPKKK MINK, que se asocia a Nck y cuyo ratón deficiente presenta defectos en selección negativa (291). Además se ha descubierto en otros sistemas la interacción entre Nur77 y Bcl-2, sugiriendo un papel coordinado de estas proteínas en los procesos de apoptosis celular (257).

Elección de linaje CD4/CD8

Los mecanismos de elección de linaje CD4 o CD8 son objeto de gran debate desde hace años en el desarrollo de los linfocitos. En un primer momento se describieron mecanismos instructivos o estocásticos dependientes del MHC que se uniera al TCR del timocito DP, que provocaban el apagado del locus de uno de los co-receptores y la activación del programa génico del linaje del co-receptor opuesto: así la interacción con MHC de clase I generaba células CD8 y el reconocimiento de MHC de clase II células CD4 (382, 383). Posteriormente, se demostró que la naturaleza del MHC no es indispensable en selección de uno u otro linaje (88, 89, 286) y se postuló la hipótesis de la “intensidad de la señal” (“sig-

nal strength”) en el proceso (286), generando señales fuertes linaje CD4 y señales débiles linfocitos CD8.

Finalmente la generación de ratones deficientes en proteínas de la cascada del TCR, o para los co-receptores CD4/CD8, el desarrollo de tratamientos para eliminar éstos en momentos determinados del desarrollo (268, 471) y la identificación de los factores de transcripción que controlan los loci de *Cd4* y *Cd8* y de sus mecanismos de actuación han desencadenado una nueva interpretación del proceso, mediante un modelo de “cinética de la señalización” (“*kinetic signaling*”).

Así se sabe que los timocitos DP pasan a un estadio CD4+CD8^{low} desde el que se pueden diferenciar a cualquiera de los linajes CD4 ó CD8. En general, la interrupción o atenuación de la señal del TCR en este punto produce la reexpresión de *Cd8* y redirección a ese linaje, mediante un mecanismo denominado “inversión del co-receptor” (“*co-receptor reversal*”), mientras que el mantenimiento de la señal en fortaleza o cinética extingue la expresión de *Cd8* y produce células CD4 SP (revisado en (442, 443)).

Esto es consistente con modelos animales en los que las señales de Lck, ZAP70, Itk y las vías de Ras/MEK/Erk están modificadas: en estos casos el linaje CD4 se redirige a CD8 o el balance entre estas poblaciones se encuentra alterado (fig 16).

Más recientemente se ha demostrado la necesidad de señalización de citoquinas para la diferenciación a linaje citolítico, especialmente de IL-7 y su la cadena α de su receptor (IL-7R α o CD127), vinculada a la expresión de *Cd8* mediante el factor de transcripción Runx3 (339, 340). Por lo que existe una asimetría en las señales que generan linfocitos de un linaje u otro: mientras que una señalización persistente del TCR es necesaria para la diferenciación celular hacia CD4 por expresión de factores como ThPOK, que dirigen la elección de este linaje (410), la señalización por citoquinas se muestra necesaria para la generación de células CD8.

En los estadios finales del desarrollo se produce la elección de linaje T regulador; se sabe que los antígenos responsables de la elección de este linaje presentan una alta afinidad por los receptores de los clones seleccionados (18,207) y que se requieren señales fuertes para producir Tregs. De hecho la falta de señales de co-estimulación como CD28, CD40, LFA-1 o B7 reducen substancialmente el número de células T reguladoras generadas en timo (404).

Reguladores negativos del TCR y umbrales de señalización en selección

Los procesos de selección positiva, negativa y de elección de linaje se producen por señales de un mismo complejo pMHC-TCR $\alpha\beta$ /CD4/CD8 (139), que deben ser interpretadas adecuadamente para activar los factores de transcripción y programas génicos específicos en cada proceso. Así es necesario situar dos umbrales o límites de señalización, uno de señalización débil para establecer la selección positiva, y otro de señalización fuerte para limitar la selección negativa; entre ellos las células se destinan a ser linfocitos T CD4 o CD8.

La existencia de estos umbrales se verificó en experimentos donde la intensidad de la señal se graduaba, bien mediante dosis crecientes de péptidos agonistas (517), número variable de ITAMs señalizando (435) o variaciones en actividad ZAP70 debido al uso de distintos mutantes (439, 482). En estos experimentos, en función de la magnitud de la señalización se superan los límites de selección positiva o negativa: en el caso de ZAP70 se ha demostrado también que esto tiene un impacto en el desarrollo posterior de inmunodeficiencias patológicas (439, 482).

Las proteínas centrales en la organización de las cascadas de señalización controlan ambos límites, como revelan modelos animales KO o con modificaciones de su actividad (fig 15). En muchos de estos modelos la modulación a la baja de los umbrales de señalización provoca que señales o péptidos que inducen selección negativa en condiciones control induzcan selección positiva de

células, como sucede en modificaciones de las cadenas ζ del TCR, calcineurina B, ZAP70 o LAT/PLC γ 1 (368, 402, 450, 540).

En este equilibrio del control de las intensidades también tienen un importante papel los reguladores negativos del TCR (fig 16), que ejercen su función en el sentido opuesto, desplazando a la alta estos umbrales cuando estas proteínas no están presentes. Esto sucede, por ejemplo, en el caso de sobreexpresión del miRNA 181a, que controla la expresión de numerosas fosfatasa en timo, y que produce que péptidos antagonistas se comporten como agonistas (252). En esta misma dirección actúan los adaptadores reguladores negativos SIT y TRIM: en ratones KO de ambas proteínas se produce selección positiva en condiciones de “*death by neglect*” y se induce selección negativa en condiciones de selección positiva (228).

Más concretamente, ratones con una mutación espontánea en SHP1 (“*motheaten*”), una de las principales fosfatasas que regulan el BCR y el TCR, presentan la selección negativa y positiva aumentadas (558). La fosfatasa SHP2, perteneciente a la misma familia, también ha demostrado tener una función en la selección de CD4s, además de en señalización del preTCR (316).

Igualmente ratones deficientes en c-Cbl, proteína ubiquitín ligasa que se une a residuos de tirosina fosforilados y conduce los complejos señalizadores a su degradación, presentan selección positiva aumentada (310) y mayor delección clonal (489).

La quinasa Csk, reguladora negativa de la activación de las Src quinasas Fyn y Lck, también participa en los procesos de selección del timo. Los ratones deficientes en ella muestran defectos en selección β y en selección de CD4s (417, 418); según el nivel de reexpresión de dicha enzima en estos ratones deficientes se rescatan estas paradas en el desarrollo (564).

Todos estos reguladores negativos están implicados en la regulación de la respuesta mediada por tirosinas quinasas, pero existen

además mecanismos adicionales de control de la señal sobre los segundos mensajeros lipídicos. Así la fosfatasa PTEN, que controla la vía de PI3K-Akt, también participa en este proceso de control de la señal, puesto que ratones deficientes en ella en linaje T presentan defectos en selección negativa (470).

Otro lípido cuya producción está altamente regulada en timocitos es el diacilglicerol. Su señalización termina cuando es fosforilado y transformado a ácido fosfatídico (PA) por la acción de las diacilglicerol quinasas (DGKs). Ratones deficientes para las dos isoformas de estas enzimas presentes en timo, DGK α y DGK ζ , tienen graves defectos en selección positiva, y carecen de células maduras en periferia (153). Esto se debe al control que ejercen estas enzimas sobre la vía de RasGRP1-Ras-Erk (330, 562). La importancia de esta ruta en procesos de desarrollo y activación de células sugiere un importante papel del DAG en la señalización en estas células.

El DAG, segundo mensajero esencial en la transmisión de señales del TCR

El estudio del DAG como segundo mensajero importante en los linfocitos se ha visto impulsado en los últimos años. A pesar de saber que este lípido se producía tras la activación del TCR y la capacidad de activar a las proteínas quinasas C (PKCs), se desconocía por qué los ésteres de forbol (análogos del DAG) como el PMA (*phorbol-12-myristate-13-acetate*) inducían la activación y proliferación de los linfocitos a través de la vía de Ras-Erk (13, 271, 497). Sin embargo, hasta el descubrimiento de la familia de proteínas GEFs RasGRPs se tenían pocas evidencias de cómo se producía este hecho, salvo por una posible conexión de la vía de PKC con Ras (176). Las principales proteínas reguladas por DAG en linfocitos T, RasGRP1 y PKC θ , son imprescindibles en el desarrollo y activación de los linfocitos, controlando vías de señalización centrales como Ras-Erk y NF- κ B.

Producción y degradación del DAG por el TCR

El DAG es un lípido constituido por una molécula de glicerol a la que se unen por enlace tipo éster dos ácidos grasos en las posiciones 1 y 2 de la cadena. En la célula el DAG forma parte de estructuras de membrana, a las que les confiere curvatura, es intermediario metabólico de otros lípidos y sobre todo, segundo mensajero celular (revisado en (67)). Numerosas proteínas con importantes funciones biológicas se activan por la unión de DAG gracias al desarrollo de dominios específicos de unión de este lípido (dominios C1) (217).

La estimulación de receptores produce la generación masiva de DAG por medio de enzimas lipasas a partir de otros precursores lipídicos. En el caso de los linfocitos T y la estimulación del TCR dos actividades enzimáticas contribuyen a la generación de este lípido:

Actividad fosfolipasa C

La fosfolipasa C1 gamma tipo 1 (PLC γ 1), perteneciente a la familia de las fosfatidilinositol fosfolipasas, es la principal productora de DAG tras la estimulación del TCR (521). Su actividad lipasa genera diacilglicerol e inositol-1,4,5-trifosfato por la hidrólisis del fosfatidil inositol-4,5-bifosfato presente en la membrana (447, 485). El IP $_3$, otro segundo mensajero, es esencial en la regulación de la salida de calcio del retículo endoplásmico, por lo que la acción de la PLC γ 1 es clave en la transducción de señales de los linfocitos mediada por calcio y DAG. Además PLC γ 1 tiene un efecto adicional estabilizando la formación de complejos señalizadores independientemente de su actividad catalítica (34).

La actividad PLC γ 1 está estrictamente controlada mediante interacciones con el adaptador LAT (560), por la interacción con otras proteínas como c-Cbl, Vav1, SLP-76 e Itk (49), necesarias para que PLC adopte una conformación óptima, y por la fosforilación en cinco tirosinas (338, 424), entre las cuales la más relevante para su actividad es la Y783

(196).

Los ratones deficientes en PLC γ 1 son letales embrionarios (202, 254). Otros modelos animales en los que PLC γ 1 no se puede activar (450) o no está presente en linaje T (127) han demostrado la función esencial en selección positiva y negativa, así como en la generación de células T reguladoras (127). Los profundos defectos en el desarrollo tímico de estos modelos son consistentes con el papel fundamental de esta enzima en la señalización del linfocito.

Actividad fosfolipasa D

La acción combinada de las enzimas fosfolipasas D (PLD), que fosforilan fosfatidilcolina principalmente convirtiéndola en ácido fosfatídico, junto con las fosfatasas del ácido fosfatídico (PAP) permite la generación de DAG (260): PC \rightarrow PA \rightarrow DAG

En mamíferos existen dos isoformas de PLD, PLD1 y PLD2. El DAG que producen es distinto en composición al de las PLCs, con ácidos grasos saturados en posición 2 (175). Recientemente se ha implicado a estas enzimas en la activación de RasGRP1 en linfocitos (305), aunque existían evidencias previas de su activación por el TCR (375), del papel regulador sobre Erk (162) o sobre el factor de transcripción AP-1 (304) también en células T. Sin embargo, aún no se han generado modelos animales KO o en los que se sobre-expresen estas proteínas que permitan evaluar el papel *in vivo* que tienen en la señalización y activación de las células T.

Diacilglicerol quinastas

Las DGKs son las enzimas encargadas de fosforilar el DAG a PA. En mamíferos constituyen una gran familia de 10 isoformas estructuralmente muy distintas, lo que refleja la diversidad de funciones en las que participan (revisado en (296)). En células T existen dos isoformas: DGK α y DGK ζ .

DGK α pertenece al grupo I de DGKs, que constan en su estructura de un dominio de homología a recoverina, dos dominios de manos de calcio, dos dominios C1 y el do-

minio catalítico quinasa. Su función más importante en las células T es la de reguladora negativa del TCR: se transloca a membrana plasmática tras la estimulación del receptor (407) donde regula la activación de RasGRP1 por la modulación de los niveles del DAG (408). El aumento de calcio intracelular, que actúa sobre los dominios de manos de calcio (407), y la actividad quinasa de Lck, que fosforila a DGK en el residuo Y335 (297), favorecen la localización de la enzima en la membrana.

DGK α está regulada a nivel transcripcional, aumentando los niveles de su ARN mensajero en condiciones de inducción de anergia *in vitro* (276). Los ratones deficientes en DGK α han confirmado este control sobre la activación de la localización de RasGRP1 y la activación de Ras en esta situación anérgica *ex vivo* (330, 556).

Además se ha propuesto una función adicional de DGK sobre la activación de los linfocitos, como regulador positivo de la proliferación por el PA que genera (117) o regulando la supervivencia de timocitos a través de Bcl-2 (333). Otros trabajos han descrito la localización de DGK α en endosomas y aparato de Golgi de linfocitos (12), donde regula la secreción de exosomas (11); y se ha sugerido, adicionalmente, un papel en el metabolismo lipídico nuclear por su translocación a matriz nuclear a tiempos tardíos tras la activación de la célula T (510).

DGK ζ es la otra DGK implicada en la metabolización del DAG producido *de novo* por el TCR. Su expresión es ubicua (55) y es más compleja estructuralmente, con dominios PDZ y repeticiones de anquirina implicados en su interacción con otras proteínas (296). Al igual que DGK α , es importante en la regulación negativa de las respuestas del TCR. Esto se ha demostrado en líneas celulares, en donde la sobre-expresión de la enzima provoca menor activación de Ras-Erk e inducción de AP-1 y CD69 (563), y en ratones deficientes para esta isoforma, que muestran una hiperactivación tras la estimulación del TCR y respuesta antiviral intensificada (562). Al igual que DGK α , linfocitos deficientes en

DGK ζ son resistentes a la inducción de anergia (330).

Además en las células T DGK ζ ha sido implicada en la regulación del tráfico vesicular mediante su interacción con SNX27 (379), sugiriendo un control adicional del DAG en la funcionalidad de las células T.

Como se ha mencionado anteriormente en el contexto del desarrollo tímico el ratón deficiente para ambas isoformas (DGK $\alpha^{-/-}$ $\zeta^{-/-}$) presenta defectos en selección positiva, con gran descenso de poblaciones SP CD4 y CD8 (153). Además estos ratones cruzados con otros transgénicos para el TCR muestran mayor propensión al desarrollo de tumores tímicos, con hiperactivación de Ras y Erk. Esto confirma el papel sinérgico de ambas DGKs en la regulación de esta vía.

Respuesta al DAG: dominios C1 y proteínas reguladas por DAG en linfocitos

Dominios C1

Los dominios C1 son los responsables de la unión de DAG y ésteres de forbol en las proteínas que los contienen. Tras el hallazgo de las proteínas quinasas C como efectores del DAG en la célula se identificó en ellas al dominio responsable de la interacción directa con el lípido, el dominio C1 (51, 158, 190, 216-218, 456, 542). En un primer momento se descubrió su capacidad de unión de ésteres de forbol (56, 331) y posteriormente la unión del lípido presente en la célula, el DAG (365-367).

Los dominios C1 se conocen también como CRD (*Cysteine Rich Domains*) y están formados por unos 50 residuos que cumplen una secuencia consenso $HX_{11-12}CX_2CX_{12-14}CX_2CX_4HX_2CX_{6-7}$ (H, histidina; C, cisteína; X, cualquier aa). Su estructura terciaria consta de 5 conformaciones β formando 2 láminas β antiparalelas y una hélice α , que generan una estructura globular con bucles flexibles en la parte superior que constituyen el surco donde se produce la inserción de DAG; dos histidinas y seis cisteínas coordinan dos átomos de zinc en la estructura (178, 188, 536, 557).

Aparte de estas cisteínas e histidinas, necesarias para formar la estructura, otros residuos permanecen altamente conservados en la secuencia primaria y son importantes en la unión del lípido (178, 188) (fig I7). En general las proteínas reguladas por DAG poseen uno o dos dominios que actúan coordinados; si se presentan como pareja éstos no son equivalentes y difieren en su secuencia y, por tanto, en sus propiedades de interacción con lípidos (82).

La unión del DAG a proteínas provoca la localización de manera estable en membranas y su activación. En mamíferos estas proteínas son PKCs (163, 427), quimerinas (159), DGKs (434), PKD (503), Munc13 (50), RasGRPs (103) y MRCK (480). Hasta el momento sólo se han identificado PKCs, PKD, Quimerina y RasGRP como proteínas efectoras en células T, y todas ellas llevan a cabo funciones imprescindibles en la activación de éstas. Las DGKs existentes en linfocitos, DGK α y DGK ζ , poseen dominios C1 atípicos incapaces de unir DAG por la modificación de residuos clave de unión al lípido (191, 211).

Una aplicación interesante de estos dominios ha sido su aislamiento para expresarlos fusionados a proteínas fluorescentes en las células. Esto permite seguir las dinámicas de producción y degradación del DAG antes y después de estímulo en células intactas. Hasta el momento esto se ha realizado en líneas celulares tan sólo (66, 113, 324, 457); en el contexto de los linfocitos trabajos realizados con células Jurkat han demostrado la localización de estos dominios en la sinapsis detectando la producción de DAG tras la estimulación (66, 457).

Proteínas reguladas por DAG en linfocitos T

Todas las proteínas reguladas por DAG presentan un dominio C1 típico de unión a este lípido. Además de las PKCs se han ido describiendo en los últimos años otras familias proteicas con estos dominios (51, 158, 217, 456); la mayoría de ellas están presentes en linfocitos (fig I7B).

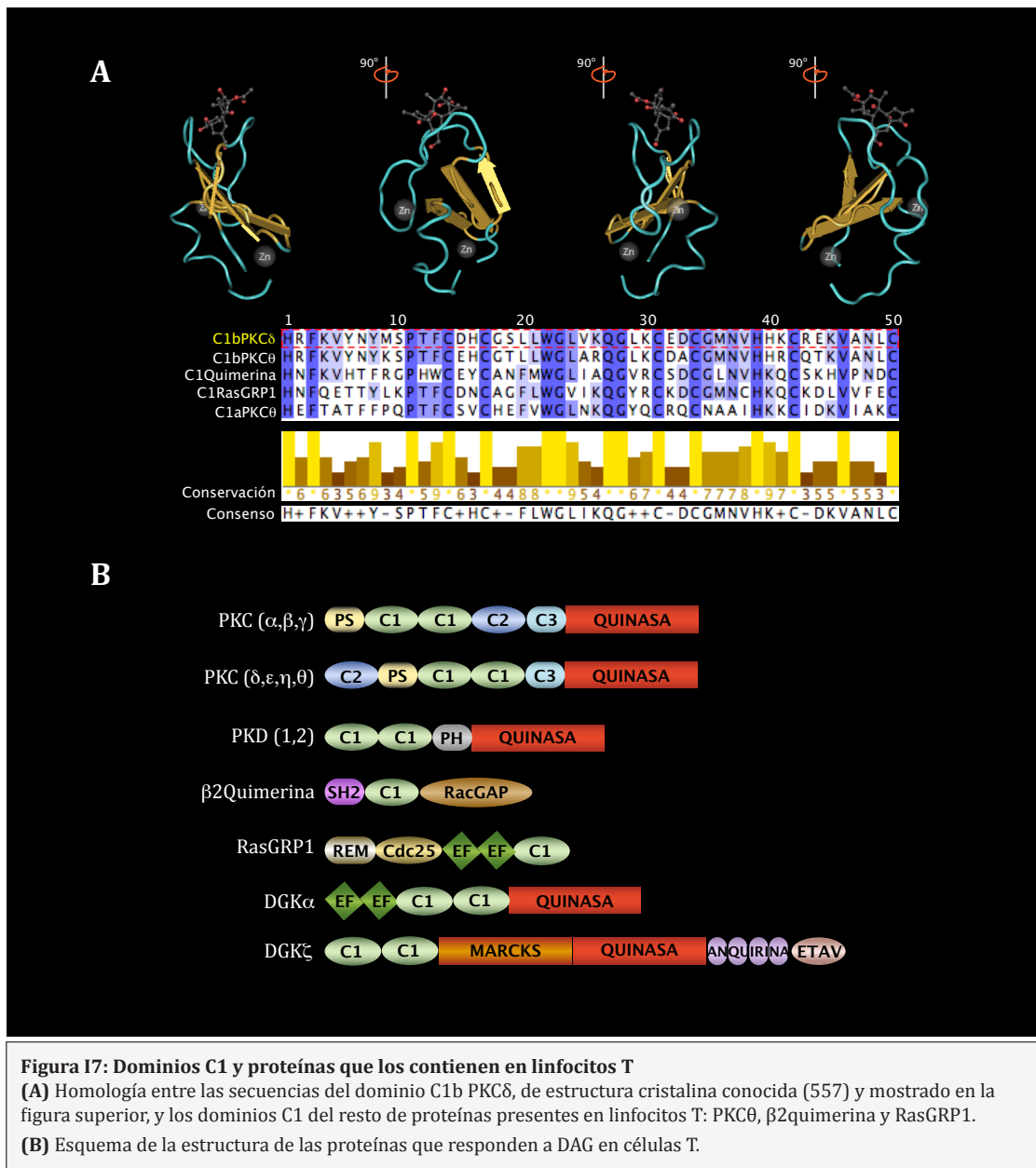


Figura 17: Dominios C1 y proteínas que los contienen en linfocitos T
 (A) Homología entre las secuencias del dominio C1b PKCδ, de estructura cristalina conocida (557) y mostrado en la figura superior, y los dominios C1 del resto de proteínas presentes en linfocitos T: PKCθ, β2quimerina y RasGRP1.
 (B) Esquema de la estructura de las proteínas que responden a DAG en células T.

A) Proteínas Quinasas C

Las PKCs (proteínas quinasas C) fueron los primeros efectores celulares de DAG descritos (163, 223, 427). Constituyen una familia de 9 isoformas de PKC con un dominio catalítico conservado que se agrupan en tres categorías en función de sus motivos estructurales, que determinan su modo de activación (revisado en (28, 147, 315)):

- PKC clásicas o convencionales (α, βI y II y γ): presentan dos dominios C1 de unión a DAG y un dominio C2 que une Ca²⁺.
- PKC nuevas (δ, ε, η, θ): similares a las clásicas pero sin necesidad de unión

de Ca²⁺ al dominio C2.

- PKC atípicas (ζ, λ/ι): tienen un dominio C1 atípico y no presentan dominio C2, por lo que se desconoce su mecanismo de activación.

Todas las PKCs comparten un mecanismo común de activación, basado en una primera fosforilación por PDK1, y una posterior autofosforilación en el dominio catalítico. La PKC fosforilada es inactiva hasta que se produce un aumento de Ca²⁺ y DAG (PKC clásicas) o DAG (PKC nuevas). La unión de DAG induce un cambio conformacional final que separa la zona pseudosustrato que bloquea la zona catalítica, generando una enzima activa (337). Sin embargo, los distintos dominios C1 de las

PKCs participan de manera diferente en función de la isoforma activada y presentan una afinidad distinta por el lípido (194, 434).

Las funciones específicas de cada isoforma son difíciles de determinar, debido a la redundancia génica, a que comparten sustratos comunes y a la inexistencia de inhibidores específicos. En general en células hematopoyéticas participan en la activación de la vía de NF- κ B (69, 468, 498), y son esenciales en la correcta activación de la respuesta inmune y en la tolerancia (69, 150, 247, 292, 300, 350, 468, 555). En los linfocitos T se conocen la participación en la señalización de las siguientes isoformas:

PKC α : se ha descrito que actúa en la señalización temprana del TCR activando la vía de NF- κ B (498). El ratón deficiente en PKC α presenta defectos en proliferación de células T dependiente de IL-2 (349); cuando se retrocruza con el ratón deficiente en PKC θ , las células T muestran defectos de activación mayores que los ratones KO simples (150). PKC α también ha sido implicada en la terminación de la señalización mediada por el reciclaje de receptores (509) y, en un trabajo más reciente, en la fosforilación de Akt tras la activación del TCR (543).

PKC θ : es la principal PKC implicada en la activación de linfocitos T, controlando la activación de NF- κ B mediante la fosforilación de CARMA1 y la interacción con el complejo IKK α -IKK β -IKK γ /NEMO (222, 288, 449). Dos grupos generaron los ratones deficientes de PKC θ en paralelo, revelando la necesidad de esta proteína en la activación de NF- κ B y AP-1 en linfocitos periféricos (350, 468). Análisis más detallados posteriores de estos modelos han demostrado también una función de PKC θ en señalización en timocitos, participando en la señalización del preTCR (111) y en selección positiva (151, 306). Se ha descrito también el requerimiento de PKC θ en la diferenciación y función de CTLs (31), y trabajos recientes han puesto de manifiesto una función en el apagado de la señalización del TCR, mediada por Cbl-b (149), y en la función supresora de las Tregs (555), donde actúa como regu-

lador negativo, debido sorprendentemente a su exclusión de la sinapsis inmune.

Salvo en esta última situación de sinapsis reguladoras, PKC θ localiza en el cSMAC de la sinapsis, siendo reclutada en microdominios de activación gracias a señales de coestimulación mediadas por CD28 (40, 85, 222, 253, 355, 406, 499, 550). Los requerimientos para esta localización de PKC θ no están claros; se ha propuesto la necesidad de ZAP70, SLP76 y de actividad PLC (99, 173), de generación de DAG (98, 294, 475), o de participación de Vav y PI3K de manera independiente de PLC γ (40, 507).

B) Proteína Quinasa D

Clasificada inicialmente como proteína quinasa C por su actividad catalítica y sus dominios C1s, debido a las diferencias estructurales se consideró posteriormente como otra familia proteica, formada por las serín/ treonín quinasas PKD1, PKD2 y PKD3 (391, 514).

En linfocitos T se expresan PKD1 y PKD2, siendo esta última la isoforma mayoritaria. Se activan tras la estimulación del TCR (290), translocándose a la sinapsis inmune de manera dependiente de PLC/DAG (457, 530). Previamente para su activación necesita de fosforilación en dos serinas consenso por PKC: la isoforma responsable de este evento en linfocitos T no está identificada, aunque se sabe que *in vitro* PKD es sustrato de PKC θ (553). Su principal función descrita es la regulación de la histona deacetilasa HDAC7, importante para desencadenar el programa de selección negativa en timo mediado por Nur77 (94, 95, 342). Además se han propuesto un papel adicional en timo, en función de la localización de la proteína, en la transición de DN a DP y en la reordenación V(D)J (285). Sin embargo, los ratones deficientes en actividad enzimática PKD no tienen defectos obvios en desarrollo, aunque muestran alteraciones en activación general de linfocitos y producción de citoquinas, sobre todo mediadas por PKD2 (289). Estas funciones habían sido descritas previamente en líneas celulares, implicando a PKD en la activación de NF- κ B mediada por Jnk (21) y en la activación de NF-AT (193, 251). Existen también trabajos que

sitúan a PKD como partícipe en la señal de integrinas, mediante el control de la localización y activación de Rap1 (293).

C) Quimerinas

Las quimerinas son una familia de proteínas descubiertas recientemente que actúan como factores GAP (*GTPase activating protein*) de Rho y Rac fundamentalmente (1, 159). Incrementan la capacidad de la GTPasa para hidrolizar el GTP, transformándolo en GDP y conduciendo, por tanto, a su desactivación.

Las quimerinas son cuatro proteínas generadas a partir de dos genes que contienen un dominio C1 en su estructura con alta afinidad por DAG y ésteres de forbol. Además las formas $\alpha 2$ y $\beta 2$ poseen un dominio SH2 de interacción con residuos de tirosina fosforilados (ver fig 1). Su descubrimiento, coetáneo a la familia de GEFs de RasGRP, propuso una función adicional al DAG en el control de la activación de las GTPasas pequeñas Ras y Rac/Rho mediante proteínas sin actividad quinasa (revisado en (541)).

En el caso de los linfocitos T se ha descrito la $\beta 2$ quimerina como GAP importante de Rac en la reorganización del citoesqueleto de actina y en la migración leucocitaria (440). En cuanto a su mecanismo de activación se conoce la dependencia de DAG y PLC γ para ejercer su función (60, 440, 513) aunque señales previas de Lck son necesarias para disponer a la proteína en una conformación óptima (441), puesto que el dominio C1 se encuentra oculto e inaccesible según el estudio del cristal de la proteína (62). De hecho la localización en la sinapsis inmunológica de la proteína es independiente de su dominio C1 (59).

Debido a la importante función de Vav (116, 360, 377, 413, 500), GEF de Rac que antagoniza la función de $\beta 2$ Quimerina, y Rac1 en la señalización durante el desarrollo tímico (142, 143, 446), el estudio en modelos *in vivo* de la regulación de quimerina por DAG cobra especial importancia.

D) RasGRPs

Junto con las quimerinas constituyen la

otra familia de proteínas no quinasas reguladas por DAG. Actúan como factores de intercambio de nucleótidos (GEFs) de Ras, provocando la activación de estas GTPasa por el intercambio GDP (Ras-GDP inactivo) por GTP (Ras-GTP activo). Existen cuatro isoformas distintas (1-4) que se expresan de manera preferencial en sistema nervioso o hematopoyético: en este último caso incluso de manera no solapante, ya que RasGRP1 se expresa en células T y B (104), RasGRP2 en plaquetas (86), RasGRP3 en linfocitos B (374) y RasGRP4 en mastocitos (250).

RasGRP1 es, por tanto, el principal activador de Ras-Erk en timocitos y en linfocitos maduros, imprescindible en el desarrollo, homeostasis y función de estas células (103). Dentro de las GTPasas de la familia de Ras se le han identificado como efectores las formas H-, K-, N- (491), M-, TC21 (328) y R-Ras (214).

En el desarrollo de timocitos RasGRP1 es esencial en la selección positiva: los ratones KO no presentan apenas timocitos SP ni linfocitos maduros en periferia por la imposibilidad de activar Erk en este proceso (100, 359). Además las señales de RasGRP1 son importantes para la diferenciación final de células CD4 (356) y células T reguladoras en timo (75).

Los linfocitos CD4 periféricos de estos ratones deficientes presentan un fenotipo de activación, con mayor susceptibilidad a muerte celular y menor capacidad de respuesta (358). Los linfocitos CD8 muestran un fenotipo de anergia ante la estimulación con antígeno conocido (357). A pesar del defecto de desarrollo en timo, en periferia existen células T reguladoras aunque éstas están alteradas en sus funciones: bien presentan un estado de hiperactivación, en el caso de CD4 Foxp3+, o bien son ineficientes en su función supresora, como las CD8 CD44hi CD122+ (75). Todo esto produce en ratones con función de RasGRP1 impedida un fenotipo de autoinmunidad similar a lupus eritomatroso sistémico (SLE) (241); la relevancia de esto es mayor puesto que en humanos se ha visto producción de transcritos aberrantes de RasGRP1, que no producen proteína funcional, en pa-

cientes de SLE (547). Igualmente en humanos se ha implicado al locus de *Rasgrp1* como alterado en diabetes tipo 1, de carácter autoinmune (363).

Además se ha identificado a RasGRP1 necesario en la activación de mastocitos en ratón y humano (265, 430) y, de manera exclusiva en humanos, de células NK (242). La expresión exacerbada de RasGRP1 se ha implicado, al igual que en otros sistemas, en transformación maligna, generando linfomas tímicos cuando la proteína está sobreexpresada (227).

Estructuralmente RasGRP1 consta de dominios REM (*Ras exchange motif*) y Cdc25 esenciales para su función GEF, dominios de mano de calcio (*EF-hands*) que unen este catión, y un dominio C1 con capacidad de unir DAG (fig 17). Existe clara controversia sobre el lugar de actuación de RasGRP1: mientras que ciertos grupos han propuesto su localización en Golgi, donde activa a Ras (43, 347), otros muchos han encontrado RasGRP1 y Ras activo en membrana plasmática (61, 104, 392, 408, 556). Se ha propuesto que la intensidad de la señal es la responsable de que la proteína se encuentre en una u otra localización subcelular (90, 347).

En cuanto a mecanismos de activación de RasGRP1, ciertos trabajos ponen de relevancia su interacción con Vav y con el citoesqueleto de actina como necesaria para que RasGRP1 desempeñe su función (61, 565); también se ha descrito su regulación negativa por el adaptador SKAP55 (231, 420). Sin embargo la unión de DAG es imprescindible en su activación y función (266, 491). Así las actividades PLC (43) y PLD (305) son necesarias para la actividad GEF de RasGRP1 por la generación de DAG; igualmente la degradación de este lípido controla la activación de RasGRP1-Ras-Erk, como se pone de manifiesto en trabajos de sobre-expresión de DGKs (205, 408, 556, 563) y en los modelos animales deficientes para estas enzimas (330, 562).

DAG y el control de la respuesta inmune

La estrategia biológica que han desarrollado los linfocitos para responder a las señales de activación de su entorno está basada en la intensidad y/o persistencia de la señal transmitida por el TCR, con la ayuda de las señales de co-estimulación generadas por el ambiente y el contexto de presentación antigénica que se encuentran.

Así en el timo este control de las intensidades y cinéticas de señalización es importante en la elección de linaje $\alpha\beta$ frente a $\gamma\delta$, en el progreso en desarrollo o muerte por apoptosis debido al “*death by neglect*”, selección positiva o negativa y en la elección de linaje final CD4, CD8 o T regulador.

En periferia los linfocitos emplean igualmente este mecanismo para discriminar entre situaciones de expansión homeostática y reconocimiento de lo propio; para la regulación de la propia respuesta efectora (35, 201) o la diferenciación celular tras una respuesta inmune (122, 165, 245, 325, 444).

Los mecanismos moleculares que decodifican y transforman una señal “cualitativa” como es la afinidad en la interacción del pMHC-TCR en una señal “cuantitativa” biológica no están claros. Sin embargo se ha relacionado la afinidad del péptido o fortaleza del estímulo con la intensidad/duración de la activación del eje Ras-Erk en timocitos; esto determina la selección positiva/negativa y la elección de linaje CD4 ó CD8 (45, 283, 284, 428, 429, 517).

De los dos GEFs de Ras existentes en estas células, Sos1 y RasGRP1, este último es el candidato ideal para llevar a cabo este proceso de decodificación de la señal. Se sabe que Sos necesita de la unión de Ras-GTP en un sitio distinto al de catálisis, de modo que este Ras-GTP es activador alostérico del GEF (282, 454). En células T se ha descrito que RasGRP1 provee el Ras-GTP alostérico necesario para el encendido de Sos (387), ejerciendo un control sobre la activación mediada por tirosinas quinasas de Erk adicional a la función

GEF propia; esto explicaría el grave defecto en fosforilación de Erk en los ratones RasGRP1^{-/-} y la falta de compensación génica por Sos (100).

Los primeros modelos matemáticos han surgido al respecto, proponiendo a RasGRP1 como un decodificador analógico de señales, de manera que la graduación en el estímulo se corresponde con una graduación en la respuesta. Por el contrario, la respuesta de Sos1 es digital, de encendido o apagado, una vez que se supera cierto umbral de estimulación. La regulación de Sos1 por RasGRP1 permitiría ayudar a controlar este umbral y generar respuestas digitales más eficientes (72).

En este escenario, la producción de DAG como activador de RasGRP1 se antoja clave en el control de la respuesta final. La regulación de las enzimas encargadas de su síntesis y degradación posibilita crear gradientes de concentración de este segundo mensajero que supongan un mecanismo de control de la intensidad de las señales generadas a la célula (fig 18).

Por todo ello el estudio de las dinámicas de producción y localización de DAG *in vivo* así como la generación de nuevos modelos y herramientas para abordar este estudio en linfocitos T serán de gran relevancia para la comprensión de los procesos de tolerancia y activación del sistema inmune.

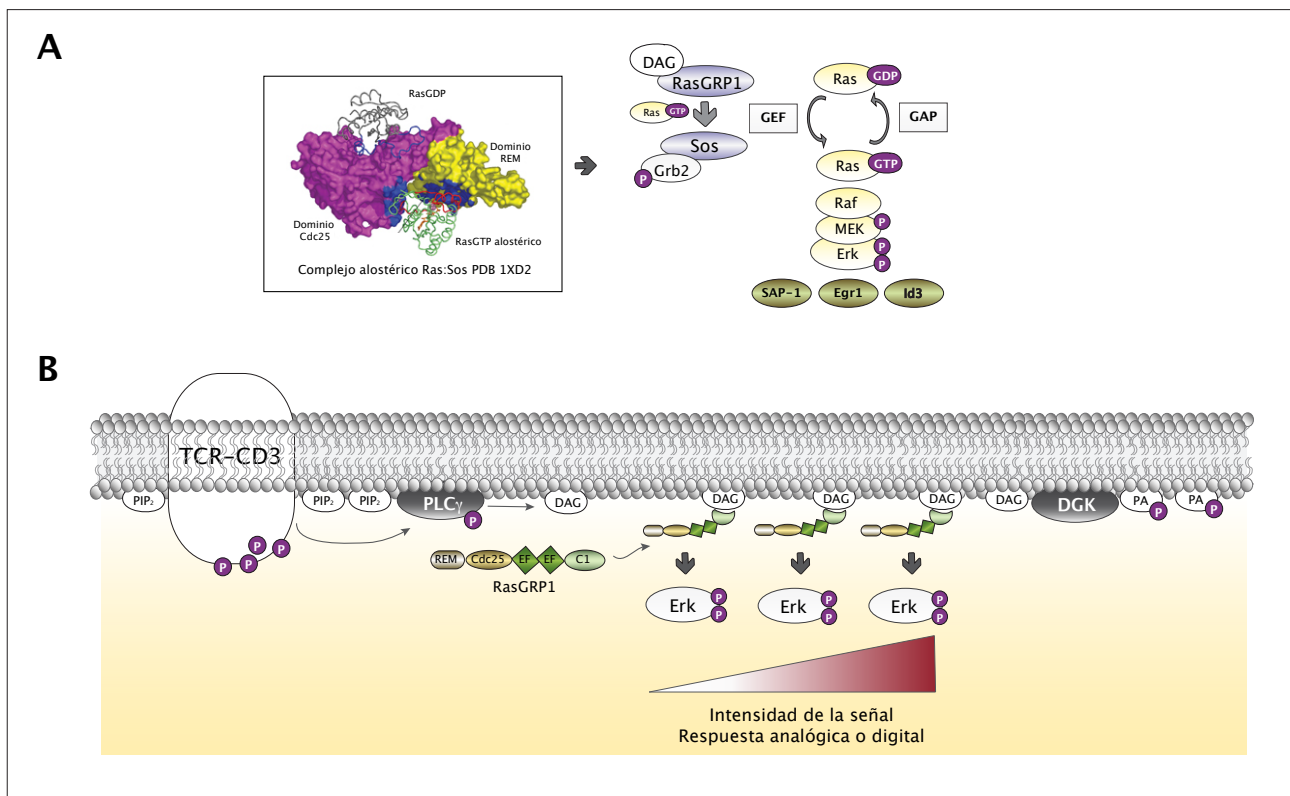


Fig 18: Esquema del mecanismo propuesto de activación de Erk en linfocitos T.

(A) Estructura del complejo Ras alostérico-Sos1: Ras-GTP se une a Sos1 en una zona distal y diferente a la de catálisis. Esta unión aumenta considerablemente la capacidad catalítica de Sos. En células T se ha propuesto que RasGRP1 proporciona este Ras-GTP a Sos, por lo que la activación del primer GEF induce a su vez la actividad del segundo, potenciando el efecto de ambos sobre la vía Ras-Raf-MEK-Erk.

(B) Mecanismo de activación de Erk tras la estimulación del TCR: la generación de mayor o menor número de moléculas de DAG tras la activación de PLC por el TCR permite hipotéticamente controlar la intensidad de la señal de Erk. Cuanto más DAG se genera, mayor será la activación de Erk mediada por RasGRP. Además el control positivo que RasGRP ejerce sobre Sos permitirá que, a partir de un umbral determinado de señal, fijado por los niveles del segundo mensajero en la membrana, se realice una acción sinérgica de ambos moduladores sobre Erk. Así concentraciones bajas de DAG activarán a RasGRP produciendo una respuesta analógica, y concentraciones altas de DAG ponen en funcionamiento ambos GEFs que inducen una respuesta digital.

Objetivos

Tradicionalmente, en el estudio de la activación de los linfocitos se ha prestado atención a aspectos como los antígenos presentados y la cualidad/estequiometría de éstos, el tipo de sinapsis formada entre células presentadoras y células T, la participación o no de moléculas coestimuladoras y el estudio de las propias proteínas transmisoras de la señalización y los factores de transcripción implicados.

Sin embargo, dentro de la biología celular y la transducción de señales de los linfocitos la contribución de los segundos mensajeros intracelulares que generan estas respuestas ha sido poco estudiada, debido sobre todo a limitaciones técnicas. En el presente trabajo pretendemos profundizar en el estudio del DAG como segundo mensajero en la activación de los linfocitos. Para ello se realizarán dos aproximaciones diferentes:

A) Estudio de las dinámicas de generación de DAG en la activación de los linfocitos.

- Generación de sondas capaces de detectar la producción de DAG en timocitos y linfocitos periféricos de ratón.

- Análisis de la producción de DAG en las sinapsis inmunes así como de la localización de las proteínas reguladas por DAG importantes en la activación de las células T.

B) Estudio la función del DAG producido por activación del TCR en el desarrollo y homeostasis de los linfocitos T.

- Diseño una herramienta capaz de metabolizar el DAG producido tras la estimulación del TCR, a partir de una enzima DGK.

- Análisis del impacto de la disminución de DAG *in vivo*, mediante la expresión en transgénesis en linaje T de dicha enzima.

Materiales y Métodos

Reactivos e inhibidores

La poli-D,L-lisina, el PFA (para-formaldehído), el polibreno (bromuro de hexadimetrino), el ortovanadato, el PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfósido), el Nonidet P-40, la albúmina sérica bovina, el glutatión reducido y FBS (suero bovino fetal) proceden de Sigma.

La aprotinina, leupeptina, la lisozima y la N-glicosidasa F son de Roche.

El colorante CMAC (CellTracker Blue

7amino4chloromethylcoumarin), la ionomicina, el Fura Red™, el CFSE (carboxifluoresceína succinimidil éster), la rodamina faloidina y el medio de montaje ProLong (Gold Antifade Reagent) son de Molecular Probes, Invitrogen. El TRIzol procede también de Invitrogen.

El DMEM, RPMI-1640, IMDM, la glutamina y el β-mercaptoetanol son de BioWhittaker.

El Tween 20 y el U73122 son de Calbio-

A

Anticuerpo	Descripción	Procedencia
anti-DGKalfa	monoclonal ratón	Cedido por Dr. Blitterswijk
anti-rataCD2	monoclonal ratón	BD Pharmingen
anti-p(Ser)PKC sustrato	policlonal conejo	Cell signaling
anti-pPKD S744/748	policlonal conejo	Cell signaling
anti-plkBα S32/36	monoclonal ratón	Cell signaling
anti-βactina	monoclonal ratón	Cell signaling
anti-pPLCγ Y783	policlonal conejo	Cell signaling
anti-PLCγ	monoclonal ratón	Upstate Biotech
anti-pZAP70 Y319	policlonal conejo	Cell signaling
anti-ZAP70	monoclonal ratón	BD Transduction Lab
anti-pLAT Y171	policlonal conejo	Cell signaling
anti-pLAT Y191	policlonal conejo	Cell signaling
anti-LAT	policlonal conejo	Upstate Biotech
anti-pErk T402/Y404	policlonal conejo	Cell signaling
anti-Erk	monoclonal ratón	Cell signaling
anti-Lck	monoclonal ratón	BD Pharmingen
anti-pAKT T308	policlonal conejo	Cell signaling
anti-pAKT S473	policlonal conejo	Cell signaling
anti-p(Ser/Thr)Akt sustrato	policlonal conejo	Cell signaling
anti-AKT	monoclonal ratón	Cell signaling
anti-Ras	monoclonal ratón	Santa Cruz Biotech
anti-GFP	monoclonal ratón	Roche Applied Science
anti-GST (26H1)	monoclonal ratón	Cell signaling
anti-CD3ε humano	clon HIT3a ratón	BD Pharmingen
anti-CD28 humano	clon CD28.2 ratón	BD Pharmingen
anti-CD3ε ratón	(145-2C11) Hámster armen	BD Pharmingen
anti-CD28 ratón	(37.51) Hámster sirio	BD Pharmingen
anti-IgG Hámster Armenio	policlonal cabra	Jackson ImmunoResearch

B

Anticuerpo	Clon	Procedencia
anti-CD3ε	145-2C11	BD Bioscience
anti-CD4	6K1.5	Pharmingen
anti-CD8	53-5.8	Pharmingen
anti-TCRβ	H57-597	Pharmingen
anti-CD69	H1.2F3	Pharmingen
anti-FoxP3	FJK-16S	eBioscience
anti-CD25	7D4	Pharmingen
anti-CD5	B19.1	Southern
anti-CD62L	MEL-14	Pharmingen
anti-CD44	IM7	Pharmingen
anti-B220	RA3-6B2	BeckmanCoulter
anti-IgM	11E10	BeckmanCoulter
anti-CD24	M1/69	Pharmingen
anti-Vα2	B20.1	Pharmingen
anti-HY TCR	T3.70	eBioscience
anti-Ter119	Ter-119	Pharmingen
anti-CD11b	M1/70	Pharmingen
anti-CD127	B12-1	Pharmingen
anti-Gr1	RB6-8C5	Pharmingen
anti-IgG (H+L)		Southern
anti-NK1.1	PK136	Pharmingen
anti-TCRγδ	GL3	Pharmingen
avidina-FITC		Southern
anti-ratCD2	OX-34	Pharmingen
anti-CCR7	4B12	Ebioscience
anti-CD69	TP1.55.3	BeckmanCoulter

C

Oligonucleótido	Uso
5' CCTTCAAGCGGATGGTGAATTGCGGCCGCTGTCC 3'	Diana Notl; clonaje pEFbos caDGK
5' CCTCTAGATGCATGGTCGACGGCCCAATT 3'	Diana Sall; clonaje pEFbos caDGK
5' GGAGACCCAACCTTGGTACCGCTTCGGATCCAAGATGAGG 3'	Diana MluI; clonaje p1017D caDGK
5' CACCATGGTGAAGCAAGGGCGA 3'	PCR de dominios GFPC1, oligo común en EGFP
5' GTGGACGGATCCTCGTTTCTTGCA 3'	PCR de EGFP1RasGRP1, introduce diana Sall
5' GTCGACGGATCCGTTTATGCCACA 3'	PCR de EGFP1PKCθ, introduce diana Sall
5' TTATCAAGCCCAAGCGAAG 3'	qRT-PCR oligo 5' para amplificar GATA3
5' TGGTGGTGTCTGACAGTTC 3'	qRT-PCR oligo 3' para amplificar GATA3
5' CTTTGCTGTGAGGTCTGC 3'	qRT-PCR oligo 5' para amplificar ThPOK/Zbtb7
5' CAGTGGGGCAGGAGTAG 3'	qRT-PCR oligo 3' para amplificar ThPOK/Zbtb7
5' TTCAACGACCTTCGATTCTG 3'	qRT-PCR oligo 5' para amplificar Runx3
5' TTGGTGAACCGGTGATTGT 3'	qRT-PCR oligo 3' para amplificar Runx3
5' CCAGCAAGCTGAGGACGGCGG 3'	qRT-PCR oligo 5' para amplificar Runx1
5' CGGATTTGTAAGACGGTGA 3'	qRT-PCR oligo 3' para amplificar Runx1
5' CTGACCCCTACTATTGCAAC 3'	qRT-PCR oligo 5' para amplificar TOX
5' GCAGGCCATTGTATTATCG 3'	qRT-PCR oligo 3' para amplificar TOX
5' GAGAGGAAATCGTGCCTGA 3'	qRT-PCR oligo 5' para amplificar 18S
5' ACATCTGCTGGAAGGTGGAC 3'	qRT-PCR oligo 3' para amplificar 18S
5' AGATCACCCACAGGAACAG 3'	Genotipado ratones caDGK
5' CTCGACCTTGCCATGCTCT 3'	Genotipado ratones caDGK
5' AACAGGAGAAAGGTGACATTGAG 3'	Genotipado ratones H-Y
5' GGACAAAACCTGGCTCTGGCTATC 3'	Genotipado ratones H-Y
5' CAGCAGCAGGTGAGACAAGT 3'	Genotipado ratones OT-I
5' GGCTTTATAATTAGCTTGGTCC 3'	Genotipado ratones OT-I
5' GCTGCTGCACAGCCTACT 3'	Genotipado ratones OT-II
5' CAGCTCACTACCAGCAGGA 3'	Genotipado ratones OT-II
5' TGTTACCAACTGGGACGACA 3'	Genotipado ratones, control de actina
5' GACATGCAAGGATGCAAGA 3'	Genotipado ratones, control de actina

Fig M1: Anticuerpos empleados en (A) Western blot e inmunofluorescencia, (B) citometría y (C) oligos utilizados.

chem; el Tritón X-100 de Fluka; el Bio-Rad Protein Assay, de Bio-Rad; la γ -sefarosa, glutatión-sefarosa 4B y el ECL de Amersham Bioscience, las columnas de cromatografía Poli-Prep de Bio-Ras, los filtros Amicon Ultra-4 de Millipore, el SEE (*staphylococcal enterotoxin E*) de Toxin Technology. Las cámaras para la microscopía proceden de Nunc (Lab-Tek).

Los péptidos SIINFEKL, EIINFEKL y RTY-TYEKL proceden de ANASPEC, la IL-2 de Prepo Tech, los anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa son de Dako y los acoplados a fluorocromos de Jackson Immunoresearch.

Cultivos celulares

Las células Jurkat (ATCC TIB-152, clon E6-1) y Raji (ATCC CCL-86) se mantuvieron en RPMI suplementado con 10% de FCS y 2mM de glutamina. Las células EL4 (ATCC TIB-39) y los timocitos aislados de ratón se cultivaron en RPMI suplementado con 10% de FCS, 2mM de glutamina y 50 μ M de β mercaptoetanol. Las células HEK293 y NIH 3T3 se crecieron en DMEM suplementado con 10% FCS y 2mM de glutamina.

Construcciones

Construcción pEFbos caDGK: para obtener la construcción caDGK (rCD2DGK α Δ 196) se generaron en el plásmido pEFbos EGFPDG-K α Δ 196 (407) sitios NotI y Sall flanqueando a la DGK mediante mutagénesis dirigida. Se emplearon oligonucleótidos específicos que introducían mutaciones para crear la diana Sall y para la diana NotI, con sus correspondientes reversos complementarios (fig M1C). La mutación se introdujo por PCR con el kit de mutagénesis "QuickChange Site-directed Mutagenesis kit" de Stratagene. El producto de digestión NotI-Sall de DGK α Δ 196 se subclonó en el vector pEFbos rCD2p110 (376) eliminando la parte correspondiente a p110 por digestión NotI-Sall.

Construcción caDGK p1017D: como vector de expresión en mamíferos empleamos el vector p1017D (320), generosamente cedido

por el doctor Robert J Kay. Este vector procede de p1017 (71), el cual contiene el promotor proximal de *Lck*, que promueve altos niveles de expresión en células T inmaduras (525). Al modificarlo se eliminaron los múltiples intrones del gen de la hormona de crecimiento humana (GenBank no. M13438, que contiene la señal de poliadenilación) y se insertó el segundo intrón del gen de la β globina de conejo (GenBank no. V00878). El vector p1017 tiene una serie de intrones posicionados en dirección 3' del ADN copia insertado, y se ha descrito que intrones dentro de regiones 3' no traducidas pueden promover degradación de los transcritos (308). Para subclonar el ADN de caDGK en p1017D introdujimos mediante mutagénesis dirigida las dianas MluI (ver tabla M1C) en el comienzo de la secuencia de pEFbos caDGK. El producto de digestión con MluI y Sall se subclonó en p1017D.

Construcciones MigR1 GFPC1s: los dominios GFPC1 se amplificaron por PCR con los oligonucleótidos específicos (tabla M1A), a partir de los plásmidos correspondientes generados en el laboratorio (66). Para facilitar el clonaje se introdujo la diana Sall en la región 3' de las construcciones. Los productos de PCR contenían las proteínas GFP fusionadas en los extremos N-terminales de los dominios C1bPKC θ , C1a+C1bPKC θ y C1RasGRP1; se introdujeron en el vector pGEM-T Easy (Promega) y de allí se subclonaron mediante digestión NotI y Sall en el vector retroviral MigR1 (344).

Construcción GSTC1bPKC θ : el dominio C1bPKC θ se clonó por digestión con las enzimas EcoRI y NotI en MigR1 GFPC1bPKC θ y se introdujo en pGEX-4T-3 (GE Healthcare Life Sciences), digerido de la misma manera. De esta forma C1bPKC θ se expresa en pauta de lectura abierta a continuación de la proteína GST.

Los plásmidos pEGFP RasGRP1 y pEGFP-PKC θ han sido previamente descritos (66).

Experimentos con dominios C1 como sensores del DAG

Obtención sobrenadantes virales: las células HEK293 se transfectaron al 50% de confluencia con 20µg de vector retroviral y 10µg del plásmido empaquetador pCL-Eco (Addgene). Para la transfección se empleó el método de fosfato cálcico: el ADN plasmídico se mezcló con una solución de CaCl₂ 0,25M (500µl de volumen final) sobre la que se añadieron gota a gota otros 500µl de 2X HBS (280mM NaCl, 50mM Hepes, 1,5mM NaPO₄, pH 7.05-7.1). Se esperó 1min a que se formara el precipitado y la mezcla se añadió a las células. A las 48h se recogió el sobrenadante viral que se tituló en células NIH-3T3, mediante la transducción de éstas por centrifugación con el sobrenadante (90 min 37°C) en presencia de polibreno 8 µg/ml. La eficiencia de la infección se siguió por análisis de expresión de GFP mediante citometría de flujo a las 48h.

Infección CD8s y diferenciación CTLs: las células T maduras CD8 se purificaron mediante selección negativa con el sistema Dynal Magnetic Beads Invitrogen siguiendo las instrucciones del proveedor. Se estimularon durante tres días con anticuerpos antiCD3 y antiCD28 pegado a placa más IL-2 recombinante (50U/ml). Al cabo de los tres días se recogieron 2x10⁵ células por condición de infección, que se infectaron en placa de 24 pocillos con 1 ml de sobrenadante viral, polibreno 8µg/ml e IL-2 (50U/ml) mediante centrifugación 90 min 37°C. Tras la infección se realizaron dos lavados en medio completo y las células se dejaron reposar al menos 48h en medio más IL-2 100U/ml antes del ensayo.

Formación de conjugados en células primarias de ratón: como células presentadoras de antígeno se emplearon las células EL4, que se cargaron con el péptido deseado (2µM) en RPMI suplementado durante 2h a temperatura ambiente. Tras este período las células se lavaron 3 veces con medio completo y se incubaron en proporción 1:1 en el caso de los

CTLs, y en proporción 1:2 (EL4:linfocitos) en el caso de los timocitos, durante 15min a 37°C antes del ensayo.

Videomicroscopía en tiempo real: las células se centrifugaron y resuspendieron en HBSS (25mM Hepes KOH pH 7.4, 1mM MgCl₂, 1mM CaCl₂, 132mM NaCl, 0,1% BSA). Se recogieron y transfirieron a cámaras recubiertas con poli-D,L-lisina y tras permitir que se adhirieran se mantuvieron a 37°C para llevar a cabo la captura de imágenes. Las grabaciones se realizaron capturando imágenes en intervalos de 10s. Las células se observaron bajo un microscopio confocal Olympus Fluoview con láser TCS-NT y las imágenes obtenidas se procesaron usando el programa ImageJ.

Inmunofluorescencia: las células se transfirieron a cubreobjetos tratados con poli-D,L-lisina para permitir su adhesión (15min), se fijaron con PFA al 2% (10min) y se lavaron con Tris-HCl 150mM pH 7.4, se permeabilizaron (4min) con PBS 0,2% Tritón X-100 y se bloquearon en PBS 1% BSA. Posteriormente se realizaron las incubaciones correspondientes con anticuerpos primarios y secundarios. Finalmente los cubreobjetos se lavaron en PBS 0,1% Tween-20 y se montaron sobre ProLong (Molecular Probes).

Estimulaciones con péptido soluble: en el caso de linfocitos maduros periféricos el péptido correspondiente se añadió a la suspensión de células (10mill/ml) obtenidas tras disgregar los bazos y lisar los eritrocitos, incubándolo durante 25min al menos a 37°C. En el caso de timocitos se emplearon células EL4 como presentadoras de antígeno, incubándolas 2h con el péptido (2µM) en medio completo, lavándolas con PBS dos veces y fijándolas posteriormente con PFA 4% 10min a temperatura ambiente. Tras someterlas de nuevo a lavados con PBS se resuspendieron en medio completo y se adicionaron a los timocitos en proporción 1:2 (EL4:timocitos), realizando las estimulaciones a 37°C durante los tiempos indicados.

Obtención proteínas recombinantes GSTC1bPKC θ : las construcciones de los dominios C1 fusionados a GST se expresaron en la cepa de bacterias *E. coli* BL21(De3)pLysS, expresando en paralelo GST como control. La expresión de las proteínas se indujo por adición de 0.5mM IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosido) a los cultivos en crecimiento exponencial. A las 7h de la inducción se recogieron las bacterias, se centrifugaron y resuspendieron en solución TBN150 (25mM TrisHCl, 150mM NaCl, 10mM β -mercaptoetanol e inhibidores de proteasas) y se lisaron mediante tres ciclos de congelación/descongelación. Tras esto añadimos lisozima y tritón X-100 para finalizar la lisis y se centrifugaron las muestras para obtener los sobrenadantes, de los que se procedieron a purificar las proteínas recombinantes, para lo cual se incubaron con glutation-sefarosa 4B prelavada (1h 4°C) Se emplearon para ello columnas de cromatografía Poli-prep de 2ml, se lavaron con solución EQM (50mM Tris-HCl pH 8.0, 100mM NaCl y 10mM ditiotreitól) y las proteínas se eluyeron con solución EQM con 10mM de glutation reducido. Las fracciones en las que estaban presentes las proteínas recombinantes se identificaron por electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE, visualizándose por tinción con azul de Coomassie. Las fracciones seleccionadas se concentraron sobre filtros específicos (Amicon Ultra-4) y se cuantificaron por comparación con patrones de BSA.

Experimentos en líneas celulares que sobreexpresan caDGK

Transfección: se recogieron 12×10^6 células por punto y se resuspendieron en 400 μ l de medio completo atemperado, se incorporaron a cubetas de electroporación, se añadieron 20 μ g de cada plásmido de interés y el pulso eléctrico se realizó a 270V y 975 μ F. Inmediatamente se transfirieron las células a 10ml de medio completo y se mantuvieron en cultivo 24h antes de ser procesadas.

Ensayo de glicosilación: las células

HEK293 se transfectaron según el protocolo descrito con el plásmido pEFbos caDGK. A las 24h de la transfección se lisaron en NP40 1% e inhibidores, se añadió SDS hasta una concentración final de 1% y se hirvieron las muestras 5min a 100°C para desnaturalizar completamente las proteínas. Se añadieron 50U/ml de enzima N-glicosidasa recombinante y NP-40 hasta una concentración final del 7.5% y se incubó la reacción 4h a 37°C. Las muestras se analizaron por SDS-PAGE y WB con anticuerpos contra DGK α y CD2.

Ensayo de actividad DGK: las células se lisaron en tampón hipotónico (10mM Tris-HCl pH 7.4, 50mM NaF, 1mM Na₃VO₄, 1mM PMFS y 10 μ g/ml de aprotinina y leupeptina) con ayuda de jeringas de 25G. Se centrifugaron a baja velocidad para retirar los núcleos y los sobrenadantes se cuantificaron para poder separar una parte para el ensayo de actividad y otra para detectar la expresión de proteínas de interés. Para la actividad se añaden 10 μ g de C8-DAG por punto. El C8-DAG se obtuvo a partir de un stock en cloroformo que evaporamos en atmósfera de N₂, para resuspender el lípido resultante en 10mM Tris-HCl pH 7.4 por sonicación. Esta mezcla se incubó 5min a temperatura ambiente para posteriormente incorporar los componentes necesarios para el ensayo: en 10mM Tris-HCl pH 7.4, ATP (20 μ M concentración final), MgCl₂ (10 μ M concentración final) y γ ³²P-ATP (1 μ Ci por reacción). La reacción se realizó durante 10min a temperatura ambiente y se paró al añadir 1M HCl:MetOH:CHCl₃ (1:2:4 v/v/v). Se agitó y tras centrifugar a máxima velocidad 30s se recogió la fase inferior que contiene los lípidos. Se lavó con 100 μ l de 1M HCl:MetOH (1:1 v/v) y se recogió la fase de abajo y secó completamente para resuspender los lípidos resultantes en una mezcla CHCl₃:MetOH (1:1 v/v) que se aplicó sobre placas de cromatografía en capa fina (TLC) con C8-PA como marcador de la migración del lípido de interés. La TLC se corrió en una solución de CHCl₃:MetOH:4M NH₄⁺ (9:7:2 v/v/v) y la presencia de C8-PA se detectó mediante autorradiografía.

Estimulaciones: Las estimulaciones se realizaron con células creciendo exponencialmente; se separaron en tubos de 1,5ml a una concentración de 10mill/ml en medio completo y se estimularon con anticuerpos empleando las concentraciones indicadas (1 μ g/ml de antiCD3 y antiCD28) o en proporción 1:1 en el caso de la estimulación con células presentadoras Raji. Las células se recogieron a los tiempos indicados y se procesaron para su análisis.

Estimulación con anticuerpo pegado a placa: la superficie a tratar se incubó a temperatura ambiente 1h ó 4°C 16h con una mezcla de los anticuerpos antiCD3+ antiCD28 (5 μ g/ml cada uno) en 150mM Tris-HCl pH 8. En el momento de la estimulación las células se resuspenden en HBSS y se depositan sobre las cámaras de microscopía. Se mantiene la temperatura a 37°C durante todo el proceso.

Medida de calcio: las células (10⁶ células/ml) se incubaron en medio completo con FuraRed (70 μ M) durante 30min a 37°C en agitación. Se lavaron dos veces en medio completo y se resuspendieron en medio completo con 2mM CaCl₂ antes de medir la emisión de fluorescencia mediante citometría de flujo.

FACS: a las 24 de la transfección las células se recogieron, se tiñeron con anticuerpo anti-CD2 si procedía, se lavaron y resuspendieron en HBSS (25mM Hepes KOH pH 7.4, 1mM MgCl₂, 1mM CaCl₂, 132mM NaCl, 0,1% BSA) a una concentración de 10mill/ml. Mediante la técnica FACS (*Fluorescence-activated cell sorter*) se separaron y recolectaron las células positivas para GFP o CD2, que se lavaron inmediatamente y se dejaron reposar en medio completo durante 4h al menos antes de estimularlas o procesarlas.

Lisis y Western blot: las células recogidas se resuspendieron en tampón de lisis (50mM Tris-HCl pH 7.4, 1% NP-40, 150mM NaCl, 10mM NaF, 10mM Na₂P₂O₇, 1mM Na₃VO₄, 1mM PMSF y 10 μ g/ml de aprotinina

y leupeptina) y se incubaron 15min a 4°C. Tras centrifugación (13000 rpm 15min 4°C) los sobrenadantes se analizaron para determinar la concentración de proteínas ("DC protein assay", BioRad) y cantidades equivalentes de cada muestra se analizaron por SDS-PAGE en condiciones reductoras. Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y la expresión se analizó con anticuerpos específicos y con el sistema de detección ECL.

Ensayo de detección de Ras-GTP: las células estimuladas se resuspendieron en 25mM Hepes pH 7.5, 150mM NaCl, 1%NP-40, 10mM MgCl₂, 1mM EDTA, 2% glicerol y los correspondientes inhibidores de proteasas (10mM NaF, 1mM Na₃VO₄, 1mM PMSF y 10mg/ml de aprotinina y leupeptina). Para favorecer el proceso de lisis se utilizaron agujas de 25G (10 veces) y después de 30G (5 veces). Los lisados obtenidos se preincubaron con glutation-sefarosa durante 10min a 4°C y se centrifugaron para retirar elementos unidos inespecíficamente. Los sobrenadantes resultantes se cuantificaron y se separaron alícuotas equivalentes de lisado total para analizar en paralelo la fosforilación de Erk y la carga total de Ras. El resto del lisado se incubó con las proteínas de fusión RBD(Raf)-GST unidas a glutation-agarosa, 30min 4°C. Se centrifugó a máxima velocidad unos segundos y después de varios lavados con el tampón de lisis se añadió tampón de carga 5X y se analizaron los niveles de Ras unido a la proteína de fusión mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras y WB posterior con anticuerpo anti-Ras. En paralelo se determinó la cantidad de Ras en lisado total.

Formación de conjugados entre células Raji y Jurkat: para cargar las células Raji con el superantígeno E (SEE de *Staphylococcus aureus*) se incubaron 10⁷ células con SEE 1ng/ml en 1ml de medio completo durante 1h a 37°C. Durante la incubación se tiñeron con el colorante vital CMAC 10 μ M. Pasado este tiempo se lavaron con PBS y se mantuvieron a 37°C en medio completo hasta su uso. Se incubaron con las células Jurkat du-

rante un mínimo de 5min en proporción 1:1 y se procedió a procesarlas para SDS-PAGE (recogiéndolas para lisis) o microscopía (depositándolas sobre cámaras recubiertas de poli-D,L-lisina). En el caso de la videomicroscopía en presentación antigénica las células Raji no se preincubaron con las Jurkat sino que se adicionaron a las cámaras una vez pegadas estas segundas a ellas.

Experimentos en ratones transgénicos que sobreexpresan caDGK.

Modelos animales: los ratones OT-I (C57BL/6-Tg(TcraTcrb)1100Mjb/J) y OT-II (C57BL/6-Tg(TcraTcrb)425Cbn/J) pro-

ceden de Jackson Laboratory y fueron generosamente donados por el Dr. Ardavín; los ratones H-Y (B10.Cg-Tg(TcraH-Y,TcrbH-Y)71Vbo), procedentes de Taconic, los obtuvimos del Dr. Alarcón. Para generar los ratones transgénicos caDGK se emplearon ratones C57BL/6J, realizándose las microinyecciones en este fondo puro. Todos los experimentos con ratones se realizaron en conformidad con todas las guías nacionales y europeas, y con la aprobación del Comité de Ética Animal del Centro Nacional de Biotecnología.

Purificación del fragmento de microinyección: el fragmento a microinyectar se ob-

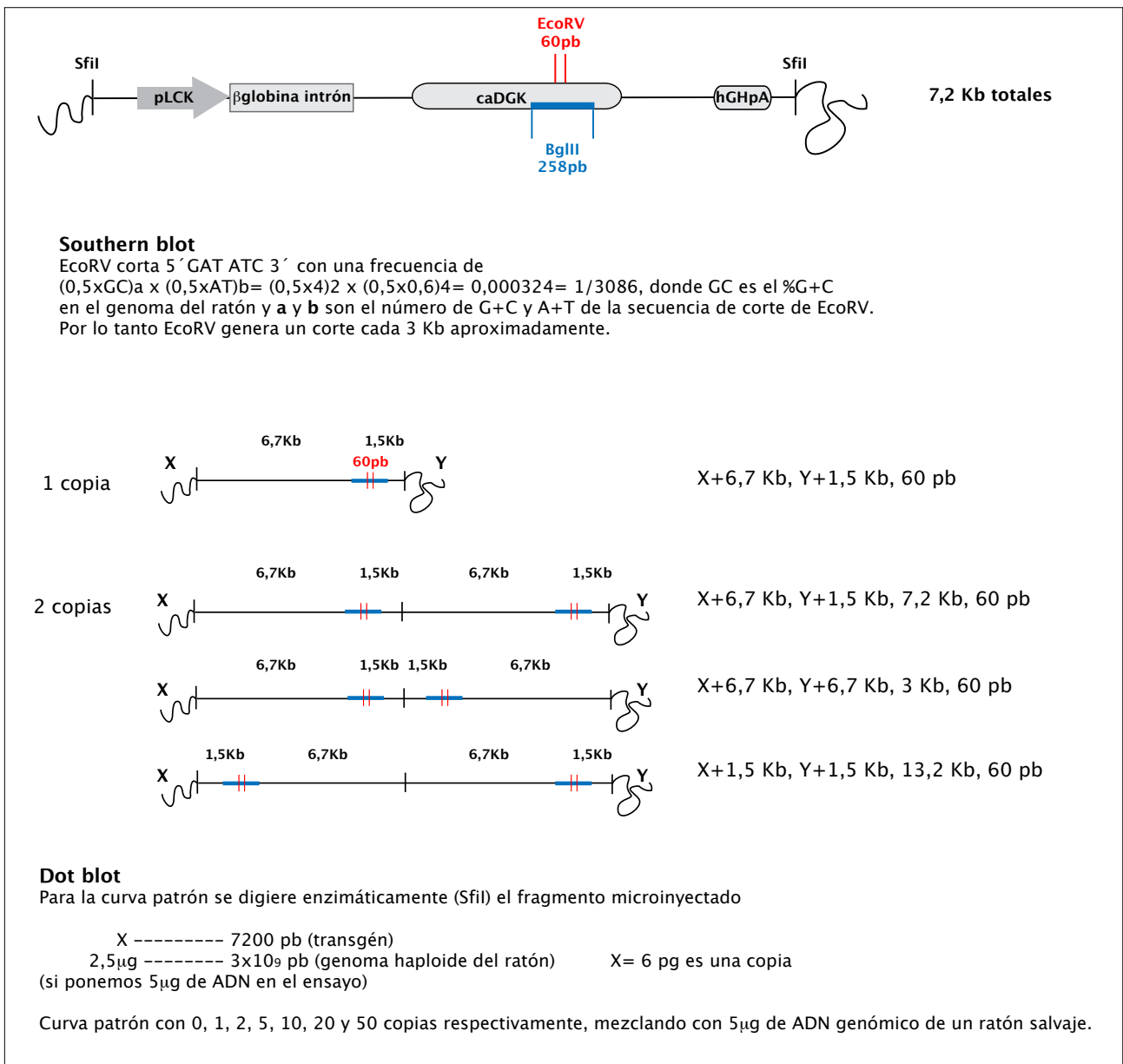


Fig M2: Estrategia del Southern blot y del Dot blot para detectar y cuantificar el número de inserciones del transgén caDGK.

tuvo por digestión enzimática con SfiI. Tras el corte y defosforilación se separó el fragmento deseado por electroforesis en gel de agarosa, se cortó la banda deseada y ésta se purificó mediante electroelución. El volumen recuperado se lavó 3 veces con fenol y 3 veces con éter y se precipitó y resuspendió en agua. Se analizó una alícuota de la muestra final en gel de agarosa para comprobar su tamaño adecuado, pureza y cantidad.

Genotipado mediante PCR: los fragmentos de colas de los ratones se procesaron para obtener ADN genómico. Se lisaron toda la noche a 55°C en el tampón Tris HCl pH 8.5 100mM, EDTA 5mM pH 8.0, SDS 0.2%, NaCl 200mM y proteinasa K 100µg/ml. El tejido disgregado resultante se centrifugó 15min a máxima velocidad y se obtuvo el ADN del sobrenadante mediante precipitación en isopropanol y lavado en EtOH 70%. El ADN genómico obtenido se sometió a PCR con oligonucleótidos específicos para la detección del transgén (**fig M2**).

Southern blot: para el análisis de la inserción del transgén se digirieron 10µg de ADN genómico obtenido de las colas de los ratones. Se empleó la enzima de restricción EcoRV, que además de cortar en el transgén lo hará en sitios adicionales del ADN genómico. Se comprobó que la digestión había sido completa mediante gel de agarosa y se precipitaron y recuperaron las muestras para separar los fragmentos generados en geles de agarosa al 0,6%; en paralelo se utilizaron marcadores de peso molecular para establecer el tamaño de las bandas de interés y 1 y 10 pmoles de ADN plasmídico linearizado con el transgén, como control positivo de la hibridación. Los geles se desnaturalizaron (10min en 0,15M HCl; 30min en 0,2M NaOH y 0,6M NaCl; 30min en 0,5M Tris-HCl pH 7.6 1,5M NaCl) y se transfirieron a membranas de nylon Amersham Hybond™-N+ GE Healthcare por capilaridad. Tras esto se lavaron las membranas en 2X SSC (saline-sodium citrate) y el ADN se fijó mediante exposición a luz UV.

La sonda del transgén se generó por di-

gestión enzimática con la enzima BglII y se purificó mediante electroforesis y elución en columna Qiaquick PCR Purification Kit (Quiagen) Se marcó con (α -³²P)dCTP mediante reacción con la polimerasa Amersham Rediprime™ Random Prime Labelling system, GE HealthCare según las instrucciones indicadas y la sonda marcada se purificó con las columnas "Micro Bio-Spin 30" (Bio-Rad).

La membrana se prehibridó en "ExpressHyb", de Clontech, durante 1h a 60°C. Tras este tiempo se incubó en solución de hibridación fresca a la que se le añadió la sonda marcada, purificada y desnaturalizada, incubando 16h. Al día siguiente se lavó la membrana: 2-3 veces con solución de lavado 1 (2X SSC, 0,05% SDS) a temperatura ambiente durante 30-40min y dos veces con solución de lavado 2 (0,1X SSC, 0,1% SDS) a 50°C durante 25min. Finalmente se expusieron las membranas y por autorradiografía se obtuvo el patrón de bandas final que permitió determinar la inserción (**fig M2**).

Dot blot: para el análisis del número de copias se prepararon muestras de 5µg de ADN genómico. Se desnaturalizaron en la solución 0,4N NaOH, 10mM EDTA durante 10min a temperatura ambiente. Al mismo tiempo y en paralelo se prepararon patrones para 1, 5, 10, 20 y 50 copias de inserto (**fig M2**), que se mezclaron con 5µg de ADN de un ratón control. Tanto las muestras como los patrones se dispusieron sobre una membrana de nitrocelulosa acoplada a una placa de 96 y a un sistema de vacío Model 785 Vacuum Blotter, BioRad para fijar las muestras a la membrana. Se realizaron dos lavados con el mismo tampón usado para desnaturalizar las muestras. Finalmente se extrajo la membrana que se lavó con solución 25mM Na₂HPO₄ pH 7.2, 1mM EDTA, y se expuso a luz UV durante 1min para fijar definitivamente los ADNs. La hibridación y revelado se realizaron en las mismas condiciones y con la misma sonda que en el caso del Southern blot.

Aislamiento de linfocitos de timo, bazo y ganglios de ratón: tras extraer los órganos

linfáticos del ratón y recogerlos en PBS frío, éstos se disgregaron mecánicamente con el émbolo de una jeringuilla sobre un filtro de 45 micras. Se centrifugaron las células obtenidas 5' 1500rpm y resuspendieron en un volumen adecuado de PBS. En el caso de los bazo se lisaron los eritrocitos, resuspendiendo las células en 2 ml de tampón RBC (0,154M NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0.1 mM EDTA pH 7.4) e incubando 2min a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron 2 veces con abundante PBS hasta llevarlas al volumen preciso.

Tinciones extracelulares: las tinciones extracelulares se hicieron con 0,5x10⁶ células por condición en placas de 96. Las células se incubaron con los anticuerpos correspondientes 30min 4°C, se lavaron dos veces con PBS-FBS 1% y se analizaron mediante citometría de flujo en un citómetro Beckman-Coulter y con el programa de análisis Flow Jo.

Tinciones intracelulares: en el caso de las tinciones intracelulares de FoxP3 2x10⁶ células se recogieron y tiñeron para anticuerpos extracelulares 30min 4°C; posteriormente las células se lavaron, fijaron y permeabilizaron con los tampones comerciales "Fixation/Permeabilization Concentrate" de eBioscience, siguiendo las instrucciones del fabricante. En el paso final se incubaron las células con el anticuerpo antiFoxP3, se lavaron con el tampón de permeabilización y se analizaron mediante citometría de flujo.

Procesamiento de la sangre: la sangre obtenida de los ratones se recogió en tubos anticoagulantes impregnados en EDTA. Se depositaron 50µl de muestra en las placas y se realizaron las tinciones extracelulares siguiendo el protocolo habitual. Finalmente las células se lavaron y resuspendieron en solución "VersaLyse™ Lysing Solution", de Beckman Coulter, y se analizaron mediante citometría de flujo.

Estimulaciones con anticuerpo soluble: los linfocitos aislados de ratón se separa-

ron en tubos de 1,5ml a una concentración de 20mill/ml en medio completo y se preincubaron con anticuerpo antiCD3ε 2µg/ml durante 15min a 4°C en PBS-FBS 1%. Se lavaron dos veces con PBS-FCS 1% y se resuspendieron en RPMI completo a la misma concentración. Para la estimulación se incubaron con anti-hámster armenio IgG 10µg/ml durante el tiempo indicado.

Marcaje con CFSE y trasplantes de células T a ratones irradiados: 10⁷ células de ganglios linfáticos se extrajeron de ratones donantes controles y transgénicos, se marcaron con CFSE siguiendo las instrucciones de la casa comercial y se inyectaron intravenosamente en ratones control subletalmente irradiados (600 rads). A los 13 días se analizaron las poblaciones existentes en bazo y ganglios mediante citometría de flujo.

RT-PCR cuantitativa en tiempo real: para el análisis de expresión de los factores de transcripción las poblaciones indicadas se seleccionaron mediante la técnica de FACS y recogieron sobre TRIzol®, de Invitrogen. Las células se lisaron por pipeteo repetidamente en este agente, y se obtuvo el ARN mediante extracción con cloroformo y precipitación con etanol posterior. El ADN copia se obtiene mediante retrotranscripción con el kit de Applied Biosystems "High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit", siguiendo el protocolo dictado. El análisis de PCR cuantitativa se realiza con oligonucleótidos específicos (ver tabla M1C) para cada caso, empleando la sonda SYBR® Green y el kit "Fluocycle SYBR® Green mix for real-time PCR", de EuroClone-Genycell. La PCR se hace con el ABI PRISM 7900HT de Applied Biosystems, software SDS v2.2.2, con las siguientes condiciones: 10' a 95°C, y 40 ciclos de 15" a 95°C y 60" a 60°C. En todos los casos los resultados se refieren al gen ubicuo 18S.

Estadística: los datos se analizaron con el programa GraphPad Prism, aplicando el test *t* de Student no pareado y siendo **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001.

Resultados

Generación del DAG tras la activación de linfocitos y desarrollo de nuevas herramientas para su detección.

Detección de DAG en linfocitos activados periféricos

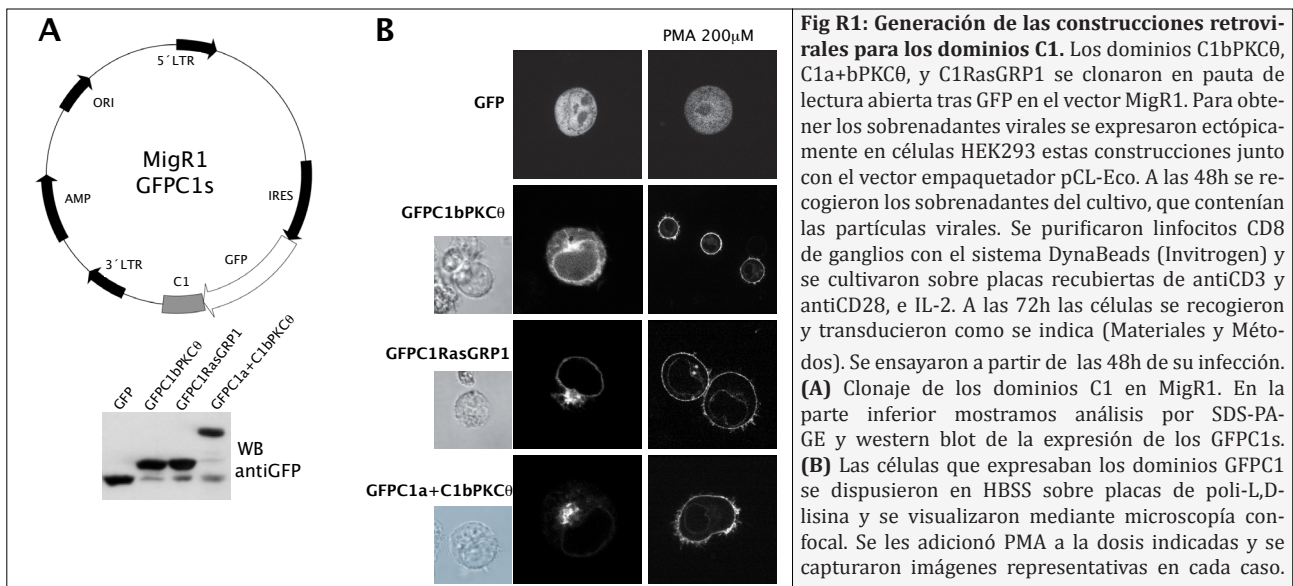
Puesto que la acumulación de gradientes de DAG puede controlar hipotéticamente la intensidad de la respuesta generada por las células T nos propusimos desarrollar herramientas que permitieran detectar su producción y localización en situaciones de estimulación antigénica.

Empleando dominios C1 fusionados a GFP, nuestro laboratorio había generado con éxito biosondas capaces unirse al DAG producido tras estimulación del TCR (66). Posteriormente otros autores (457) emplearon el dominio C1 de la PKD como sensor de la producción de este lípido en condiciones de sinapsis. En ambos casos el modelo experimental empleado fue la línea celular humana Jurkat, y en el momento de comenzar nuestro trabajo no se había realizado ningún intento de expresar ninguno de estos dominios en células primarias humanas o de ratón, a fin de emplear los modelos animales existentes

o usar sistemas péptido específicos de estimulación.

Hicimos uso de la tecnología de transducción retroviral, para lo que clonamos los dominios GFP C1s en el vector de expresión retroviral MigR1 (344). Puesto que dicho vector contenía como marcador de expresión GFP introdujimos los dominios en pauta de lectura abierta tras esta proteína. De esta manera GFP servía además para seguir la localización del DAG. Elegimos el dominio C1b y el tándem C1a+C1b de PKC θ , como sensores del DAG producido por la estimulación del TCR en células Jurkat, y el dominio C1 de RasGRP1, que no responde a la activación del TCR en términos de localización y que permanece retenido en localizaciones internas (66).

Mediante técnicas de biología molecular clonamos dichos dominios y comprobamos su correcta expresión en lisados totales de los linfocitos transducidos, obteniéndose bandas del tamaño esperado en western blot (fig R1A). Empleamos linfocitos CD8 activados (diferenciados a células citolíticas, CTLs) procedentes de ratones transgénicos OT-I, que expresan un TCR V α 2+V β 5+ capaz de reconocer el péptido de la ovoalbúmina



SIINFEKL (OVA₂₅₇₋₂₆₄), presentado en el contexto de H-2K^b (177).

Los dominios expresados tenían una localización basal interna, con patrón vesicular en el caso del GFPC1RasGRP1 y GFPC1a+C1bPKC θ . Para comprobar que mantenían su capacidad de unión de diacilglicerol estimulamos las células con el éster de forbol PMA (forbol 12-miristato-13-acetato), análogo del DAG. Todos los dominios C1 eran capaces de translocarse a la membrana plasmática tras este tratamiento, confirmando su capacidad de reconocimiento y unión a análogos del DAG (**fig R1B**).

Para estudiar la producción de DAG en sinapsis empleamos linfocitos citolíticos que expresaban estos dominios en ensayos de presentación antigénica. Como APCs usamos células EL4, procedentes de un linfoma murino, isogénicas para los ratones transgénicos OT-I (fondo genético C57/BL6 de ambos). Estas células se cargaron con el péptido agonista SIINFEKL y con un colorante vital y se adicionaron sobre CTLs transducidos con los diferentes dominios dispuestos en placas de poli-D,L-lisina para su visualización al microscopio. En estas condiciones los linfocitos transgénicos para el TCR reconocen el péptido expuesto en el MHC de clase I de las EL4, activándose y ejerciendo su acción citolítica hasta la muerte de la célula diana.

Mediante videomicroscopía confocal se monitorizó la formación de conjugados y la localización de los dominios C1s en tiempo real.

El dominio GFPC1bPKC θ localizó rápidamente (**fig R2A**, primera línea de paneles) en la zona de contacto entre la célula presentadora de antígeno y el linfocito, permaneciendo de manera estable en la sinapsis. Por el contrario el dominio GFPC1RasGRP1 presentó una fuerte localización en estructuras vesiculares durante el proceso de reconocimiento y conjugación; tan sólo a tiempos cortos fue posible apreciar su translocación a sinapsis brevemente (**fig R2A**, segunda línea de paneles). El tándem de dominios GFPC1a+C1bPKC θ se encontró presente en

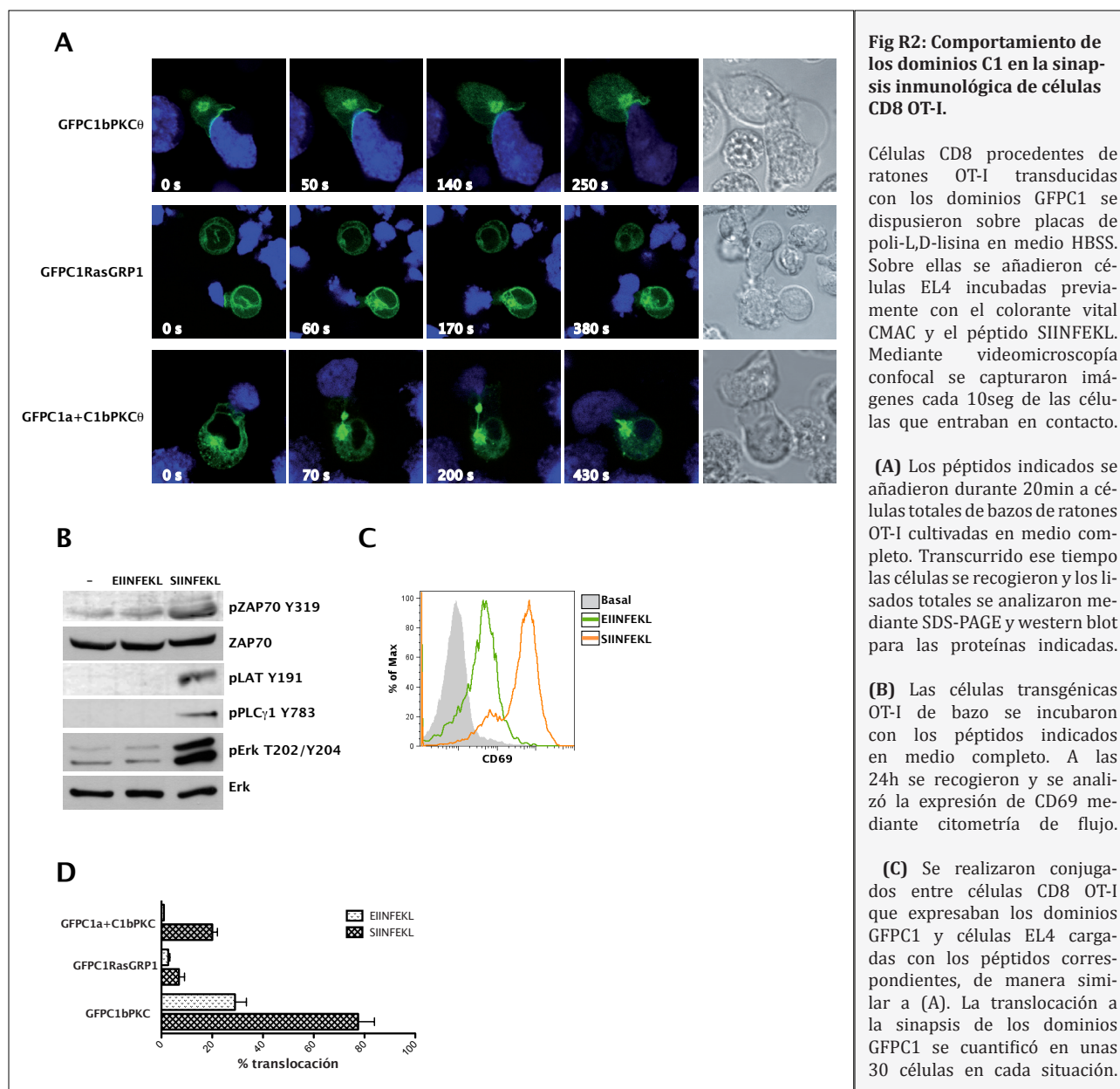
estructuras vesiculares durante todo el tiempo de la estimulación. Las vesículas reconocidas por los dominios C1s polarizaron hacia la sinapsis inmune en todas las situaciones.

Esta localización en estructuras diferentes a la membrana plasmática se había observado anteriormente en las células Jurkat, en las que estos dominios se encuentran en situación basal en aparato de Golgi y retículo endoplásmico. Además los C1s muestran, en función de su secuencia, afinidad por diferentes especies de DAG; de hecho el GFP-C1RasGRP1 reconoce de forma preferente DAG presente en membranas internas (66). Se conocía la participación del DAG en la regulación de la formación de vesículas, aunque no se había observado previamente la localización específica de este lípido en ellas (389, 395, 437, 508).

El DAG presente en diversas localizaciones subcelulares puede ser detectado mediante el uso de dominios GFPC1s. La sobreexpresión de éstos en células CD8 activadas muestran localización de DAG en estructuras internas en situación basal. El dominio GFPC1bPKC θ es un sensor del DAG producido en la sinapsis inmunológica.

La señalización por péptidos agonistas desencadena respuestas efectoras en los linfocitos; sin embargo, cuando se emplean péptidos alterados o agonistas parciales se obtienen efectos celulares distintos, como la diferenciación a células de memoria frente a células efectoras, o la inducción de anergia (246, 396). Nos preguntamos si la producción de DAG se veía disminuida en estas situaciones de señalización débil/intermedia, correspondiéndose con el descenso de la intensidad de la señal. Ya que disponíamos de un sistema de TCR transgénico (OT-I) ampliamente estudiado y en el que se han descrito péptidos con distintas afinidades por el receptor elegimos una variante de OVA₂₅₇₋₂₆₄, EIINFEKL ó E1, que actúa como agonista débil (90, 177) para ensayarlo en nuestro sistema.

Comprobamos el comportamiento de ambos péptidos en su capacidad de activar



de la cascada de señalización del TCR, incubando células de bazo con ellos y analizando posteriormente los lisados por western blot (**fig R2B**). El péptido agonista SIINFEKL era capaz de inducir una fuerte fosforilación de todas las proteínas analizadas (ZAP70, LAT, PLC y Erk) mientras que con el péptido E1 no se apreciaban cambios en la activación temprana de estas proteínas. No obstante, medimos la expresión de CD69 en superficie, marcador temprano de activación ⁽⁷⁰⁾, al cabo de 24 horas, y vimos que este péptido sí era capaz de estimular las células T (**fig R2C**) aunque en mucha menor medida que el agonista SIINFEKL.

A continuación estudiamos la localización en sinapsis de los dominios C1s con estos

dos péptidos. El dominio GFPC1bPKC θ , sensor del DAG producido en sinapsis, localizó en ella en un menor porcentaje de células con el péptido E1 en comparación con el alto porcentaje de translocación que mostró cuando se ensayó con SIINFEKL (29% frente a 77%) (**fig R2D**). En estas condiciones de alta afinidad del complejo pMHC-TCR el tándem GFPC1a+C1b también mostró cierto porcentaje (20%) de translocación estable a sinapsis, disminuyendo claramente en el caso del péptido E1 (2% de translocación). El dominio GFPC1RasGRP1, por el contrario, apenas alteró su patrón de localización en ninguna de estas situaciones.

La producción del DAG en linfocitos maduros, medida como localización en la sinapsis de los dominios C1, se corresponde con la afinidad del péptido antigénico presentado. El dominio GFPC1bPKC θ permite detectar esta producción diferencial del lípido en función del estímulo en la sinapsis de los linfocitos.

Generación de una sonda sensor de la producción de DAG en timocitos: GSTC1bPKC θ

Los datos de localización del dominio GFPC1bPKC θ en linfocitos periféricos de ratón mostraban a esta construcción como un perfecto sensor de la producción de DAG en sinapsis. Quisimos generar una sonda

similar susceptible de ser usada en timocitos de manera que nos permitiera emplear un sistema de péptidos semejante para estudiar localización de proteínas y producción del lípido en función de la intensidad de la señal en timo.

Decidimos utilizar ratones transgénicos para el TCR OT-I; el péptido agonista de este sistema, OVA₂₅₇₋₂₆₄ o SIINFEKL se une con alta afinidad al TCR transgénico e induce selección negativa de los timocitos (522). Se han generado múltiples variantes de este péptido con constantes de disociación pMHC-TCR alteradas, lo que tiene un impacto en la señalización posterior y en la respuesta final de linfocito (90): los péptidos de afinidades menores o constantes de disociación altas generan señales fuertes o transitorias y una

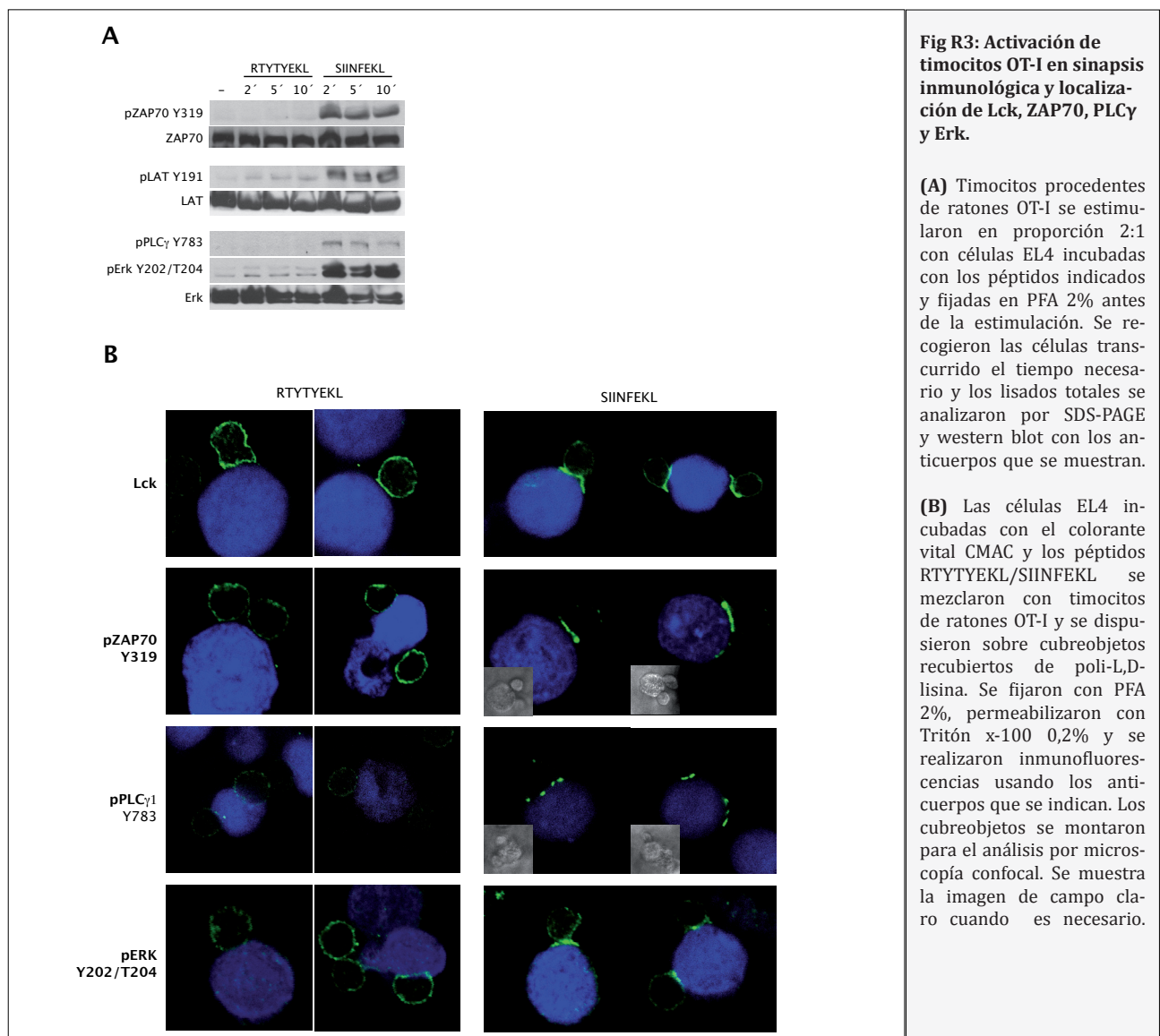


Fig R3: Activación de timocitos OT-I en sinapsis inmunológica y localización de Lck, ZAP70, PLC γ y Erk.

(A) Timocitos procedentes de ratones OT-I se estimularon en proporción 2:1 con células EL4 incubadas con los péptidos indicados y fijadas en PFA 2% antes de la estimulación. Se recogieron las células transcurrido el tiempo necesario y los lisados totales se analizaron por SDS-PAGE y western blot con los anticuerpos que se muestran.

(B) Las células EL4 incubadas con el colorante vital CMAC y los péptidos RTYTYEKL/SIINFEKL se mezclaron con timocitos de ratones OT-I y se dispusieron sobre cubreobjetos recubiertos de poli-L,D-lisina. Se fijaron con PFA 2%, permeabilizaron con Tritón x-100 0,2% y se realizaron inmunofluorescencias usando los anticuerpos que se indican. Los cubreobjetos se montaron para el análisis por microscopía confocal. Se muestra la imagen de campo claro cuando es necesario.

respuesta de selección positiva mientras que constantes de disociación bajas/afinidades altas provocan señales fuertes o sostenidas y selección negativa (423). Como péptido de baja afinidad capaz de inducir señales de selección positiva en el sistema OT-I elegimos la variante RTYTYEKL, derivado de la proteína β catenina.

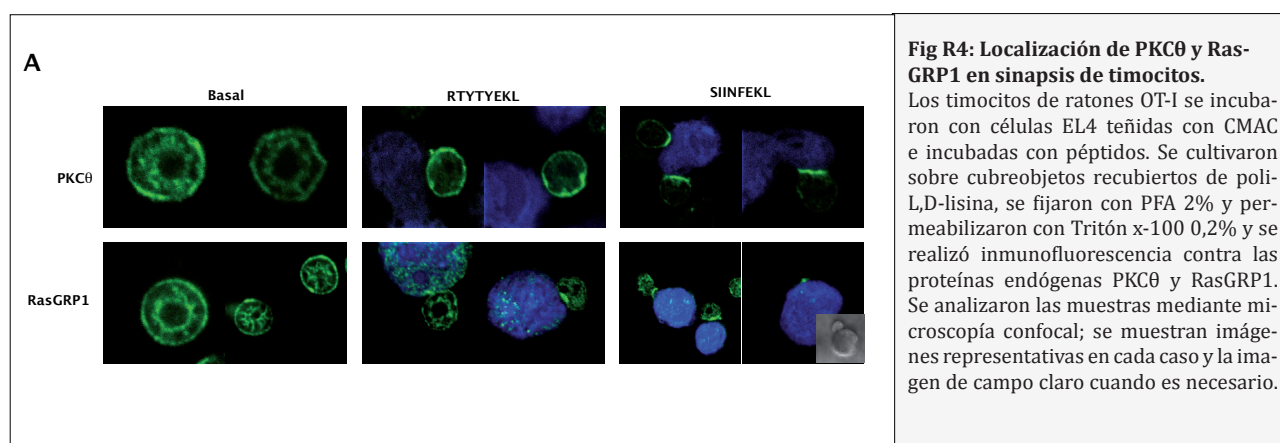
Comprobamos el comportamiento de ambos péptidos en señalización temprana, estimulando timocitos extraídos de ratones OT-I con células EL4 incubadas con SIINFEKL o RTYTYEKL y fijadas previamente a la estimulación. Mientras que SIINFEKL indujo una fuerte activación de ZAP70, LAT, PLC y Erk, las señales de RTYTYEKL fueron mucho más débiles y sólo se apreció una débil estimulación de LAT y Erk en comparación con el control de células sin estimular (fig R3A). Este resultado confirma el comportamiento ya descrito del péptido de baja afinidad en nuestras condiciones.

Además quisimos estudiar la localización de estas proteínas implicadas en la transmisión de señales tempranas del TCR. Para ello realizamos conjugados entre timocitos y células EL4 cargadas con péptido, y visualizamos la localización de las proteínas mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal. Pudimos observar que RTYTYEKL producía una localización en membrana plasmática de Lck y de pZAP70, pPLC γ 1 y pErk. En el caso de las formas fosforiladas de estas dos últimas moléculas los niveles de detección eran, además, muy bajos, correspondiendo con los datos bioquímicos (fig R3B, paneles izquierda). Cuando se inducía

la formación de sinapsis con el péptido agonista, SIINFEKL, todas estas proteínas sufrían un reclutamiento a la zona de contacto (fig R3B, paneles derecha).

En estas condiciones nos preguntamos dónde se localizaban las proteínas reguladas por DAG e implicadas en desarrollo tímico: RasGRP1 y PKC θ . Como se ha mencionado, RasGRP1 juega un papel esencial en la selección positiva mediante la activación de Erk (100, 359), mientras que PKC θ está implicada en este proceso contribuyendo a la activación de esta MAPK (306). En situación basal en timocitos ambas proteínas presentan localización tanto en membrana plasmática como en membranas internas (fig R4A, paneles izquierda). Cuando incubamos los timocitos OT-I con células EL4 pudimos observar que, en estimulación con SIINFEKL –situación de selección negativa y de fuerte señalización– ambas proteínas localizan en la sinapsis inmunológica. Sin embargo, cuando la señal es débil, en el caso de RTYTYEKL, PKC θ localiza en toda la membrana plasmática. Por el contrario, RasGRP1 sigue translocándose a la zona de contacto, aunque con una frecuencia mucho menor que en el caso del péptido agonista, puesto que en aproximadamente la mitad de los conjugados apreciamos una localización similar a la basal (fig R4A, paneles centrales y derecha).

Esta localización de RasGRP1 en sinapsis en condiciones de estimulación débil concuerda con su función propuesta en selección positiva, tanto por modelos matemáticos (72) como por los defectos mostrados con ratones KO de RasGRP1, que tienen defectos en



transmisión de señales débiles del TCR (359). Como contrapunto, el resultado de la localización de RasGRP1 y del resto de proteínas analizadas con el péptido de baja afinidad contradice el modelo propuesto de localización interna de los complejos señalizadores en estas condiciones de estimulación (90). No obstante el uso de APCs en nuestro caso, en lugar de estímulo soluble, podría proveer señales de co-estimulación adicionales que explicasen nuestro resultado final.

Señales de péptidos agonistas, que inducen selección negativa, localizan a las proteínas Lck, PKC y RasGRP1 y a las formas activas de ZAP70, PLC y Erk en la sinapsis inmunológica en timocitos. Por el contrario, con péptidos de baja afinidad que inducen

selección positiva todas estas proteínas se encuentran en membrana plasmática. Tan sólo RasGRP1 se muestra sensible en su localización con el péptido de baja afinidad, encontrándose con cierta frecuencia en sinapsis en esta situación.

Ya que estas proteínas localizan en sinapsis cuando el estímulo es fuerte quisimos estudiar si esto se correspondía con un aumento de los niveles del segundo mensajero que las regula, el DAG, en dicha localización. Puesto que el dominio C1 de PKC θ une este lípido con alta afinidad y detecta los aumentos que se producen de él en sinapsis (fig R2A) intentamos expresarlo como proteína recombinante con el fin de emplearlo a modo de anticuerpo en inmunofluorescencia y

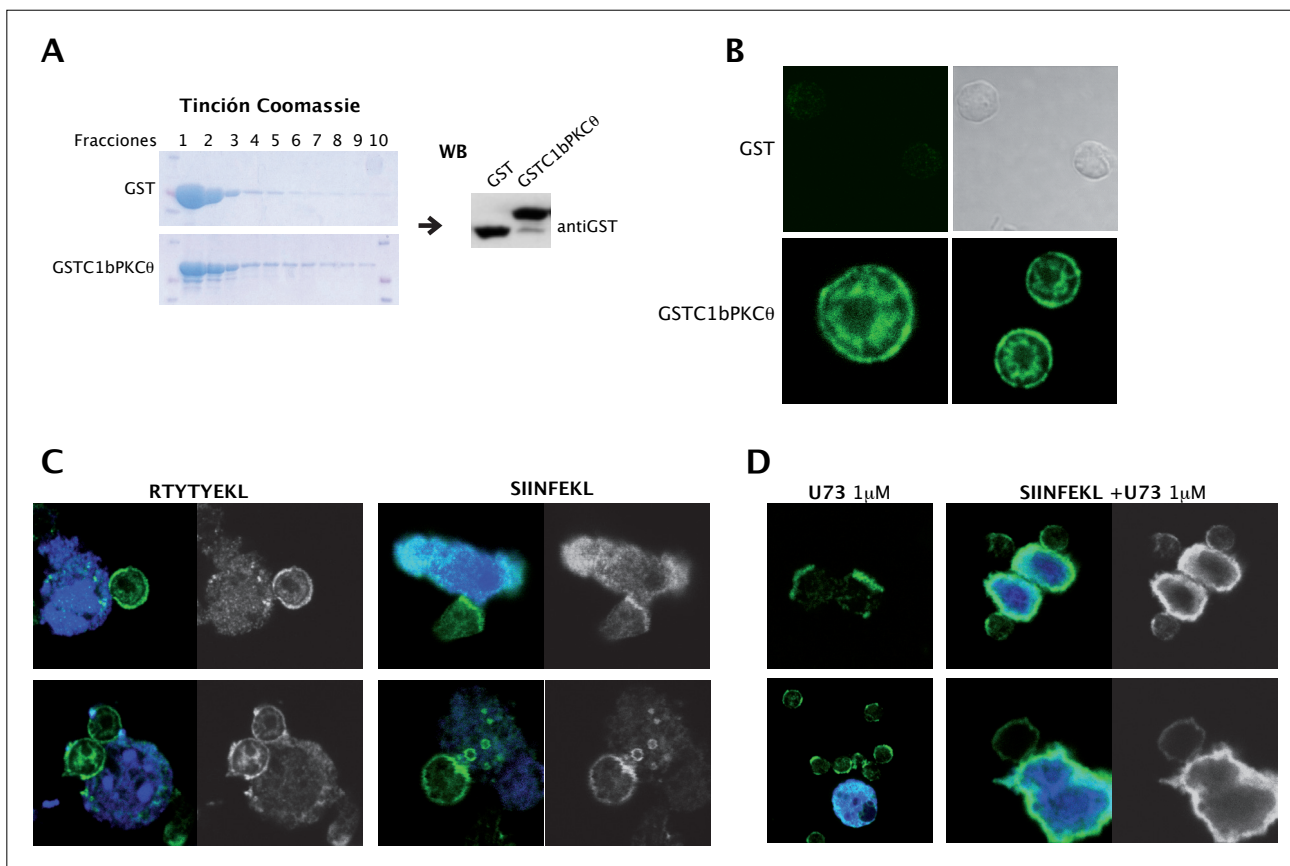


Fig R5: Generación de una sonda GSTC1bPKC θ para detectar DAG en timocitos.

(A) Se expresaron las proteínas GST y GSTC1bPKC θ en la cepa bacteriana BL21(De3)pLysS. De los lisados de estas células se purificaron las proteínas con columnas de cromatografía; mediante SDS-PAGE y tinción de Coomassie se seleccionaron las fracciones a concentrar, y por western blot con un anticuerpo α GST se comprobó la expresión y tamaño de ambas proteínas. (B) Se aislaron células de timo que se dispusieron sobre cubreobjetos recubiertos de poli-L,D-lisina, se fijaron con PFA 2% y permeabilizaron con Tritón x-100 0,2%. Las proteínas recombinantes se emplearon como anticuerpos primarios en inmunofluorescencia; posteriormente se usó un anticuerpo α GST acoplado a un fluorocromo. Los cubreobjetos se montaron y analizaron mediante microscopía confocal. (C) Timocitos transgénicos OT-I se estimularon con células EL4 teñidas con CMAC e incubadas con péptidos. Los conjugados se dispusieron sobre cristales para inmunofluorescencia, fijando y permeabilizando las muestras como se ha indicado (B). Se empleó el dominio GSTC1bPKC θ para realizar la inmunofluorescencia y se capturaron imágenes representativas mediante microscopía confocal. (D) Durante la formación de conjugados entre timocitos y células EL4 se adicionó el inhibidor de PLC U73122. Las células se dispusieron sobre cubreobjetos y se procedió como anteriormente (B y C) para su análisis por microscopía confocal.

posterior análisis por microscopía confocal.

Para ello clonamos el dominio C1bPKC θ en el vector de expresión bacteriana pGEX-T3 fusionado a la proteína GST. Expresamos GST como control y GSTC1b en la cepa de bacterias BL21(DE3)pLys y purificamos mediante columnas de unión a GST ambas proteínas, comprobando su correcta expresión, tamaño e integridad mediante electroforesis en gel de acrilamida y tinción de Coomassie y Western blot (**fig R5A**). Aislamos timocitos OT-I y mediante inmunofluorescencia ensayamos la funcionalidad de la proteína recombinante en su unión *in vitro* a DAG. Incubamos las células fijadas y permeabilizadas con GST o GSTC1bPKC θ y posteriormente empleamos anticuerpos antiGST y secundarios marcados con fluorocromos para visualizar mediante microscopía confocal las tinciones. El control de incubación con GST sola mostró que no había uniones inespecíficas debidas al uso de esta proteína (**fig R5B** panel superior) El análisis de GSTC1bPKC θ mostró una localización de DAG en membrana interna y membrana plasmática muy similar a la de la proteína completa PKC θ .

Cuando incubamos los timocitos con células EL4 que presentaban los péptidos RTY-TYEKL o SIINFEKL observamos que en el caso de estimulación de baja afinidad el dominio GSTC1b permanecía en una situación similar a la basal, localizado tanto en membranas internas como en membrana plasmática. Sin embargo en los conjugados con SIINFEKL se encontraba preferencialmente en la sinapsis inmunológica, abandonando su localización interna (**fig R5C**).

Como control final del reconocimiento eficiente del DAG por el dominio GSTC1bPKC θ en los timocitos incubamos las células con el inhibidor específico de PLC U73122 (⁴⁴). Tanto en situación basal como en conjugados la localización de GSTC1bPKC θ se alteró considerablemente, mostrando una menor señal en todos los casos y una localización polarizada del lípido en membrana plasmática, perdiéndose la señal de membrana interna totalmente.

La sonda GSTC1bPKC θ detecta el DAG presente en timocitos. Éste se encuentra distribuido, en situación basal, en membranas internas y membrana plasmática. En el caso de estimulación con péptido agonista el DAG se acumula de manera masiva en la sinapsis inmunológica entre timocitos y APCs.

Efectos de la disminución de DAG en el desarrollo y activación de linfocitos T.

En estos experimentos con los dominios GFP o GSTC1, la acumulación de DAG en la sinapsis observada correlaciona con la intensidad de la señal dada y sugiere un papel importante de este lípido en los mecanismos de activación que se desencadenan. En la segunda parte de esta tesis decidimos estudiar más a fondo la función de este segundo mensajero en la activación de cada ruta de señalización así como en el desarrollo y homeostasis de las células T.

Como aproximación experimental generamos una construcción modulando una actividad enzimática DGK, de manera que alterase los niveles de este lípido en una localización concreta y clave para ejercer su función de activador del TCR, la membrana plasmática. En la primera parte de este estudio diseñamos y desarrollamos dicha enzima y comprobamos sus efectos inmediatos en señalización temprana en líneas celulares; posteriormente generamos un modelo animal modificado genéticamente con dicha actividad de manera que pudiéramos evaluar la función biológica del DAG en un sistema *in vivo*.

Elaboración de una herramienta que disminuya los niveles celulares de DAG en la membrana plasmática

Para disminuir los niveles de DAG producidos tras la estimulación del TCR generamos y sobre-expresamos una DGK constitutivamente activa en la membrana plasmática,

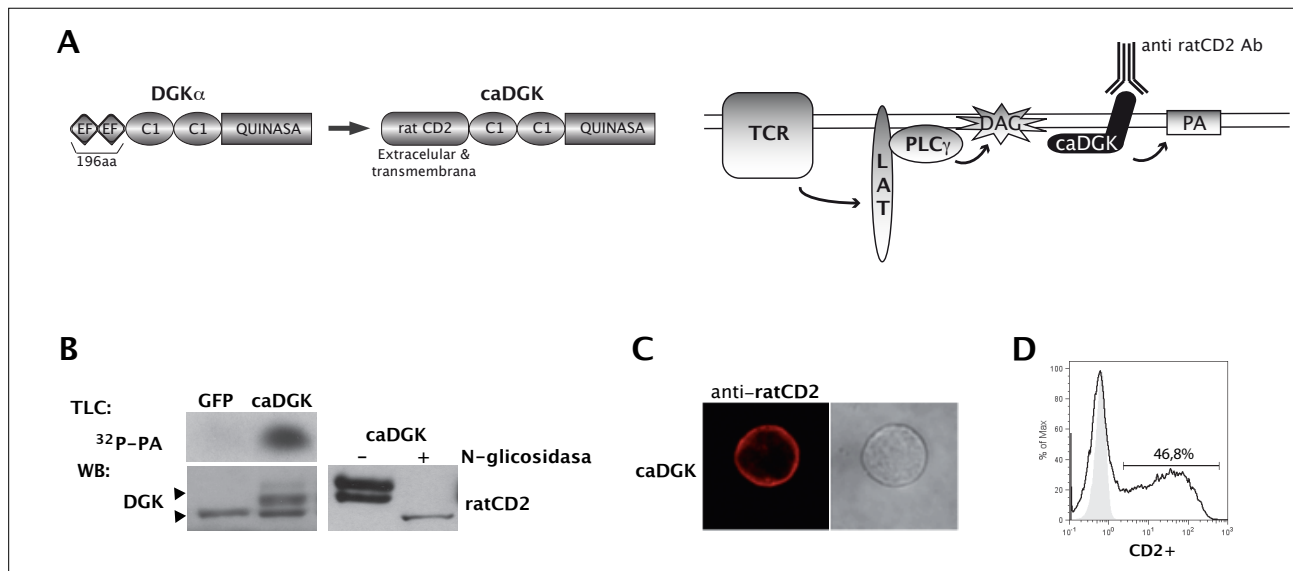


Fig R6: Diseño de una actividad DGK constitutivamente activa localizada en la membrana plasmática.

(A) Esquema de generación de caDGK partiendo del ADN copia de DGK α porcina: se eliminaron los dominios de manos de calcio de la enzima original y se sustituyeron por los dominios extracelular y transmembrana de LFA-1 de rata. De esta manera obtendríamos una DGK con actividad constitutiva en la membrana plasmática. Esto permite eliminar el DAG generado por la activación del TCR y PLC γ y fosforilarlo a PA.

(B) Ensayo de actividad quinasa de caDGK: se transfectaron células Jurkat con plásmido control GFP o caDGK. Las células se recogieron a las 24h y se lisaron en ausencia de detergente para ensayar la actividad DGK usando un sustrato exógeno, C8-DAG y (γ -³²P)ATP (descrito en Materiales y Métodos). En paralelo se analizó la expresión de DGK α en estos mismos lisados.

Ensayo de glicosilación: las células HEK293 transfectadas con caDGK se lisaron y sometieron a ensayo de deglicosilación in vitro con la enzima N-glicosidasa. Las muestras pre- y post- deglicosilación se analizaron por western blot con un anticuerpos específico de DGK α .

(C) La localización de caDGK se estudió mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal: células Jurkat transfectadas con caDGK se dispusieron sobre cristales cubreobjetos, se fijaron con PFA 2% y permeabilizaron con Tritón x-100 0,2% y se incubaron con anticuerpo específico contra CD2 de rata. Se capturaron imágenes representativas.

(D) La expresión de caDGK se analizó mediante citometría de flujo: se empleó un anticuerpo antiCD2 de rata que se incubó en células Jurkat control y transfectadas con caDGK.

de manera que reconociese y transformase el DAG existente en esa localización a PA. Esta aproximación, en teoría, nos permitiría manipular de forma selectiva uno de los segundos mensajeros generados tras la activación de fosfolipasa C sin afectar los niveles de calcio ni la activación de otras señales reguladas por tirosinas quinasa. De esta forma manipularíamos teóricamente uno de los segundos mensajeros celulares, el DAG, sin afectar al resto de mensajeros lipídicos, a los niveles de calcio o a la activación por tirosinas quinasa.

Estudios previos del laboratorio habían mostrado que la isoforma DGK α se transloca a membrana plasmática tras la activación del TCR (408). Asimismo, el trabajo experimental del grupo había determinado que los dominios de manos de calcio, localizados en la parte N-terminal de la enzima, actúan como reguladores negativos de su actividad: de hecho mutantes de delección de esta parte presentan una mayor actividad catalítica así

como localización basal en membrana (407).

Para generar una versión constitutivamente activa de la enzima decidimos eliminar, en la variante porcina de ésta, las manos de calcio, correspondientes a los primeros 196 aa (Δ 196DGK α). Como modo de localización en membrana antepusimos los dominios extracelular y transmembrana de la molécula de adhesión LFA-2 (CD2) de rata (fig R1A izquierda). Esta aproximación experimental de anclaje de proteínas a membrana ya ha sido empleada previamente para generar modelos celulares y animales (285, 376).

CD2 es una integrina implicada en el establecimiento de los contactos iniciales entre la célula presentadora de antígeno y el linfocito T, y forma parte de la sinapsis inmunológica en el anillo de integrinas periférico, facilitando el contacto entre ambas células (423). Su dominio intracelular le confiere funciones señalizadoras (74, 154, 169), de modo que

CD2 actúa como molécula de coestimulación (487).

Con la adición de estos dominios a $\Delta 196\text{DGK}\alpha$ se generó la quimera proteica, a la que llamaremos a partir de ahora **caDGK**. Ante la falta de anticuerpos eficientes para $\text{DGK}\alpha$, el empleo del dominio extracelular de CD2 de rata permitiría además la detección de la expresión de la proteína mediante un anticuerpo específico (fig R6A derecha).

Tras la generación de la construcción por técnicas de biología molecular el primer paso fue estudiar su correcta expresión, función y localización. Para ello realizamos experimentos en la línea celular linfocítica humana T Jurkat. En primer lugar se sobre-expresó la proteína y se realizaron ensayos quinasas sobre extractos proteicos totales. Como se puede comprobar en la fig R6B, la sobre-expresión de caDGK aumenta la actividad diacilglicerol quinasa total en las células. Además, mediante un anticuerpo específico, se estudió la correcta expresión de la proteína por western blot, apreciándose dos bandas que difieren muy poco en su peso molecular, ambas de mayor peso que la proteína endógena (flecha inferior en fig R6B, panel inferior izquierdo). Está descrito que la molécula CD2 sufre procesos de N-glicosilación que sirven para orientar su parte extracelular y evitar la acción de proteasas (394). En células T CD2 pre-

senta dos pesos moleculares en función de su grado de glicosilación (232). Para comprobar que el doblete observado en la expresión de nuestra proteína se debía a este proceso de adición de azúcares realizamos un tratamiento con N-glicosidasa *in vitro*, tras el cual se observaba tan sólo una banda. Debido al protocolo de deglicosilación, que se realiza con altas concentraciones de SDS para favorecer la actividad glicosidasa (detallado en materiales y métodos), la movilidad electroforética de la muestra aumentó y la banda única que aparece tiene en apariencia menor peso molecular del esperado (fig R6B, panel derecha). Por lo tanto, la construcción caDGK sufre el mismo patrón de glicosilación que la molécula CD2 original.

A continuación comprobamos que la proteína se localizaba en membrana plasmática correctamente, mediante sobre-expresión e inmunofluorescencia con un anticuerpo que reconocía CD2. Como se aprecia en la figura la construcción caDGK se localiza mayoritariamente en membrana plasmática (fig R6C). Igualmente se verificó mediante citometría de flujo la expresión en superficie de caDGK (fig 6D).

La quimera proteica caDGK generada localiza en membrana plasmática, se expresa correctamente y presenta actividad quinasas *in vitro*.

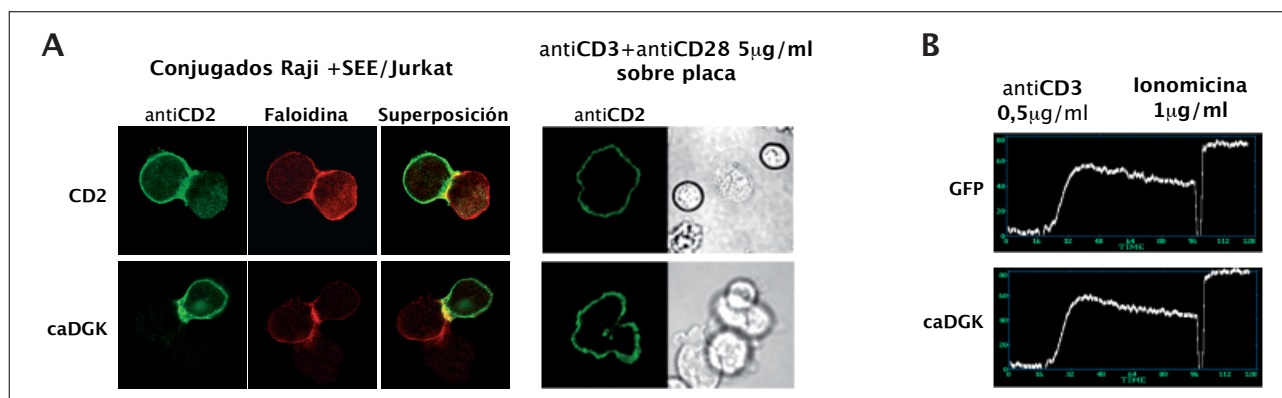


Fig R7: Efecto de la sobre-expresión de caDGK en la reorganización del citoesqueleto y la entrada de calcio extracelular.

(A) Para la determinación de polimerización de actina las células Jurkat transfectadas con CD2 o caDGK se conjugaron con células Raji cargadas con SEE. Los conjugados se cultivaron sobre cubreobjetos, se fijaron con y permeabilizaron siguiendo el protocolo usual y se empleó faloidina marcada con rodamina para visualizar la actina polimerizada (en rojo), y antiCD2 (en verde). En el caso del ensayo sobre antiCD3+antiCD28 las células se cultivaron sobre cristales recubiertos de estos anticuerpos, se fijaron y permeabilizaron, y se visualizó la proteína caDGK con anticuerpo antiCD2 (verde). Todas las imágenes se analizaron mediante microscopía confocal y son representativas de las muestras. **(B)** Células Jurkat transfectadas con GFP o caDGK se incubaron con FuraRed y se resuspendieron en medio con CaCl_2 como fuente externa de calcio. Se estimularon con antiCD3 e ionomicina posteriormente y pérdida de fluorescencia del FuraRed se analizó mediante citometría de flujo.

Efectos de la disminución de DAG en la reorganización del citoesqueleto y la movilización de calcio intracelular.

Uno de los eventos inmediatos tras la estimulación del TCR es la reorganización del citoesqueleto de actina de la célula T ⁽⁴²⁾ para establecer un contacto prolongado y adecuado con la célula presentadora del antígeno y formar una sinapsis inmunológica eficiente que actúe como plataforma señalizadora ⁽⁵⁰⁶⁾. Entre las principales proteínas implicadas en este proceso se encuentra la GTPasa Rac, y uno de sus reguladores clave en linfocitos T es el GAP $\beta 2$ -quimerina, proteína que contiene un dominio canónico C1 y que une DAG para ejercer su función ⁽⁴⁴⁰⁾. Como la modificación de los niveles de DAG por la expresión de caDGK podía estar afectando este proceso por su efecto sobre $\beta 2$ quimerina quisimos estudiar la capacidad de reorganización del citoesqueleto en células con sobre-expresión de la DGK constitutiva. Para ello realizamos tinciones de actina en células Jurkat tras su estimulación con APCs en condiciones de sobre-expresión de caDGK (**fig R7A**, izquierda). Como APCs empleamos las células B humanas Raji, procedentes de un linfoma de Burkitt ⁽²¹³⁾, cargadas con superantígeno SEE, que se une a MHC clase II y posteriormente a la cadena $V\beta$ del TCR, activando a dicho receptor y mimetizando la sinapsis inmunológica ^(516, 523). Como se puede observar en la figura, la sobre-expresión de caDGK permite la formación de los conjugados célula T-célula B así como la polimerización de actina, determinada por tinción con faloidina marcada con rodamina, en la zona de contacto de manera similar a células control, que expresan los dominios extracelular y transmembrana de CD2 (panel superior).

Como experimento adicional en el estudio de la reorganización del citoesqueleto cultivamos las células Jurkat sobre placas recubiertas de anticuerpos contra CD3 y CD28. En estas condiciones, los linfocitos se estimulan y sufren un cambio en su morfología que les lleva a extenderse sobre la placa, como puede observarse en células control que expresan los dominios extracelular y transmembrana

de CD2 (**fig R7A**, panel derecho superior). Cuando se sobreexpresa la proteína caDGK las células remodelan su citoesqueleto de forma similar a estas células control (**fig R7A**, panel derecho inferior). Por lo tanto, la expresión de la DGK activa en la membrana no afecta a la reorganización del citoesqueleto de actina ni a la formación de la sinapsis inmune en las condiciones estudiadas.

Otro hecho esencial en la activación del linfocito es el aumento de calcio intracelular por la activación de PLC $\gamma 1$ ⁽¹³⁰⁾; este calcio será responsable de la activación del factor de transcripción NF-AT a través de las proteínas calmodulina-calcineurina ⁽²⁷⁵⁾. En los linfocitos T se han descrito canales catiónicos susceptibles de regulación por DAG que podrían estar implicados en la entrada de calcio extracelular en el citoplasma ^(132, 164), por lo que decidimos estudiar si la modificación de los niveles de DAG estaba alterando la movilización del calcio, y consecuentemente, otras posibles vías de activación de los linfocitos. Realizamos medidas de calcio intracelular por citometría de flujo tras estimulación del TCR, y no observamos diferencias entre las células que expresan caDGK y células GFP control (**fig R7B**), lo que sugiere que defectos en la acumulación de DAG no resultan de gran impacto en la movilización de este segundo mensajero.

La sobreexpresión de caDGK no altera los procesos de reorganización de citoesqueleto ni movilización de calcio tras la estimulación del TCR.

Dinámicas de generación y distribución de DAG en linfocitos que sobreexpresan la proteína caDGK.

Alterar la señalización del TCR por la sobre-expresión de una DGK implica eliminar o disminuir los niveles de DAG producido por PLC γ en la membrana. Aunque habíamos comprobado que la caDGK tenía actividad quinasa *in vitro* (**fig R6B**), quisimos estudiar si la expresión de esta construcción afectaba la acumulación de niveles de DAG que se pro-

ducía en condiciones de sinapsis. Para ello hicimos uso de los dominios de unión a DAG, dominios C1s fusionados a GFP, generados y caracterizados previamente en la línea celular Jurkat en nuestro laboratorio. Este trabajo previo había mostrado que el dominio GFPC1bPKC θ era capaz de reconocer el DAG producido tras la estimulación del TCR, en un sistema de microesferas recubiertas de antiCD3 y antiCD28. La construcción GFP-C1RasGRP1 permanecía, en cambio, localizada en las membranas internas (66).

Ensayamos estas dos construcciones en

nuestro sistema de presentación antigénica de células Jurkat y Raji cargadas con SEE. Como se observa en la **figura 8A**, el dominio GFPC1bPKC θ muestra una localización basal citosólica y en membrana interna, y se transloca tras la estimulación con APCs cargadas con SEE a la sinapsis inmunológica, permaneciendo en ella de manera estable durante todo el tiempo del ensayo (primera línea de paneles). GFPC1RasGRP1 muestra un patrón similar de localización interna en condiciones basales, pero persiste en dicha localización subcelular aunque se forme la sinapsis

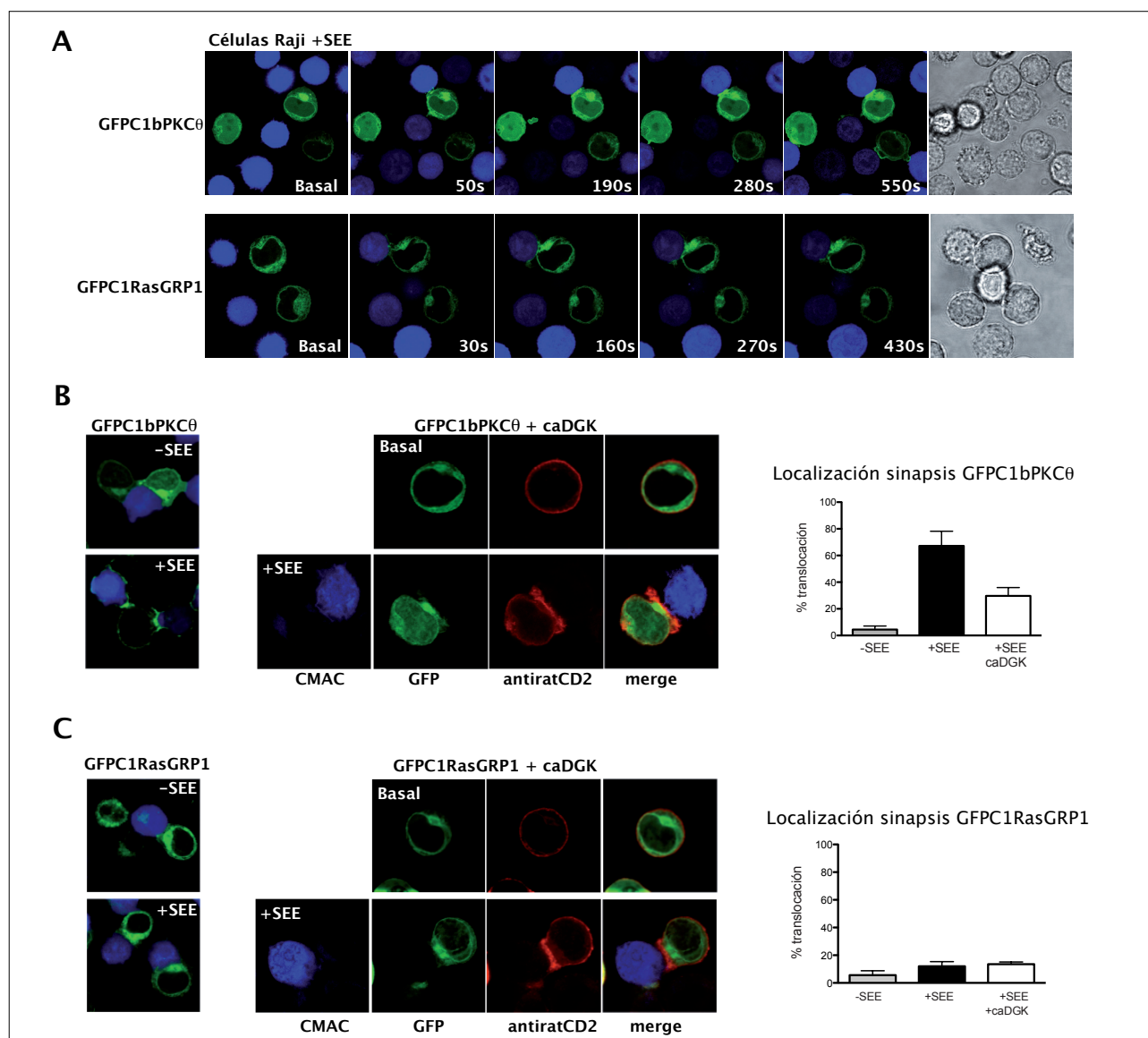


Fig R8: Producción de DAG en sinapsis de células Jurkat y efecto de la sobre-expresión de caDGK.

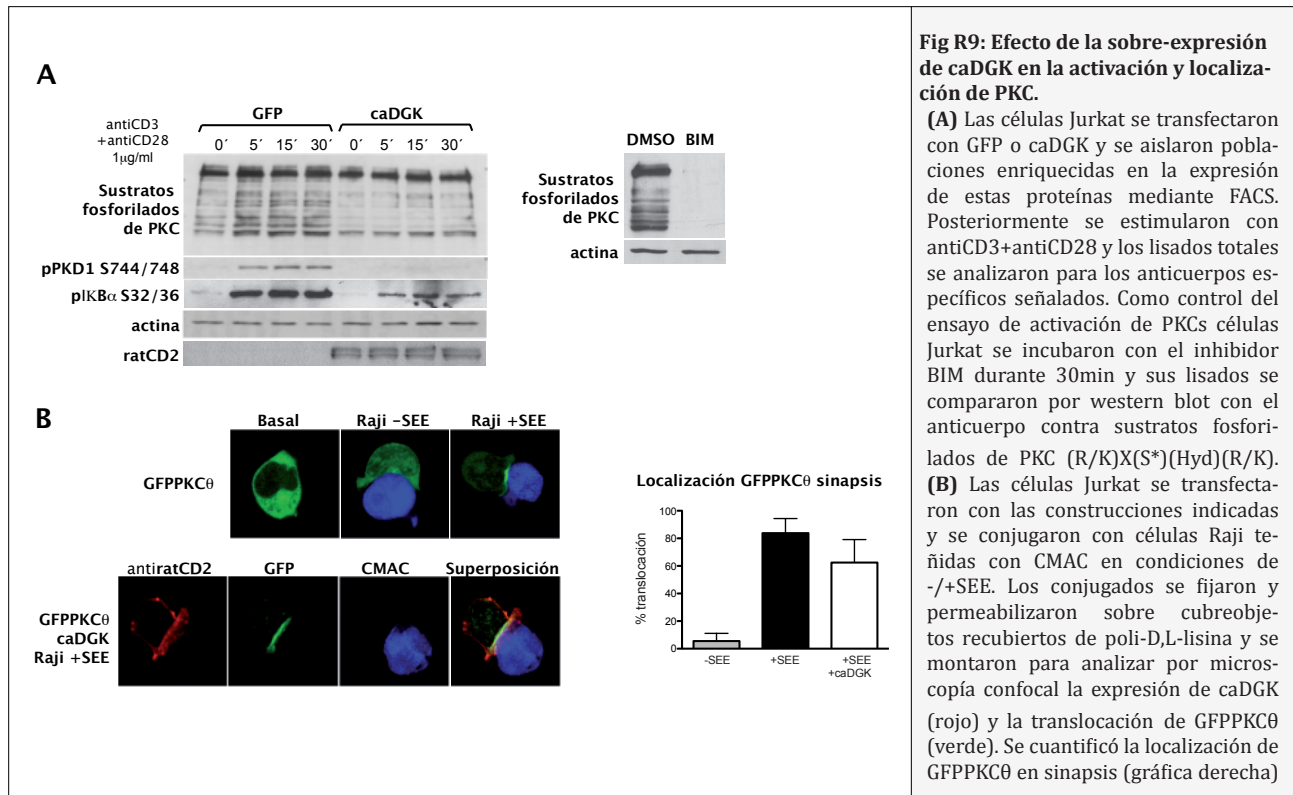
Se transfectoron células Jurkat con las construcciones indicadas en cada caso y se conjugaron con células Raji teñidas con CMAC y cargadas con SEE:

(A) Se cultivaron las células Jurkat en medio HBSS sobre cámaras recubiertas de poli-L,D-lisina y se adicionaron las células Raji sobre ellas. Se capturaron imágenes de videomicroscopía confocal cada 10seg.

(B y C) Los conjugados entre células Jurkat y Raji se cultivaron sobre cubreobjetos recubiertos de poli-L,D-lisina, se fijaron, permeabilizaron y la expresión de caDGK se analizó con anticuerpo antiCD2. La translocación de los dominios GFPC1 (verde) se cuantificó y representó en cada caso. En la figura se muestran imágenes representativas de cada situación.

inmune (paneles inferior de R8A). Por tanto el comportamiento de ambos dominios es muy similar al que presentan cuando se expresan en células CD8 de ratón.

ni en situación basal (por la localización de GFPC1bPKC θ y GFPC1RasGRP1) ni en sinapsis inmunológica (por la localización interna de GFPC1RasGRP1).



Para estudiar si existían cambios en la distribución de DAG en células que expresaban la DGK constitutivamente activa co-expresamos los dominios C1 junto con caDGK. Mediante el uso de un anticuerpo antiCD2 diferenciamos las células que expresaban la DGK por inmunofluorescencia. Pudimos comprobar que, en el caso de GFPC1bPKC θ , la sobre-expresión de caDGK no alteraba la localización en membranas interna de éste, pero sí reducía drásticamente la localización en sinapsis (**fig R8B**). Sin embargo, en el caso de GFPC1RasGRP1 no observamos diferencias en la localización de éste cuando la DGK constitutivamente activa estaba presente (**fig R8C**).

La acumulación de DAG en la sinapsis inmunológica medida como translocación del dominio GFPC1bPKC θ se ve disminuida por la sobre-expresión de caDGK. Sin embargo, el DAG existente en membranas internas no se ve modificado en su localización o niveles,

Efecto de la disminución de DAG en la activación de las PKCs.

Como se ha mencionado en la introducción, el DAG es un activador alostérico de las proteínas quinasas C clásicas y nuevas mediante su unión a los dominios C1 de éstas (337). En la cascada del TCR se han implicado isoformas pertenecientes a ambos subgrupos (38, 101, 498, 509), aunque la PKC más importante en la función de los linfocitos T es la PKC θ (350, 468). El estudio de la activación de las PKCs en linfocitos que sobre-expresan la caDGK constituye así un control esencial para testar el funcionamiento de la quinasa lipídica sobre vías de señalización dependientes de la generación de DAG. Tras la estimulación del TCR las células Jurkat que sobre-expresaban caDGK mostraron una menor activación de PKCs clásicas, como muestra el análisis de los sustratos fosforilados de PKC (**fig R9A**, panel superior izquierdo); el tratamiento con el inhibidor de PKCs clásicas BIM a dosis

bajas, que actúan de forma específica sobre estas isoformas (492), confirmó la especificidad de dicho anticuerpo (fig R9A, panel superior derecho).

Estudiamos a continuación el impacto del metabolismo del DAG sobre la activación de PKC θ , mediante la medida de la fosforilación de PKD1, descrita como sustrato directo (553) y de la fosforilación de I κ -B α (253,449). En ambos casos la fosforilación de estos sustratos apareció disminuida en las células que expresaban caDGK, revelando una deficiente activación de PKC θ .

Estos profundos defectos en la activación de PKC θ se podían deber a un defecto en la localización de ésta en la sinapsis o a una deficiente activación por falta de producción de DAG. Para discriminar entre estas dos posibilidades sobre-expresamos GFPPKC θ sola o junto con caDGK en células Jurkat y realizamos conjugados con células Raji.

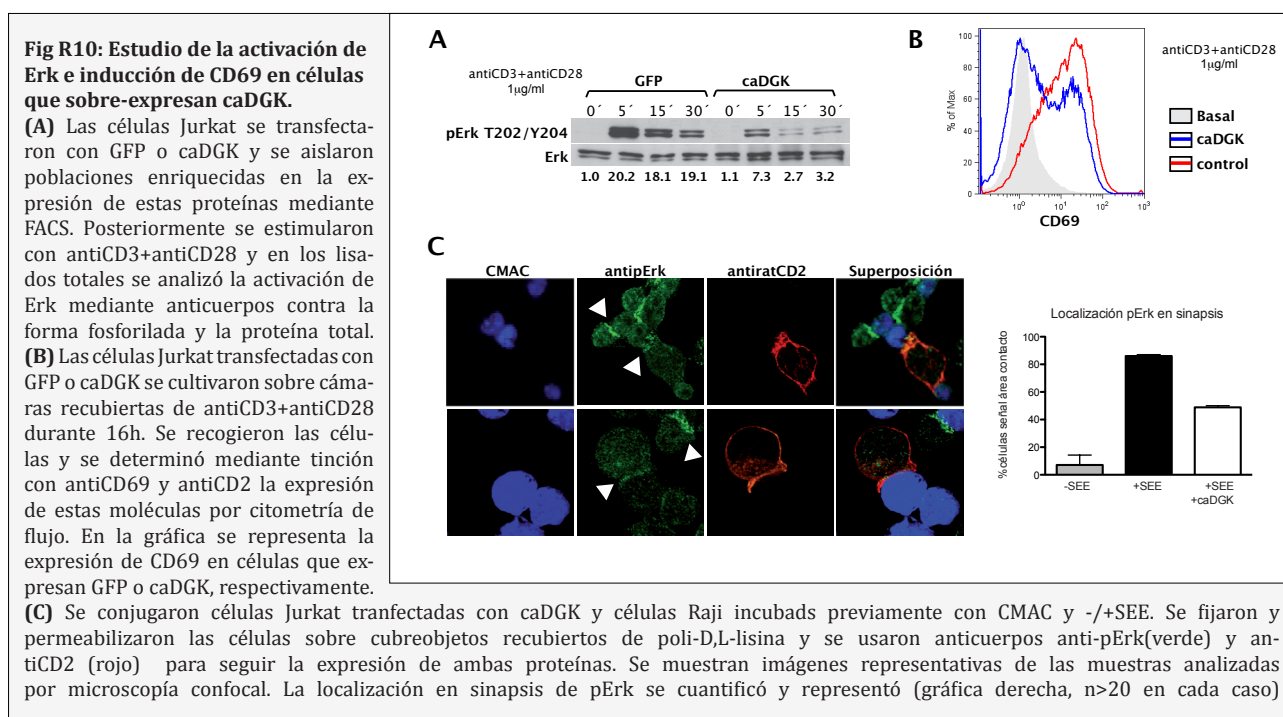
El análisis por microscopía confocal mostró que la translocación de la PKC θ disminuye ligeramente como efecto de la expresión de caDGK (fig R9B). Sin embargo esta diferencia no es tan manifiesta como en el caso del dominio GFPC1bPKC θ por sí solo (fig R8B), que se comporta como altamente sensible a la producción de DAG y a su modu-

lación. Por tanto, el efecto predominante del DAG sobre la vía de PKC θ se ejerce a nivel de su activación y no de su localización en membrana, aunque pueda contribuir parcialmente a la estabilización de la proteína en ella. Este resultado es acorde con los trabajos que resaltan la necesidad de señales de CD28 para que PKC θ se transloque a la sinapsis, en los que la translocación de PKC depende de su interacción con esta molécula de co-estimulación y no de la producción del lípido (40, 85, 222, 253, 355, 406, 499, 550).

La activación y señalización de PKC θ está radicalmente disminuida en células que expresan ectópicamente caDGK. Estos defectos no se deben a la localización defectuosa de PKC, que es capaz de llegar a la sinapsis inmunológica en estas células.

Función del DAG en la activación de Ras/Erk/CD69

RasGRP1 es esencial en la activación de Ras/Erk en linfocitos. La unión de DAG a su dominio C1 es necesaria para ejercer la función catalítica de RasGRP1 (266, 491). Por tanto, cabe esperar que una deficiente generación de DAG afectará de manera crítica a la activación de Erk mediada por RasGRP1/



Ras. Para estudiar esta hipótesis sobre-expresamos caDGK en células Jurkat y las estimulamos con antiCD3 y antiCD28; como se observa en fig R10A la fosforilación de esta MAPK está drásticamente alterada con respecto a células control. Esta disminución en la activación de una proteína clave en la función de los linfocitos sugiere que las células que sobre-expresan caDGK verán afectado su respuesta general a la estimulación. Para comprobar esto analizamos los niveles del marcador de activación CD69 en linfocitos cultivados sobre placas recubiertas de anticuerpo contra el TCR. De acuerdo con el descenso en Erk activo encontramos que la inducción de CD69 estaba disminuida en células que sobre-expresan caDGK, indicando la necesidad de que se produzcan niveles adecuados de DAG para obtener una respuesta eficiente tras la estimulación de los linfocitos.

específicamente en la sinapsis. En el resto de células que expresaban caDGK y en las que se observaba señal de pErk la localización de éste correspondía al área de contacto, de manera similar a las células control (**fig R10B**). Por tanto la disminución de DAG no altera la localización en sinapsis de pErk, aunque sí su nivel de fosforilación.

Las células que sobre-expresan caDGK presentan deficiencias en la inducción de CD69 y en la fosforilación de Erk en respuesta al TCR.

Para analizar si la deficiente activación de Erk era una consecuencia directa del requerimiento por DAG para la activación de RasGRP1/Ras realizamos ensayos pull-down para medir los niveles de Ras activo. Sorprendentemente, no observamos cambios significativos mediante esta aproximación

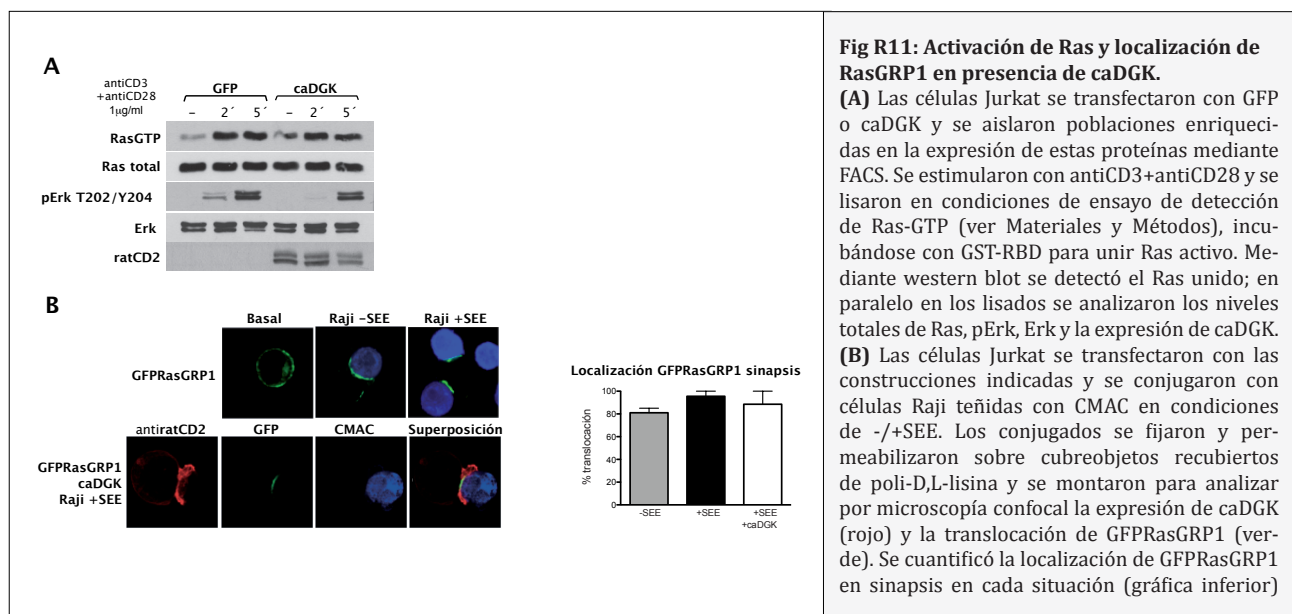


Fig R11: Activación de Ras y localización de RasGRP1 en presencia de caDGK.

(A) Las células Jurkat se transfectaron con GFP o caDGK y se aislaron poblaciones enriquecidas en la expresión de estas proteínas mediante FACS. Se estimularon con antiCD3+antiCD28 y se lisaron en condiciones de ensayo de detección de Ras-GTP (ver Materiales y Métodos), incubándose con GST-RBD para unir Ras activo. Mediante western blot se detectó el Ras unido; en paralelo en los lisados se analizaron los niveles totales de Ras, pErk, Erk y la expresión de caDGK. (B) Las células Jurkat se transfectaron con las construcciones indicadas y se conjugaron con células Raji teñidas con CMAC en condiciones de +/-SEE. Los conjugados se fijaron y permeabilizaron sobre cubreobjetos recubiertos de poli-D,L-lisina y se montaron para analizar por microscopía confocal la expresión de caDGK (rojo) y la translocación de GFP/RasGRP1 (verde). Se cuantificó la localización de GFP/RasGRP1 en sinapsis en cada situación (gráfica inferior)

En condiciones de débil estimulación del TCR se ha descrito la localización interna de Erk activo (90). Ya que la sobre-expresión de caDGK producía una señal más débil de activación del linfocito, nos preguntamos dónde se encontraba Erk activo en células con los niveles de DAG disminuidos. Realizamos inmunofluorescencia en conjugados y encontramos que aproximadamente en el 50% de las células positivas para tinción de CD2 la señal de pErk disminuía en toda la célula y

en la activación de Ras en células que expresaban caDGK (**fig R11A**). Sin embargo, no podemos descartar que no estemos modificando una isoforma específica de Ras activo o en una localización subcelular determinada, hecho que el ensayo de pull-down no nos permite discernir. Igualmente, también puede ser que el mayor efecto sobre la activación de Erk que se observa en las células que expresan caDGK se deba a la aportación de las PKCs sobre esta vía (361, 362).

De igual manera que para pErk, también se ha descrito la localización interna de RasGRP1 en condiciones de estimulación débil (90, 347), por lo que comprobamos en nuestro sistema dónde se localizaba esta proteína. Para ello sobre-expresamos GFPRasGRP1 en presencia o ausencia de caDGK y realizamos ensayos de presentación antigénica. En situación basal encontramos un gran porcentaje de GFPRasGRP1 en membrana plasmática y una gran acumulación de la proteína en la zona de contacto entre la APC y la célula T incluso en condiciones donde no hay producción de DAG (Raji -SEE, **fig R11B**). Al simular la sinapsis con células Raji cargadas con SEE GFPRasGRP1 se transloca a la zona de contacto, y esta localización no se altera por la sobre-expresión de caDGK (**figR11B**), por lo que no es estrictamente dependiente de DAG. Este resultado concuerda con el hecho de que el GFPC1RasGRP1 no se una al DAG producido en la sinapsis (**fig R8A**) y de que la proteína completa se encuentre en membrana en situación basal o de no estimulación (Raji -SEE).

A pesar de ser descrita inicialmente como proteína presente en el aparato de Golgi (43) nuestro laboratorio y otros grupos han publicado la localización de RasGRP1 en membrana en diversas situaciones fisiológicas (392, 408, 556). De hecho, otros trabajos y abordajes experimentales han constatado que la localización en sinapsis de RasGRP1 depende de

un mecanismo de interacción con Ras (486) y que la activación de esta GTPasa se produce exclusivamente en membrana plasmática en linfocitos (392). No obstante la localización de RasGRP1 es objeto de controversia y el modelo o abordaje experimental empleado en cada estudio es clave a la hora de interpretar el comportamiento de la proteína.

Las células que sobre-expresan caDGK no presentan disminución en la carga de Ras total celular, pese a la disminución de pErk. La proteína GFPRasGRP1 en estas células presenta el mismo patrón de localización subcelular que en células control, con localización en membrana plasmática incluso en situaciones de no estimulación.

Regulación del DAG sobre la activación de Akt.

La estimulación del TCR produce una rápida y persistente activación de la enzima PI3K (83, 515), que activa a proteínas con dominios PH como Akt/PKB por la producción de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (281). La activación de PI3K/Akt es esencial en supervivencia y proliferación en linfocitos (206, 411, 474, 520) y en la producción de respuestas primarias y secundarias (5, 455).

Estudios desarrollados en el laboratorio y publicaciones recientes sugieren una conexión entre el DAG y la activación de PI3K/Akt (41, 353), y entre PKC θ y Akt (33, 490), por lo que quisimos estudiar si las células que expresaban caDGK tenían alterada la activación de esta vía. Analizamos la fosforilación de Akt en sus residuos S473 y T308 tras la estimulación del TCR como medida de activación de PI3K, en células control y que sobre-expresaban caDGK. Además mediante un anticuerpo que reconoce el motivo consenso de fosforilación por Akt en su forma fosforilada estudiamos la actividad de Akt/PKB. En todos los casos encontramos que las células que expresan la caDGK la fosforilación de Akt en sus dos residuos, así como de sus sustratos, era ligeramente menor (**fig R12**).

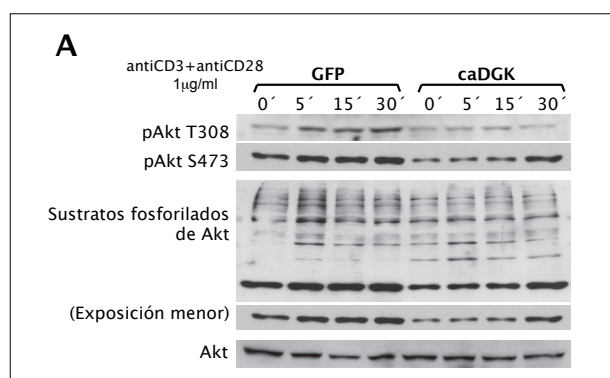
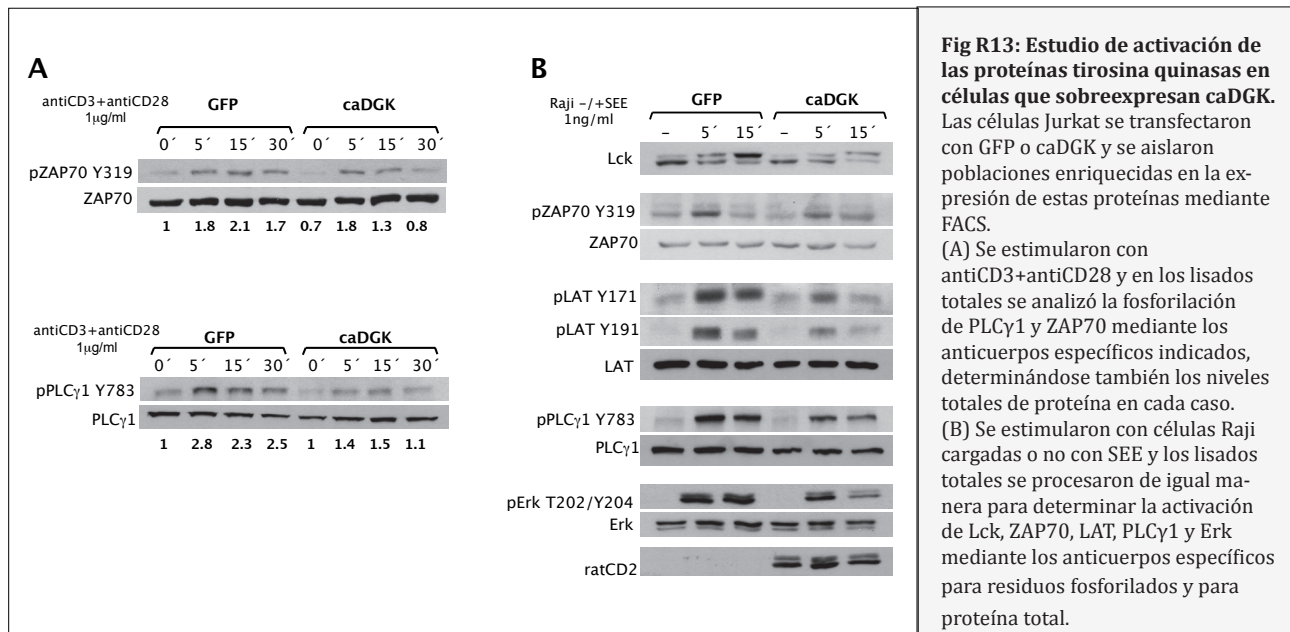


Fig R12: Efecto de la sobreexpresión de caDGK en la activación de la vía de PI3K/Akt.

Las células Jurkat se transfectaron con GFP o caDGK y se aislaron poblaciones enriquecidas en la expresión de estas proteínas mediante FACS. Posteriormente se estimularon con antiCD3+antiCD28 y en los lisados totales se analizó la activación de Akt mediante anticuerpos contra sus residuos T308 y S473 fosforilados, y contra sustratos consenso fosforilados por Akt (R/K)X(R/K)XX(T*/S*). Como control de carga se ensayaron los niveles de proteína total.



La activación de PI3K y Akt está ligeramente disminuida en células que expresan caDGK.

Estudio de la regulación del DAG sobre la activación del TCR: tirosinas quinasas.

La sobre-expresión de caDGK en células Jurkat y disminución consiguiente de DAG tenía un gran impacto en la activación general de los linfocitos, y más concretamente en el encendido de Erk. Se han descrito mecanismos reguladores positivos de esta MAPK sobre la cascada del TCR: la activación de Erk es necesaria para la fosforilación de Lck en S59. Esta fosforilación previene de la interacción de Lck con SHP1 y evita de esta manera la acción inhibitoria de esta fosfatasa sobre el TCR (220, 534). Puesto que en nuestras células que sobre-expresaban caDGK los niveles de fosforilación de Erk están disminuidos, nos preguntamos si esto tenía repercusión en la activación de las proteínas tirosinas quinasas del TCR, tan estrictamente dependientes de Lck.

Así ensayamos la activación de ZAP70 y PLCγ tras la estimulación del TCR medida como fosforilación de estas proteínas en células que sobre-expresan caDGK. En ambas situaciones se observó un ligero pero reproducible defecto en la fosforilación (fig R13A).

A continuación quisimos comprobar si esto sucedía en conjugados de células Jurkat y Raji; al analizar la activación de Lck (medida como su cambio de movilidad electroforética con el anticuerpo anti-Lck, clon MOL171 BD Pharmingen (528)) o las fosforilaciones de ZAP70, LAT, PLCγ y Erk se encontraron que siempre, en el caso de células que expresaban ectópicamente caDGK, se encontraban moderadamente disminuidas (fig R13B).

Entre estos resultados cabe destacar la disminución de la fosforilación de PLCγ1, que sin embargo no parece afectar en gran medida a la movilización de calcio (figR7B). Como residuo lectura de activación hemos medido la Y783, aunque otras tirosinas se han descrito como importantes para la función de PLCγ1 (424). La regulación de la actividad PLC es compleja e implica a múltiples proteínas (49) y la entrada de calcio es un fenómeno transitorio, puntual y explosivo y puede que la menor activación de PLC produzca el IP₃ necesario para desencadenar una entrada regular de calcio desde el exterior celular.

La activación de Lck, ZAP70 y PLC por el TCR se ve ligeramente disminuida por la expresión de caDGK.

Expresión en transgénesis de caDGK en linaje T.

La DGK constitutivamente activa generada caDGK era capaz de disminuir la activación general de las vías de señalización del TCR con un especial impacto en fosfoErk. La señalización general se ve atenuada y el umbral de activación del linfocito aumentado. En el contexto de los linfocitos esto tiene gran relevancia, puesto que la intensidad/cinética de la señalización general y concretamente de Ras/Erk incide en el desarrollo y selección de dichas células.

Por ello procedimos a estudiar el impacto que tenía la sobre-expresión de caDGK en transgénesis en todos estos procesos. Clonamos el ADN copia correspondiente a dicha construcción en el vector de expresión en mamíferos p1017D (320), generosamente cedido por el doctor Robert J Kay (fig R14A). Este vector procede de p1017 (71), que contiene el promotor proximal de *Lck*, que

induce altos niveles de expresión de esta proteína en células T inmaduras (525). Las modificaciones llevadas a cabo (ver descripción en Materiales y Métodos) hacen que las construcciones expresadas en transgénesis con p1017D obtengan mayor estabilidad y niveles de expresión que con el vector p1017 (320).

Los animales se generaron por microinyección en oocitos fecundados de ratones de fondo puro C57BL/6J (fig R14B) y la inserción del transgén se detectó mediante PCR con oligonucleótidos específicos sobre ADN genómico. Los individuos positivos que transmitían el transgén se establecieron como fundadores (fig R14C); se comprobó en ADN genómico procedente de estos individuos la inserción y orientación de las copias de transgén mediante southern blot (fig R14D y M0). Para determinar aproximadamente el número de copias se realizó dot blot comparando la intensidad de señal obtenida con un patrón establecido (fig R14E

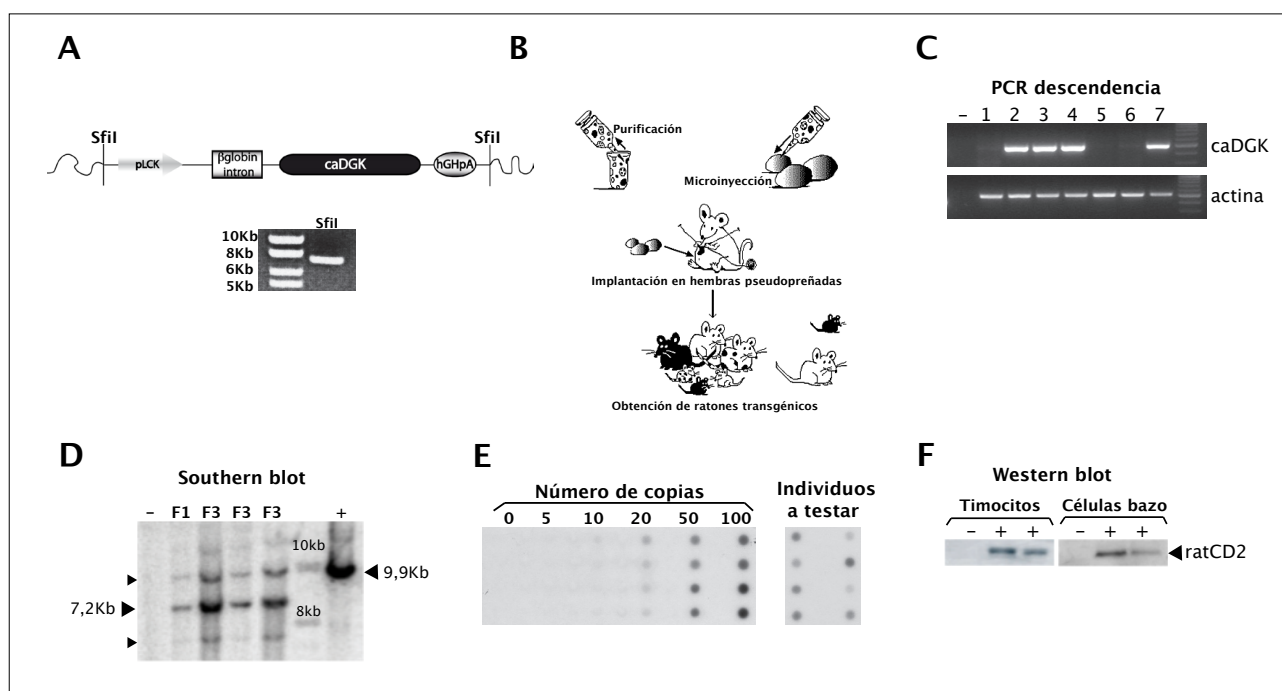


Fig R14: Generación de los ratones transgénicos caDGK.

(A) El ADN copia de caDGK se clonó en el vector de expresión en mamíferos p1017D. El fragmento a microinyectar se analizó en gel de agarosa.

(B) Tras la purificación se realizó la microinyección en oocitos fecundados que se implantaron en hembras pseudopreñadas.

(C) El ADN genómico de los ratones se analizó mediante PCR con oligonucleótidos específicos para la detección del transgén.

(D y E) El ADN genómico de los individuos positivos para la inserción del transgén por PCR se sometió a análisis por Southern y Dot Blot (ver Materiales y Métodos y figuras M1 y M2)

(F) Células procedentes de timos y bazos de ratones control y transgénicos caDGK se lisaron y procesaron para determinar la expresión del transgén mediante western blot con anticuerpo antiCD2.

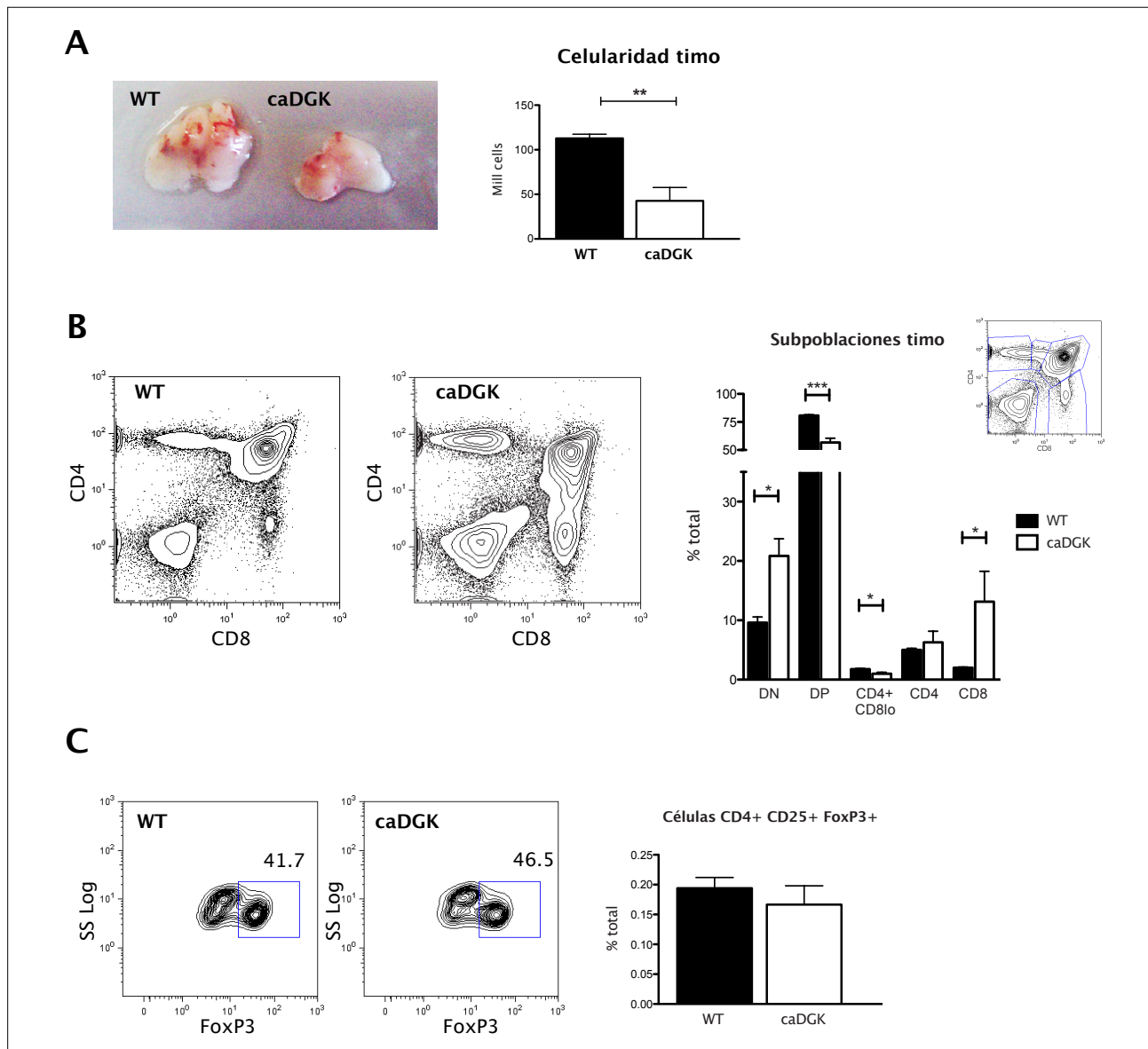


Fig R15: Análisis de las poblaciones tímicas de los ratones caDGK.

(A) Se extrajeron los timos de ratones control y transgénicos caDGK (fotografía izquierda), se disgregaron y se determinó su celularidad total.

(B) Perfiles de expresión de CD4 y CD8 de timocitos de ratones entre 6-8 semanas de edad, analizados mediante citometría de flujo. La cuantificación se realizó en porcentaje sobre el total de las distintas subpoblaciones.

(C) Los timocitos totales se fijaron y permeabilizaron y se emplearon anticuerpos antiCD4, antiCD25 y antiFoxP3 para la cuantificación de la población nTreg en ratones control y caDGK.

En todos los casos se muestran los resultados de más de 5 experimentos en los que n=5. En el análisis estadístico se aplicó en test t de Student a los datos, siendo $p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$.

y M0). Finalmente se analizó la expresión en timocitos y células de bazo mediante western blot empleando un anticuerpo antiCD2 (**fig R14F**), obteniéndose una banda del peso molecular esperado.

De todo este análisis se obtuvieron 3 líneas independientes, procedentes de individuos fundadores que transmitían el transgén y cuya expresión de la proteína caDGK era detectable. En los tres casos se obtuvo una sola inserción con múltiples copias en

tándem cabeza-cabeza y expresión tanto en timo como en órganos linfoides periféricos. Desafortunadamente no fuimos capaces de detectar la expresión de CD2 ni mediante citometría de flujo ni mediante inmunofluorescencia (datos no mostrados).

El transgén caDGK se expresó en células de timo y linfocitos periféricos exitosamente.

Caracterización de poblaciones tímicas en ratones *caDGK*

El promotor proximal de *Lck* que empleamos en la generación de los ratones transgénicos induce expresión desde estadio DN1 en los timocitos, por lo que evaluamos las poblaciones tímicas desde DN a célula maduras funcionales.

Los timos de los ratones transgénicos *caDGK* (*caDGK*) mostraron un menor tama-

ño y celularidad que los ratones control (wt) (**fig R15A**). Analizamos las diferentes subpoblaciones establecidas durante el desarrollo en porcentajes respecto al total de células de timo: dobles negativos (DN), dobles positivos (DP), CD4+CD8^{lo}, CD4 simples positivos (CD4) y CD8 simples positivos (CD8). Pudimos observar que los ratones *caDGK* presentan una acumulación de células DN, un descenso del porcentaje de DP y CD4+CD8^{lo} y un claro aumento de células

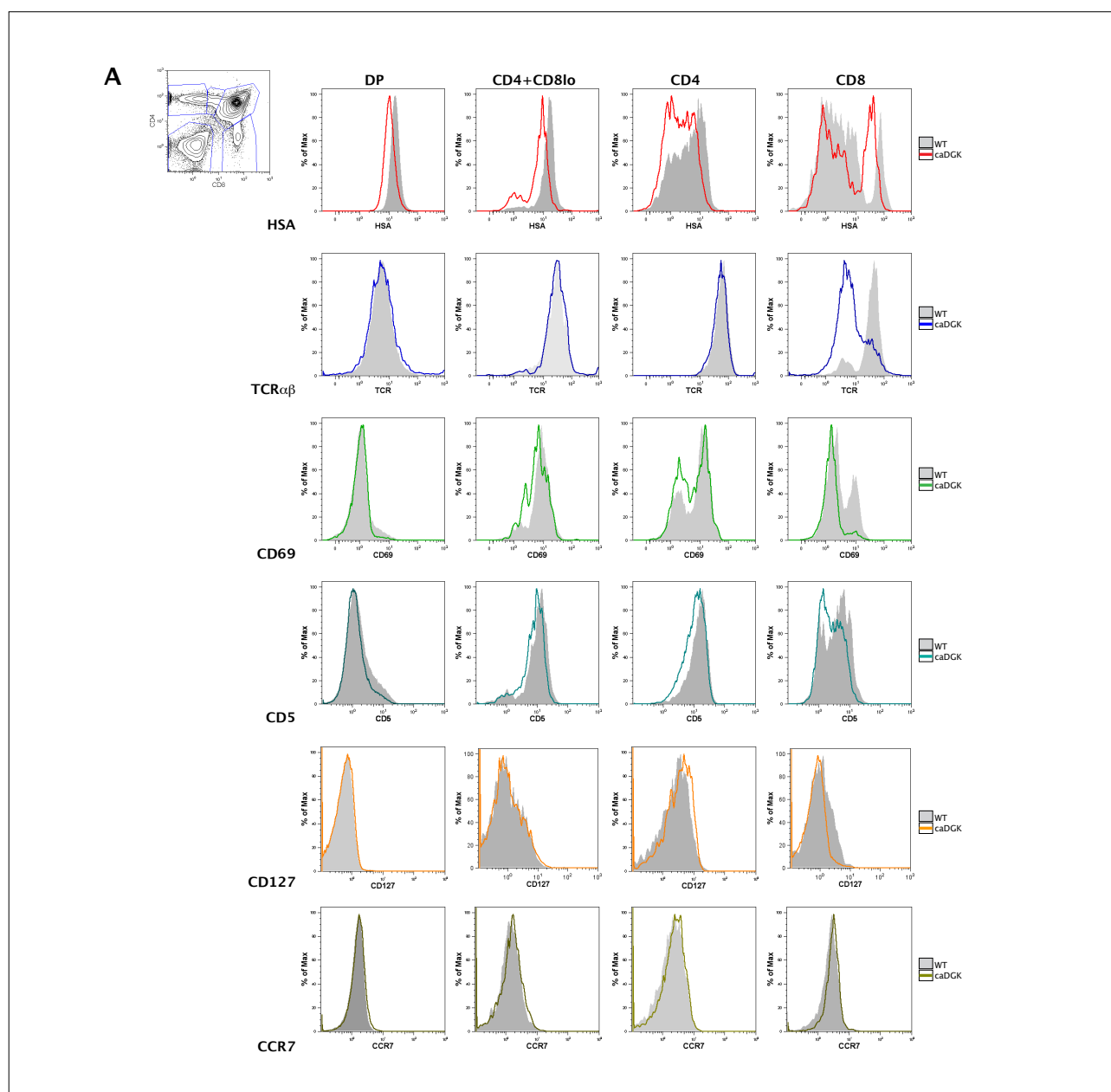


Fig R16: Caracterización de las distintas subpoblaciones tímicas en ratones *caDGK*.

Las células totales de timo se analizaron mediante citometría de flujo para los marcadores indicados en cada subpoblación relevante en desarrollo. Se emplearon anticuerpos antiCD4 y antiCD8 y las poblaciones indicadas se seleccionaron electrónicamente con el citómetro de flujo: mediante anticuerpos específicos para HSA, TCR, CD69, CD5, CD127 y CCR7 se estudió la expresión en membrana de cada una de estas moléculas en cada subpoblación.

CD8 en comparación con ratones control (**fig R15B**, cuantificación gráfica derecha). El análisis de las células T reguladoras en timo (CD4+CD25+FoxP3+), no reveló diferencias significativas en los porcentajes de esta última subpoblación (**fig R15C**, cuantificación en gráfica derecha).

Los ratones transgénicos *caDGK* presentan deficiencias en número y en distribución de poblaciones en timo.

Para comprender por qué existían estas diferencias en las distintas poblaciones procedimos a caracterizarlas individualmente en función de marcadores de desarrollo. Estudiamos la expresión de HSA/CD24, TCR $\alpha\beta$, CD69, CD5, CD127 y CCR7.

La expresión de TCR $\alpha\beta$ en superficie en timocitos se inicia tras la selección β y la transición de células DN a DP. Tras la selección positiva y en el paso final de maduración de los linfocitos simples positivos la expresión de TCR es máxima (240, 272).

CD69 y CD5 son marcadores de selección positiva en timo (473, 484, 539). CD5 antagoniza la señal del TCR mediante mecanismos dependientes de la activación de ZAP70, por lo que se le considera además indicador de la intensidad de la señal transmitida (348).

CD127/IL-7R α transmite las señales de proliferación y supervivencia de IL-7 esenciales en el progreso de los timocitos en sus etapas iniciales de desarrollo, desde ETPs

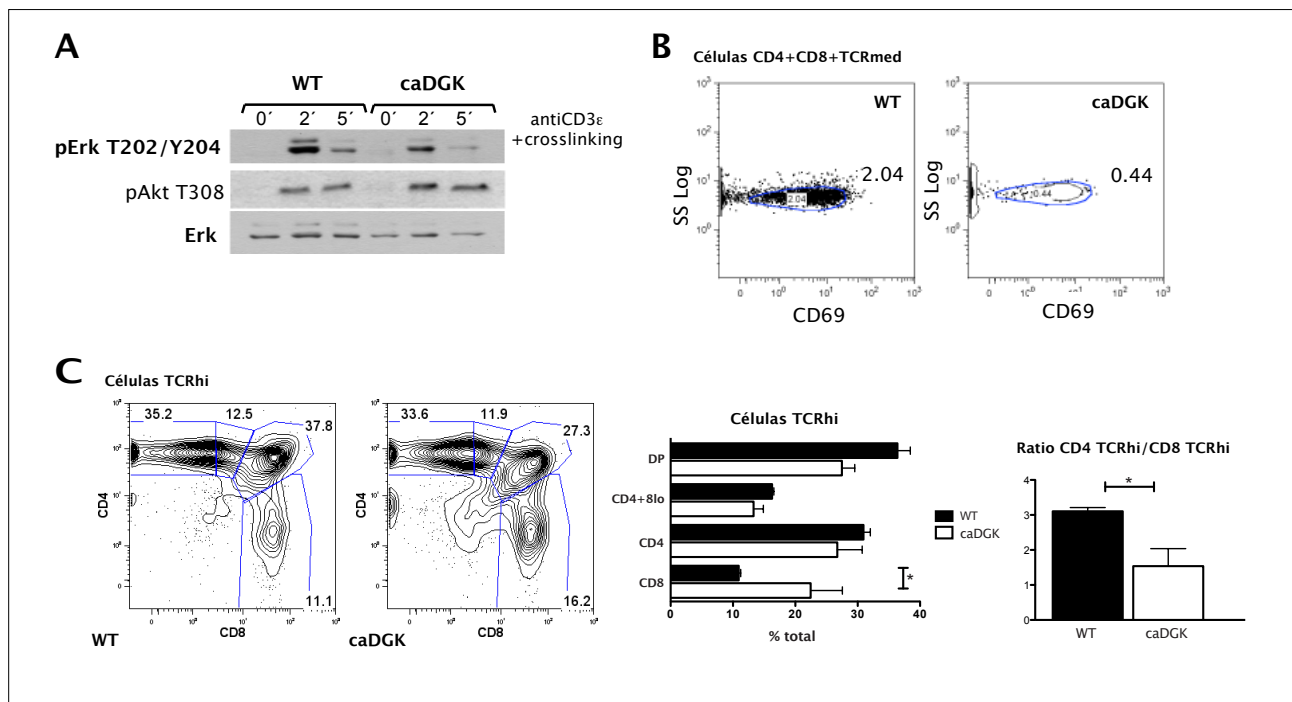


Fig R17: Medida de parámetros de selección positiva en ratones *caDGK*: activación de pErk y expresión de TCR.

(A) Timocitos totales de ratones control y *caDGK* se incubaron con anticuerpo antiCD3 durante 20min a 4oC, se resuspendieron en medio completo y se estimularon a 37oC con anticuerpo antiIgG de Hámster Armenio durante los tiempos indicados. Los lisados celulares totales se analizaron por western blot para medir la activación de pErk y pAkt.
 (B) Se determinó mediante citometría de flujo la expresión de CD69 dentro de la población CD4+CD8+, seleccionada electrónicamente.
 (C) Se analizaron mediante citometría de flujo la distribución de las poblaciones CD4 y CD8 en células seleccionadas electrónicamente para niveles altos de expresión de TCR $\alpha\beta$. Se determinaron porcentajes relativos y ratios CD4 frente a CD8 en ambos casos. Los resultados corresponden a más de 3 experimentos en los que n=5; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

HSA (Heat Stable Antigen) es una glicoproteína de superficie expresada en células T inmaduras, entre otros tipos celulares. Según las células progresan en desarrollo pierden su expresión en superficie, pasando de ser HSAhi en ETP a HSAlo en estadios T maduros (181).

hasta células DN-IPs. Posteriormente su expresión disminuye durante el estadio DP, para finalmente aumentar en la maduración final de los timocitos a células SP (463, 504).

CCR7 y sus ligandos CCL21/19 son los responsables de la migración de los timoci-

tos de córtex a médula (239, 502). La expresión de CCR7 se induce por las señales de selección positiva (548).

El análisis de estos marcadores en las poblaciones de timocitos control (wt) y transgénicos (caDGK) reveló importantes diferencias, principalmente en las poblaciones DP y CD8 SP. Los timocitos DP presentan niveles normales de HSA y TCR pero los marcadores CD69 y CD5 se encuentran disminuidos en los ratones transgénicos, indicando defectos en selección y transmisión de señales más débil por el TCR (fig R16).

Por otro lado las células CD8 estaban drásticamente afectadas en los ratones transgénicos, presentando un fenotipo más

inmaduro (HSAhi TCRlo CD69lo) También observamos diferencias en la expresión de CD5 y CD127, en ambos casos a la baja en comparación con el control.

En los timocitos CD4+CD8lo y CD4 SP no observamos grandes cambios en los marcadores de desarrollo.

La expresión en transgénesis de caDGK produce un aumento de DN que se ve reflejado en un descenso de la población DP; esta última muestra defectos en marcadores de selección positiva como CD69 y CD5. Además el linaje CD8 se ve favorecido, si bien estas células presentan un fenotipo más inmaduro.

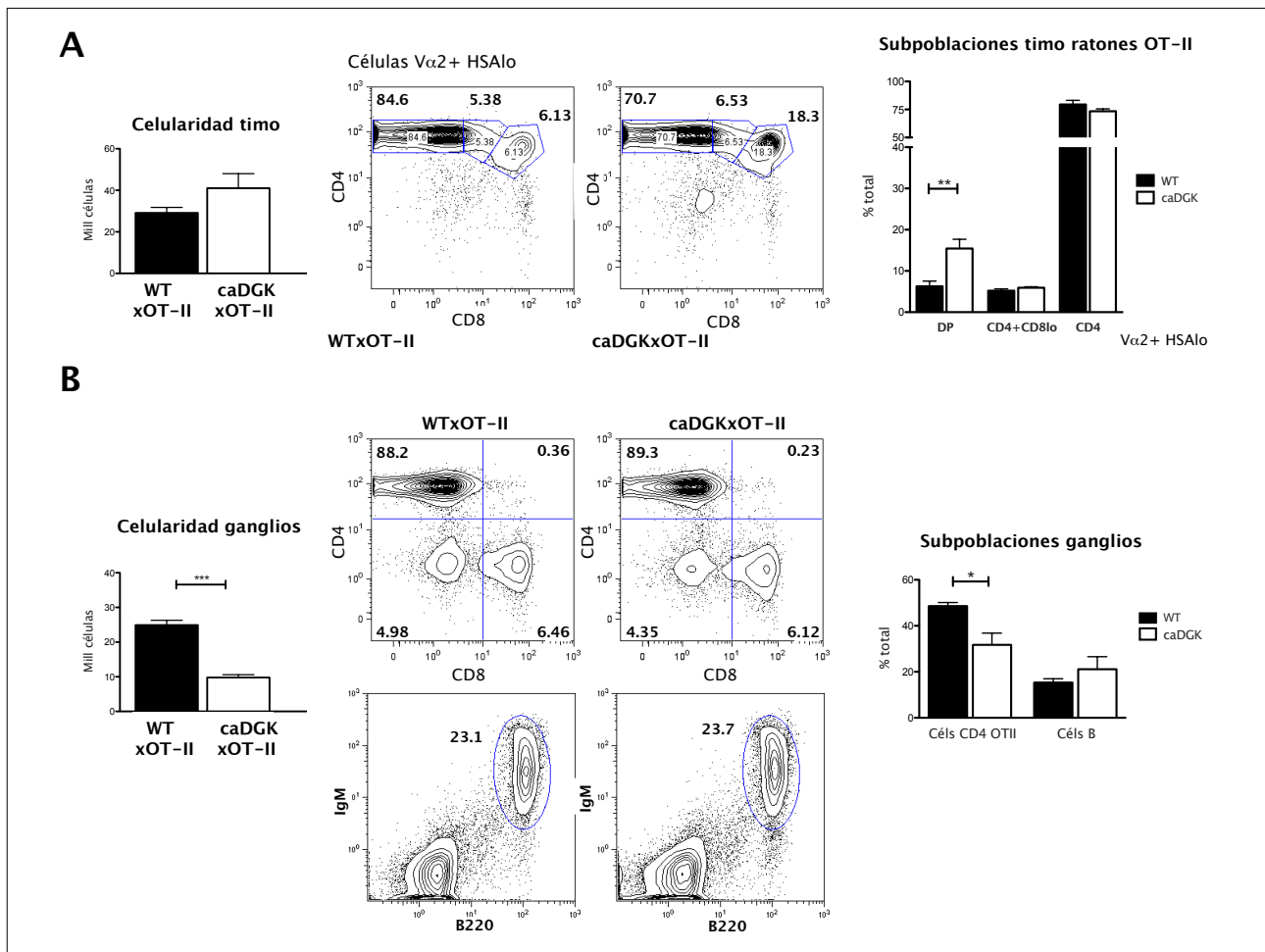


Fig R18: Estudio de la selección positiva de células CD4 en ratones caDGKxOT-II.
 (A) Análisis de la celularidad (izquierda) y poblaciones CD4 y CD8 en timocitos electrónicamente seleccionados Vα2+ HSAlo (centro y cuantificación derecha)
 (B) Los ganglios linfáticos de ratones control OT-II y transgénicos caDGKxOT-II se analizaron en su celularidad (izquierda) y poblaciones de células T y B, mediante anticuerpos específicos para marcadores CD4, CD8, B220, IgM y Vα2+ (histogramas centrales y cuantificación derecha)
 Los resultados corresponden a más de 3 experimentos en los que n=5; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Selección positiva y negativa en ratones caDGK.

La disminución de la celularidad de los timos, la distribución anormal de poblaciones y la menor expresión de marcadores como CD5 ó CD69 sugerían defectos en el proceso de selección positiva. La activación de Erk es esencial en este paso, por lo que decidimos ensayarla en nuestros timocitos transgénicos. Tras la estimulación de las células con antiCD3 y análisis por western blot comprobamos que la fosforilación de esta quinasa era menor en los timos de los ratones caDGK (fig R17A). Además cuantificamos la expresión de CD69 en la población DP específicamente (fig R17B).

Como medida adicional de selección analizamos las poblaciones con altos niveles de expresión de TCR (TCRhi): su expresión

aumenta en las etapas finales de desarrollo gracias a señales eficientes de selección. El análisis detallado de las poblaciones TCRhi demostró un desequilibrio hacia CD8 SP en los ratones transgénicos (fig R17C, histogramas y gráfica centro). El ratio de células CD4 TCRhi:CD8 TCRhi, que en situación normal suele ser 3:1 para el timo (fig R17C gráfica derecha control) disminuyó cerca de un 50% debido a esto.

La activación de Erk es deficiente en timos de ratones transgénicos caDGK. Las poblaciones CD4 y CD8 maduras se generan en proporciones diferentes en estos ratones.

Ya que es difícil estudiar selección en sistemas donde el repertorio de TCRs es tan diverso empleamos ratones transgénicos para el TCR para estudiar la selección de células DP hacia linajes CD4 ó CD8.

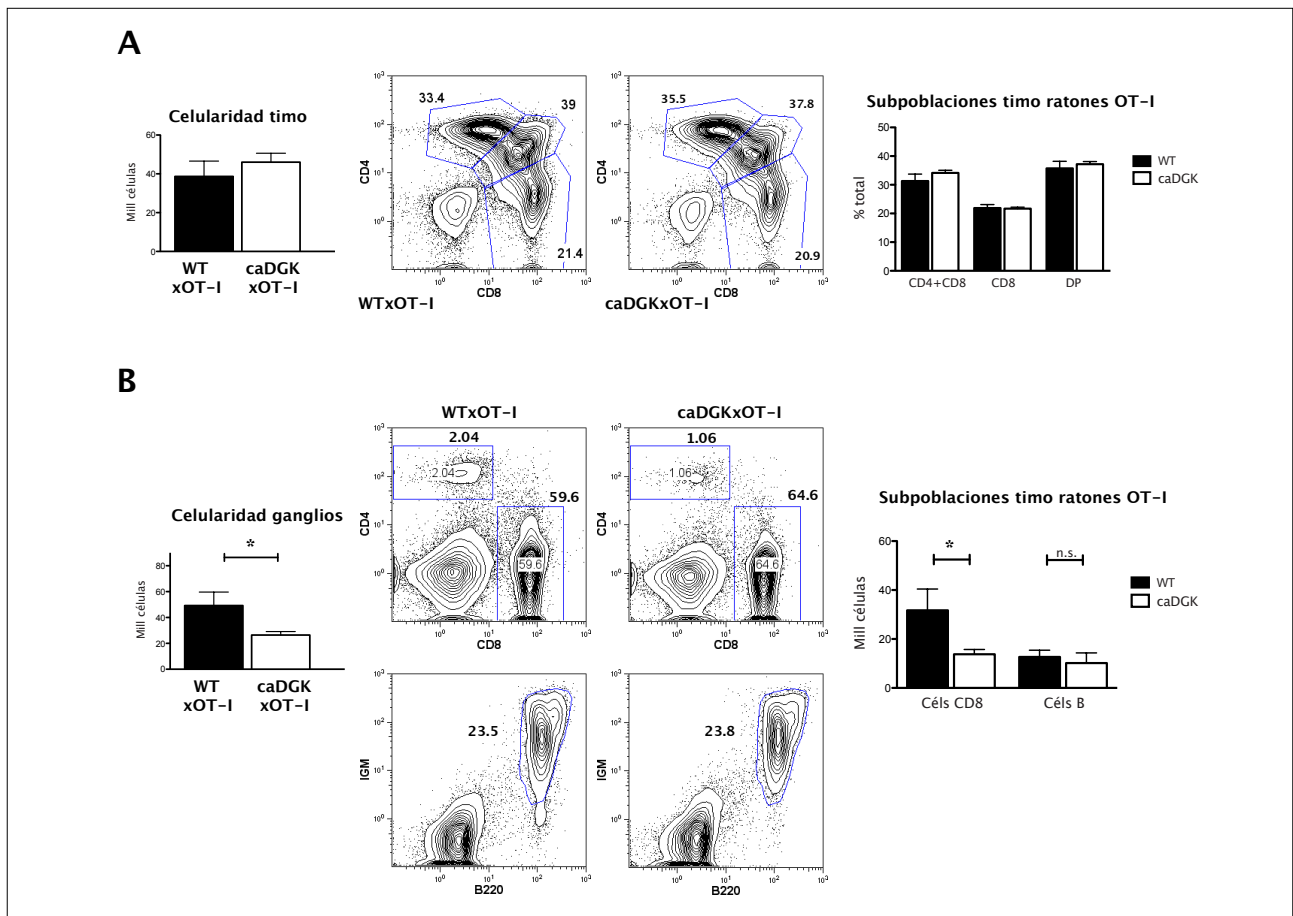
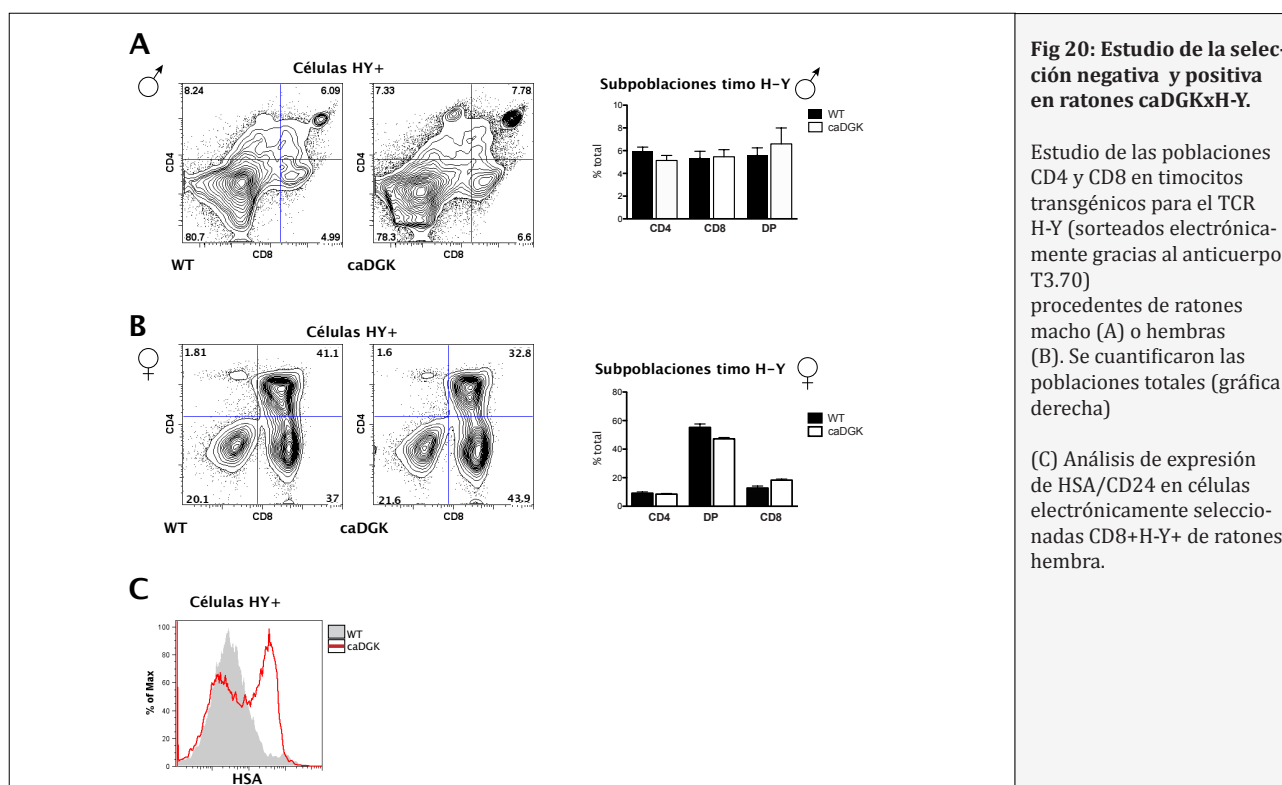


Fig R19: Estudio de la selección positiva de células CD8 en ratones caDGKxOT-I.
(A) Análisis de las poblaciones CD4 y CD8 en timocitos transgénicos para el TCR OT-I, electrónicamente seleccionados para Vα2+ (izquierda). Cuantificación de la celularidad de los timos (centro) y de las subpoblaciones (derecha)
(B) Los ganglios linfáticos de ratones control OT-I y transgénicos caDGKxOT-I se analizaron en su celularidad (izquierda) y en la distribución de poblaciones de células T y B (histogramas centrales y cuantificación derecha)
 Los resultados corresponden a datos de más de 3 experimentos en los que n=5; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.



Para estudiar el efecto del DAG en la selección positiva restringida por MHC de clase II (selección positiva de células CD4) usamos ratones OT-II, que expresan un TCR reorganizado de cadenas $V\alpha 2+$ $V\beta 5+$ específico para el péptido de la ovoalbúmina (30). El timo de los ratones caDGKxOT-II era ligeramente mayor en celularidad que los ratones control WTxOT-II. Al analizar las poblaciones de timocitos transgénicos para el TCR ($V\alpha 2+$) y más avanzadas en desarrollo (HSAlo) encontramos una acumulación de células DP en los ratones caDGKxOT-II en comparación con el control. Se observa también un ligero descenso en los CD4 SP producidos como consecuencia de esta parada parcial (fig R18A).

Este defecto tiene reflejo en los órganos periféricos de estos ratones: los ganglios linfáticos de los ratones caDGKxOT-II son muchísimo menores en tamaño y en número de células (fig R18B, gráfica izquierda) Esto se debe a un descenso en la población CD4, puesto que no encontramos alteraciones en otros linajes como células B (fig R18B, histogramas centrales y gráfica derecha)

La selección de células CD4 es menos eficiente en ratones que expresan caDGK que en ratones control.

De manera análoga al estudio de la selección de CD4s empleamos ratones OT-I, que expresan un TCR $V\alpha 2+V\beta 5+$ específico para un péptido restringido por MHC de clase I, para estudiar la selección positiva de células CD8 (177).

En este caso no vimos diferencias en los timos de ratones caDGKxOT-I en comparación con los controles (fig R19A). Sin embargo, sí observamos un descenso en la celularidad de los ganglios linfáticos debido, nuevamente, a un menor número de células CD8.

El TCR OT-I señala con gran fortaleza. Decidimos emplear otro modelo experimental que permitiera evaluar señales débiles selección positiva, para lo que hicimos uso de ratones H-Y, transgénicos para un TCR que transmite señales de menor intensidad (317). El antígeno para el TCR de estos ratones se expresa en el cromosoma Y, por lo que está presente en los individuos macho, produciendo fuerte reconocimiento en el timo y selección negativa, y ausente en los individuos hembra, generando selección positiva (225).

No observamos diferencias significativas en el timo de ratones macho caDGKxH-Y en comparación con controles H-Y (fig R20A).

En el caso de ratones hembra, donde se produce selección positiva de células CD8, el análisis de poblaciones totales DP/CD4/CD8 no mostraba diferencias entre individuos control e individuos caDGKxH-Y (**fig R20B**). Sin embargo, cuando analizamos en detalle la población CD8 pudimos comprobar que gran parte de estas células son inmaduras y expresan altos niveles de HSA (**fig R20C**). Esto indica que o bien estas células no han llegado al estadio DP y son intermedios de diferenciación desde DN o bien son células CD8 SP seleccionadas que no han terminado su proceso de maduración.

Estos resultados asemejan a los datos publicados de ratones RasGRP1-/- cruzados con ratones de TCR transgénico H-Y ó 2C, restringidos a clase II. En estos modelos se observan diferencias más acusadas en selección cuanto más débil señala el TCR expresado en transgénesis, de lo que se deduce el papel de RasGRP1 transmitiendo señales de baja intensidad (359). En ambos casos las cé-

lulas CD8 obtenidas presentan un fenotipo de inmadurez, por la expresión disminuida de CD69 o incrementada de HSA en superficie. El efecto observado en nuestros ratones caDGKxH-Y podría deberse, entonces, a una deficiente activación de RasGRP1 durante la selección positiva.

La selección negativa en ratones caDGK no está alterada. En el sistema H-Y de selección positiva los timocitos transgénicos caDGKxH-Y CD8 no aparecen modificados en sus porcentajes y números absolutos pero sí en su fenotipo, semejante a células inmaduras.

Estudio de las poblaciones preseleccionadas: DN e ISP

Tanto el análisis de marcadores de desarrollo de timocitos transgénicos caDGK como los datos de selección de hembras caDGKxH-Y presentaban células CD8 con

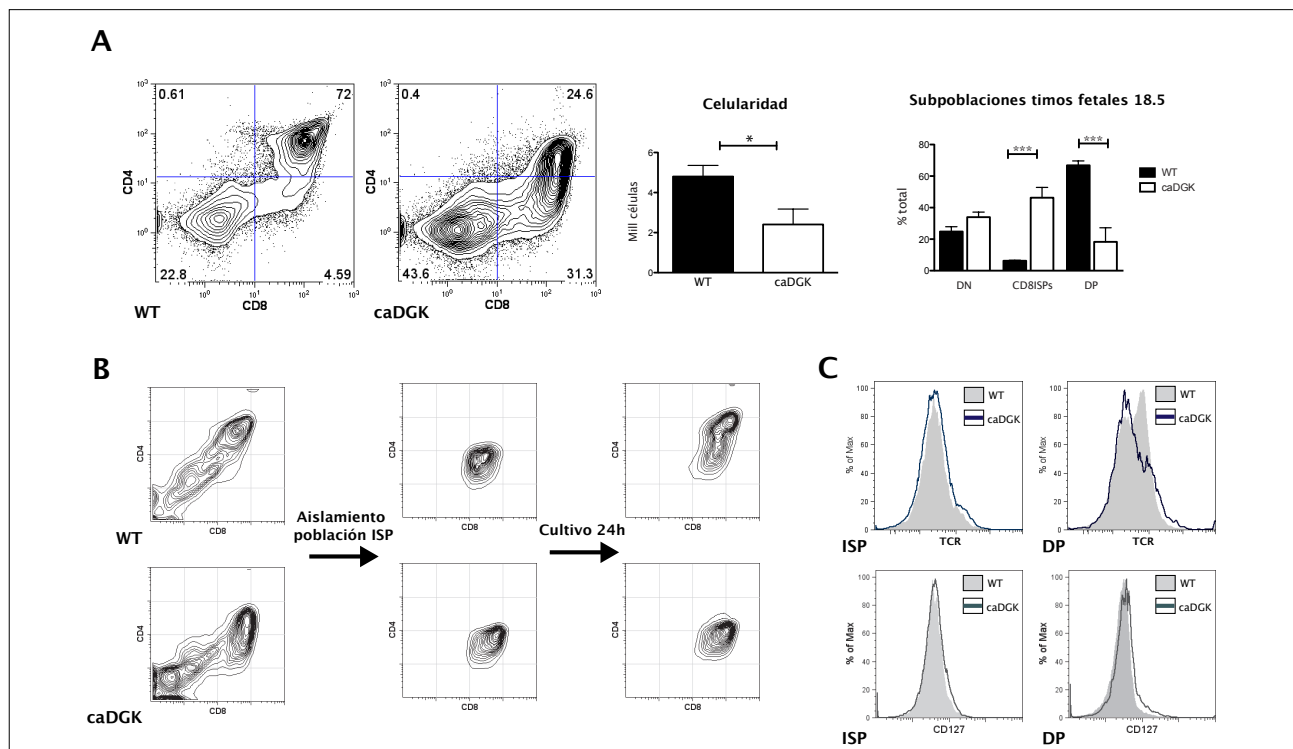
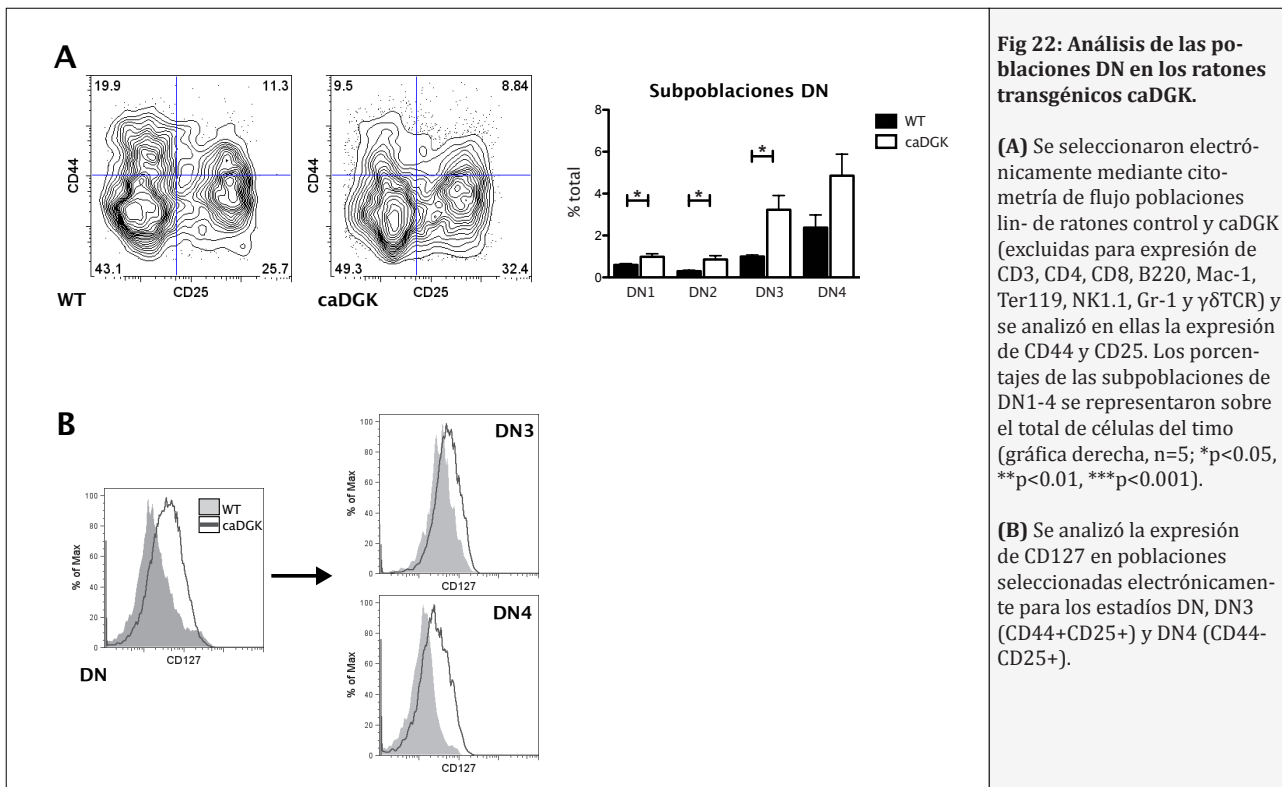


Fig 21: Diferenciación desde estadio DN a DP en ratones que sobre-expresan caDGK.

(A) Se aislaron timos fetales de embriones de día 18.5 y se analizaron los perfiles de expresión de CD4 y CD8 mediante citometría de flujo (izquierda). Se determinó el número total de células así como los porcentajes relativos de cada población (n=5; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001)
 (B) Las células ISP CD8+CD4lo se seleccionaron mediante FACS y se cultivaron durante 24h en medio completo. Al cabo de ese tiempo el perfil de expresión de CD4 y CD8 fue analizado de nuevo mediante citometría de flujo.
 (C) Se determinó la expresión de TCRαβ y CD127 en superficie en las poblaciones ISP y DP de timocitos fetales control y transgénicos caDGK.



fenotipo inmaduro. Nos preguntamos si esta población correspondía a células ISPs o células CD8 SP que no hubieran terminado su desarrollo. Las células ISPs son células en transición desde DN que inducirán la expresión de CD4 para alcanzar el estadio de DP (343, 436). El perfil característico de esta población (CD8+CD4^{lo}HSA^{hi}TCR^{lo}CD69^{lo}) asemeja mucho al obtenido de nuestro análisis detallado de subpoblaciones (fig R16). Por otro lado modelos animales con señales de Erk deficientes, como en nuestros timocitos transgénicos (fig R17A), presentan células CD8 SP inmaduras (45, 87, 264, 301).

Para distinguir si este defecto en nuestros transgénicos es previo o posterior al paso por el estadio DP analizamos timos fetales a día 18.5. En esta situación las poblaciones tímicas se distribuyen en DN, ISPs y DP; las poblaciones más maduras TCR^{hi} correspondientes a CD4+CD8^{lo} y SP no han aparecido aún (535).

Observamos que los fetos transgénicos tenían una distribución de poblaciones claramente alterada, con un gran aumento de CD8 ISPs a costa de la población DP (fig R21A, histogramas y gráfica central). Además la

celularidad de los timos fetales transgénicos estaba disminuida en más de un 50% (gráfica derecha).

Para comprobar si estas células ISPs habían perdido su capacidad de madurar las aislamos mediante la técnica de FACS y las cultivamos durante 16h en medio completo *ex vivo*. Si son capaces de progresar en desarrollo en estas condiciones comienzan a expresar CD4 y se convierten en células DP (52, 340, 552) y fig R21B paneles superiores). Al contrario que las células control, los ISPs transgénicos no son capaces de inducir CD4 y permanecen como población inmadura tras el cultivo (fig R21B paneles inferiores). De acuerdo con este resultado los DP transgénicos fetales se mostraron como células parcialmente inmaduras puesto que no eran capaces de aumentar al nivel del control la expresión de TCR (fig R21C histogramas superiores)

Como caracterización final de esta población medimos los niveles de CD127/IL-7R α : ratones que sobre-expresan en transgénesis en linaje T esta molécula muestran una acumulación de ISPs, por lo que quisimos estudiar si la expresión de este receptor

estaba aumentada en nuestros animales (552). Sin embargo no encontramos diferencias entre células control y transgénicas (fig R21C histogramas inferiores) siendo los niveles de receptor similares en ambos casos.

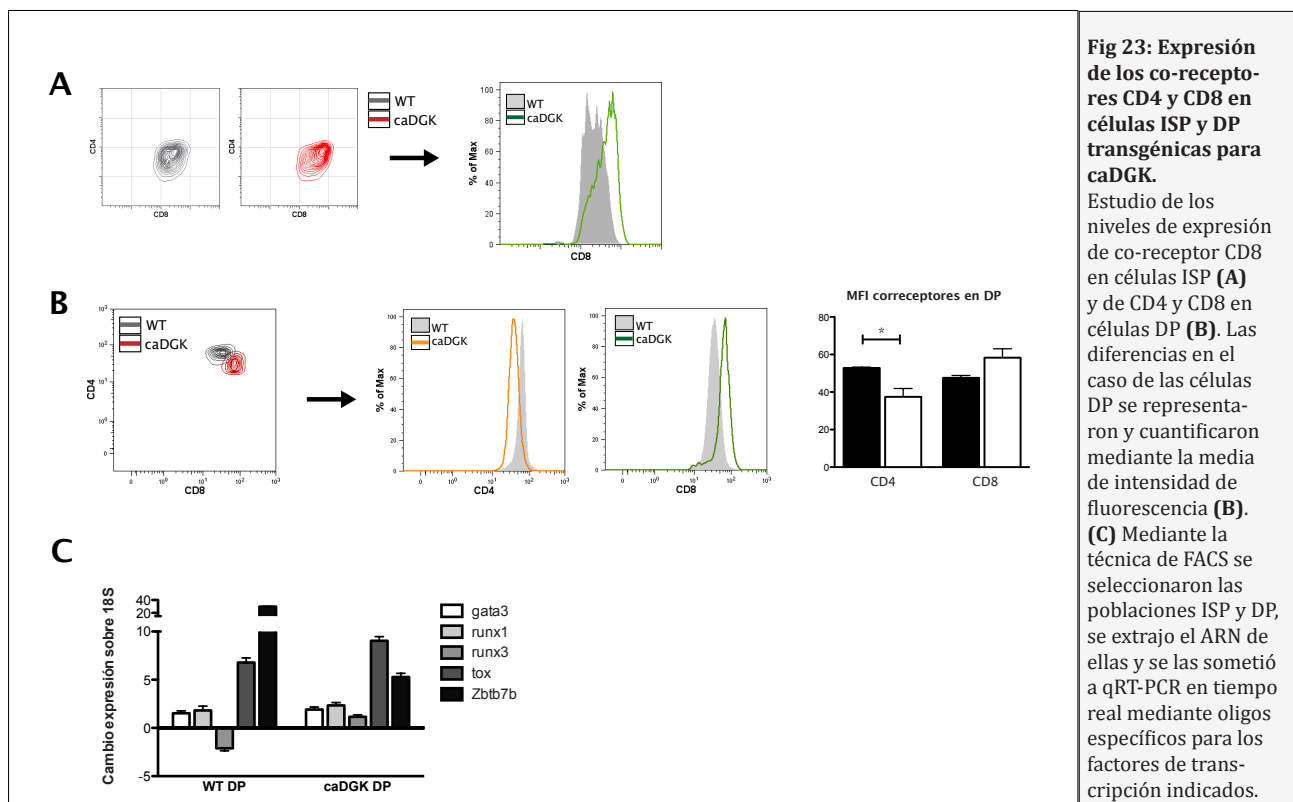
Los ratones transgénicos caDGK presentan una parada parcial en el estadio ISPs. Las células ISPs transgénicas no son capaces de inducir la expresión de CD4 ni de TCR adecuadamente.

Puesto que estas ISPs parecían normales en cuanto a la expresión de TCR e IL-7R α y tan sólo se veían aumentadas en número decidimos estudiar el paso previo a su generación, el estadio DN. En el análisis de poblaciones en timo postnatal de los transgénicos caDGK habíamos observado también un aumento en esta población (aproximadamente 20% del total en timos transgénicos frente a un 10% del control).

Los timocitos DN se subdividen en diversos estadios DN1-4 en función de la expresión de los marcadores de superficie CD44 y CD25 (141). Analizamos la distribución de estas poblaciones DN1-4 en los timocitos transgénicos mediante tinciones para estas dos moléculas de superficie en timocitos lin-

(excluidos electrónicamente por citometría para los marcadores CD3, CD4, CD8, B220, Mac-1, Ter119, NK1.1, Gr-1 y $\gamma\delta$ TCR). La distribución en porcentaje entre las poblaciones DN1-4 en los ratones transgénicos caDGK permanecían constantes aunque sobre la población total de timocitos todas estaban aumentadas debido al incremento total de DN; este incremento es notable en las poblaciones DN3 y DN4 (fig R22A, histogramas y cuantificación).

La acumulación generalizada de timocitos en el estadio DN nos llevó a pensar en alteraciones a lo largo del desarrollo de esta población. Uno de los factores esenciales de supervivencia en estas etapas es la señalización por IL-7; la cadena α de su receptor se expresa abundantemente durante las fases DN1-2 (97, 495), disminuyendo después su expresión hasta el mínimo en las células ISPs y DP, para permitir la transmisión de señales de supervivencia/selección en estas células únicamente por el TCR (463, 504). Cuando determinamos el nivel de IL-7R α /CD127 en la población DN de los ratones transgénicos caDGK encontramos que su expresión estaba aumentada con respecto a las células control; este efecto se observaba claramente en los



estadios de DN3 y DN4, donde la expresión de CD127 disminuye en ratones salvajes.

Los timos de ratones caDGK presentan una parada parcial en el estadio DN que corresponde principalmente a un incremento de las poblaciones DN3 y DN4. Estas dos subpoblaciones presentan niveles de expresión de IL-7R α aumentados.

Este incremento en la expresión en IL-7R α podría ser la causa de las paradas en DN y subsiguientemente en ISP. A pesar de que en este último estadio no hay cambios en los niveles de receptor, defectos acumulados por la persistencia de la expresión o señalización de éste previamente podrían provocar los defectos en el desarrollo de la población anterior. De hecho, y como se ha comentado anteriormente, la sobre-expresión en transgénesis de IL-7R α genera parada en este estadio.

Pero además el IL-7R α se ha visto implicado en la regulación de la expresión de CD8 tras la señal de selección positiva (339, 442). En nuestro caso esto cobra importancia porque durante el estudio tanto de timos postnatales como fetales nos dimos cuenta de que las células ISPs y DP procedentes de los ratones transgénicos parecían presentar diferencias en los niveles de co-receptores expresados (figs R15B, R17A, R21A y R21B). En el caso de las ISPs la expresión de CD8 era mayor en células transgénicas que en células control (fig R23A).

En las DPs se observaba un aumento de CD8 y una disminución de CD4 con respecto a células control (fig R23B) que se evidenciaba además en la superposición de los histogramas CD4 frente CD8 de dichas poblaciones (fig R23B). Cuantificamos estas diferencias mediante la intensidad media de fluorescencia y aparecieron significativas en el caso de los niveles de CD4. En el caso de CD8 aunque no fueron tan acusadas las encontramos también reproducibles (fig R23B).

De acuerdo a los experimentos realizados por otros grupos, una expresión persis-

tente de IL-7R α favorecería la aparición de aquellas poblaciones que expresan niveles altos de CD8, como son las ISPs y CD8 SP. De hecho, se sabe que el ratón deficiente en *Gfi1* (*growth factor independent-1*), represor que controla la transcripción de *IL7Ra* y por tanto con mayores niveles de expresión de esta molécula, aumenta selectivamente la diferenciación hacia linaje CD8 citolítico (554).

Finalmente analizamos si estas diferencias de expresión de co-receptor en DP correspondían con alteraciones en los factores de transcripción responsables de los locus *Cd4* y *Cd8* y de la elección de linaje. La transcripción de *Cd4* se ejerce gracias a la acción de los factores GATA-3, TOX, y ThPOK (8, 91, 171). La expresión de estos tres factores aumenta o se induce por señales de selección positiva en DP; las señales persistentes del TCR aumentan la expresión de ThPOK especialmente (170, 212, 410), que es necesario y suficiente para redirigir a los timocitos a linaje CD4 (466). En el caso de *Cd8* su transcripción se regula por la unión de Runx1 y Runx3 a sus elementos potenciadores (*enhancers*) (152, 483). Runx1 se expresa a partir de DN y Runx3 tras la selección positiva cuando se interrumpen las señales del TCR y comienza la señalización por IL-7 (105). Los factores Runx son capaces simultáneamente de silenciar el locus *Cd4* y el de ThPOK (*Zbtb7b*) y potenciar la transcripción del locus *Cd8* dirigiendo a los timocitos a linaje citotóxico (425, 483).

Mediante qRT-PCR en tiempo real analizamos los niveles de ARN mensajero de estos factores de transcripción en células DP. Encontramos que los timocitos transgénicos presentaban mayores niveles de Runx3 y menor inducción de ThPOK en comparación con timocitos control; este resultado concuerda con las medidas de expresión de co-receptores en estas células. Además por sí sólo este desequilibrio en la inducción de Runx3 y ThPOK a partir de esta etapa aumentaría la proporción de células CD8 final; las diferencias encontradas en poblaciones SP maduras en los ratones transgénicos caDGK es acorde a estos datos.

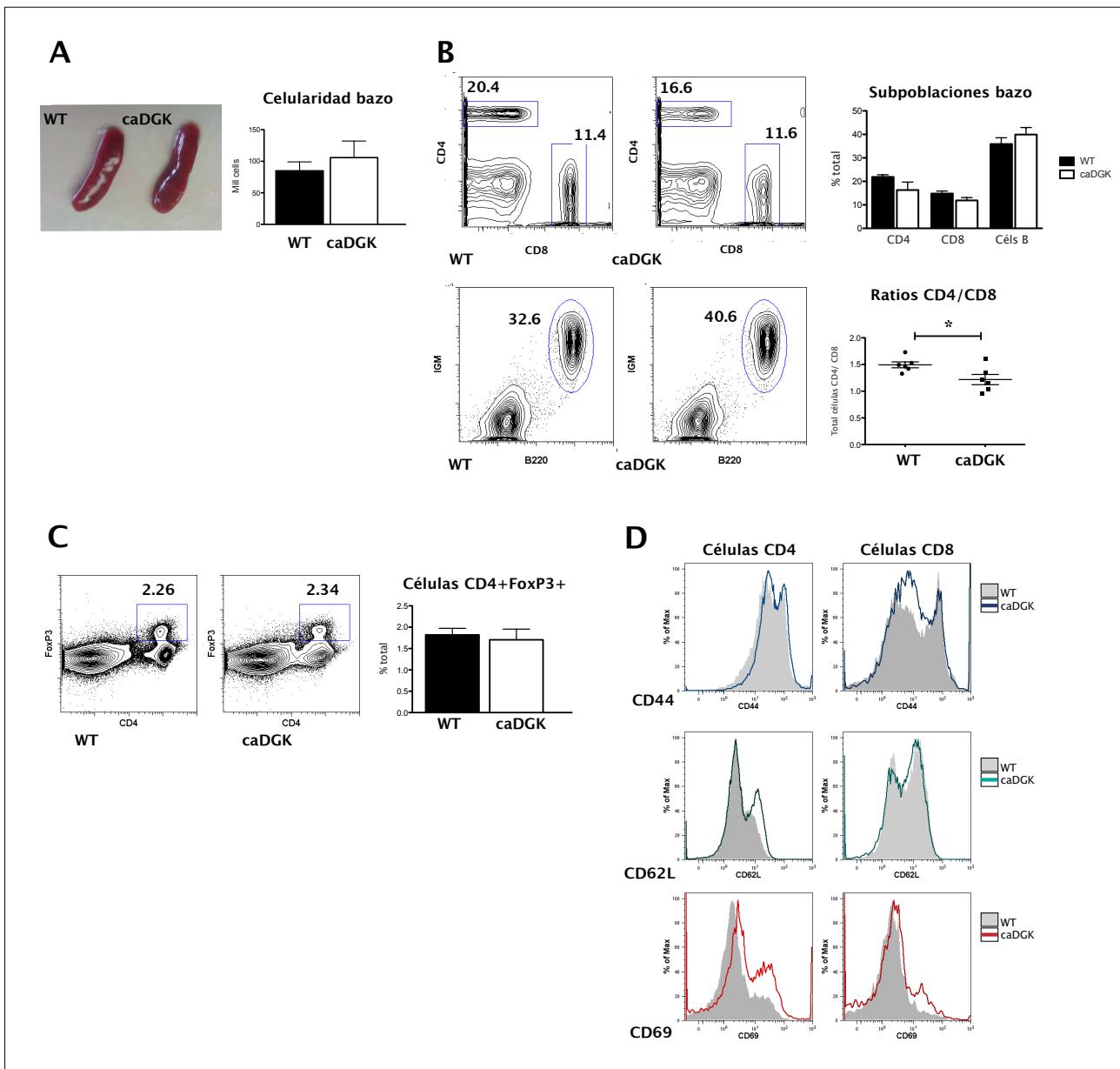


Fig 24: Efectos de la sobre-expresión de caDGK en linfocitos periféricos de bazo.

(A) Los bazos de ratones control y transgénicos caDGK se extrajeron, disgregaron y evaluaron en su celularidad.

(B) Se determinaron los perfiles de expresión de CD4 frente a CD8 y de IgM frente a B220, para cuantificar poblaciones totales de células T y B. Los valores totales se representaron (gráfica inferior izquierda) así como la relación entre linfocitos CD4 y CD8.

(C) Las poblaciones de células T CD4 reguladoras se analizaron en ratones control y transgénico mediante la expresión de FoxP3. Se cuantificaron en porcentaje sobre el total en ambos casos.

(D) Se estudió la expresión de las moléculas CD44, CD62L y CD69 tanto en linfocitos CD4 como CD8.

En todos los casos los datos provienen de experimentos independientes repetidos al menos 5 veces, donde n=5; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

En las etapas ISP y DP de timocitos transgénicos caDGK la expresión de CD8 está aumentada. En el caso de las DP, además, se produce una disminución de expresión de CD4. Coherentemente factores que favorecen linaje CD8, como Runx3, se ven incrementados en su expresión y factores que favorecen linaje CD4, como ThPOK, se ven disminuidos en estas células DP con respecto a los controles.

Efectos de la expresión en transgénesis de caDGK en los órganos periféricos.

Finalmente evaluamos el impacto de los defectos en desarrollo tímico encontrados en la homeostasis y funcionalidad de los linfocitos de órganos periféricos en los ratones transgénicos caDGK.

Los bazos de los ratones transgénicos caDGK no presentan cambios drásticos en

la celularidad ni en las distintas subpoblaciones de células T y B (fig R24A, R24B). Sin embargo, sí observamos cambios en el ratio de células CD4 frente a CD8, estando

disminuido éste en los ratones transgénicos. Esto es un reflejo de una mayor proporción de células CD8 maduras producidas por el timo, como ya habíamos determinado

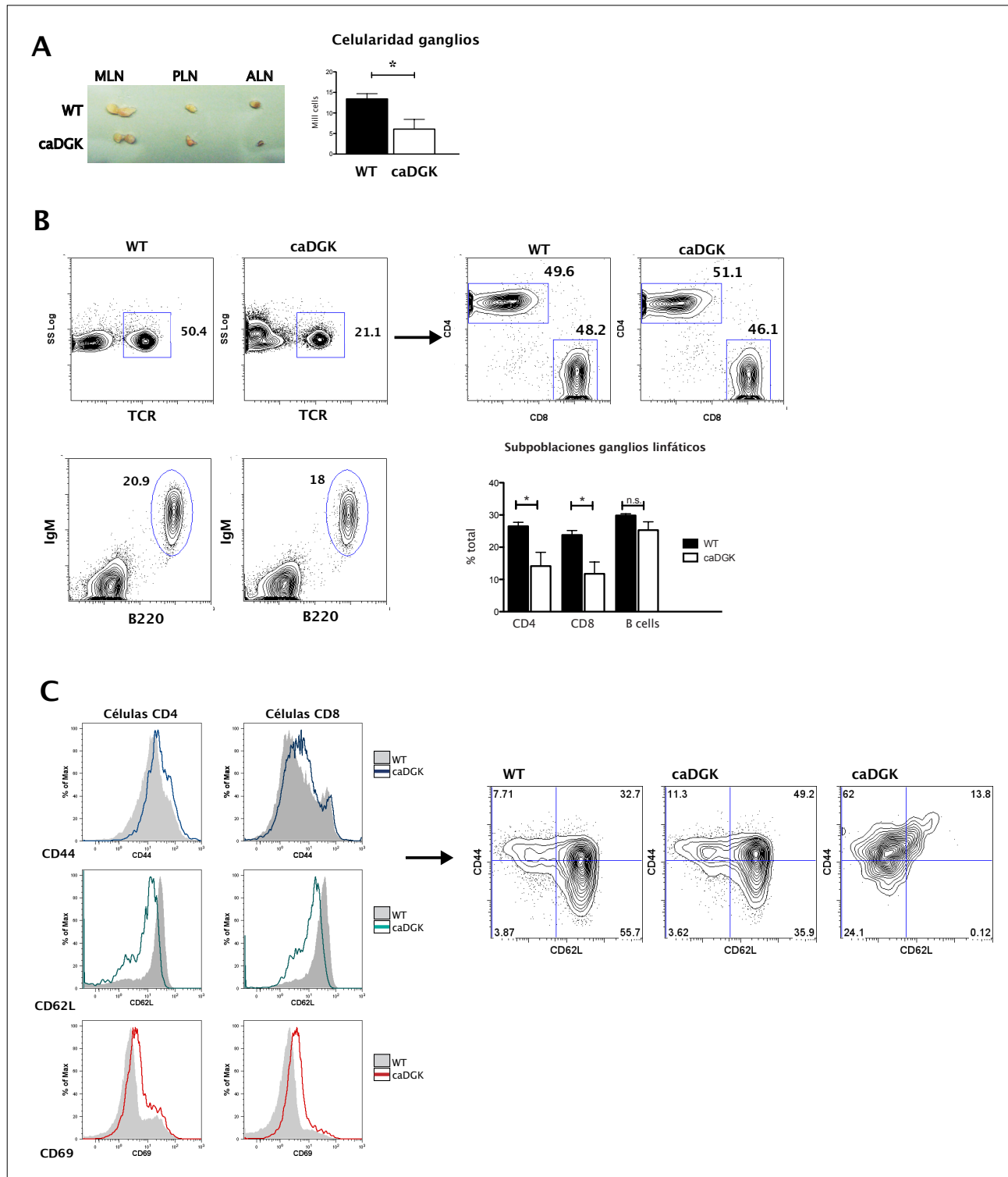


Fig 25: Efectos de la sobre-expresión de caDGK en linfocitos periféricos de ganglios linfáticos.

(A) Los ganglios linfáticos de ratones control y transgénicos caDGK se extrajeron, disgregaron y evaluaron en su celularidad.
 (B) Se analizaron los porcentajes de células T totales y se desglosaron en poblaciones CD4 y CD8 en el análisis posterior. Igualmente se analizó la cantidad de células B mediante tinción de IgM y B220 en superficie. Los valores se expresaron como porcentaje frente al total de las células de ganglios.
 (C) Se realizaron tinciones de CD44, CD62L y CD69 tanto en linfocitos CD4 como CD8.
 En todos los casos los datos provienen de experimentos independientes repetidos al menos 5 veces, donde n=5; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

previamente (**fig R17A**, ratio CD4 TCRhi/CD8 TCRhi) No encontramos diferencias en los porcentajes de células T reguladoras (CD4+Foxp3+) (**fig R24C**).

Caracterizamos las poblaciones CD4 y CD8 en bazo para ver si las diferencias observadas en timo se reflejaban en este compartimento: la expresión de TCR y CD3 en superficie era normal (dato no mostrado), y al estudiar los marcadores de superficie CD44, CD62L y CD69 no observamos grandes diferencias entre células control y células transgénicas, salvo un ligero aumento en la expresión de CD69 en ambos linajes, que podía reflejar cierto perfil de hiperactivación (**fig R24D**).

Los bazos de ratones transgénicos caDGK presentan proporciones alteradas de células CD4 frente a CD8; las poblaciones T presentan un leve aumento de CD69 en superficie.

A continuación estudiamos las poblaciones de células T presentes en ganglios. Aislamos los ganglios mesentéricos (MLN), poplíteos (PLN) y axilares (ALN) de ratones control y transgénicos caDGK y observamos una disminución en tamaño y celularidad de estos últimos (**fig R25A**). El análisis de poblaciones reflejó que este descenso se debía

a un menor número de linfocitos T, tanto CD4 como CD8s. El porcentaje de células B no se vio alterado (**fig R25B**).

En general, las células T que pueblan los ganglios son predominantemente poblaciones *naïve* o vírgenes, que no han visto antígeno y representan un lectura directa del proceso de desarrollo en el timo. Sin embargo las células T transgénicas caDGK mostraban evidentes diferencias en sus marcadores de superficie, con un aumento de la expresión de CD44 y CD69, marcadores de activación en periferia, y una disminución de CD62L/L-selectina (**fig R25C**). Este descenso de CD62L en superficie es también un fenómeno que acompaña la activación de linfocitos, y es necesario para redirigirlos desde los ganglios a los sitios de infección (160).

Este análisis de marcadores coincide con un fenotipo de las células T similar a células T de memoria (CD62loCD44hi) De hecho, en la representación de los histogramas de estos dos marcadores, se puede ver que las proporciones de células *naïve* (CD62LhiCD44lo) frente a células de memoria central (CD62LhiCD44hi) o células efectoras de memoria (CD62LloCD44hi) están alterados en los ratones transgénicos caDGK. En la mayo-

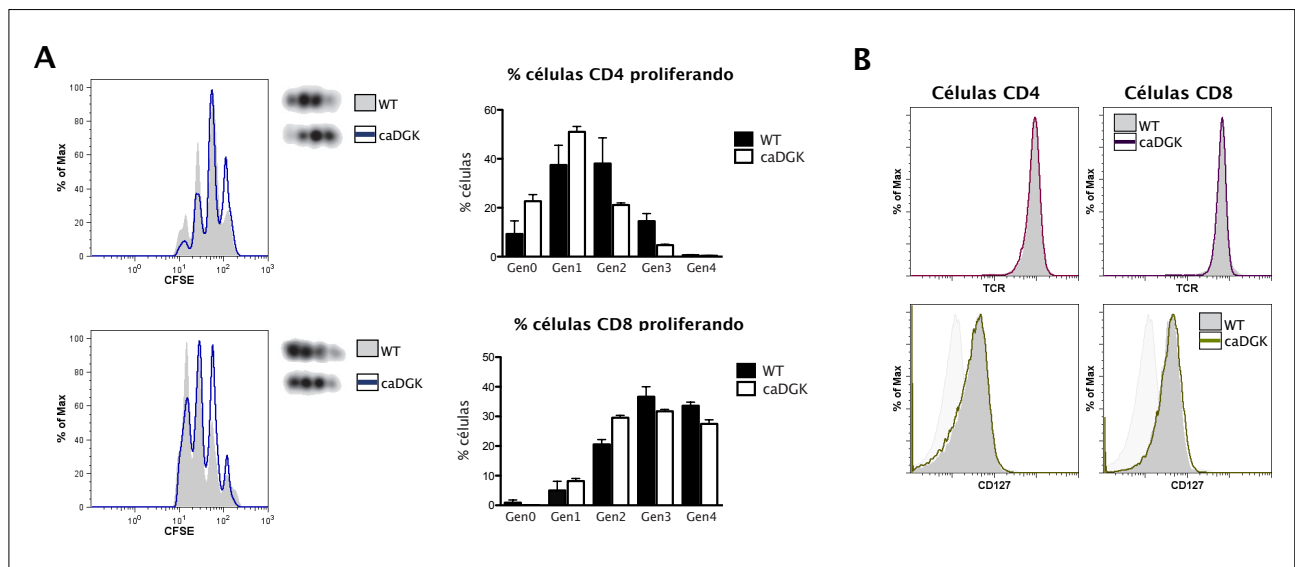


Fig 26: Estudio de las expansiones homeostáticas en linfocitos transgénicos caDGK.

(A) Se purificaron células procedentes de ganglios linfáticos de ratones control y caDGK, que se marcaron con CFSE y se inyectaron en ratones irradiados con dosis subletal. A los 13 días se extrajeron células de ganglios de los ratones receptores y se analizó la expresión de CD4, CD8 y CFSE (n=4)

(B) Mediante tinción de CD4, CD8, TCRαβ y CD127 se comprobó la expresión de estas dos últimas moléculas en superficie de linfocitos T.

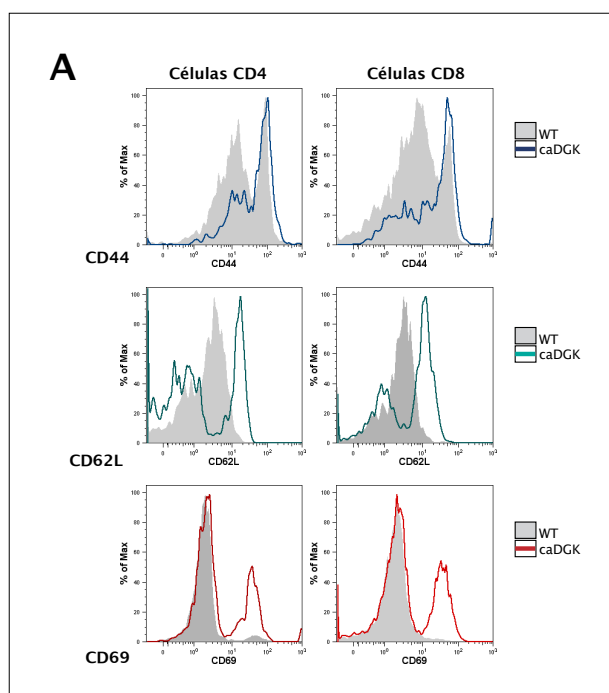


Fig 27: Efectos de la sobre-expresión de caDGK en linfocitos periféricos sanguíneos.

La sangre procedente de ratones control y transgénicos caDGK se procesaron como se describe (Materiales y Métodos) y la expresión de CD4, CD8, CD44, CD62L y CD69 se determinó mediante citometría de flujo.

ría de situaciones hay un aumento general de las dos últimas poblaciones a costa de células vírgenes, y en ratones muy afectados en su fenotipo el desbalanceo es claro hacia células efectoras de memoria (fig R25C paneles derecha).

Este fenotipo mostrado por las células presentes en ganglios es consistente con una situación de linfopenia o déficit en los números de linfocitos; hay muchas evidencias de que en situaciones donde las células T poseen espacio disponible se altera la homeostasis de éstas, ya que intentan dar una respuesta proliferativa y adoptan un fenotipo de memoria. Esto sucede, por ejemplo, en ratones deficientes en LAT, GADS, SLP-76, NFATc2/c3, y RasGRP1 (280, 358, 371, 452, 544). Para estudiar este fenómeno en más detalle, purificamos células T de ratones control y transgénicos caDGK, marcándolas con CFSE para seguir su proliferación tras su inyección intravenosa en ratones linfopénicos, irradiados con una dosis semi-lethal. Analizamos las poblaciones a los 13 días y vimos, mediante dilución de la sonda fluorescente, que las células T CD4 y CD8 procedentes de los ratones

transgénicos proliferaban a menor ritmo que las células control (fig R26A). Puesto que la homeostasis depende del reconocimiento de antígenos propios por el TCR y de señales de IL-7 comprobamos que los niveles de estos receptores no estaban alterados en nuestras poblaciones de linfocitos caDGK (fig R26B), de modo que estos factores no fueran los causantes de esta deficiente proliferación.

Así parece que estas células T transgénicas, a pesar del fenotipo de hiperactivación y de tener espacio disponible, son incapaces de señalizar eficientemente. De hecho, esta linfopenia no se recupera con el paso del tiempo, y aparece sea cual sea la edad de los ratones analizados (dato no mostrado). Además cabe destacar que los linfocitos periféricos de los ratones caDGK aún tienen expresión del transgén (fig R14F), lo que podría estar influyendo también en este resultado.

Finalmente examinamos las poblaciones T circulantes en sangre, PBLs (*peripheral blood lymphocytes*). Como hemos comentado, los ganglios están mucho más restringidos a ser colonizados con poblaciones vírgenes que el bazo, lo que podría explicar las diferencias en número y apariencia de las células T entre ambos compartimentos; de acuerdo con esto, linfocitos activados limitados en su entrada a ganglios deberían estar circulando en sangre. Para comprobarlo miramos marcadores de activación en PBLs; efectivamente las células de ambos linajes T en los ratones transgénicos caDGK presentan un perfil de hiperactivación de acuerdo con los perfiles de expresión de CD44 y CD69 (fig R27).

Los ratones transgénicos caDGK tienen ganglios linfáticos menores con una drástica reducción en células T. Además las poblaciones CD4 y CD8 presentan un fenotipo de células de memoria en base a sus marcadores de superficie; no obstante estas poblaciones están limitadas en su capacidad de expansión. Los linfocitos periféricos presentes en sangre también muestran expresión alterada de marcadores de activación.

Discusión

Durante el presente trabajo de investigación nuestra prioridad ha sido diseñar herramientas para el estudio de las funciones de DAG en linfocitos. En el momento de comenzar nuestro estudio, los datos existentes sobre las funciones de DGKs en sistema inmune provenían de líneas celulares (407-409, 563). El descubrimiento de RasGRP1, de su regulación por DAG y la generación del ratón deficiente de este GEF de Ras mostró necesario estudiar el papel del DAG en la señalización durante el desarrollo.

Por otro lado, en nuestro laboratorio se acababan de describir los dominios GFPC1s como sensores del DAG en células linfoides (66). El éxito en el funcionamiento de estas construcciones nos llevó a plantearnos su adaptación y uso en células primarias de ratón: en el estudio del desarrollo y activación del linfocito se han generado múltiples modelos animales, transgénicos para diversos TCRs, y la oportunidad de disponer de una herramienta que permitiera trabajar en cualquiera de estos sistemas nos pareció importante, así que desarrollamos los vectores retrovirales y proteínas recombinantes descritos.

En el transcurso de nuestro trabajo experimental se han descrito los ratones deficientes en DGK α y DGK ζ , y los dobles KO para estas proteínas (153, 330, 562), implicando a estas proteínas en desarrollo de timocitos, en activación de linfocitos e inducción de anergia; en este último caso se ha encontrado la conexión directa con el eje RasGRP1-Erk (556). Se ha analizado a fondo el fenotipo de los ratones RasGRP1 (75, 357, 358) y se ha profundizado en la regulación de esta proteína dependientes de DAG-PKC θ (386). En cuanto a los mecanismos de señalización en timo se ha propuesto la localización de los complejos señalizadores, con la participación de RasGRP1 en ellos, como determinante en la lectura final de selección positiva frente a

negativa (90), y el balance entre señalización por el TCR frente a señalización por citoquinas se ha evidenciado crítico en el proceso de elección de linaje (339, 340, 410).

Todos estos descubrimientos resaltan la importancia del DAG en la biología de los linfocitos T y permiten situar e interpretar nuestros resultados en un escenario plenamente activo en la caracterización de los mecanismos moleculares que dirigen los procesos de desarrollo y activación de los linfocitos.

Generación de DAG en las sinapsis de linfocitos

La estimulación del TCR produce la acumulación de DAG en las membranas celulares. Su tiempo de residencia allí y su concentración es determinante en su función como segundo mensajero, y depende de la regulación, en función del estímulo, de las enzimas que lo producen y lo degradan. Las dificultades bioquímicas para medir concentraciones de lípidos, la necesidad de estudiarlo en condiciones de polarización celular y en estructuras con una gran organización como son las sinapsis nos llevaron a intentar una aproximación experimental diferente y emplear los dominios C1 en células de ratón, de manera que pudiéramos estudiar este lípido en sinapsis de linfocitos T maduros, como son CTLs OT-I, y de células de timo.

En los linfocitos periféricos empleamos los dominios GFPC1bPKC θ , GFPC1RasGRP1 y GFPC1a+C1bPKC θ ; todas estas construcciones tienen gran afinidad por ésteres de forbol y diacilglicerol. El dominio C1aPKC θ es el único que presenta ciertas diferencias en residuos importantes para el contacto con el lípido; esto es general para los dominios C1a de las PKCs, cuya afinidad por los lípidos suelen ser menores que los C1b (434). No

obstante en el tándem GFPC1a+bPKC θ el dominio actúa de manera cooperativa favoreciendo la unión de DAG por el C1b ⁽⁶⁶⁾.

En situación basal todas estas construcciones permanecían localizadas en estructuras de endomembrana, de forma similar al patrón mostrado en células Jurkat ⁽⁶⁶⁾ y **fig R7**). Esto indica la gran cantidad de DAG existente en esas localizaciones subcelulares y la restricción de generación de este segundo mensajero en membrana plasmática en condiciones exclusivas de estimulación antigénica.

La presencia de DAG en membranas internas puede deberse a motivos estructurales o desempeñar una función biológica. El DAG confiere curvatura negativa e inestabilidad a las membranas y es necesario para los procesos de estrechamiento, formación de vesículas y fusión de membranas ⁽⁴³¹⁾. En este sentido es interesante observar que las estructuras a las que se unen los dominios GFPC1 en CTLs presentan un claro patrón vesicular, cuya naturaleza tenemos aún que definir; hasta el momento el DAG ha sido relacionado tan sólo con el proceso de formación de vesículas y no específicamente con su presencia en las bicapas de éstas ^(389, 395, 437, 508).

Además el DAG regula la unión y/o activación de proteínas que son importantes en estos procesos de vesiculación, como son la PKD o ARF-GAP ^(17, 278). Aunque PKD1 se localiza en sinapsis inmunológica o membranas plasmáticas en linfocitos T y B, no podemos descartar una función en la regulación del tráfico vesicular en estas células, al igual que se ha demostrado en otros sistemas. Recientemente nuestro laboratorio describió la función de DGK ζ en el tráfico vesicular en células T ⁽³⁷⁹⁾, lo cual confirma que tanto el DAG como las proteínas que lo regulan tendrán funciones importantes en estos procesos.

En situación de estimulación antigénica hemos observado una gran producción de DAG en sinapsis inmunológica medida por la localización de GFPC1bPKC θ tanto en CTLs

de ratón como en células Jurkat (**fig R2A y R8A**, respectivamente). La acumulación de este dominio en la zona de contacto es sostenida en el tiempo. En el caso del GFPC1RasGRP1 tan sólo vemos localización de esta construcción en la sinapsis en tiempos muy tempranos o en un porcentaje pequeño de los conjugados (**fig R2A**). El comportamiento diferente de estos dos dominios puede deberse a su afinidad por distintas especies de DAG: datos previos publicados por el laboratorio muestran que GFPC1bPKC θ se une preferiblemente al DAG generado mediante la hidrólisis del PIP₂ catalizada por la PLC, con alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados, mientras que el GFPC1RasGRP1 es más afín por el DAG que contiene ácidos grasos monoinsaturados o saturados y que se genera a partir de la fosfatidilcolina (PC) mediante rutas de síntesis *de novo* ^(66, 67). El hecho de que GFPC1RasGRP1 se transloque a sinapsis tan sólo en los momentos iniciales de la estimulación (experimentos de videomicroscopía, **fig R2A**) podría indicar la generación de este último tipo de DAG a tiempos cortos. Con los trabajos recientes que indican una activación de PLD por parte de LFA-1 esta hipótesis gana sentido; en el contacto inicial entre la célula presentadora y el linfocito se produce la interacción ICAM-1/LFA-1 que generaría DAG por la acción conjunta de PLD y PAP. El DAG generado por estas enzimas es distinto en composición al procedente de PLC y asemeja más al existente en membranas internas ⁽¹⁷⁴⁾. La interacción eficiente posterior de pMHC-TCR activaría a PLC γ 1 produciendo un DAG reconocible con mayor afinidad por GFPC1bPKC θ .

En experimentos previos en el laboratorio usando microesferas recubiertas de anticuerpo antiCD3 y antiCD28 se había visto que el GFPC1bPKC θ se acumulaba brevemente en la zona de contacto y difundía posteriormente por la membrana plasmática ⁽⁶⁶⁾. En nuestros sistemas de presentación antigénica encontramos una localización permanente del GFPC1bPKC θ en la sinapsis durante el tiempo que dura la estimulación. Esta acumulación puede deberse a una mayor activación de PLC que produciría de forma sostenida y lo-

cal DAG, a la acción de DGKs en el resto de la membrana plasmática fosforilando el lípido allí presente y “acotando” por tanto la zona de acumulación de éste a la zona de contacto entre las células, o a la combinación de ambos hechos. En nuestro caso en los experimentos de videomicroscopía no observamos ningún tipo de difusión del GFPC1bPKC θ a lo largo de la membrana plasmática, a pesar de la facilidad de DAG a hacerlo debido a su estructura (27, 431), lo que sugiere la participación de las DGKs en el proceso. De acuerdo con esto se ha descrito que la actividad DGK es necesaria para mantener esta concentración de DAG, producir la polarización del MTOC y generar las respuestas efectoras en las células CTL (364). La interacción entre el linfocito y la APC aportaría señales adicionales a la estimulación del TCR que regularían la actividad y localización de DGKs y explicaría, en nuestro caso, las diferencias de localización del GFPC1bPKC θ entre los distintos modos de estimulación.

Según nuestros resultados, la acumulación de DAG en sinapsis depende, además, de la intensidad de la señal transmitida por el complejo pMHC-TCR (fig R2). En estimulación con péptido antagonista/agonista débil la localización del GFPC1bPKC θ se ve drásticamente afectada en comparación con SIINFEKL. Con un péptido similar al que hemos empleado nosotros otros autores han descrito que señales débiles producen una menor fosforilación de Erk, localización de éste en cSMAC, y secreción de gránulos líticos en sinapsis de CTLs (201). La producción deficiente de DAG en estas condiciones podría estar directamente relacionada con todos estos hechos, por lo que sería interesante cuantificar estos parámetros en nuestro sistema. De igual modo, datos sobre actividad o localización de DGKs según la fortaleza de la estimulación o experimentos con nuestras sondas en linfocitos de ratones DGK α -/- y DGK ζ -/- podrían ser también muy informativos para entender la regulación de las respuestas efectoras de los CTLs.

Ya que el dominio C1bPKC θ se mostraba como un sensor muy eficiente del DAG pro-

ducido en sinapsis decidimos emplearlo para determinar la producción de este lípido en timocitos.

En estas células la contribución de la intensidad de la señal es esencial en el proceso de selección positiva o negativa. Sin embargo, la producción de DAG y la estructura y dinámica de las sinapsis en timo en estas condiciones están muy poco estudiadas. Estudios empleando sistemas de bicapas lipídicas capaces inducir selección positiva han descrito que las sinapsis que se forman en esta situación son descentralizadas y multifocales, con acumulaciones puntuales de MHC (155). Por otro lado, otro trabajo en el que se estudiaban localización de Lck y CD3 ζ en cultivos tímicos reagregados sugirió que las sinapsis en timo constan de un anillo central y otro periférico, de manera similar a sinapsis de linfocitos maduros, aunque a diferencia de éstas ni Lck ni CD3 ζ localizan claramente en la zona central, ni siquiera en casos de estimulación agonista que produce selección negativa (378). En ninguna de estas publicaciones se había analizado la activación ni la localización de proteínas situadas más abajo en la cascada de señalización, hasta que un estudio reciente empleó péptidos de diferentes afinidades con un sistema de estimulación soluble (tetrameros de MHC cargados con péptidos): en este caso péptidos de alta afinidad producen activación y localización de las proteínas en membrana plasmática (pZAP70, Grb2/Sos, Ras/Raf, RasGRP1, pErk) mientras que péptidos de baja afinidad, que dan señales de selección positiva, localizan todos estos complejos fosforilados y activos en membranas internas (90).

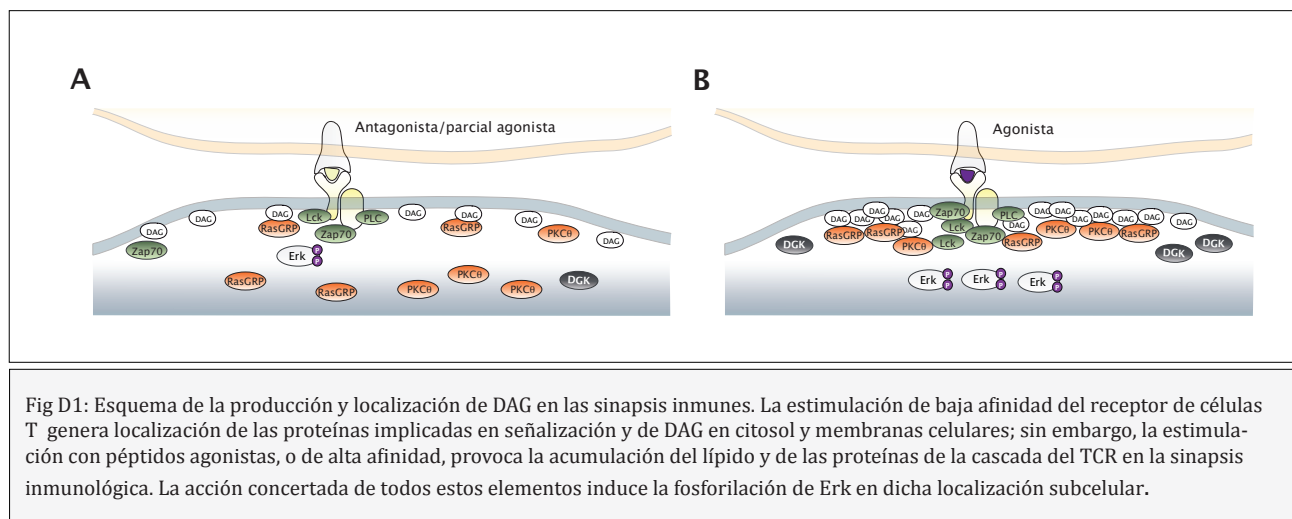
Estas controversias en cuanto a la estructura de la sinapsis y a la localización/activación de los complejos nos llevó a preguntarnos cómo se generaba el DAG y en qué localización subcelular concreta lo hacía. En nuestro sistema de presentación antigénica elegido, con timocitos conjugados con células EL4, las señales de selección positiva generan la localización de Lck, pZAP70, pPLC, DAG, PKC θ y pErk en membrana plasmática. La excepción en este caso la presenta Ras-

GRP1, capaz de localizarse parcialmente en sinapsis. El péptido agonista, que provoca selección negativa, localiza a todas las proteínas en la sinapsis (figs R3 y R4). Estas diferencias con respecto a los resultados de Daniels et al. pueden deberse, como se comentó en los resultados, al modo de estimulación empleado: el uso de APCs puede producir señales de coestimulación adicionales o internalización de receptores y complejos con cinéticas diferentes a las producidas con el empleo de estímulo soluble.

De especial interés es la localización de RasGRP1 que encontramos en sinapsis en condiciones de selección positiva: la débil activación de las cascadas de señalización con el péptido de baja afinidad que vemos en los experimentos de bioquímica (fig R3A) sugiere una sutil producción de DAG cuya acumulación no detectamos en la sinapsis

localización del GEF, RasGRP1, y de pErk, en esa localización subcelular. Esta localización de RasGRP1 en membrana plasmática, detectando concentraciones bajas de DAG, es acorde a los modelos matemáticos de la señal digital frente a analógica, en los que este GEF detectaría en concentraciones de DAG que le permitirían generar una respuesta gradual (condición de baja afinidad y selección positiva) o de “on/off” (alta afinidad y selección negativa) (72).

En cualquier caso, sería interesante ensayar nuestras sondas de DAG así como las proteínas reguladas por este lípido en condiciones de distintas intensidades de señalización y con otras aproximaciones experimentales y/o marcadores de sinapsis, con el fin de conciliar los datos existentes hasta el momento.



(fig R5C). No obstante, RasGRP1 es capaz de llegar a la zona de contacto en esta condición de señalización. La activación de Erk, más débil que en el caso del péptido agonista, se produce en cualquier caso a nivel de membrana plasmática; hasta el momento y en nuestras manos no hemos encontrado Erk activo en membranas internas en ninguna célula linfoide. De acuerdo con los últimos trabajos del campo, que emplean sondas capaces de detectar Ras activo endógeno, la activación de esta GTPasa por el TCR es exclusiva de membranas plasmáticas (392), lo que está de acuerdo con nuestros resultados de

DAG en cascadas de señalización del TCR

En nuestro estudio de la función del DAG en la señalización del TCR empleamos una aproximación de sobre-expresión de la quimera proteica caDGK para eliminar el DAG producido y afectar selectivamente a las vías de señalización reguladas por este lípido. Sin embargo, encontramos que la expresión ectópica de esta enzima produce una atenuación general de la señal del TCR, debido posiblemente a las interconexiones entre las distintas cascadas de señalización y los

mecanismos de retroalimentación negativa existentes en los procesos de transducción de señales.

Tras comprobar que la enzima diseñada se localizaba adecuadamente y presentaba actividad *in vitro* pasamos a estudiar el impacto en los distintos eventos subsiguientes a la estimulación del TCR. Las vías reguladas por DAG como son la activación de Erk y de PKC, estaban claramente afectadas en nuestras células que sobre-expresan caDGK.

Es interesante destacar que, en nuestro estudio, la regulación de DAG sobre sus proteínas diana no parece ejercerse a nivel de la localización subcelular de éstas: tanto PKC θ como RasGRP1 son capaces de llegar a la sinapsis cuando sobre-expresamos caDGK. Aunque la disminución de DAG tiene un gran impacto en la activación general de PKCs (**fig R9**), la actividad caDGK no afecta a la localización de PKC θ de la misma manera que lo hace con su dominio C1b aislado (**fig R8B y R9B**). En consonancia con esto, y como se ha comentado anteriormente, numerosos trabajos han demostrado que la localización de PKC θ depende de su anclaje a CD28 (40, 85, 222, 253, 355, 406, 499, 550).

En el caso de RasGRP1 su translocación a sinapsis parece independiente de la producción de DAG, como muestran los datos de localización de su dominio C1 (**fig R8C**) y de la proteína completa en ausencia de superantígeno (**fig R11B**). No obstante, mutantes del dominio C1 de estas proteínas muestran un acusado descenso en su actividad catalítica (440, 491) y datos no mostrados).

Por tanto, aunque se tiene la idea primitiva de que la función del DAG es localizar a sus proteínas diana, el estudio de mecanismos de activación de éstas pone de manifiesto que este concepto no es del todo acertado. La unión del DAG es más importante para la activación *per se* de PKC θ y RasGRP1 que para la mera localización de éstas, sugiriendo la importancia de otros mecanismos como proteínas andamio en la localización específica de estas proteínas a la sinapsis inmunológica. Esto sucede también en el

caso de la β 2quimerina, donde la resolución cristalográfica de la proteína mostró que el dominio C1 permanece oculto y que son necesarias señales previas que localicen a la molécula en la membrana y la dispongan en una conformación abierta que le permita unir el DAG de la membrana (62). No obstante, todas estas proteínas necesitan la unión de DAG para realizar su función una vez llegan a la membrana plasmática, como reflejan nuestros datos.

En el análisis de la activación de Erk mediada por RasGRP1 sorprende la falta de defecto en la activación de Ras medida mediante ensayo “*pull-down*”. Los linfocitos muestran una gran dependencia de producción de DAG para la activación de esta vía, dato que parece corroborado por la gran bajada en la fosforilación de Erk en células que sobreexpresan caDGK. De hecho, el control que el DAG ejerce sobre la activación de RasGRP1 es doble, por la unión al GEF directamente y por la fosforilación mediada por PKC θ (386). Por tanto es necesario examinar este parámetro más a fondo, mediante ensayos de carga de Ras específicos de isoforma, o mediante las sondas GFP-RBD diseñadas para ensayar activación y localización de Ras-GTP endógeno.

La sobre-expresión de caDGK refleja un leve descenso de la fosforilación de proteínas tirosina quinasa, lo que trae como consecuencia un defecto en la activación final del linfocito, medido como expresión de CD69. Es de esperar que la disminución del DAG, como segundo mensajero, afecte a efectores situados por debajo de él en las cascadas de señalización celulares. No obstante, la existencia de mecanismos reguladores negativos y positivos pueden explicar estos hechos. Se sabe que existe un bucle de retroalimentación positiva de Erk sobre Lck: Erk activo fosforila a Lck en su residuo S59 (421, 519). Esta fosforilación disminuye la movilidad electroforética de la proteína y hace aparecer una banda de mayor peso molecular detectable mediante SDS-PAGE y western blot (528). La fosforilación de este residuo previene de la unión de la fosfata SHP-1 a Lck, y esta competición por la S59 de Lck entre Erk y SHP-1

regula la actividad de esta Src quinasa (460).

De hecho la participación de SHP-1 en este proceso es interesante puesto que se ha descrito que la unión de lípidos aniónicos, como el PA, estimula su actividad fosfatasa (124). La activación de DGK α por señalización del TCR podría a su vez inducir la activación de SHP-1 y realizar ambas una acción conjunta de apagado de la señal. DGK atenuaría la activación de Erk, disminuyendo la regulación positiva de esta MAPK por Lck, y dejando disponible el sitio de anclaje S59. Al mismo tiempo, DGK activaría SHP1 por la generación de PA, que tendría disponible la S59 para unirse y ejercer su función reguladora negativa. De esta manera ambos mecanismos reguladores negativos se pondrían en marcha al mismo tiempo.

En nuestros resultados podemos observar que la sobre-expresión de caDGK produce una menor fosforilación de Lck, medida como aparición de la banda de peso molecular superior (fig R13B). Esto puede deberse a cualquiera de las dos causas expuestas anteriormente, bien por la activación ineficiente de Erk o bien por la regulación positiva de SHP-1. En cualquier caso, el defecto en fosforilación de Lck explica el descenso general en las subsiguientes fosforilaciones de ZAP70, LAT y PLC γ 1. En el caso de la activación de PLC γ 1 esta bajada es más evidente: su fosforilación en la Y783, descrita como lectura de su activación, está reducida a la mitad en condiciones de estimulación soluble (fig R13A). La regulación de PLC depende no sólo de su reclutamiento por LAT sino de otras proteínas situadas más abajo en la cascada de señalización, como GADS, SLP-76 e Itk (49, 114), por lo que el descenso más acusado en su activación puede deberse a un efecto acumulativo de estos dos hechos. Sin embargo, esta bajada no parece ser tan acusada como para mostrar defectos evidentes en la movilización de calcio (fig R7B), por lo que cabe suponer que las vías situadas por debajo de este segundo mensajero no están afectadas.

De estos resultados se deduce que la dis-

minución de un segundo mensajero central como es el DAG tiene como consecuencia la atenuación de la señal del TCR y el aumento del umbral de activación de los linfocitos que sobre-expresan caDGK.

Función del DAG en desarrollo y homeostasis de las células T

Durante el proceso de desarrollo los linfocitos existen dos eventos esenciales de señalización: por el preTCR, que regulará la transición de las células DN a DP, y por el TCR $\alpha\beta$ CD4CD8, encargado de la progresión desde DP a SP y de generar células maduras y funcionales. Una vez que éstas se encuentran en periferia, su supervivencia depende de la transmisión de señales homeostáticas por TCR $\alpha\beta$ -CD4/CD8 y su funcionalidad de señales de activación por el mismo complejo. En todos estos casos, uno de los segundos mensajeros esenciales generados es el DAG; nos dispusimos a estudiar la función de este lípido en cada una de estas situaciones mediante la expresión en transgénesis de caDGK.

Los ratones caDGK presentan una evidente linfopenia en periferia, reflejo de un acusado descenso de la celularidad de los timos transgénicos. Este defecto se debe tanto a la acumulación de poblaciones inmaduras (DN e ISPs) como a los defectos en selección de las poblaciones posteriores.

Señalización del preTCR e IL-7 y efecto de la sobreexpresión de caDGK.

El hallazgo más notable en nuestros ratones transgénicos caDGK es la parada en ISPs, población en transición desde el estadio DN a DP. Esta población, minoritaria en porcentaje en timos postnatales, se ha visto incrementada en grandes proporciones en los timos transgénicos. Los experimentos en timos fetales han evidenciado esta acumulación. Estas células ISPs son incapaces de progresar en desarrollo ya que no inducen

expresión de CD4 (**fig R21A**). En contadas ocasiones se ha observado esta parada en otros modelos animales: tan sólo en ratones que sobreexpresan el factor de transcripción TOX ⁽⁹⁾ y en ratones transgénicos para IL-7R α ⁽⁵⁵²⁾.

TOX es un factor de transcripción con una caja HMG (“*High-Mobility Group*”). Los factores con estos dominios operan uniéndose al ADN y alterando la estructura de la cromatina, permitiendo el acceso de otros factores de transcripción. En el caso de TOX, esta alteración del plegamiento del ADN es indispensable para que los factores Runx ejerzan su función ⁽³²⁾. Nuestros ratones caDGK tienen levemente incrementados los niveles de TOX en la población ISP, aunque el aumento en los niveles de ARN mensajero son más evidentes en las células DP transgénicas (**fig R23C**). Aunque desconocemos hasta el momento la causa de este hecho, esto podría generar la mayor expresión de CD8 en nuestros timocitos: de hecho los ratones que sobreexpresan TOX tienen gran número de células CD8 ISPs y CD8 SP, como los ratones transgénicos caDGK.

En el caso del receptor de IL-7, las células ISPs caDGK no presentan niveles alterados de su receptor (**fig R21C**). Sin embargo, si miramos en estadios previos observamos un ineficiente apagado de la expresión de IL-7R α /CD127 en DN3 y DN4, acompañado de una parada parcial de los timocitos transgénicos en estos dos estadios (**fig R22**). La transición de DN3 a DN4 implica superar eficientemente la señalización del preTCR y selección β : en este punto son importantes tanto la señalización por Ras-Erk-Egr1 ^(87, 115, 229, 298, 301) como por PI3K-Akt ^(210, 411, 412). Cabe la posibilidad de que la expresión de caDGK está afectando durante la señalización del preTCR el encendido de estas vías, como muestran nuestros datos bioquímicos de sobre-expresión en líneas celulares (**fig R10A y R12A**). Aunque en general los defectos de señalización durante selección β generan exclusivamente parada en DN3 ^(81, 87, 302, 351, 559) y la disminución de expresión de IL-7R α no depende de la señalización del preTCR, sino

de la progresión en desarrollo de los timocitos ⁽⁴⁷⁸⁾, futuros experimentos evaluarán esta posibilidad.

De hecho el aumento de expresión de IL-7R α es un hecho interesante que no se ha visto en ninguna otra de las modificaciones genéticas que afectan a la señalización del preTCR. Varios hechos relacionan este incremento en los niveles en superficie de IL-7R α con el fenotipo de los ratones caDGK: en primer lugar, ratones deficientes en Gfi1, represor del promotor de *IL7RA*, tienen una redirección de las poblaciones hacia linaje CD8 tanto en timo como en periferia ⁽⁵⁵⁴⁾, muy similar a la que encontramos nosotros; además, la señalización por IL-7R α controla negativamente la expresión de los factores TCF-1, LEF-1 y ROR γ , necesarios para promover la transición de ISPs a DPs ⁽⁵⁵²⁾; finalmente, las señales de IL-7R α tras la selección positiva están ligadas a la activación de los factores Runx, esenciales en la elección de linaje CD8 ^(339, 340).

Por todo esto sería interesante analizar en más detalle los efectos de esta expresión alterada de IL-7R α , que se puede deber a dos hechos fundamentales: o el transgén bloquea la señalización de IL-7, que en condiciones normales ejerce un control negativo sobre la expresión de su receptor ⁽³⁴¹⁾, o el transgén mantiene la señalización por IL-7R α a pesar de la señal moduladora negativa de IL-7. El análisis de la fosforilación de STAT5 como efector del receptor así como de la inducción de los factores TCF-1, LEF-1 y ROR γ nos ayudarán a comprender los mecanismos que median esta parada en ISP en los ratones caDGK.

En resumen, todas estas observaciones sugieren que los niveles de DAG sean quizá necesarios para definir el estado metabólico del timocito y que éste progrese de forma adecuada en estas primeras etapas del desarrollo, de manera independiente de la producción de DAG por el preTCR. Se sabe que los timocitos DN tienen un umbral de activación más bajo que los DP ⁽¹⁵⁶⁾, y que las poblaciones DP preseleccionadas tienen una

mayor facilidad para activar la vía de Erk (131). Los niveles de DAG podrían contribuir a todo esto; de hecho, hay que destacar que en estas etapas en las que vemos estos defectos no hay expresión de DGK α (333). En este sentido nuestra aproximación experimental permite discernir efectos adicionales del DAG con respecto a los observados en ratones deficientes en DGKs.

Señalización del TCR en células DP: efecto de la disminución de DAG en selección y linaje.

El otro hecho notorio en los timocitos transgénicos caDGK es el defecto en el proceso de selección positiva de las células DP: las células transgénicas presentan menores niveles de Erk activo y la población DP CD69+ es menor en los ratones caDGK (fig R17A). Además los CD4 SP se seleccionan ineficientemente o con menor frecuencia que las CD8 SP, según el análisis de las poblaciones TCRhi (fig R17B). Para corroborar estos defectos de selección de poblaciones restringidas por MHC de clase II empleamos los ratones transgénicos OT-II, confirmando la ineficiente selección de CD4 tanto en timo como en periferia (fig R18). Sin embargo, en los porcentajes totales de poblaciones no observamos un descenso en CD4 SP en los timos transgénicos, a pesar de que sí existe un “vacío” en la población precedente CD4+8lo (fig R15B); esto puede deberse a que las células que son capaces de avanzar en el desarrollo han perdido la expresión del transgén parcial o totalmente y son capaces de evadir estos defectos. Estamos realizando experimentos intentando optimizar las tinciones de CD2 en timo para comprobar esta hipótesis.

La selección de las células CD8 (CD8 TCRhi) se ve favorecida en los ratones transgénicos caDGK (fig R17B). Al analizar en hembras H-Y las poblaciones transgénicas caDGK encontramos un aumento importante de células CD8 inmaduras (HSAhi) (fig R20B,20C). En los ratones caDGKxOT-I no encontramos diferencias en timo, aunque sí

hay un descenso de linfocitos T en periferia (fig R19). Estos resultados obtenidos se asemejan, con un fenotipo menos severo, a los estudios de selección de poblaciones restringidas por MHC de clase I en ratones RasGRP1-/- (359). Así tanto en los ratones caDGK como en los KO de RasGRP1 la señalización por DAG se muestra especialmente relevante en la transmisión de señales débiles del TCR, puesto que los defectos en selección que observamos se aprecian de manera más evidente en ratones H-Y que en ratones 2C u OT-I.

Este alto porcentaje de células inmaduras en las hembras H-Y pueden ser falsas ISPs, al no disminuir los niveles de HSA pero expresar prematuramente en transgénesis el TCR. Por otro lado, también se ha implicado a la activación de Erk en la maduración final de los CD8SP, por la existencia de células inmaduras CD8 TCRmed en modelos en los que la señalización por Erk estaba afectada (45, 87, 264, 301). Sin embargo en estos trabajos no se ha determinado si estas células son pre o post-selección (HSAhi o HSAlo) y tan sólo se han medido los niveles de expresión de TCR; estos resultados deberían ser reevaluados para distinguir entre las implicaciones de la activación de Erk en la transición DN-DP frente a DP-SP.

En cualquier caso, los defectos en selección y el desequilibrio entre las poblaciones CD4 y CD8 en los ratones caDGK son consistentes con los datos publicados hasta la fecha sobre DGK/RasGRP/Ras/Erk: los dobles KO de DGK α DGK ζ , los ratones deficientes en RasGRP1 y Erk y los modelos de ganancia o pérdida de función de Ras muestran todos defectos en selección positiva (115, 153, 359, 472). Además, de acuerdo con el modelo de “cinética de la señalización” en la elección de linaje, las señales continuas de esta vía son necesarias para la selección de células CD4: así se ha visto en el caso de RasGRP1 y Erk, donde la pérdida de función de estas proteínas favorece la aparición de CD8 SP en proporciones mayores (356, 428, 429), de manera similar a lo que sucede en nuestros ratones caDGK.

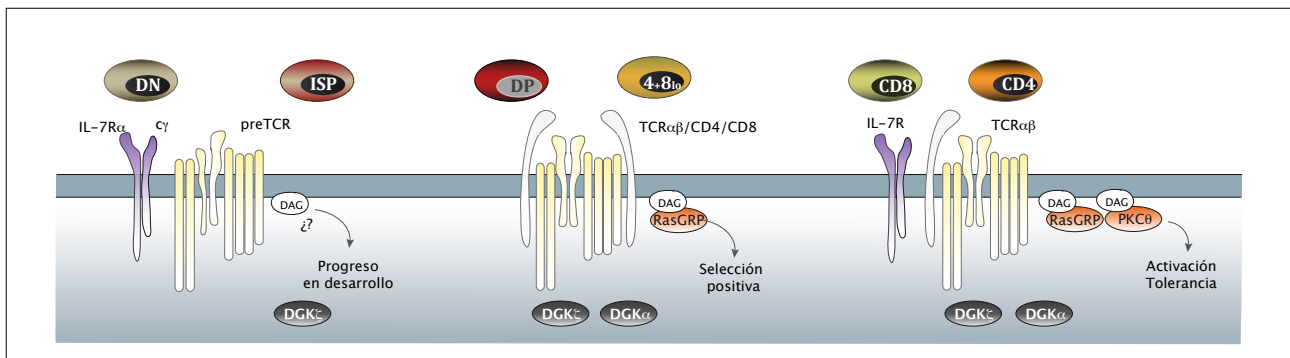


Fig D2: Señalización por DAG durante el desarrollo y activación de linfocitos T. Las señales del preTCR, TCR DP y TCR maduro producen DAG. La expresión de las DGKs regula las funciones señalizadoras o metabólicas del lípido en cada caso, en términos de activación de RasGRP y PKC en selección tímica y activación de linfocitos periféricos y jugando un papel por determinar aún en timocitos DN.

Curiosamente, y apoyando esta idea de la necesidad de DAG en la selección de poblaciones, nuestros ratones *caDGK* muestran también defectos similares a los ratones deficientes en *Itk*. En estos animales existen defectos en señalización del preTCR que producen la disminución de la población DP (270); además hay menos células SP maduras (255), la selección de células CD4 está inhibida aunque sin experimentar redirección de linaje hacia CD8 (269), la población CD8 SP se ve por tanto favorecida y como consecuencia los ratios CD4:CD8 alterados (256). Mecánicamente, *Itk* es la encargada de fosforilar a *PLCγ1* (54, 566), y este hecho es crucial para la activación de esta lipasa (263, 415), por lo que estos defectos son reflejo también de una ineficiente producción de DAG. Es interesante que los ratones deficientes en *Itk* tienen aumentadas las poblaciones de linfocitos iNKTs e IELs ($CD8\alpha\alpha$), con características innatas, tanto en timo como en periferia (24, 186). Estas poblaciones están disminuidas en los ratones *TOX*^{-/-} (7), por lo que serían interesantes evaluarlas en nuestros transgénicos, dados los paralelismos en ellos y los modelos animales *Itk*^{-/-} y que sobre-expresan *TOX*.

Homeostasis de linfocitos periféricos en los ratones *caDGK*

Finalmente, los defectos en la selección en timo en los ratones *caDGK* tienen consecuencias importantes en las poblaciones de periferia, donde la proliferación inducida por la linfopenia (LIP) produce el fenotipo

de hiperactivación que muestran las células CD4 y CD8 (478). Los modelos animales que muestran este fenotipo presentan todos deficiencias en señalización del TCR y, a pesar de la expresión de marcadores de activación en superficie, sus linfocitos no son capaces de proliferar ni por señales homeostáticas ni por señales de activación (57, 432, 433). Nuestros primeros experimentos preliminares con las poblaciones en periferia muestran resultados que van en esta dirección (fig R26 y datos no mostrados).

A este resultado también podría contribuir la modulación del PA generado por la expresión de *caDGK* sobre *mTOR* (*mammalian Target of Rapamicin*). Esta proteína cumple funciones esenciales en el control de la proliferación, de la síntesis de proteínas y de la transcripción (108, 166, 224). El PA se une a ella y ejerce una regulación positiva de su actividad quinasa (467). En células T se han descrito recientemente importantes funciones de *mTOR* en linfocitos periféricos: favorece la diferenciación a células T de memoria frente a células efectoras (20, 372) y controla la expresión de *FoxP3* y la diferenciación de células reguladoras (93, 262). Nuestro grupo describió que el PA generado por DGKs regula la actividad de *mTOR* en células adherentes (25); sería interesante investigar si existe un paralelismo a esta regulación en linfocitos, o una contribución a los defectos que observamos en los ratones *caDGK* por parte de *mTOR*, mediante el estudio de la activación de sus proteínas sustrato como *S6K*.

Conjuntamente nuestros datos indican la importante regulación que ejerce el DAG en la activación de RasGRP1, el importante papel de esta proteína en la transmisión de señales de débil intensidad durante el desarrollo tímico y la necesidad de que este proceso culmine exitosamente para el mantenimiento de la homeostasis de las poblaciones en periferia.

Conclusiones

1. El uso de dominios C1 como biosensores del DAG permite estudiar las dinámicas de este lípido en los timocitos y linfocitos maduros de ratón, revelando la existencia de distintas acumulaciones subcelulares de DAG y de una generación diferencial de éste en función del estímulo recibido.

2. Tanto el DAG como las proteínas a la que regula directamente, PKC θ y RasGRP1, se localizan en la sinapsis cuando se usan péptidos agonistas como estímulo. En situaciones de estimulación débil, con péptidos agonistas parciales o antagonistas, existe una menor producción de DAG en la sinapsis, reflejada por la pérdida de acumulación en ella del dominio C1bPKC θ acoplado a GFP o GST.

3. La DGK constitutivamente activa generada, caDGK, se localiza en la membrana plasmática y presenta actividad catalítica *in vitro*. Las células que sobre-expresan caDGK son capaces de movilizar calcio y formar sinapsis inmunológicas, aunque la acumulación de DAG en estas sinapsis está reducida.

4. La expresión ectópica de caDGK disminuye de manera drástica la activación de vías reguladas por DAG, como Erk y PKC, tras la estimulación del TCR. Estos defectos no se deben a la pérdida de localización en sinapsis de las proteínas PKC θ y RasGRP1. La disminución de DAG por sobre-expresión de caDGK produce una atenuación general de las cascadas de señalización mediadas por tirosinas quinasas. Todos estos hechos se reflejan en una activación ineficiente de los linfocitos.

5. Los ratones transgénicos caDGK tienen defectos en desarrollo y selección de poblaciones: los timos transgénicos tienen un gran descenso en celularidad, presentan menor selección positiva de células CD4 SP y acumulación de células CD8 inmaduras y CD8 SP. La expresión sostenida de la cadena α del receptor de IL-7 en etapas tempranas de desarrollo y la alteración de los niveles de expresión de las moléculas CD4 y CD8 pueden generar estos defectos.

6. Los defectos en el desarrollo de los timocitos transgénicos caDGK tienen un impacto claro en la periferia: las células T se encuentran disminuidas en sus porcentajes totales y las proporciones CD4 frente a CD8 alterados. Además los linfocitos residentes en ganglios y los circulantes en sangre presentan un fenotipo de “hiperactivación” que recuerda al de células de memoria. Estas células están alteradas en sus funciones puesto que no pueden llevar a cabo expansiones adecuadas.

Referencias

1. **Ahmed, S., R. Kozma, C. Monfries, C. Hall, H. H. Lim, P. Smith, and L. Lim.** 1990. Human brain n-chimaerin cDNA encodes a novel phorbol ester receptor. *Biochem J* **272**:767-73.
2. **Aifantis, I., F. Gounari, L. Scorrano, C. Borowski, and H. von Boehmer.** 2001. Constitutive pre-TCR signaling promotes differentiation through Ca²⁺ mobilization and activation of NF-kappaB and NFAT. *Nat Immunol* **2**:403-9.
3. **Alam, S. M., G. M. Davies, C. M. Lin, T. Zal, W. Nasholds, S. C. Jameson, K. A. Hogquist, N. R. Gascoigne, and P. J. Travers.** 1999. Qualitative and quantitative differences in T cell receptor binding of agonist and antagonist ligands. *Immunity* **10**:227-37.
4. **Alam, S. M., P. J. Travers, J. L. Wung, W. Nasholds, S. Redpath, S. C. Jameson, and N. R. Gascoigne.** 1996. T-cell-receptor affinity and thymocyte positive selection. *Nature* **381**:616-20.
5. **Alcazar, I., I. Cortes, A. Zaballos, C. Hernandez, D. A. Fruman, D. F. Barber, and A. C. Carrera.** 2009. p85beta phosphoinositide 3-kinase regulates CD28 coreceptor function. *Blood* **113**:3198-208.
6. **Alessi, D. R., S. R. James, C. P. Downes, A. B. Holmes, P. R. Gaffney, C. B. Reese, and P. Cohen.** 1997. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr Biol* **7**:261-9.
7. **Aliahmad, P., B. de la Torre, and J. Kaye.** Shared dependence on the DNA-binding factor TOX for the development of lymphoid tissue-inducer cell and NK cell lineages. *Nat Immunol* **11**:945-52.
8. **Aliahmad, P., and J. Kaye.** 2008. Development of all CD4 T lineages requires nuclear factor TOX. *J Exp Med* **205**:245-56.
9. **Aliahmad, P., E. O'Flaherty, P. Han, O. D. Goularte, B. Wilkinson, M. Satake, J. D. Molkentin, and J. Kaye.** 2004. TOX provides a link between calcineurin activation and CD8 lineage commitment. *J Exp Med* **199**:1089-99.
10. **Almeida, A. R., B. Rocha, A. A. Freitas, and C. Tanchot.** 2005. Homeostasis of T cell numbers: from thymus production to peripheral compartmentalization and the indexation of regulatory T cells. *Semin Immunol* **17**:239-49.
11. **Alonso, R., C. Mazzeo, I. Merida, and M. Izquierdo.** 2007. A new role of diacylglycerol kinase alpha on the secretion of lethal exosomes bearing Fas ligand during activation-induced cell death of T lymphocytes. *Biochimie* **89**:213-21.
12. **Alonso, R., M. C. Rodriguez, J. Pindado, E. Merino, I. Merida, and M. Izquierdo.** 2005. Diacylglycerol kinase alpha regulates the secretion of lethal exosomes bearing Fas ligand during activation-induced cell death of T lymphocytes. *J Biol Chem* **280**:28439-50.
13. **Amaral, M. C., A. M. Casillas, and A. E. Nel.** 1993. Contrasting effects of two tumour promoters, phorbol myristate acetate and okadaic acid, on T-cell responses and activation of p42 MAP-kinase/ERK-2. *Immunology* **79**:24-31.
14. **Amsen, D., and A. M. Kruisbeek.** 1998. Thymocyte selection: not by TCR alone. *Immunol Rev* **165**:209-29.
15. **Anderson, G., P. J. Lane, and E. J. Jenkinson.** 2007. Generating intrathymic microenvironments to establish T-cell tolerance. *Nat Rev Immunol* **7**:954-63.
16. **Anderson, M. S., E. S. Venanzi, Z. Chen, S. P. Berzins, C. Benoist, and D. Mathis.** 2005. The cellular mechanism of Aire control of T cell tolerance. *Immunity* **23**:227-39.
17. **Antonny, B., I. Huber, S. Paris, M. Chabre, and D. Cassel.** 1997. Activation of ADP-ribosylation factor 1 GTPase-activating protein by phosphatidylcholine-derived diacylglycerols. *J Biol Chem* **272**:30848-51.
18. **Apostolou, I., A. Sarukhan, L. Klein, and H. von Boehmer.** 2002. Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. *Nat Immunol* **3**:756-63.
19. **Appleman, L. J., and V. A. Boussiotis.** 2003. T cell anergy and costimulation. *Immunol Rev* **192**:161-80.
20. **Araki, K., A. P. Turner, V. O. Shaffer, S. Gangappa, S. A. Keller, M. F. Bachmann, C. P. Larsen, and R. Ahmed.** 2009. mTOR regulates memory CD8 T-cell differentiation. *Nature* **460**:108-12.
21. **Arnold, R., I. M. Patzak, B. Neuhaus, S. Vancauwenbergh, A. Veillette, J. Van Lint, and F. Kiefer.** 2005. Activation of hematopoietic progenitor kinase 1 involves relocation, autophosphorylation, and transphosphorylation by protein kinase D1. *Mol Cell Biol* **25**:2364-83.

22. **Arpaia, E., M. Shahar, H. Dadi, A. Cohen, and C. M. Roifman.** 1994. Defective T cell receptor signaling and CD8⁺ thymic selection in humans lacking zap-70 kinase. *Cell* **76**:947-58.
23. **Aschenbrenner, K., L. M. D'Cruz, E. H. Vollmann, M. Hinterberger, J. Emmerich, L. K. Swee, A. Rolink, and L. Klein.** 2007. Selection of Foxp3⁺ regulatory T cells specific for self antigen expressed and presented by Aire⁺ medullary thymic epithelial cells. *Nat Immunol* **8**:351-8.
24. **Atherly, L. O., J. A. Lucas, M. Felices, C. C. Yin, S. L. Reiner, and L. J. Berg.** 2006. The Tec family tyrosine kinases Itk and Rlk regulate the development of conventional CD8⁺ T cells. *Immunity* **25**:79-91.
25. **Avila-Flores, A., T. Santos, E. Rincon, and I. Merida.** 2005. Modulation of the mammalian target of rapamycin pathway by diacylglycerol kinase-produced phosphatidic acid. *J Biol Chem* **280**:10091-9.
26. **Bachmaier, K., C. Krawczyk, I. Koziarzki, Y. Y. Kong, T. Sasaki, A. Oliveira-dos-Santos, S. Mariathasan, D. Bouchard, A. Wakeham, A. Itie, J. Le, P. S. Ohashi, I. Sarosi, H. Nishina, S. Lipkowitz, and J. M. Penninger.** 2000. Negative regulation of lymphocyte activation and autoimmunity by the molecular adaptor Cbl-b. *Nature* **403**:211-6.
27. **Bai, J., and R. E. Pagano.** 1997. Measurement of spontaneous transfer and transbilayer movement of BODIPY-labeled lipids in lipid vesicles. *Biochemistry* **36**:8840-8.
28. **Baier, G., and J. Wagner.** 2009. PKC inhibitors: potential in T cell-dependent immune diseases. *Curr Opin Cell Biol* **21**:262-7.
29. **Bain, G., M. W. Quong, R. S. Soloff, S. M. Hedrick, and C. Murre.** 1999. Thymocyte maturation is regulated by the activity of the helix-loop-helix protein, E47. *J Exp Med* **190**:1605-16.
30. **Barnden, M. J., J. Allison, W. R. Heath, and F. R. Carbone.** 1998. Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements. *Immunol Cell Biol* **76**:34-40.
31. **Barouch-Bentov, R., E. E. Lemmens, J. Hu, E. M. Janssen, N. M. Droin, J. Song, S. P. Schoenberger, and A. Altman.** 2005. Protein kinase C-theta is an early survival factor required for differentiation of effector CD8⁺ T cells. *J Immunol* **175**:5126-34.
32. **Bartfeld, D., L. Shimon, G. C. Couture, D. Rabinovich, F. Frolow, D. Levanon, Y. Groner, and Z. Shakked.** 2002. DNA recognition by the RUNX1 transcription factor is mediated by an allosteric transition in the RUNT domain and by DNA bending. *Structure* **10**:1395-407.
33. **Bauer, B., and G. Baier.** 2002. Protein kinase C and AKT/protein kinase B in CD4⁺ T-lymphocytes: new partners in TCR/CD28 signal integration. *Mol Immunol* **38**:1087-99.
34. **Beach, D., R. Gonen, Y. Bogin, I. G. Reischl, and D. Yablonski.** 2007. Dual role of SLP-76 in mediating T cell receptor-induced activation of phospholipase C-gamma1. *J Biol Chem* **282**:2937-46.
35. **Beal, A. M., N. Anikeeva, R. Varma, T. O. Cameron, G. Vasiliver-Shamis, P. J. Norris, M. L. Dustin, and Y. Sykulev.** 2009. Kinetics of early T cell receptor signaling regulate the pathway of lytic granule delivery to the secretory domain. *Immunity* **31**:632-42.
36. **Bendelac, A., P. B. Savage, and L. Teyton.** 2007. The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol* **25**:297-336.
37. **Berry, D. M., P. Nash, S. K. Liu, T. Pawson, and C. J. McGlade.** 2002. A high-affinity Arg-X-X-Lys SH3 binding motif confers specificity for the interaction between Gads and SLP-76 in T cell signaling. *Curr Biol* **12**:1336-41.
38. **Bertolotto, C., L. Maulon, N. Filippa, G. Baier, and P. Auberger.** 2000. Protein kinase C theta and epsilon promote T-cell survival by a rsk-dependent phosphorylation and inactivation of BAD. *J Biol Chem* **275**:37246-50.
39. **Bettini, M., H. Xi, J. Milbrandt, and G. J. Kersh.** 2002. Thymocyte development in early growth response gene 1-deficient mice. *J Immunol* **169**:1713-20.
40. **Bi, K., Y. Tanaka, N. Coudronniere, K. Suge, S. Hong, M. J. van Stipdonk, and A. Altman.** 2001. Antigen-induced translocation of PKC-theta to membrane rafts is required for T cell activation. *Nat Immunol* **2**:556-63.
41. **Bilim, O., Y. Takeishi, T. Kitahara, T. Arimoto, T. Niizeki, T. Sasaki, K. Goto, and I. Kubota.** 2008. Diacylglycerol kinase zeta inhibits myocardial atrophy and restores cardiac dysfunction in streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol* **7**:2.
42. **Billadeau, D. D., J. C. Nolz, and T. S. Gomez.** 2007. Regulation of T-cell activation by the cytoskeleton. *Nat Rev Immunol* **7**:131-43.
43. **Bivona, T. G., I. Perez De Castro, I. M. Ahearn, T. M. Grana, V. K. Chiu, P. J. Lockyer, P. J. Cullen, A. Pellicer, A. D. Cox, and M. R. Philips.** 2003. Phospholipase Cgamma activates Ras on

- the Golgi apparatus by means of RasGRP1. *Nature* **424**:694-8.
44. **Bleasdale, J. E., N. R. Thakur, R. S. Gremban, G. L. Bundy, F. A. Fitzpatrick, R. J. Smith, and S. Bunting.** 1990. Selective inhibition of receptor-coupled phospholipase C-dependent processes in human platelets and polymorphonuclear neutrophils. *J Pharmacol Exp Ther* **255**:756-68.
 45. **Bommhardt, U., M. A. Basson, U. Krummrei, and R. Zamoyska.** 1999. Activation of the extracellular signal-related kinase/mitogen-activated protein kinase pathway discriminates CD4 versus CD8 lineage commitment in the thymus. *J Immunol* **163**:715-22.
 46. **Bonneville, M., R. L. O'Brien, and W. K. Born.** Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat Rev Immunol* **10**:467-78.
 47. **Born, W. K., Z. Yin, Y. S. Hahn, D. Sun, and R. L. O'Brien.** Analysis of gamma delta T cell functions in the mouse. *J Immunol* **184**:4055-61.
 48. **Bouillet, P., J. F. Purton, D. I. Godfrey, L. C. Zhang, L. Coultas, H. Puthalakath, M. Pellegrini, S. Cory, J. M. Adams, and A. Strasser.** 2002. BH3-only Bcl-2 family member Bim is required for apoptosis of autoreactive thymocytes. *Nature* **415**:922-6.
 49. **Braiman, A., M. Barda-Saad, C. L. Sommers, and L. E. Samelson.** 2006. Recruitment and activation of PLCgamma1 in T cells: a new insight into old domains. *EMBO J* **25**:774-84.
 50. **Brose, N., K. Hofmann, Y. Hata, and T. C. Sudhof.** 1995. Mammalian homologues of *Caenorhabditis elegans* unc-13 gene define novel family of C2-domain proteins. *J Biol Chem* **270**:25273-80.
 51. **Brose, N., and C. Rosenmund.** 2002. Move over protein kinase C, you've got company: alternative cellular effectors of diacylglycerol and phorbol esters. *J Cell Sci* **115**:4399-411.
 52. **Brugnera, E., A. Bhandoola, R. Cibotti, Q. Yu, T. I. Ginter, Y. Yamashita, S. O. Sharrow, and A. Singer.** 2000. Coreceptor reversal in the thymus: signaled CD4+8+ thymocytes initially terminate CD8 transcription even when differentiating into CD8+ T cells. *Immunity* **13**:59-71.
 53. **Buhlmann, J. E., S. K. Elkin, and A. H. Sharpe.** 2003. A role for the B7-1/B7-2:CD28/CTLA-4 pathway during negative selection. *J Immunol* **170**:5421-8.
 54. **Bunnell, S. C., M. Diehn, M. B. Yaffe, P. R. Findell, L. C. Cantley, and L. J. Berg.** 2000. Biochemical interactions integrating Itk with the T cell receptor-initiated signaling cascade. *J Biol Chem* **275**:2219-30.
 55. **Bunting, M., W. Tang, G. A. Zimmerman, T. M. McIntyre, and S. M. Prescott.** 1996. Molecular cloning and characterization of a novel human diacylglycerol kinase zeta. *J Biol Chem* **271**:10230-6.
 56. **Burns, D. J., and R. M. Bell.** 1991. Protein kinase C contains two phorbol ester binding domains. *J Biol Chem* **266**:18330-8.
 57. **Bushar, N. D., E. Corbo, M. Schmidt, J. S. Maltzman, and D. L. Farber.** Ablation of SLP-76 signaling after T cell priming generates memory CD4 T cells impaired in steady-state and cytokine-driven homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**:827-31.
 58. **Calnan, B. J., S. Szychowski, F. K. Chan, D. Cado, and A. Winoto.** 1995. A role for the orphan steroid receptor Nur77 in apoptosis accompanying antigen-induced negative selection. *Immunity* **3**:273-82.
 59. **Caloca, M. J., P. Delgado, B. Alarcon, and X. R. Bustelo.** 2008. Role of chimaerins, a group of Rac-specific GTPase activating proteins, in T-cell receptor signaling. *Cell Signal* **20**:758-70.
 60. **Caloca, M. J., M. L. Garcia-Bermejo, P. M. Blumberg, N. E. Lewin, E. Kremmer, H. Mischak, S. Wang, K. Nacro, B. Bienfait, V. E. Marquez, and M. G. Kazanietz.** 1999. beta2-chimaerin is a novel target for diacylglycerol: binding properties and changes in subcellular localization mediated by ligand binding to its C1 domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:11854-9.
 61. **Caloca, M. J., J. L. Zugaza, D. Matallanas, P. Crespo, and X. R. Bustelo.** 2003. Vav mediates Ras stimulation by direct activation of the GDP/GTP exchange factor Ras GRP1. *EMBO J* **22**:3326-36.
 62. **Canagarajah, B., F. C. Leskow, J. Y. Ho, H. Mischak, L. F. Saidi, M. G. Kazanietz, and J. H. Hurley.** 2004. Structural mechanism for lipid activation of the Rac-specific GAP, beta2-chimaerin. *Cell* **119**:407-18.
 63. **Cante-Barrett, K., M. M. Winslow, and G. R. Crabtree.** 2007. Selective role of NFATc3 in positive selection of thymocytes. *J Immunol* **179**:103-10.
 64. **Carlson, C. M., B. T. Endrizzi, J. Wu, X. Ding, M. A. Weinreich, E. R. Walsh, M. A. Wani, J. B. Lingrel, K. A. Hogquist, and S. C. Jameson.** 2006. Kruppel-like factor 2 regulates thymocyte and T-cell migration. *Nature* **442**:299-302.
 65. **Carpenter, A. C., and R. Bosselut.** Decision

- checkpoints in the thymus. *Nat Immunol* **11**:666-73.
66. Carrasco, S., and I. Merida. 2004. Diacylglycerol-dependent binding recruits PKC θ and RasGRP1 C1 domains to specific subcellular localizations in living T lymphocytes. *Mol Biol Cell* **15**:2932-42.
67. Carrasco, S., and I. Merida. 2007. Diacylglycerol, when simplicity becomes complex. *Trends Biochem Sci* **32**:27-36.
68. Carter, J. D., G. M. Calabrese, M. Naganuma, and U. Lorenz. 2005. Deficiency of the Src homology region 2 domain-containing phosphatase 1 (SHP-1) causes enrichment of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* **174**:6627-38.
69. Castrillo, A., D. J. Pennington, F. Otto, P. J. Parker, M. J. Owen, and L. Bosca. 2001. Protein kinase C ϵ is required for macrophage activation and defense against bacterial infection. *J Exp Med* **194**:1231-42.
70. Cebrian, M., E. Yague, M. Rincon, M. Lopez-Botet, M. O. de Landazuri, and F. Sanchez-Madrid. 1988. Triggering of T cell proliferation through AIM, an activation inducer molecule expressed on activated human lymphocytes. *J Exp Med* **168**:1621-37.
71. Chaffin, K. E., C. R. Beals, T. M. Wilkie, K. A. Forbush, M. I. Simon, and R. M. Perlmutter. 1990. Dissection of thymocyte signaling pathways by in vivo expression of pertussis toxin ADP-ribosyltransferase. *EMBO J* **9**:3821-9.
72. Chakraborty, A. K., J. Das, J. Zikherman, M. Yang, C. C. Govern, M. Ho, A. Weiss, and J. Roose. 2009. Molecular origin and functional consequences of digital signaling and hysteresis during Ras activation in lymphocytes. *Sci Signal* **2**:pt2.
73. Chan, A. C., T. A. Kadlecsek, M. E. Elder, A. H. Filipovich, W. L. Kuo, M. Iwashima, T. G. Parslow, and A. Weiss. 1994. ZAP-70 deficiency in an autosomal recessive form of severe combined immunodeficiency. *Science* **264**:1599-601.
74. Chang, H. C., P. Moingeon, R. Pedersen, J. Lucich, C. Stebbins, and E. L. Reinherz. 1990. Involvement of the PPPGHR motif in T cell activation via CD2. *J Exp Med* **172**:351-5.
75. Chen, X., J. J. Priatel, M. T. Chow, and H. S. Teh. 2008. Preferential development of CD4 and CD8 T regulatory cells in RasGRP1-deficient mice. *J Immunol* **180**:5973-82.
76. Cheng, L. E., F. K. Chan, D. Cado, and A. Winoto. 1997. Functional redundancy of the Nur77 and Nor-1 orphan steroid receptors in T-cell apoptosis. *EMBO J* **16**:1865-75.
77. Chi, A. W., J. J. Bell, D. A. Zlotoff, and A. Bhandoola. 2009. Untangling the T branch of the hematopoiesis tree. *Curr Opin Immunol* **21**:121-6.
78. Chien, Y. H., and Y. Konigshofer. 2007. Antigen recognition by gammadelta T cells. *Immunol Rev* **215**:46-58.
79. Choi, S., and R. H. Schwartz. 2007. Molecular mechanisms for adaptive tolerance and other T cell anergy models. *Semin Immunol* **19**:140-52.
80. Ciofani, M., T. M. Schmitt, A. Ciofani, A. M. Michie, N. Cuburu, A. Aublin, J. L. Maryanski, and J. C. Zuniga-Pflucker. 2004. Obligatory role for cooperative signaling by pre-TCR and Notch during thymocyte differentiation. *J Immunol* **172**:5230-9.
81. Clements, J. L., B. Yang, S. E. Ross-Barta, S. L. Eliason, R. F. Hrstka, R. A. Williamson, and G. A. Koretzky. 1998. Requirement for the leukocyte-specific adapter protein SLP-76 for normal T cell development. *Science* **281**:416-9.
82. Colon-Gonzalez, F., and M. G. Kazanietz. 2006. C1 domains exposed: from diacylglycerol binding to protein-protein interactions. *Biochim Biophys Acta* **1761**:827-37.
83. Costello, P. S., M. Gallagher, and D. A. Cantrell. 2002. Sustained and dynamic inositol lipid metabolism inside and outside the immunological synapse. *Nat Immunol* **3**:1082-9.
84. Costello, P. S., R. H. Nicolas, Y. Watanabe, I. Rosewell, and R. Treisman. 2004. Ternary complex factor SAP-1 is required for Erk-mediated thymocyte positive selection. *Nat Immunol* **5**:289-98.
85. Coudronniere, N., M. Villalba, N. Englund, and A. Altman. 2000. NF-kappa B activation induced by T cell receptor/CD28 costimulation is mediated by protein kinase C-theta. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:3394-9.
86. Crittenden, J. R., W. Bergmeier, Y. Zhang, C. L. Piffath, Y. Liang, D. D. Wagner, D. E. Housman, and A. M. Graybiel. 2004. CalDAG-GEFI integrates signaling for platelet aggregation and thrombus formation. *Nat Med* **10**:982-6.
87. Crompton, T., K. C. Gilmour, and M. J. Owen. 1996. The MAP kinase pathway controls differentiation from double-negative to double-positive thymocyte. *Cell* **86**:243-51.
88. Crompton, T., R. K. Lees, H. Pircher, and H. R. MacDonald. 1993. Precommitment of CD4+CD8+ thymocytes to either CD4 or CD8 lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:8982-6.

89. **Crump, A. L., M. J. Grusby, L. H. Glimcher, and H. Cantor.** 1993. Thymocyte development in major histocompatibility complex-deficient mice: evidence for stochastic commitment to the CD4 and CD8 lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:10739-43.
90. **Daniels, M. A., E. Teixeira, J. Gill, B. Hausmann, D. Roubaty, K. Holmberg, G. Werlen, G. A. Hollander, N. R. Gascoigne, and E. Palmer.** 2006. Thymic selection threshold defined by compartmentalization of Ras/MAPK signalling. *Nature* **444**:724-9.
91. **Dave, V. P., D. Allman, R. Keefe, R. R. Hardy, and D. J. Kappes.** 1998. HD mice: a novel mouse mutant with a specific defect in the generation of CD4(+) T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:8187-92.
92. **Delgado, P., E. Fernandez, V. Dave, D. Kappes, and B. Alarcon.** 2000. CD3delta couples T-cell receptor signalling to ERK activation and thymocyte positive selection. *Nature* **406**:426-30.
93. **Delgoffe, G. M., T. P. Kole, Y. Zheng, P. E. Zarek, K. L. Matthews, B. Xiao, P. F. Worley, S. C. Kozma, and J. D. Powell.** 2009. The mTOR kinase differentially regulates effector and regulatory T cell lineage commitment. *Immunity* **30**:832-44.
94. **Dequiedt, F., H. Kasler, W. Fischle, V. Kierner, M. Weinstein, B. G. Herndier, and E. Verdin.** 2003. HDAC7, a thymus-specific class II histone deacetylase, regulates Nur77 transcription and TCR-mediated apoptosis. *Immunity* **18**:687-98.
95. **Dequiedt, F., J. Van Lint, E. Lecomte, V. Van Duppen, T. Seufferlein, J. R. Vandenhede, R. Wattiez, and R. Kettmann.** 2005. Phosphorylation of histone deacetylase 7 by protein kinase D mediates T cell receptor-induced Nur77 expression and apoptosis. *J Exp Med* **201**:793-804.
96. **Derbinski, J., A. Schulte, B. Kyewski, and L. Klein.** 2001. Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nat Immunol* **2**:1032-9.
97. **Di Santo, J. P., I. Aifantis, E. Rosmaraki, C. Garcia, J. Feinberg, H. J. Fehling, A. Fischer, H. von Boehmer, and B. Rocha.** 1999. The common cytokine receptor gamma chain and the pre-T cell receptor provide independent but critically overlapping signals in early alpha/beta T cell development. *J Exp Med* **189**:563-74.
98. **Diaz-Flores, E., M. Siliceo, A. C. Martinez, and I. Merida.** 2003. Membrane translocation of protein kinase C θ during T lymphocyte activation requires phospholipase C-gamma-generated diacylglycerol. *J Biol Chem* **278**:29208-15.
99. **Dienz, O., A. Moller, A. Strecker, N. Stephan, P. H. Kramer, W. Droge, and M. L. Schmitz.** 2003. Src homology 2 domain-containing leukocyte phosphoprotein of 76 kDa and phospholipase C gamma 1 are required for NF-kappa B activation and lipid raft recruitment of protein kinase C theta induced by T cell costimulation. *J Immunol* **170**:365-72.
100. **Dower, N. A., S. L. Stang, D. A. Bottorff, J. O. Ebinu, P. Dickie, H. L. Ostergaard, and J. C. Stone.** 2000. RasGRP is essential for mouse thymocyte differentiation and TCR signaling. *Nat Immunol* **1**:317-21.
101. **Dreikhausen, U. E., K. Gorf, K. Resch, and M. Szamel.** 2003. Protein kinase Cbeta1, a major regulator of TCR-CD28-activated signal transduction leading to IL-2 gene transcription and secretion. *Int Immunol* **15**:1089-98.
102. **Dudley, E. C., H. T. Petrie, L. M. Shah, M. J. Owen, and A. C. Hayday.** 1994. T cell receptor beta chain gene rearrangement and selection during thymocyte development in adult mice. *Immunity* **1**:83-93.
103. **Ebinu, J. O., D. A. Bottorff, E. Y. Chan, S. L. Stang, R. J. Dunn, and J. C. Stone.** 1998. RasGRP, a Ras guanyl nucleotide-releasing protein with calcium- and diacylglycerol-binding motifs. *Science* **280**:1082-6.
104. **Ebinu, J. O., S. L. Stang, C. Teixeira, D. A. Bottorff, J. Hooton, P. M. Blumberg, M. Barry, R. C. Bleakley, H. L. Ostergaard, and J. C. Stone.** 2000. RasGRP links T-cell receptor signaling to Ras. *Blood* **95**:3199-203.
105. **Egawa, T., R. E. Tillman, Y. Naoe, I. Taniuchi, and D. R. Littman.** 2007. The role of the Runx transcription factors in thymocyte differentiation and in homeostasis of naive T cells. *J Exp Med* **204**:1945-57.
106. **Elder, M. E., D. Lin, J. Clever, A. C. Chan, T. J. Hope, A. Weiss, and T. G. Parslow.** 1994. Human severe combined immunodeficiency due to a defect in ZAP-70, a T cell tyrosine kinase. *Science* **264**:1596-9.
107. **Engel, I., C. Johns, G. Bain, R. R. Rivera, and C. Murre.** 2001. Early thymocyte development is regulated by modulation of E2A protein activity. *J Exp Med* **194**:733-45.
108. **Fang, Y., M. Vilella-Bach, R. Bachmann, A. Flanigan, and J. Chen.** 2001. Phosphatidic acid-mediated mitogenic activation of mTOR signaling. *Science* **294**:1942-5.
109. **Felices, M., and L. J. Berg.** 2008. The Tec kinases Itk and Rlk regulate NKT cell maturation, cytokine production, and survival. *J Immunol*

180:3007-18.

- 110.** Felli, M. P., M. Maroder, T. A. Mitsiadis, A. F. Campese, D. Bellavia, A. Vacca, R. S. Mann, L. Frati, U. Lendahl, A. Gulino, and I. Screpanti. 1999. Expression pattern of notch1, 2 and 3 and Jagged1 and 2 in lymphoid and stromal thymus components: distinct ligand-receptor interactions in intrathymic T cell development. *Int Immunol* **11**:1017-25.
- 111.** Felli, M. P., A. Vacca, A. Calce, D. Bellavia, A. F. Campese, R. Grillo, M. Di Giovine, S. Checquolo, C. Talora, R. Palermo, G. Di Mario, L. Frati, A. Gulino, and I. Screpanti. 2005. PKC theta mediates pre-TCR signaling and contributes to Notch3-induced T-cell leukemia. *Oncogene* **24**:992-1000.
- 112.** Fernandez, E. 2000. Thymocyte development past the CD4(+)CD8(+) stage requires an active p38 mitogen-activated protein kinase. *Blood* **95**:1356-61.
- 113.** Fernandez-Ulibarri, I., M. Vilella, F. Lazaro-Dieguez, E. Sarri, S. E. Martinez, N. Jimenez, E. Claro, I. Merida, K. N. Burger, and G. Egea. 2007. Diacylglycerol is required for the formation of COPI vesicles in the Golgi-to-ER transport pathway. *Mol Biol Cell* **18**:3250-63.
- 114.** Finco, T. S., T. Kadlecsek, W. Zhang, L. E. Samelson, and A. Weiss. 1998. LAT is required for TCR-mediated activation of PLCgamma1 and the Ras pathway. *Immunity* **9**:617-26.
- 115.** Fischer, A. M., C. D. Katayama, G. Pages, J. Pouyssegur, and S. M. Hedrick. 2005. The role of erk1 and erk2 in multiple stages of T cell development. *Immunity* **23**:431-43.
- 116.** Fischer, K. D., Y. Y. Kong, H. Nishina, K. Tedford, L. E. Marengere, I. Koziaradzki, T. Sasaki, M. Starr, G. Chan, S. Gardener, M. P. Nghiem, D. Bouchard, M. Barbacid, A. Bernstein, and J. M. Penninger. 1998. Vav is a regulator of cytoskeletal reorganization mediated by the T-cell receptor. *Curr Biol* **8**:554-62.
- 117.** Flores, I., T. Casaseca, A. C. Martinez, H. Kanoh, and I. Merida. 1996. Phosphatidic acid generation through interleukin 2 (IL-2)-induced alpha-diacylglycerol kinase activation is an essential step in IL-2-mediated lymphocyte proliferation. *J Biol Chem* **271**:10334-40.
- 118.** Fontenot, J. D., J. L. Dooley, A. G. Farr, and A. Y. Rudensky. 2005. Developmental regulation of Foxp3 expression during ontogeny. *J Exp Med* **202**:901-6.
- 119.** Fontenot, J. D., M. A. Gavin, and A. Y. Rudensky. 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* **4**:330-6.
- 120.** Fontenot, J. D., J. P. Rasmussen, L. M. Williams, J. L. Dooley, A. G. Farr, and A. Y. Rudensky. 2005. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity* **22**:329-41.
- 121.** Fooksman, D. R., S. Vardhana, G. Vasiliver-Shamis, J. Liese, D. A. Blair, J. Waite, C. Sacristan, G. D. Victora, A. Zanin-Zhorov, and M. L. Dustin. Functional anatomy of T cell activation and synapse formation. *Annu Rev Immunol* **28**:79-105.
- 122.** Fowler, C. C., L. I. Pao, J. N. Blattman, and P. D. Greenberg. SHP-1 in T cells limits the production of CD8 effector cells without impacting the formation of long-lived central memory cells. *J Immunol* **185**:3256-67.
- 123.** Foxwell, B. M., C. Beadling, D. Guschin, I. Kerr, and D. Cantrell. 1995. Interleukin-7 can induce the activation of Jak 1, Jak 3 and STAT 5 proteins in murine T cells. *Eur J Immunol* **25**:3041-6.
- 124.** Frank, C., H. Keilhack, F. Opitz, O. Zschornig, and F. D. Bohmer. 1999. Binding of phosphatidic acid to the protein-tyrosine phosphatase SHP-1 as a basis for activity modulation. *Biochemistry* **38**:11993-2002.
- 125.** Franke, T. F., D. R. Kaplan, L. C. Cantley, and A. Toker. 1997. Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science* **275**:665-8.
- 126.** Friedl, P., A. T. den Boer, and M. Gunzer. 2005. Tuning immune responses: diversity and adaptation of the immunological synapse. *Nat Rev Immunol* **5**:532-45.
- 127.** Fu, G., Y. Chen, M. Yu, A. Podd, J. Schuman, Y. He, L. Di, M. Yassai, D. Haribhai, P. E. North, J. Gorski, C. B. Williams, D. Wang, and R. Wen. Phospholipase C{gamma}1 is essential for T cell development, activation, and tolerance. *J Exp Med* **207**:309-18.
- 128.** Fukazawa, T., K. A. Reedquist, G. Panchamoorthy, S. Soltoff, T. Trub, B. Druker, L. Cantley, S. E. Shoelson, and H. Band. 1995. T cell activation-dependent association between the p85 subunit of the phosphatidylinositol 3-kinase and Grb2/phospholipase C-gamma 1-binding phosphotyrosyl protein pp36/38. *J Biol Chem* **270**:20177-82.
- 129.** Gallegos, A. M., and M. J. Bevan. 2004. Central tolerance to tissue-specific antigens mediated by direct and indirect antigen presentation. *J Exp Med* **200**:1039-49.
- 130.** Gallo, E., A. Caselli, F. Ragaini, S. Fantauzzi,

- N. Masciocchi, A. Sironi, and S. Cenini. 2005. Structural determination of ruthenium-porphyrin complexes relevant to catalytic epoxidation of olefins. *Inorg Chem* **44**:2039-49.
- 131.** Gallo, E. M., M. M. Winslow, K. Cante-Barrett, A. N. Radermacher, L. Ho, L. McGinnis, B. Iritani, J. R. Neilson, and G. R. Crabtree. 2007. Calcineurin sets the bandwidth for discrimination of signals during thymocyte development. *Nature* **450**:731-5.
- 132.** Gamberucci, A., E. Giurisato, P. Pizzo, M. Tassi, R. Giunti, D. P. McIntosh, and A. Benedetti. 2002. Diacylglycerol activates the influx of extracellular cations in T-lymphocytes independently of intracellular calcium-store depletion and possibly involving endogenous TRP6 gene products. *Biochem J* **364**:245-54.
- 133.** Gambineri, E., T. R. Torgerson, and H. D. Ochs. 2003. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis. *Curr Opin Rheumatol* **15**:430-5.
- 134.** Gapin, L., J. L. Matsuda, C. D. Surh, and M. Kronenberg. 2001. NKT cells derive from double-positive thymocytes that are positively selected by CD1d. *Nat Immunol* **2**:971-8.
- 135.** Gartner, F., F. W. Alt, R. Monroe, M. Chu, B. P. Sleckman, L. Davidson, and W. Swat. 1999. Immature thymocytes employ distinct signaling pathways for allelic exclusion versus differentiation and expansion. *Immunity* **10**:537-46.
- 136.** Gavin, M. A., J. P. Rasmussen, J. D. Fontenot, V. Vasta, V. C. Manganiello, J. A. Beavo, and A. Y. Rudensky. 2007. Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature* **445**:771-5.
- 137.** Genot, E., and D. A. Cantrell. 2000. Ras regulation and function in lymphocytes. *Curr Opin Immunol* **12**:289-94.
- 138.** Germain, R. N. 2002. T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat Rev Immunol* **2**:309-22.
- 139.** Gil, D., A. G. Schrum, B. Alarcon, and E. Palmer. 2005. T cell receptor engagement by peptide-MHC ligands induces a conformational change in the CD3 complex of thymocytes. *J Exp Med* **201**:517-22.
- 140.** Godfrey, D. I., and S. P. Berzins. 2007. Control points in NKT-cell development. *Nat Rev Immunol* **7**:505-18.
- 141.** Godfrey, D. I., J. Kennedy, T. Suda, and A. Zlotnik. 1993. A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8- triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. *J Immunol* **150**:4244-52.
- 142.** Gomez, M., D. Kioussis, and D. A. Cantrell. 2001. The GTPase Rac-1 controls cell fate in the thymus by diverting thymocytes from positive to negative selection. *Immunity* **15**:703-13.
- 143.** Gomez, M., V. Tybulewicz, and D. A. Cantrell. 2000. Control of pre-T cell proliferation and differentiation by the GTPase Rac-1. *Nat Immunol* **1**:348-52.
- 144.** Gommeaux, J., C. Gregoire, P. Nguessan, M. Richelme, M. Malissen, S. Guerder, B. Malissen, and A. Carrier. 2009. Thymus-specific serine protease regulates positive selection of a subset of CD4+ thymocytes. *Eur J Immunol* **39**:956-64.
- 145.** Gong, Q., A. M. Cheng, A. M. Akk, J. Alberola-Ila, G. Gong, T. Pawson, and A. C. Chan. 2001. Disruption of T cell signaling networks and development by Grb2 haploid insufficiency. *Nat Immunol* **2**:29-36.
- 146.** Goodnow, C. C., J. Sprent, B. Fazekas de St Groth, and C. G. Vinuesa. 2005. Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature* **435**:590-7.
- 147.** Gould, C. M., and A. C. Newton. 2008. The life and death of protein kinase C. *Curr Drug Targets* **9**:614-25.
- 148.** Goux, D., J. D. Coudert, D. Maurice, L. Scarpellino, G. Jeannot, S. Piccolo, K. Weston, J. Huelshen, and W. Held. 2005. Cooperating pre-T-cell receptor and TCF-1-dependent signals ensure thymocyte survival. *Blood* **106**:1726-33.
- 149.** Gruber, T., N. Hermann-Kleiter, R. Hinterleitner, F. Fresser, R. Schneider, G. Gastl, J. M. Penninger, and G. Baier. 2009. PKC-theta modulates the strength of T cell responses by targeting Cbl-b for ubiquitination and degradation. *Sci Signal* **2**:ra30.
- 150.** Gruber, T., N. Hermann-Kleiter, C. Pfeifhofer-Obermair, C. Lutz-Nicoladoni, N. Thuille, T. Letschka, J. Barsig, M. Baudler, J. Li, B. Metzler, B. Nusslein-Hildesheim, J. Wagner, M. Leitges, and G. Baier. 2009. PKC theta cooperates with PKC alpha in alloimmune responses of T cells in vivo. *Mol Immunol* **46**:2071-9.
- 151.** Gruber, T., C. Pfeifhofer-Obermair, and G. Baier. PKCtheta is necessary for efficient activation of NFkappaB, NFAT, and AP-1 during positive selec-

- tion of thymocytes. *Immunol Lett* **132**:6-11.
- 152.** Grueter, B., M. Petter, T. Egawa, K. Laule-Kilian, C. J. Aldrian, A. Wuerch, Y. Ludwig, H. Fukuyama, H. Wardemann, R. Waldschuetz, T. Moroy, I. Taniuchi, V. Steimle, D. R. Littman, and M. Ehlers. 2005. Runx3 regulates integrin alpha E/CD103 and CD4 expression during development of CD4-/CD8+ T cells. *J Immunol* **175**:1694-705.
 - 153.** Guo, R., C. K. Wan, J. H. Carpenter, T. Mousallem, R. M. Boustany, C. T. Kuan, A. W. Burks, and X. P. Zhong. 2008. Synergistic control of T cell development and tumor suppression by diacylglycerol kinase alpha and zeta. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:11909-14.
 - 154.** Hahn, W. C., and B. E. Bierer. 1993. Separable portions of the CD2 cytoplasmic domain involved in signaling and ligand avidity regulation. *J Exp Med* **178**:1831-6.
 - 155.** Hailman, E., W. R. Burack, A. S. Shaw, M. L. Dustin, and P. M. Allen. 2002. Immature CD4(+) CD8(+) thymocytes form a multifocal immunological synapse with sustained tyrosine phosphorylation. *Immunity* **16**:839-48.
 - 156.** Haks, M. C., S. M. Belkowski, M. Ciofani, M. Rhodes, J. M. Lefebvre, S. Trop, P. Hugo, J. C. Zuniga-Pflucker, and D. L. Wiest. 2003. Low activation threshold as a mechanism for ligand-independent signaling in pre-T cells. *J Immunol* **170**:2853-61.
 - 157.** Haks, M. C., J. M. Lefebvre, J. P. Lauritsen, M. Carleton, M. Rhodes, T. Miyazaki, D. J. Kappes, and D. L. Wiest. 2005. Attenuation of gammadeltaTCR signaling efficiently diverts thymocytes to the alphabeta lineage. *Immunity* **22**:595-606.
 - 158.** Hall, C., L. Lim, and T. Leung. 2005. C1, see them all. *Trends Biochem Sci* **30**:169-71.
 - 159.** Hall, C., C. Monfries, P. Smith, H. H. Lim, R. Kozma, S. Ahmed, V. Vanniasingham, T. Leung, and L. Lim. 1990. Novel human brain cDNA encoding a 34,000 Mr protein n-chimaerin, related to both the regulatory domain of protein kinase C and BCR, the product of the breakpoint cluster region gene. *J Mol Biol* **211**:11-6.
 - 160.** Hamann, A., K. Klugewitz, F. Austrup, and D. Jablonski-Westrich. 2000. Activation induces rapid and profound alterations in the trafficking of T cells. *Eur J Immunol* **30**:3207-18.
 - 161.** Hambor, J. E., J. Mennone, M. E. Coon, J. H. Hanke, and P. Kavathas. 1993. Identification and characterization of an Alu-containing, T-cell-specific enhancer located in the last intron of the human CD8 alpha gene. *Mol Cell Biol* **13**:7056-70.
 - 162.** Hamdi, S. M., C. Cariven, S. Coronas, N. Malet, H. Chap, B. Perret, J. P. Salles, and M. Record. 2008. Potential role of phospholipase D2 in increasing interleukin-2 production by T-lymphocytes through activation of mitogen-activated protein kinases ERK1/ERK2. *Biochim Biophys Acta* **1781**:263-9.
 - 163.** Hannun, Y. A., C. R. Loomis, and R. M. Bell. 1985. Activation of protein kinase C by Triton X-100 mixed micelles containing diacylglycerol and phosphatidylserine. *J Biol Chem* **260**:10039-43.
 - 164.** Hardie, R. C. 2003. Regulation of TRP channels via lipid second messengers. *Annu Rev Physiol* **65**:735-59.
 - 165.** Hasegawa, K., F. Martin, G. Huang, D. Tomas, L. Diehl, and A. C. Chan. 2004. PEST domain-enriched tyrosine phosphatase (PEP) regulation of effector/memory T cells. *Science* **303**:685-9.
 - 166.** Hay, N., and N. Sonenberg. 2004. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev* **18**:1926-45.
 - 167.** Hayes, S. M., R. M. Laird, and P. E. Love. Beyond alphabeta/gammadelta lineage commitment: TCR signal strength regulates gammadelta T cell maturation and effector fate. *Semin Immunol* **22**:247-51.
 - 168.** Hayes, S. M., L. Li, and P. E. Love. 2005. TCR signal strength influences alphabeta/gammadelta lineage fate. *Immunity* **22**:583-93.
 - 169.** He, Q., A. D. Beyers, A. N. Barclay, and A. F. Williams. 1988. A role in transmembrane signaling for the cytoplasmic domain of the CD2 T lymphocyte surface antigen. *Cell* **54**:979-84.
 - 170.** He, X., V. P. Dave, Y. Zhang, X. Hua, E. Nicolas, W. Xu, B. A. Roe, and D. J. Kappes. 2005. The zinc finger transcription factor Th-POK regulates CD4 versus CD8 T-cell lineage commitment. *Nature* **433**:826-33.
 - 171.** Hernandez-Hoyos, G., M. K. Anderson, C. Wang, E. V. Rothenberg, and J. Alberola-Ila. 2003. GATA-3 expression is controlled by TCR signals and regulates CD4/CD8 differentiation. *Immunity* **19**:83-94.
 - 172.** Hernandez-Hoyos, G., S. J. Sohn, E. V. Rothenberg, and J. Alberola-Ila. 2000. Lck activity controls CD4/CD8 T cell lineage commitment. *Immunity* **12**:313-22.
 - 173.** Herndon, T. M., X. C. Shan, G. C. Tsokos, and R. L. Wange. 2001. ZAP-70 and SLP-76 regulate protein kinase C-theta and NF-kappa B activation in response to engagement of CD3 and CD28. *J Immunol* **166**:5654-64.

- 174.** Hinton, H. J., D. R. Alessi, and D. A. Cantrell. 2004. The serine kinase phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK1) regulates T cell development. *Nat Immunol* **5**:539-45.
- 175.** Hodgkin, M. N., T. R. Pettitt, A. Martin, R. H. Michell, A. J. Pemberton, and M. J. Wakelam. 1998. Diacylglycerols and phosphatidates: which molecular species are intracellular messengers? *Trends Biochem Sci* **23**:200-4.
- 176.** Hogquist, K. 2001. RasGRP: the missing link for Ras activation in thymocytes. *Trends Immunol* **22**:69.
- 177.** Hogquist, K. A., S. C. Jameson, W. R. Heath, J. L. Howard, M. J. Bevan, and F. R. Carbone. 1994. T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* **76**:17-27.
- 178.** Hommel, U., M. Zurini, and M. Luyten. 1994. Solution structure of a cysteine rich domain of rat protein kinase C. *Nat Struct Biol* **1**:383-7.
- 179.** Honey, K., T. Nakagawa, C. Peters, and A. Rudensky. 2002. Cathepsin L regulates CD4+ T cell selection independently of its effect on invariant chain: a role in the generation of positively selecting peptide ligands. *J Exp Med* **195**:1349-58.
- 180.** Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* **299**:1057-61.
- 181.** Hough, M. R., F. Takei, R. K. Humphries, and R. Kay. 1994. Defective development of thymocytes overexpressing the costimulatory molecule, heat-stable antigen. *J Exp Med* **179**:177-84.
- 182.** Hozumi, K., C. Mailhos, N. Negishi, K. Hirano, T. Yahata, K. Ando, S. Zuklys, G. A. Hollander, D. T. Shima, and S. Habu. 2008. Delta-like 4 is indispensable in thymic environment specific for T cell development. *J Exp Med* **205**:2507-13.
- 183.** Hsieh, C. S., and A. Y. Rudensky. 2005. The role of TCR specificity in naturally arising CD25+ CD4+ regulatory T cell biology. *Curr Top Microbiol Immunol* **293**:25-42.
- 184.** Hsu, L. Y., Y. X. Tan, Z. Xiao, M. Malissen, and A. Weiss. 2009. A hypomorphic allele of ZAP-70 reveals a distinct thymic threshold for autoimmune disease versus autoimmune reactivity. *J Exp Med* **206**:2527-41.
- 185.** Hsu, S. C., C. C. Wu, J. Han, and M. Z. Lai. 2003. Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in different stages of thymocyte development. *Blood* **101**:970-6.
- 186.** Hu, J., N. Sahu, E. Walsh, and A. August. 2007. Memory phenotype CD8+ T cells with innate function selectively develop in the absence of active I κ k. *Eur J Immunol* **37**:2892-9.
- 187.** Huang, Z., H. Xie, V. Ioannidis, W. Held, H. Clevers, M. S. Sadim, and Z. Sun. 2006. Transcriptional regulation of CD4 gene expression by T cell factor-1/beta-catenin pathway. *J Immunol* **176**:4880-7.
- 188.** Hubbard, S. R., W. R. Bishop, P. Kirschmeier, S. J. George, S. P. Cramer, and W. A. Hendrickson. 1991. Identification and characterization of zinc binding sites in protein kinase C. *Science* **254**:1776-9.
- 189.** Huppa, J. B., and M. M. Davis. 2003. T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nat Rev Immunol* **3**:973-83.
- 190.** Hurley, J. H. 2006. Membrane binding domains. *Biochim Biophys Acta* **1761**:805-11.
- 191.** Hurley, J. H., A. C. Newton, P. J. Parker, P. M. Blumberg, and Y. Nishizuka. 1997. Taxonomy and function of C1 protein kinase C homology domains. *Protein Sci* **6**:477-80.
- 192.** Inobe, M., and R. H. Schwartz. 2004. CTLA-4 engagement acts as a brake on CD4+ T cell proliferation and cytokine production but is not required for tuning T cell reactivity in adaptive tolerance. *J Immunol* **173**:7239-48.
- 193.** Irie, A., K. Harada, H. Tsukamoto, J. R. Kim, N. Araki, and Y. Nishimura. 2006. Protein kinase D2 contributes to either IL-2 promoter regulation or induction of cell death upon TCR stimulation depending on its activity in Jurkat cells. *Int Immunol* **18**:1737-47.
- 194.** Irie, K., A. Nakahara, Y. Nakagawa, H. Ohigashi, M. Shindo, H. Fukuda, H. Konishi, U. Kikkawa, K. Kashiwagi, and N. Saito. 2002. Establishment of a binding assay for protein kinase C isozymes using synthetic C1 peptides and development of new medicinal leads with protein kinase C isozyme and C1 domain selectivity. *Pharmacol Ther* **93**:271-81.
- 195.** Iritani, B. M., J. Alberola-Ila, K. A. Forbush, and R. M. Perimutter. 1999. Distinct signals mediate maturation and allelic exclusion in lymphocyte progenitors. *Immunity* **10**:713-22.
- 196.** Irvin, B. J., B. L. Williams, A. E. Nilson, H. O. Maynor, and R. T. Abraham. 2000. Pleiotropic contributions of phospholipase C-gamma1 (PLC-gamma1) to T-cell antigen receptor-mediated signaling: reconstitution studies of a PLC-gamma1-deficient Jurkat T-cell line. *Mol Cell Biol* **20**:9149-61.

- 197. Iwasaki, H., and K. Akashi.** 2006. Thymus exclusivity: all the right conditions for T cells. *Immunity* **25**:697-700.
- 198. Iwashima, M., B. A. Irving, N. S. van Oers, A. C. Chan, and A. Weiss.** 1994. Sequential interactions of the TCR with two distinct cytoplasmic tyrosine kinases. *Science* **263**:1136-9.
- 199. Jameson, S. C.** 2002. Maintaining the norm: T-cell homeostasis. *Nat Rev Immunol* **2**:547-56.
- 200. Jang, I. K., J. Zhang, Y. J. Chiang, H. K. Kole, D. G. Cronshaw, Y. Zou, and H. Gu.** Grb2 functions at the top of the T-cell antigen receptor-induced tyrosine kinase cascade to control thymic selection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**:10620-5.
- 201. Jenkins, M. R., A. Tsun, J. C. Stinchcombe, and G. M. Griffiths.** 2009. The strength of T cell receptor signal controls the polarization of cytotoxic machinery to the immunological synapse. *Immunity* **31**:621-31.
- 202. Ji, Q. S., G. E. Winnier, K. D. Niswender, D. Horstman, R. Wisdom, M. A. Magnuson, and G. Carpenter.** 1997. Essential role of the tyrosine kinase substrate phospholipase C-gamma1 in mammalian growth and development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:2999-3003.
- 203. Jiang, Q., W. Q. Li, F. B. Aiello, R. Mazzucchelli, B. Asefa, A. R. Khaled, and S. K. Durum.** 2005. Cell biology of IL-7, a key lymphotrophin. *Cytokine Growth Factor Rev* **16**:513-33.
- 204. Jimi, E., I. Strickland, R. E. Voll, M. Long, and S. Ghosh.** 2008. Differential role of the transcription factor NF-kappaB in selection and survival of CD4+ and CD8+ thymocytes. *Immunity* **29**:523-37.
- 205. Jones, D. R., M. A. Sanjuan, J. C. Stone, and I. Merida.** 2002. Expression of a catalytically inactive form of diacylglycerol kinase alpha induces sustained signaling through RasGRP. *FASEB J* **16**:595-7.
- 206. Jones, R. G., M. Parsons, M. Bonnard, V. S. Chan, W. C. Yeh, J. R. Woodgett, and P. S. Ohashi.** 2000. Protein kinase B regulates T lymphocyte survival, nuclear factor kappaB activation, and Bcl-X(L) levels in vivo. *J Exp Med* **191**:1721-34.
- 207. Jordan, M. S., A. Boesteanu, A. J. Reed, A. L. Petrone, A. E. Holenbeck, M. A. Lerman, A. Najj, and A. J. Caton.** 2001. Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol* **2**:301-6.
- 208. Jordan, M. S., J. E. Smith, J. C. Burns, J. E. Austin, K. E. Nichols, A. C. Aschenbrenner, and G. A. Koretzky.** 2008. Complementation in trans of altered thymocyte development in mice expressing mutant forms of the adaptor molecule SLP76. *Immunity* **28**:359-69.
- 209. Jost, P. J., S. Weiss, U. Ferch, O. Gross, T. W. Mak, C. Peschel, and J. Ruland.** 2007. Bcl10/Malt1 signaling is essential for TCR-induced NF-kappaB activation in thymocytes but dispensable for positive or negative selection. *J Immunol* **178**:953-60.
- 210. Juntilla, M. M., J. A. Wofford, M. J. Birnbaum, J. C. Rathmell, and G. A. Koretzky.** 2007. Akt1 and Akt2 are required for alphabeta thymocyte survival and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:12105-10.
- 211. Kanoh, H., F. Sakane, S. Imai, and I. Wada.** 1993. Diacylglycerol kinase and phosphatidic acid phosphatase--enzymes metabolizing lipid second messengers. *Cell Signal* **5**:495-503.
- 212. Kappes, D. J., and X. He.** 2006. Role of the transcription factor Th-POK in CD4:CD8 lineage commitment. *Immunol Rev* **209**:237-52.
- 213. Karpova, M. B., J. Schoumans, I. Ernberg, J. I. Henter, M. Nordenskjold, and B. Fadeel.** 2005. Raji revisited: cytogenetics of the original Burkitt's lymphoma cell line. *Leukemia* **19**:159-61.
- 214. Kawasaki, H., G. M. Springett, S. Toki, J. J. Canales, P. Harlan, J. P. Blumenstiel, E. J. Chen, I. A. Bany, N. Mochizuki, A. Ashbacher, M. Matsuda, D. E. Housman, and A. M. Graybiel.** 1998. A Rap guanine nucleotide exchange factor enriched highly in the basal ganglia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:13278-83.
- 215. Kaye, J.** 2000. Regulation of T cell development in the thymus. *Immunol Res* **21**:71-81.
- 216. Kazanietz, M. G.** 2000. Eyes wide shut: protein kinase C isozymes are not the only receptors for the phorbol ester tumor promoters. *Mol Carcinog* **28**:5-11.
- 217. Kazanietz, M. G.** 2002. Novel "nonkinase" phorbol ester receptors: the C1 domain connection. *Mol Pharmacol* **61**:759-67.
- 218. Kazanietz, M. G., M. J. Caloca, P. Eroles, T. Fujii, M. L. Garcia-Bermejo, M. Reilly, and H. Wang.** 2000. Pharmacology of the receptors for the phorbol ester tumor promoters: multiple receptors with different biochemical properties. *Biochem Pharmacol* **60**:1417-24.
- 219. Kersh, G. J.** 2004. Transcriptional control of thymocyte positive selection. *Immunol Res* **29**:125-38.
- 220. Kesavan, K. P., C. C. Isaacson, C. L. Ashendel,**

- R. L. Geahlen, and M. L. Harrison.** 2002. Characterization of the in vivo sites of serine phosphorylation on Lck identifying serine 59 as a site of mitotic phosphorylation. *J Biol Chem* **277**:14666-73.
- 221. Khattri, R., T. Cox, S. A. Yasayko, and F. Ramsdell.** 2003. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol* **4**:337-42.
- 222. Khoshnan, A., D. Bae, C. A. Tindell, and A. E. Nel.** 2000. The physical association of protein kinase C theta with a lipid raft-associated inhibitor of kappa B factor kinase (IKK) complex plays a role in the activation of the NF-kappa B cascade by TCR and CD28. *J Immunol* **165**:6933-40.
- 223. Kikkawa, U., Y. Takai, Y. Tanaka, R. Miyake, and Y. Nishizuka.** 1983. Protein kinase C as a possible receptor protein of tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem* **258**:11442-5.
- 224. Kim, D. H., D. D. Sarbassov, S. M. Ali, J. E. King, R. R. Latek, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, and D. M. Sabatini.** 2002. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* **110**:163-75.
- 225. Kisielow, P., H. Bluthmann, U. D. Staerz, M. Steinmetz, and H. von Boehmer.** 1988. Tolerance in T-cell-receptor transgenic mice involves deletion of nonmature CD4+8+ thymocytes. *Nature* **333**:742-6.
- 226. Kisielow, P., and A. Miazek.** 1995. Positive selection of T cells: rescue from programmed cell death and differentiation require continual engagement of the T cell receptor. *J Exp Med* **181**:1975-84.
- 227. Klinger, M. B., B. Guilbault, R. E. Goulding, and R. J. Kay.** 2005. Deregulated expression of RasGRP1 initiates thymic lymphomagenesis independently of T-cell receptors. *Oncogene* **24**:2695-704.
- 228. Koelsch, U., B. Schraven, and L. Simeoni.** 2008. SIT and TRIM determine T cell fate in the thymus. *J Immunol* **181**:5930-9.
- 229. Koltsova, E. K., M. Ciofani, R. Benezra, T. Miyazaki, N. Clipstone, J. C. Zuniga-Pflucker, and D. L. Wiest.** 2007. Early growth response 1 and NF-ATc1 act in concert to promote thymocyte development beyond the beta-selection checkpoint. *J Immunol* **179**:4694-703.
- 230. Kopan, R., and M. X. Ilagan.** 2009. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell* **137**:216-33.
- 231. Kosco, K. A., F. Cerignoli, S. Williams, R. T. Abraham, and T. Mustelin.** 2008. SKAP55 modulates T cell antigen receptor-induced activation of the Ras-Erk-AP1 pathway by binding RasGRP1. *Mol Immunol* **45**:510-22.
- 232. Krensky, A. M., F. Sanchez-Madrid, E. Robbins, J. A. Nagy, T. A. Springer, and S. J. Burakoff.** 1983. The functional significance, distribution, and structure of LFA-1, LFA-2, and LFA-3: cell surface antigens associated with CTL-target interactions. *J Immunol* **131**:611-6.
- 233. Kreslavsky, T., M. Gleimer, and H. von Boehmer.** Alphabeta versus gammadelta lineage choice at the first TCR-controlled checkpoint. *Curr Opin Immunol* **22**:185-92.
- 234. Kruisbeek, A. M., M. C. Haks, M. Carleton, A. M. Michie, J. C. Zuniga-Pflucker, and D. L. Wiest.** 2000. Branching out to gain control: how the pre-TCR is linked to multiple functions. *Immunol Today* **21**:637-44.
- 235. Kuchroo, V. K., M. P. Das, J. A. Brown, A. M. Ranger, S. S. Zamvil, R. A. Sobel, H. L. Weiner, N. Nabavi, and L. H. Glimcher.** 1995. B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. *Cell* **80**:707-18.
- 236. Kurebayashi, S., E. Ueda, M. Sakaue, D. D. Patel, A. Medvedev, F. Zhang, and A. M. Jetten.** 2000. Retinoid-related orphan receptor gamma (RORgamma) is essential for lymphoid organogenesis and controls apoptosis during thymopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:10132-7.
- 237. Kurobe, H., C. Liu, T. Ueno, F. Saito, I. Ohigashi, N. Seach, R. Arakaki, Y. Hayashi, T. Kitagawa, M. Lipp, R. L. Boyd, and Y. Takahama.** 2006. CCR7-dependent cortex-to-medulla migration of positively selected thymocytes is essential for establishing central tolerance. *Immunity* **24**:165-77.
- 238. Kuroda, N., T. Mitani, N. Takeda, N. Ishimaru, R. Arakaki, Y. Hayashi, Y. Bando, K. Izumi, T. Takahashi, T. Nomura, S. Sakaguchi, T. Ueno, Y. Takahama, D. Uchida, S. Sun, F. Kajiura, Y. Mouri, H. Han, A. Matsushima, G. Yamada, and M. Matsumoto.** 2005. Development of autoimmunity against transcriptionally unrepressed target antigen in the thymus of Aire-deficient mice. *J Immunol* **174**:1862-70.
- 239. Kwan, J., and N. Killeen.** 2004. CCR7 directs the migration of thymocytes into the thymic medulla. *J Immunol* **172**:3999-4007.
- 240. Kydd, R., K. Lundberg, D. Vremec, A. W. Harris, and K. Shortman.** 1995. Intermediate steps in thymic positive selection. Generation of CD4-8+ T cells in culture from CD4+8+, CD4int8+, and CD4+8int thymocytes with up-regulated levels

- of TCR-CD3. *J Immunol* **155**:3806-14.
- 241.** Layer, K., G. Lin, A. Nencioni, W. Hu, A. Schmucker, A. N. Antov, X. Li, S. Takamatsu, T. Chevassut, N. A. Dower, S. L. Stang, D. Beier, J. Buhlmann, R. T. Bronson, K. B. Elkon, J. C. Stone, L. Van Parijs, and B. Lim. 2003. Autoimmunity as the consequence of a spontaneous mutation in Ras-grp1. *Immunity* **19**:243-55.
- 242.** Lee, S. H., S. Yun, J. Lee, M. J. Kim, Z. H. Piao, M. Jeong, J. W. Chung, T. D. Kim, S. R. Yoon, P. D. Greenberg, and I. Choi. 2009. RasGRP1 is required for human NK cell function. *J Immunol* **183**:7931-8.
- 243.** Lee, S. L., R. L. Wesselschmidt, G. P. Linette, O. Kanagawa, J. H. Russell, and J. Milbrandt. 1995. Unimpaired thymic and peripheral T cell death in mice lacking the nuclear receptor NGFI-B (Nur77). *Science* **269**:532-5.
- 244.** Legname, G., B. Seddon, M. Lovatt, P. Tomlinson, N. Sarner, M. Tolaini, K. Williams, T. Norton, D. Kioussis, and R. Zamoyska. 2000. Inducible expression of a p56Lck transgene reveals a central role for Lck in the differentiation of CD4 SP thymocytes. *Immunity* **12**:537-46.
- 245.** Leignadier, J., J. Rooney, J. F. Daudelin, and N. Labrecque. Lowering TCR expression on naive CD8(+) T cells does not affect memory T-cell differentiation. *Immunol Cell Biol*.
- 246.** Leitenberg, D., and K. Bottomly. 1999. Regulation of naive T cell differentiation by varying the potency of TCR signal transduction. *Semin Immunol* **11**:283-92.
- 247.** Leitges, M., C. Schmedt, R. Guinamad, J. Davoust, S. Schaal, S. Stabel, and A. Tarakhovsky. 1996. Immunodeficiency in protein kinase cbeta-deficient mice. *Science* **273**:788-91.
- 248.** Levelt, C. N., R. Carsetti, and K. Eichmann. 1993. Regulation of thymocyte development through CD3. II. Expression of T cell receptor beta CD3 epsilon and maturation to the CD4+8+ stage are highly correlated in individual thymocytes. *J Exp Med* **178**:1867-75.
- 249.** Levelt, C. N., A. Ehrfeld, and K. Eichmann. 1993. Regulation of thymocyte development through CD3. I. Timepoint of ligation of CD3 epsilon determines clonal deletion or induction of developmental program. *J Exp Med* **177**:707-16.
- 250.** Li, L., Y. Yang, and R. L. Stevens. 2002. Cloning of rat Ras guanine nucleotide releasing protein 4, and evaluation of its expression in rat mast cells and their bone marrow progenitors. *Mol Immunol* **38**:1283-8.
- 251.** Li, Q., X. Sun, J. Wu, Z. Lin, and Y. Luo. 2009. PKD2 interacts with Lck and regulates NFAT activity in T cells. *BMB Rep* **42**:35-40.
- 252.** Li, Q. J., J. Chau, P. J. Ebert, G. Sylvester, H. Min, G. Liu, R. Braich, M. Manoharan, J. Soutschek, P. Skare, L. O. Klein, M. M. Davis, and C. Z. Chen. 2007. miR-181a is an intrinsic modulator of T cell sensitivity and selection. *Cell* **129**:147-61.
- 253.** Li, Y., C. E. Sedwick, J. Hu, and A. Altman. 2005. Role for protein kinase Ctheta (PKCtheta) in TCR/CD28-mediated signaling through the canonical but not the non-canonical pathway for NF-kappaB activation. *J Biol Chem* **280**:1217-23.
- 254.** Liao, H. J., T. Kume, C. McKay, M. J. Xu, J. N. Ihle, and G. Carpenter. 2002. Absence of erythropoiesis and vasculogenesis in Plcg1-deficient mice. *J Biol Chem* **277**:9335-41.
- 255.** Liao, X. C., and D. R. Littman. 1995. Altered T cell receptor signaling and disrupted T cell development in mice lacking Itk. *Immunity* **3**:757-69.
- 256.** Liao, X. C., D. R. Littman, and A. Weiss. 1997. Itk and Fyn make independent contributions to T cell activation. *J Exp Med* **186**:2069-73.
- 257.** Lin, B., S. K. Kolluri, F. Lin, W. Liu, Y. H. Han, X. Cao, M. I. Dawson, J. C. Reed, and X. K. Zhang. 2004. Conversion of Bcl-2 from protector to killer by interaction with nuclear orphan receptor Nur77/TR3. *Cell* **116**:527-40.
- 258.** Lin, W., D. Haribhai, L. M. Relland, N. Truong, M. R. Carlson, C. B. Williams, and T. A. Chatila. 2007. Regulatory T cell development in the absence of functional Foxp3. *Nat Immunol* **8**:359-68.
- 259.** Lio, C. W., L. F. Dodson, C. M. Deppong, C. S. Hsieh, and J. M. Green. CD28 facilitates the generation of Foxp3(-) cytokine responsive regulatory T cell precursors. *J Immunol* **184**:6007-13.
- 260.** Liscovitch, M., M. Czarny, G. Fiucci, and X. Tang. 2000. Phospholipase D: molecular and cell biology of a novel gene family. *Biochem J* **345 Pt 3**:401-15.
- 261.** Liston, A., S. Lesage, J. Wilson, L. Peltonen, and C. C. Goodnow. 2003. Aire regulates negative selection of organ-specific T cells. *Nat Immunol* **4**:350-4.
- 262.** Liu, G., S. Burns, G. Huang, K. Boyd, R. L. Proia, R. A. Flavell, and H. Chi. 2009. The receptor S1P1 overrides regulatory T cell-mediated immune suppression through Akt-mTOR. *Nat Immunol* **10**:769-77.
- 263.** Liu, K. Q., S. C. Bunnell, C. B. Gurniak, and L. J. Berg. 1998. T cell receptor-initiated calcium re-

- lease is uncoupled from capacitative calcium entry in Itk-deficient T cells. *J Exp Med* **187**:1721-7.
- 264.** Liu, X., and R. Bosselut. 2004. Duration of TCR signaling controls CD4-CD8 lineage differentiation in vivo. *Nat Immunol* **5**:280-8.
- 265.** Liu, Y., M. Zhu, K. Nishida, T. Hirano, and W. Zhang. 2007. An essential role for RasGRP1 in mast cell function and IgE-mediated allergic response. *J Exp Med* **204**:93-103.
- 266.** Lorenzo, P. S., M. Beheshti, G. R. Pettit, J. C. Stone, and P. M. Blumberg. 2000. The guanine nucleotide exchange factor RasGRP is a high-affinity target for diacylglycerol and phorbol esters. *Mol Pharmacol* **57**:840-6.
- 267.** Love, P. E., E. W. Shores, M. D. Johnson, M. L. Tremblay, E. J. Lee, A. Grinberg, S. P. Huang, A. Singer, and H. Westphal. 1993. T cell development in mice that lack the zeta chain of the T cell antigen receptor complex. *Science* **261**:918-21.
- 268.** Lucas, B., and R. N. Germain. 1996. Unexpectedly complex regulation of CD4/CD8 coreceptor expression supports a revised model for CD4+CD8+ thymocyte differentiation. *Immunity* **5**:461-77.
- 269.** Lucas, J. A., L. O. Atherly, and L. J. Berg. 2002. The absence of Itk inhibits positive selection without changing lineage commitment. *J Immunol* **168**:6142-51.
- 270.** Lucas, J. A., M. Felices, J. W. Evans, and L. J. Berg. 2007. Subtle defects in pre-TCR signaling in the absence of the Tec kinase Itk. *J Immunol* **179**:7561-7.
- 271.** Lugo, J. P., S. N. Krishnan, R. D. Sailor, and E. V. Rothenberg. 1986. Early precursor thymocytes can produce interleukin 2 upon stimulation with calcium ionophore and phorbol ester. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**:1862-6.
- 272.** Lundberg, K., W. Heath, F. Kontgen, F. R. Carbone, and K. Shortman. 1995. Intermediate steps in positive selection: differentiation of CD4+8int TCRint thymocytes into CD4-8+TCRhi thymocytes. *J Exp Med* **181**:1643-51.
- 273.** Lyon, M. F., J. Peters, P. H. Glenister, S. Ball, and E. Wright. 1990. The scurfy mouse mutant has previously unrecognized hematological abnormalities and resembles Wiskott-Aldrich syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:2433-7.
- 274.** Ma, A., J. C. Pena, B. Chang, E. Margosian, L. Davidson, F. W. Alt, and C. B. Thompson. 1995. Bclx regulates the survival of double-positive thymocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:4763-7.
- 275.** Macian, F. 2005. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat Rev Immunol* **5**:472-84.
- 276.** Macian, F., F. Garcia-Cozar, S. H. Im, H. F. Horton, M. C. Byrne, and A. Rao. 2002. Transcriptional mechanisms underlying lymphocyte tolerance. *Cell* **109**:719-31.
- 277.** Macian, F., S. H. Im, F. J. Garcia-Cozar, and A. Rao. 2004. T-cell anergy. *Curr Opin Immunol* **16**:209-16.
- 278.** Maeda, Y., G. V. Beznoussenko, J. Van Lint, A. A. Mironov, and V. Malhotra. 2001. Recruitment of protein kinase D to the trans-Golgi network via the first cysteine-rich domain. *EMBO J* **20**:5982-90.
- 279.** Magnan, A., V. Di Bartolo, A. M. Mura, C. Boyer, M. Richelme, Y. L. Lin, A. Roure, A. Gillet, C. Arrieumerlou, O. Acuto, B. Malissen, and M. Malissen. 2001. T cell development and T cell responses in mice with mutations affecting tyrosines 292 or 315 of the ZAP-70 protein tyrosine kinase. *J Exp Med* **194**:491-505.
- 280.** Maltzman, J. S., L. Kovoov, J. L. Clements, and G. A. Koretzky. 2005. Conditional deletion reveals a cell-autonomous requirement of SLP-76 for thymocyte selection. *J Exp Med* **202**:893-900.
- 281.** Manning, B. D., and L. C. Cantley. 2007. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* **129**:1261-74.
- 282.** Margarit, S. M., H. Sondermann, B. E. Hall, B. Nagar, A. Hoelz, M. Pirruccello, D. Bar-Sagi, and J. Kuriyan. 2003. Structural evidence for feedback activation by Ras.GTP of the Ras-specific nucleotide exchange factor SOS. *Cell* **112**:685-95.
- 283.** Mariathasan, S., S. S. Ho, A. Zakarian, and P. S. Ohashi. 2000. Degree of ERK activation influences both positive and negative thymocyte selection. *Eur J Immunol* **30**:1060-8.
- 284.** Mariathasan, S., A. Zakarian, D. Bouchard, A. M. Michie, J. C. Zuniga-Pflucker, and P. S. Ohashi. 2001. Duration and strength of extracellular signal-regulated kinase signals are altered during positive versus negative thymocyte selection. *J Immunol* **167**:4966-73.
- 285.** Marklund, U., K. Lightfoot, and D. Cantrell. 2003. Intracellular location and cell context-dependent function of protein kinase D. *Immunity* **19**:491-501.
- 286.** Matechak, E. O., N. Killeen, S. M. Hedrick, and B. J. Fowlkes. 1996. MHC class II-specific T cells can develop in the CD8 lineage when CD4 is absent. *Immunity* **4**:337-47.

- 287.** Matloubian, M., C. G. Lo, G. Cinamon, M. J. Lesneski, Y. Xu, V. Brinkmann, M. L. Allende, R. L. Proia, and J. G. Cyster. 2004. Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* **427**:355-60.
- 288.** Matsumoto, R., D. Wang, M. Blonska, H. Li, M. Kobayashi, B. Pappu, Y. Chen, and X. Lin. 2005. Phosphorylation of CARMA1 plays a critical role in T Cell receptor-mediated NF-kappaB activation. *Immunity* **23**:575-85.
- 289.** Matthews, S. A., M. N. Navarro, L. V. Sinclair, E. A. Emslie, M. C. Feijoo-Carnero, and D. Cantrell. Unique functions for protein kinase D1 and protein kinase D2 in mammalian cells. *Biochem J*.
- 290.** Matthews, S. A., E. Rozenfurt, and D. Cantrell. 2000. Protein kinase D. A selective target for antigen receptors and a downstream target for protein kinase C in lymphocytes. *J Exp Med* **191**:2075-82.
- 291.** McCarty, N., S. Paust, K. Ikizawa, I. Dan, X. Li, and H. Cantor. 2005. Signaling by the kinase MINK is essential in the negative selection of autoreactive thymocytes. *Nat Immunol* **6**:65-72.
- 292.** Mecklenbrauker, I., K. Saijo, N. Y. Zheng, M. Leitges, and A. Tarakhovsky. 2002. Protein kinase Cdelta controls self-antigen-induced B-cell tolerance. *Nature* **416**:860-5.
- 293.** Medeiros, R. B., D. M. Dickey, H. Chung, A. C. Quale, L. R. Nagarajan, D. D. Billadeau, and Y. Shimizu. 2005. Protein kinase D1 and the beta 1 integrin cytoplasmic domain control beta 1 integrin function via regulation of Rap1 activation. *Immunity* **23**:213-26.
- 294.** Medkova, M., and W. Cho. 1999. Interplay of C1 and C2 domains of protein kinase C-alpha in its membrane binding and activation. *J Biol Chem* **274**:19852-61.
- 295.** Melowic, H. R., R. V. Stahelin, N. R. Blatner, W. Tian, K. Hayashi, A. Altman, and W. Cho. 2007. Mechanism of diacylglycerol-induced membrane targeting and activation of protein kinase Ctheta. *J Biol Chem* **282**:21467-76.
- 296.** Merida, I., A. Avila-Flores, and E. Merino. 2008. Diacylglycerol kinases: at the hub of cell signalling. *Biochem J* **409**:1-18.
- 297.** Merino, E., A. Avila-Flores, Y. Shirai, I. Moraga, N. Saito, and I. Merida. 2008. Lck-dependent tyrosine phosphorylation of diacylglycerol kinase alpha regulates its membrane association in T cells. *J Immunol* **180**:5805-15.
- 298.** Michie, A. M., S. Trop, D. L. Wiest, and J. C. Zuniga-Pflucker. 1999. Extracellular signal-regulated kinase (ERK) activation by the pre-T cell receptor in developing thymocytes in vivo. *J Exp Med* **190**:1647-56.
- 299.** Misslitz, A., O. Pabst, G. Hintzen, L. Ohl, E. Kremmer, H. T. Petrie, and R. Forster. 2004. Thymic T cell development and progenitor localization depend on CCR7. *J Exp Med* **200**:481-91.
- 300.** Miyamoto, A., K. Nakayama, H. Imaki, S. Hirose, Y. Jiang, M. Abe, T. Tsukiyama, H. Nagahama, S. Ohno, S. Hatakeyama, and K. I. Nakayama. 2002. Increased proliferation of B cells and autoimmunity in mice lacking protein kinase Cdelta. *Nature* **416**:865-9.
- 301.** Miyazaki, T. 1997. Two distinct steps during thymocyte maturation from CD4-CD8- to CD4+CD8+ distinguished in the early growth response (Egr)-1 transgenic mice with a recombinase-activating gene-deficient background. *J Exp Med* **186**:877-85.
- 302.** Molina, T. J., K. Kishihara, D. P. Siderovski, W. van Ewijk, A. Narendran, E. Timms, A. Wakeham, C. J. Paige, K. U. Hartmann, A. Veillette, and et al. 1992. Profound block in thymocyte development in mice lacking p56lck. *Nature* **357**:161-4.
- 303.** Molinero, L. L., J. Yang, T. Gajewski, C. Abraham, M. A. Farrar, and M. L. Alegre. 2009. CARMA1 controls an early checkpoint in the thymic development of FoxP3+ regulatory T cells. *J Immunol* **182**:6736-43.
- 304.** Mollinedo, F., C. Gajate, and I. Flores. 1994. Involvement of phospholipase D in the activation of transcription factor AP-1 in human T lymphoid Jurkat cells. *J Immunol* **153**:2457-69.
- 305.** Mor, A., G. Campi, G. Du, Y. Zheng, D. A. Foster, M. L. Dustin, and M. R. Philips. 2007. The lymphocyte function-associated antigen-1 receptor costimulates plasma membrane Ras via phospholipase D2. *Nat Cell Biol* **9**:713-9.
- 306.** Morley, S. C., K. S. Weber, H. Kao, and P. M. Allen. 2008. Protein kinase C-theta is required for efficient positive selection. *J Immunol* **181**:4696-708.
- 307.** Nagamine, K., P. Peterson, H. S. Scott, J. Kudoh, S. Minoshima, M. Heino, K. J. Krohn, M. D. Lalioti, P. E. Mullis, S. E. Antonarakis, K. Kawasaka, S. Asakawa, F. Ito, and N. Shimizu. 1997. Positional cloning of the APECED gene. *Nat Genet* **17**:393-8.
- 308.** Nagy, E., and L. E. Maquat. 1998. A rule for termination-codon position within intron-containing genes: when nonsense affects RNA abundance. *Trends Biochem Sci* **23**:198-9.

- 309.** Nakagawa, T., W. Roth, P. Wong, A. Nelson, A. Farr, J. Deussing, J. A. Villadangos, H. Ploegh, C. Peters, and A. Y. Rudensky. 1998. Cathepsin L: critical role in li degradation and CD4 T cell selection in the thymus. *Science* **280**:450-3.
- 310.** Naramura, M., H. K. Kole, R. J. Hu, and H. Gu. 1998. Altered thymic positive selection and intracellular signals in Cbl-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:15547-52.
- 311.** Nedjic, J., M. Aichinger, J. Emmerich, N. Mizushima, and L. Klein. 2008. Autophagy in thymic epithelium shapes the T-cell repertoire and is essential for tolerance. *Nature* **455**:396-400.
- 312.** Negishi, I., N. Motoyama, K. Nakayama, S. Senju, S. Hatakeyama, Q. Zhang, A. C. Chan, and D. Y. Loh. 1995. Essential role for ZAP-70 in both positive and negative selection of thymocytes. *Nature* **376**:435-8.
- 313.** Neilson, J. R., M. M. Winslow, E. M. Hur, and G. R. Crabtree. 2004. Calcineurin B1 is essential for positive but not negative selection during thymocyte development. *Immunity* **20**:255-66.
- 314.** Nemazee, D., and K. A. Hogquist. 2003. Antigen receptor selection by editing or downregulation of V(D)J recombination. *Curr Opin Immunol* **15**:182-9.
- 315.** Newton, A. C. Protein kinase C: poised to signal. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **298**:E395-402.
- 316.** Nguyen, T. V., Y. Ke, E. E. Zhang, and G. S. Feng. 2006. Conditional deletion of Shp2 tyrosine phosphatase in thymocytes suppresses both pre-TCR and TCR signals. *J Immunol* **177**:5990-6.
- 317.** Nitta, T., S. Murata, K. Sasaki, H. Fujii, A. M. Ripen, N. Ishimaru, S. Koyasu, K. Tanaka, and Y. Takahama. Thymoproteasome shapes immunocompetent repertoire of CD8+ T cells. *Immunity* **32**:29-40.
- 318.** Nitta, T., S. Murata, T. Ueno, K. Tanaka, and Y. Takahama. 2008. Thymic microenvironments for T-cell repertoire formation. *Adv Immunol* **99**:59-94.
- 319.** Nomura, T., and S. Sakaguchi. 2007. Foxp3 and Aire in thymus-generated Treg cells: a link in self-tolerance. *Nat Immunol* **8**:333-4.
- 320.** Norment, A. M., L. Y. Bogatzki, M. Klinger, E. W. Ojala, M. J. Bevan, and R. J. Kay. 2003. Transgenic expression of RasGRP1 induces the maturation of double-negative thymocytes and enhances the production of CD8 single-positive thymocytes. *J Immunol* **170**:1141-9.
- 321.** Nossal, G. J. 1994. Negative selection of lymphocytes. *Cell* **76**:229-39.
- 322.** Nunez-Cruz, S., E. Aguado, S. Richelme, B. Chetaille, A. M. Mura, M. Richelme, L. Pouyet, E. Jouvin-Marche, L. Xerri, B. Malissen, and M. Malissen. 2003. LAT regulates gammadelta T cell homeostasis and differentiation. *Nat Immunol* **4**:999-1008.
- 323.** O'Garra, A., and P. Vieira. 2004. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nat Med* **10**:801-5.
- 324.** Oancea, E., M. N. Teruel, A. F. Quest, and T. Meyer. 1998. Green fluorescent protein (GFP)-tagged cysteine-rich domains from protein kinase C as fluorescent indicators for diacylglycerol signaling in living cells. *J Cell Biol* **140**:485-98.
- 325.** Obar, J. J., and L. Lefrancois. Early signals during CD8 T cell priming regulate the generation of central memory cells. *J Immunol* **185**:263-72.
- 326.** Oettinger, M. A., D. G. Schatz, C. Gorka, and D. Baltimore. 1990. RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science* **248**:1517-23.
- 327.** Oh-hora, M., and A. Rao. 2008. Calcium signaling in lymphocytes. *Curr Opin Immunol* **20**:250-8.
- 328.** Ohba, Y., N. Mochizuki, S. Yamashita, A. M. Chan, J. W. Schrader, S. Hattori, K. Nagashima, and M. Matsuda. 2000. Regulatory proteins of R-Ras, TC21/R-Ras2, and M-Ras/R-Ras3. *J Biol Chem* **275**:20020-6.
- 329.** Ohno, H., T. Aoe, S. Taki, D. Kitamura, Y. Ishida, K. Rajewsky, and T. Saito. 1993. Developmental and functional impairment of T cells in mice lacking CD3 zeta chains. *EMBO J* **12**:4357-66.
- 330.** Olenchock, B. A., R. Guo, J. H. Carpenter, M. Jordan, M. K. Topham, G. A. Koretzky, and X. P. Zhong. 2006. Disruption of diacylglycerol metabolism impairs the induction of T cell anergy. *Nat Immunol* **7**:1174-81.
- 331.** Ono, Y., T. Fujii, K. Igarashi, T. Kuno, C. Tanaka, U. Kikkawa, and Y. Nishizuka. 1989. Phorbol ester binding to protein kinase C requires a cysteine-rich zinc-finger-like sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:4868-71.
- 332.** Osterloh, P., K. Linkemann, S. Tenzer, H. G. Rammensee, M. P. Radsak, D. H. Busch, and H. Schild. 2006. Proteasomes shape the repertoire of T cells participating in antigen-specific immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:5042-7.
- 333.** Outram, S. V., T. Crompton, I. Merida, A.

- Varas, and A. C. Martinez.** 2002. Diacylglycerol kinase alpha activity promotes survival of CD4+ 8+ double positive cells during thymocyte development. *Immunology* **105**:391-8.
- 334. Pages, F., M. Ragueneau, R. Rottapel, A. Truneh, J. Nunes, J. Imbert, and D. Olive.** 1994. Binding of phosphatidylinositol-3-OH kinase to CD28 is required for T-cell signalling. *Nature* **369**:327-9.
- 335. Pages, G., S. Guerin, D. Grall, F. Bonino, A. Smith, F. Anjuere, P. Auberger, and J. Pouyssegur.** 1999. Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice. *Science* **286**:1374-7.
- 336. Palmer, E.** 2003. Negative selection--clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. *Nat Rev Immunol* **3**:383-91.
- 337. Parekh, D. B., W. Ziegler, and P. J. Parker.** 2000. Multiple pathways control protein kinase C phosphorylation. *EMBO J* **19**:496-503.
- 338. Park, D. J., H. W. Rho, and S. G. Rhee.** 1991. CD3 stimulation causes phosphorylation of phospholipase C-gamma 1 on serine and tyrosine residues in a human T-cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:5453-6.
- 339. Park, J. H., S. Adoro, T. Guinter, B. Erman, A. S. Alag, M. Catalfamo, M. Y. Kimura, Y. Cui, P. J. Lucas, R. E. Gress, M. Kubo, L. Hennighausen, L. Feigenbaum, and A. Singer.** 2010. Signaling by intrathymic cytokines, not T cell antigen receptors, specifies CD8 lineage choice and promotes the differentiation of cytotoxic-lineage T cells. *Nat Immunol* **11**:257-64.
- 340. Park, J. H., S. Adoro, P. J. Lucas, S. D. Sarafova, A. S. Alag, L. L. Doan, B. Erman, X. Liu, W. Ellmeier, R. Bosselut, L. Feigenbaum, and A. Singer.** 2007. 'Coreceptor tuning': cytokine signals transcriptionally tailor CD8 coreceptor expression to the self-specificity of the TCR. *Nat Immunol* **8**:1049-59.
- 341. Park, J. H., Q. Yu, B. Erman, J. S. Appelbaum, D. Montoya-Durango, H. L. Grimes, and A. Singer.** 2004. Suppression of IL7Ralpha transcription by IL-7 and other prosurvival cytokines: a novel mechanism for maximizing IL-7-dependent T cell survival. *Immunity* **21**:289-302.
- 342. Parra, M., H. Kasler, T. A. McKinsey, E. N. Olson, and E. Verdin.** 2005. Protein kinase D1 phosphorylates HDAC7 and induces its nuclear export after T-cell receptor activation. *J Biol Chem* **280**:13762-70.
- 343. Paterson, D. J., and A. F. Williams.** 1987. An intermediate cell in thymocyte differentiation that expresses CD8 but not CD4 antigen. *J Exp Med* **166**:1603-8.
- 344. Pear, W. S., J. P. Miller, L. Xu, J. C. Pui, B. Soffer, R. C. Quackenbush, A. M. Pendergast, R. Bronson, J. C. Aster, M. L. Scott, and D. Baltimore.** 1998. Efficient and rapid induction of a chronic myelogenous leukemia-like myeloproliferative disease in mice receiving P210 bcr/abl-transduced bone marrow. *Blood* **92**:3780-92.
- 345. Pearse, G.** 2006. Histopathology of the thymus. *Toxicol Pathol* **34**:515-47.
- 346. Pearse, G.** 2006. Normal structure, function and histology of the thymus. *Toxicol Pathol* **34**:504-14.
- 347. Perez de Castro, I., T. G. Bivona, M. R. Phillips, and A. Pellicer.** 2004. Ras activation in Jurkat T cells following low-grade stimulation of the T-cell receptor is specific to N-Ras and occurs only on the Golgi apparatus. *Mol Cell Biol* **24**:3485-96.
- 348. Perez-Villar, J. J., G. S. Whitney, M. A. Bowen, D. H. Hewgill, A. A. Aruffo, and S. B. Kanner.** 1999. CD5 negatively regulates the T-cell antigen receptor signal transduction pathway: involvement of SH2-containing phosphotyrosine phosphatase SHP-1. *Mol Cell Biol* **19**:2903-12.
- 349. Pfeifhofer, C., T. Gruber, T. Letschka, N. Thuille, C. Lutz-Nicoladoni, N. Hermann-Kleiter, U. Braun, M. Leitges, and G. Baier.** 2006. Defective IgG2a/2b class switching in PKC alpha-/- mice. *J Immunol* **176**:6004-11.
- 350. Pfeifhofer, C., K. Kofler, T. Gruber, N. G. Tabrizi, C. Lutz, K. Maly, M. Leitges, and G. Baier.** 2003. Protein kinase C theta affects Ca2+ mobilization and NFAT cell activation in primary mouse T cells. *J Exp Med* **197**:1525-35.
- 351. Pivniouk, V., E. Tsitsikov, P. Swinton, G. Rathbun, F. W. Alt, and R. S. Geha.** 1998. Impaired viability and profound block in thymocyte development in mice lacking the adaptor protein SLP-76. *Cell* **94**:229-38.
- 352. Plotkin, J., S. E. Prockop, A. Lepique, and H. T. Petrie.** 2003. Critical role for CXCR4 signaling in progenitor localization and T cell differentiation in the postnatal thymus. *J Immunol* **171**:4521-7.
- 353. Poon, H. Y., and J. C. Stone.** 2009. Functional links between diacylglycerol and phosphatidylinositol signaling systems in human leukocyte-derived cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* **390**:1395-401.
- 354. Powell, J. D.** 2006. The induction and maintenance of T cell anergy. *Clin Immunol* **120**:239-46.

- 355. Praveen, K., Y. Zheng, F. Rivas, and T. F. Gajewski.** 2009. Protein kinase C θ focusing at the cSMAC is a consequence rather than cause of TCR signaling and is dependent on the MEK/ERK pathway. *J Immunol* **182**:6022-30.
- 356. Priatel, J. J., X. Chen, S. Dhanji, N. Abraham, and H. S. Teh.** 2006. RasGRP1 transmits prodifferentiation TCR signaling that is crucial for CD4 T cell development. *J Immunol* **177**:1470-80.
- 357. Priatel, J. J., X. Chen, Y. H. Huang, M. T. Chow, L. A. Zenewicz, J. J. Coughlin, H. Shen, J. C. Stone, R. Tan, and H. S. Teh.** RasGRP1 regulates antigen-induced developmental programming by naive CD8 T cells. *J Immunol* **184**:666-76.
- 358. Priatel, J. J., X. Chen, L. A. Zenewicz, H. Shen, K. W. Harder, M. S. Horwitz, and H. S. Teh.** 2007. Chronic immunodeficiency in mice lacking RasGRP1 results in CD4 T cell immune activation and exhaustion. *J Immunol* **179**:2143-52.
- 359. Priatel, J. J., S. J. Teh, N. A. Dower, J. C. Stone, and H. S. Teh.** 2002. RasGRP1 transduces low-grade TCR signals which are critical for T cell development, homeostasis, and differentiation. *Immunity* **17**:617-27.
- 360. Prisco, A., L. Vanes, S. Ruf, C. Trigueros, and V. L. Tybulewicz.** 2005. Lineage-specific requirement for the PH domain of Vav1 in the activation of CD4+ but not CD8+ T cells. *Immunity* **23**:263-74.
- 361. Puente, L. G., J. S. He, and H. L. Ostergaard.** 2006. A novel PKC regulates ERK activation and degranulation of cytotoxic T lymphocytes: Plasticity in PKC regulation of ERK. *Eur J Immunol* **36**:1009-18.
- 362. Puente, L. G., J. C. Stone, and H. L. Ostergaard.** 2000. Evidence for protein kinase C-dependent and -independent activation of mitogen-activated protein kinase in T cells: potential role of additional diacylglycerol binding proteins. *J Immunol* **165**:6865-71.
- 363. Qu, H. Q., S. F. Grant, J. P. Bradfield, C. Kim, E. Frackelton, H. Hakonarson, and C. Polychronakos.** 2009. Association of RASGRP1 with type 1 diabetes is revealed by combined follow-up of two genome-wide studies. *J Med Genet* **46**:553-4.
- 364. Quann, E. J., E. Merino, T. Furuta, and M. Huse.** 2009. Localized diacylglycerol drives the polarization of the microtubule-organizing center in T cells. *Nat Immunol* **10**:627-35.
- 365. Quest, A. F., E. S. Bardes, and R. M. Bell.** 1994. A phorbol ester binding domain of protein kinase C gamma. Deletion analysis of the Cys2 domain defines a minimal 43-amino acid peptide. *J Biol Chem* **269**:2961-70.
- 366. Quest, A. F., E. S. Bardes, and R. M. Bell.** 1994. A phorbol ester binding domain of protein kinase C gamma. High affinity binding to a glutathione-S-transferase/Cys2 fusion protein. *J Biol Chem* **269**:2953-60.
- 367. Quest, A. F., and R. M. Bell.** 1994. The regulatory region of protein kinase C gamma. Studies of phorbol ester binding to individual and combined functional segments expressed as glutathione S-transferase fusion proteins indicate a complex mechanism of regulation by phospholipids, phorbol esters, and divalent cations. *J Biol Chem* **269**:20000-12.
- 368. Raman, V., F. Blaeser, N. Ho, D. L. Engle, C. B. Williams, and T. A. Chatila.** 2001. Requirement for Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase type IV/Gr in setting the thymocyte selection threshold. *J Immunol* **167**:6270-8.
- 369. Ramsey, C., A. Bukrinsky, and L. Peltonen.** 2002. Systematic mutagenesis of the functional domains of AIRE reveals their role in intracellular targeting. *Hum Mol Genet* **11**:3299-308.
- 370. Ramsey, C., O. Winqvist, L. Puhakka, M. Halonen, A. Moro, O. Kampe, P. Eskelin, M. Pelto-Huikko, and L. Peltonen.** 2002. Aire deficient mice develop multiple features of APECED phenotype and show altered immune response. *Hum Mol Genet* **11**:397-409.
- 371. Ranger, A. M., M. Oukka, J. Rengarajan, and L. H. Glimcher.** 1998. Inhibitory function of two NFAT family members in lymphoid homeostasis and Th2 development. *Immunity* **9**:627-35.
- 372. Rao, R. R., Q. Li, K. Odunsi, and P. A. Shrikant.** The mTOR kinase determines effector versus memory CD8+ T cell fate by regulating the expression of transcription factors T-bet and Eomesodermin. *Immunity* **32**:67-78.
- 373. Rathmell, J. C., T. Lindsten, W. X. Zong, R. M. Cinalli, and C. B. Thompson.** 2002. Deficiency in Bak and Bax perturbs thymic selection and lymphoid homeostasis. *Nat Immunol* **3**:932-9.
- 374. Rebhun, J. F., A. F. Castro, and L. A. Quilliam.** 2000. Identification of guanine nucleotide exchange factors (GEFs) for the Rap1 GTPase. Regulation of MR-GEF by M-Ras-GTP interaction. *J Biol Chem* **275**:34901-8.
- 375. Reid, P. A., S. D. Gardner, D. M. Williams, and M. M. Harnett.** 1997. The antigen receptors on mature and immature T lymphocytes are coupled to phosphatidylcholine-specific phospholipase D activation. *Immunology* **90**:250-6.
- 376. Reif, K., B. M. Burgering, and D. A. Cantrell.**

1997. Phosphatidylinositol 3-kinase links the interleukin-2 receptor to protein kinase B and p70 S6 kinase. *J Biol Chem* **272**:14426-33.
- 377. Reynolds, L. F., L. A. Smyth, T. Norton, N. Freshney, J. Downward, D. Kioussis, and V. L. Tybulewicz.** 2002. Vav1 transduces T cell receptor signals to the activation of phospholipase C-gamma1 via phosphoinositide 3-kinase-dependent and -independent pathways. *J Exp Med* **195**:1103-14.
- 378. Richie, L. I., P. J. Ebert, L. C. Wu, M. F. Krummel, J. J. Owen, and M. M. Davis.** 2002. Imaging synapse formation during thymocyte selection: inability of CD3zeta to form a stable central accumulation during negative selection. *Immunity* **16**:595-606.
- 379. Rincon, E., T. Santos, A. Avila-Flores, J. P. Albar, V. Lalioti, C. Lei, W. Hong, and I. Merida.** 2007. Proteomics identification of sorting nexin 27 as a diacylglycerol kinase zeta-associated protein: new diacylglycerol kinase roles in endocytic recycling. *Mol Cell Proteomics* **6**:1073-87.
- 380. Rincon, M., A. Whitmarsh, D. D. Yang, L. Weiss, B. Derijard, P. Jayaraj, R. J. Davis, and R. A. Flavell.** 1998. The JNK pathway regulates the In vivo deletion of immature CD4(+)CD8(+) thymocytes. *J Exp Med* **188**:1817-30.
- 381. Rivera, R. R., C. P. Johns, J. Quan, R. S. Johnson, and C. Murre.** 2000. Thymocyte selection is regulated by the helix-loop-helix inhibitor protein, Id3. *Immunity* **12**:17-26.
- 382. Robey, E. A., B. J. Fowlkes, J. W. Gordon, D. Kioussis, H. von Boehmer, F. Ramsdell, and R. Axel.** 1991. Thymic selection in CD8 transgenic mice supports an instructive model for commitment to a CD4 or CD8 lineage. *Cell* **64**:99-107.
- 383. Robey, E. A., B. J. Fowlkes, and D. M. Pardoll.** 1990. Molecular mechanisms for lineage commitment in T cell development. *Semin Immunol* **2**:25-34.
- 384. Romeo, C., and B. Seed.** 1991. Cellular immunity to HIV activated by CD4 fused to T cell or Fc receptor polypeptides. *Cell* **64**:1037-46.
- 385. Roncagalli, R., M. Mingueneau, C. Gregoire, M. Malissen, and B. Malissen.** LAT signaling pathology: an "autoimmune" condition without T cell self-reactivity. *Trends Immunol* **31**:253-9.
- 386. Roose, J. P., M. Mollenauer, V. A. Gupta, J. Stone, and A. Weiss.** 2005. A diacylglycerol-protein kinase C-RasGRP1 pathway directs Ras activation upon antigen receptor stimulation of T cells. *Mol Cell Biol* **25**:4426-41.
- 387. Roose, J. P., M. Mollenauer, M. Ho, T. Kurosaki, and A. Weiss.** 2007. Unusual interplay of two types of Ras activators, RasGRP and SOS, establishes sensitive and robust Ras activation in lymphocytes. *Mol Cell Biol* **27**:2732-45.
- 388. Rossi, F. M., S. Y. Corbel, J. S. Merzaban, D. A. Carlow, K. Gossens, J. Duenas, L. So, L. Yi, and H. J. Ziltener.** 2005. Recruitment of adult thymic progenitors is regulated by P-selectin and its ligand PSGL-1. *Nat Immunol* **6**:626-34.
- 389. Roth, M. G.** 1999. Lipid regulators of membrane traffic through the Golgi complex. *Trends Cell Biol* **9**:174-9.
- 390. Rothenberg, E. V.** 2007. Negotiation of the T lineage fate decision by transcription-factor interplay and microenvironmental signals. *Immunity* **26**:690-702.
- 391. Rozengurt, E., O. Rey, and R. T. Waldron.** 2005. Protein kinase D signaling. *J Biol Chem* **280**:13205-8.
- 392. Rubio, I., S. Grund, S. P. Song, C. Biskup, S. Bandemer, M. Fricke, M. Forster, A. Graziani, U. Wittig, and S. Kliche.** TCR-induced activation of Ras proceeds at the plasma membrane and requires palmitoylation of N-Ras. *J Immunol* **185**:3536-43.
- 393. Rudd, M. L., A. Tua-Smith, and D. B. Straus.** 2006. Lck SH3 domain function is required for T-cell receptor signals regulating thymocyte development. *Mol Cell Biol* **26**:7892-900.
- 394. Rudd, P. M., T. Elliott, P. Cresswell, I. A. Wilson, and R. A. Dwek.** 2001. Glycosylation and the immune system. *Science* **291**:2370-6.
- 395. Ruiz-Arguello, M. B., G. Basanez, F. M. Goni, and A. Alonso.** 1996. Different effects of enzyme-generated ceramides and diacylglycerols in phospholipid membrane fusion and leakage. *J Biol Chem* **271**:26616-21.
- 396. Sadegh-Nasseri, S., S. K. Dalai, L. C. Korb Ferris, and S. Mirshahidi.** Suboptimal engagement of the T-cell receptor by a variety of peptide-MHC ligands triggers T-cell anergy. *Immunology* **129**:1-7.
- 397. Saha, N. R., J. Smith, and C. T. Amemiya.** Evolution of adaptive immune recognition in jawless vertebrates. *Semin Immunol* **22**:25-33.
- 398. Saibil, S. D., E. K. Deenick, and P. S. Ohashi.** 2007. The sound of silence: modulating anergy in T lymphocytes. *Curr Opin Immunol* **19**:658-64.
- 399. Saini, M., C. Sinclair, D. Marshall, M. Tolaini, S. Sakaguchi, and B. Seddon.** Regulation of Zap70 expression during thymocyte development enables temporal separation of CD4 and CD8 reper-

- toire selection at different signaling thresholds. *Sci Signal* **3**:ra23.
- 400.** Saint-Ruf, C., O. Lechner, J. Feinberg, and H. von Boehmer. 1998. Genomic structure of the human pre-T cell receptor alpha chain and expression of two mRNA isoforms. *Eur J Immunol* **28**:3824-31.
- 401.** Saint-Ruf, C., M. Panigada, O. Azogui, P. Debey, H. von Boehmer, and F. Grassi. 2000. Different initiation of pre-TCR and gammadeltaTCR signalling. *Nature* **406**:524-7.
- 402.** Sakaguchi, N., T. Takahashi, H. Hata, T. Nomura, T. Tagami, S. Yamazaki, T. Sakihama, T. Matsutani, I. Negishi, S. Nakatsuru, and S. Sakaguchi. 2003. Altered thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice. *Nature* **426**:454-60.
- 403.** Sakaguchi, S. 2004. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* **22**:531-62.
- 404.** Sakaguchi, S., M. Ono, R. Setoguchi, H. Yagi, S. Hori, Z. Fehervari, J. Shimizu, T. Takahashi, and T. Nomura. 2006. Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev* **212**:8-27.
- 405.** Samelson, L. E., M. D. Patel, A. M. Weissman, J. B. Harford, and R. D. Klausner. 1986. Antigen activation of murine T cells induces tyrosine phosphorylation of a polypeptide associated with the T cell antigen receptor. *Cell* **46**:1083-90.
- 406.** Sanchez-Lockhart, M., B. Graf, and J. Miller. 2008. Signals and sequences that control CD28 localization to the central region of the immunological synapse. *J Immunol* **181**:7639-48.
- 407.** Sanjuan, M. A., D. R. Jones, M. Izquierdo, and I. Merida. 2001. Role of diacylglycerol kinase alpha in the attenuation of receptor signaling. *J Cell Biol* **153**:207-20.
- 408.** Sanjuan, M. A., B. Pradet-Balade, D. R. Jones, A. C. Martinez, J. C. Stone, J. A. Garcia-Sanz, and I. Merida. 2003. T cell activation in vivo targets diacylglycerol kinase alpha to the membrane: a novel mechanism for Ras attenuation. *J Immunol* **170**:2877-83.
- 409.** Santos, T., S. Carrasco, D. R. Jones, I. Merida, and A. Eguinoa. 2002. Dynamics of diacylglycerol kinase zeta translocation in living T-cells. Study of the structural domain requirements for translocation and activity. *J Biol Chem* **277**:30300-9.
- 410.** Sarafova, S. D., F. Van Laethem, S. Adoro, T. Guintier, S. O. Sharrow, L. Feigenbaum, and A. Singer. 2009. Upregulation of CD4 expression during MHC class II-specific positive selection is essential for error-free lineage choice. *Immunity* **31**:480-90.
- 411.** Sasaki, T., J. Irie-Sasaki, R. G. Jones, A. J. Oliveira-dos-Santos, W. L. Stanford, B. Bolon, A. Wakeham, A. Itie, D. Bouchard, I. Koziaradzki, N. Joza, T. W. Mak, P. S. Ohashi, A. Suzuki, and J. M. Penninger. 2000. Function of PI3Kgamma in thymocyte development, T cell activation, and neutrophil migration. *Science* **287**:1040-6.
- 412.** Sasaki, T., A. Suzuki, J. Sasaki, and J. M. Penninger. 2002. Phosphoinositide 3-kinases in immunity: lessons from knockout mice. *J Biochem* **131**:495-501.
- 413.** Saveliev, A., L. Vanes, O. Ksionda, J. Rapley, S. J. Smerdon, K. Rittinger, and V. L. Tybulewicz. 2009. Function of the nucleotide exchange activity of vav1 in T cell development and activation. *Sci Signal* **2**:ra83.
- 414.** Sawada, S., and D. R. Littman. 1991. Identification and characterization of a T-cell-specific enhancer adjacent to the murine CD4 gene. *Mol Cell Biol* **11**:5506-15.
- 415.** Schaeffer, E. M., J. Debnath, G. Yap, D. McVicar, X. C. Liao, D. R. Littman, A. Sher, H. E. Varmus, M. J. Lenardo, and P. L. Schwartzberg. 1999. Requirement for Tec kinases Rlk and Itk in T cell receptor signaling and immunity. *Science* **284**:638-41.
- 416.** Schatz, D. G., M. A. Oettinger, and D. Baltimore. 1989. The V(D)J recombination activating gene, RAG-1. *Cell* **59**:1035-48.
- 417.** Schmedt, C., K. Saijo, T. Niidome, R. Kuhn, S. Aizawa, and A. Tarakhovskiy. 1998. Csk controls antigen receptor-mediated development and selection of T-lineage cells. *Nature* **394**:901-4.
- 418.** Schmedt, C., and A. Tarakhovskiy. 2001. Autonomous maturation of alpha/beta T lineage cells in the absence of COOH-terminal Src kinase (Csk). *J Exp Med* **193**:815-26.
- 419.** Schneider, H., Y. C. Cai, K. V. Prasad, S. E. Shoelson, and C. E. Rudd. 1995. T cell antigen CD28 binds to the GRB-2/SOS complex, regulators of p21ras. *Eur J Immunol* **25**:1044-50.
- 420.** Schneider, H., H. Wang, M. Raab, E. Valk, X. Smith, M. Lovatt, Z. Wu, B. Maqueira-Iglesias, K. Strebhardt, and C. E. Rudd. 2008. Adaptor SKAP-55 binds p21 activating exchange factor RasGRP1 and negatively regulates the p21-ERK pathway in T-cells. *PLoS One* **3**:e1718.

- 421. Schroder, A. J., P. Quehl, J. Muller, and Y. Samstag.** 2000. Conversion of p56(lck) to p60(lck) in human peripheral blood T lymphocytes is dependent on co-stimulation through accessory receptors: involvement of phospholipase C, protein kinase C and MAP-kinases in vivo. *Eur J Immunol* **30**:635-43.
- 422. Schulze-Luehrmann, J., and S. Ghosh.** 2006. Antigen-receptor signaling to nuclear factor kappa B. *Immunity* **25**:701-15.
- 423. Selvaraj, P., M. L. Plunkett, M. Dustin, M. E. Sanders, S. Shaw, and T. A. Springer.** 1987. The T lymphocyte glycoprotein CD2 binds the cell surface ligand LFA-3. *Nature* **326**:400-3.
- 424. Serrano, C. J., L. Graham, K. DeBell, R. Rawat, M. C. Veri, E. Bonvini, B. L. Rellahan, and I. G. Reischl.** 2005. A new tyrosine phosphorylation site in PLC gamma 1: the role of tyrosine 775 in immune receptor signaling. *J Immunol* **174**:6233-7.
- 425. Setoguchi, R., M. Tachibana, Y. Naoe, S. Muroi, K. Akiyama, C. Tezuka, T. Okuda, and I. Taniuchi.** 2008. Repression of the transcription factor Th-POK by Runx complexes in cytotoxic T cell development. *Science* **319**:822-5.
- 426. Shao, H., D. H. Kono, L. Y. Chen, E. M. Rubin, and J. Kaye.** 1997. Induction of the early growth response (Egr) family of transcription factors during thymic selection. *J Exp Med* **185**:731-44.
- 427. Sharkey, N. A., K. L. Leach, and P. M. Blumberg.** 1984. Competitive inhibition by diacylglycerol of specific phorbol ester binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**:607-10.
- 428. Sharp, L. L., and S. M. Hedrick.** 1999. Commitment to the CD4 lineage mediated by extracellular signal-related kinase mitogen-activated protein kinase and lck signaling. *J Immunol* **163**:6598-605.
- 429. Sharp, L. L., D. A. Schwarz, C. M. Bott, C. J. Marshall, and S. M. Hedrick.** 1997. The influence of the MAPK pathway on T cell lineage commitment. *Immunity* **7**:609-18.
- 430. Shefler, I., Y. A. Mekori, and A. Mor.** 2008. Stimulation of human mast cells by activated T cells leads to N-Ras activation through Ras guanine nucleotide releasing protein 1. *J Allergy Clin Immunol* **122**:1222-5.
- 431. Shemesh, T., A. Luini, V. Malhotra, K. N. Burger, and M. M. Kozlov.** 2003. Prefission constriction of Golgi tubular carriers driven by local lipid metabolism: a theoretical model. *Biophys J* **85**:3813-27.
- 432. Shen, S., M. I. Chuck, M. Zhu, D. M. Fuller, C. W. Ou Yang, and W. Zhang.** The importance of LAT in the activation, homeostasis, and regulatory function of T cells. *J Biol Chem.*
- 433. Shen, S., M. Zhu, J. Lau, M. Chuck, and W. Zhang.** 2009. The essential role of LAT in thymocyte development during transition from the double-positive to single-positive stage. *J Immunol* **182**:5596-604.
- 434. Shindo, M., K. Irie, A. Nakahara, H. Ohigashi, H. Konishi, U. Kikkawa, H. Fukuda, and P. A. Wender.** 2001. Toward the identification of selective modulators of protein kinase C (PKC) isozymes: establishment of a binding assay for PKC isozymes using synthetic C1 peptide receptors and identification of the critical residues involved in the phorbol ester binding. *Bioorg Med Chem* **9**:2073-81.
- 435. Shores, E. W., T. Tran, A. Grinberg, C. L. Sommers, H. Shen, and P. E. Love.** 1997. Role of the multiple T cell receptor (TCR)-zeta chain signaling motifs in selection of the T cell repertoire. *J Exp Med* **185**:893-900.
- 436. Shortman, K., A. Wilson, M. Egerton, M. Pearse, and R. Scollay.** 1988. Immature CD4- CD8+ murine thymocytes. *Cell Immunol* **113**:462-79.
- 437. Siddhanta, A., and D. Shields.** 1998. Secretory vesicle budding from the trans-Golgi network is mediated by phosphatidic acid levels. *J Biol Chem* **273**:17995-8.
- 438. Siggs, O. M., L. E. Makaroff, and A. Liston.** 2006. The why and how of thymocyte negative selection. *Curr Opin Immunol* **18**:175-83.
- 439. Siggs, O. M., L. A. Miosge, A. L. Yates, E. M. Kucharska, D. Sheahan, T. Brdicka, A. Weiss, A. Liston, and C. C. Goodnow.** 2007. Opposing functions of the T cell receptor kinase ZAP-70 in immunity and tolerance differentially titrate in response to nucleotide substitutions. *Immunity* **27**:912-26.
- 440. Siliceo, M., D. Garcia-Bernal, S. Carrasco, E. Diaz-Flores, F. Coluccio Leskow, J. Teixido, M. G. Kazanietz, and I. Merida.** 2006. Beta2-chimaerin provides a diacylglycerol-dependent mechanism for regulation of adhesion and chemotaxis of T cells. *J Cell Sci* **119**:141-52.
- 441. Siliceo, M., and I. Merida.** 2009. T cell receptor-dependent tyrosine phosphorylation of beta2-chimaerin modulates its Rac-GAP function in T cells. *J Biol Chem* **284**:11354-63.
- 442. Singer, A., S. Adoro, and J. H. Park.** 2008. Lineage fate and intense debate: myths, models and mechanisms of CD4- versus CD8-lineage choice. *Nat Rev Immunol* **8**:788-801.

- 443. Singer, A., and R. Bosselut.** 2004. CD4/CD8 coreceptors in thymocyte development, selection, and lineage commitment: analysis of the CD4/CD8 lineage decision. *Adv Immunol* **83**:91-131.
- 444. Smith-Garvin, J. E., J. C. Burns, M. Gohil, T. Zou, J. S. Kim, J. S. Maltzman, E. J. Wherry, G. A. Koretzky, and M. S. Jordan.** T cell receptor signals direct the composition and function of the memory CD8⁺ T cell pool. *Blood*.
- 445. Smith-Garvin, J. E., G. A. Koretzky, and M. S. Jordan.** 2009. T cell activation. *Annu Rev Immunol* **27**:591-619.
- 446. Smits, K., V. Iannucci, V. Stove, P. Van Hauwe, E. Naessens, P. J. Meuwissen, K. K. Arien, M. Bentahir, J. Plum, and B. Verhasselt.** Rho GTPase Cdc42 is essential for human T-cell development. *Haematologica* **95**:367-75.
- 447. Smrcka, A. V., J. R. Hepler, K. O. Brown, and P. C. Sternweis.** 1991. Regulation of polyphosphoinositide-specific phospholipase C activity by purified Gq. *Science* **251**:804-7.
- 448. Sohn, S. J., J. Thompson, and A. Winoto.** 2007. Apoptosis during negative selection of autoreactive thymocytes. *Curr Opin Immunol* **19**:510-5.
- 449. Sommer, K., B. Guo, J. L. Pomerantz, A. D. Bandaranayake, M. E. Moreno-Garcia, Y. L. Ovechkina, and D. J. Rawlings.** 2005. Phosphorylation of the CARMA1 linker controls NF-kappaB activation. *Immunity* **23**:561-74.
- 450. Sommers, C. L., J. Lee, K. L. Steiner, J. M. Gurson, C. L. Depersis, D. El-Khoury, C. L. Fuller, E. W. Shores, P. E. Love, and L. E. Samelson.** 2005. Mutation of the phospholipase C-gamma1-binding site of LAT affects both positive and negative thymocyte selection. *J Exp Med* **201**:1125-34.
- 451. Sommers, C. L., R. K. Menon, A. Grinberg, W. Zhang, L. E. Samelson, and P. E. Love.** 2001. Knock-in mutation of the distal four tyrosines of linker for activation of T cells blocks murine T cell development. *J Exp Med* **194**:135-42.
- 452. Sommers, C. L., C. S. Park, J. Lee, C. Feng, C. L. Fuller, A. Grinberg, J. A. Hildebrand, E. Lacana, R. K. Menon, E. W. Shores, L. E. Samelson, and P. E. Love.** 2002. A LAT mutation that inhibits T cell development yet induces lymphoproliferation. *Science* **296**:2040-3.
- 453. Sommers, C. L., L. E. Samelson, and P. E. Love.** 2004. LAT: a T lymphocyte adapter protein that couples the antigen receptor to downstream signaling pathways. *Bioessays* **26**:61-7.
- 454. Sondermann, H., S. M. Soisson, S. Boykevich, S. S. Yang, D. Bar-Sagi, and J. Kuriyan.** 2004. Structural analysis of autoinhibition in the Ras activator Son of sevenless. *Cell* **119**:393-405.
- 455. Soond, D. R., E. Bjorgo, K. Moltu, V. Q. Dale, D. T. Patton, K. M. Torgersen, F. Galleway, B. Twomey, J. Clark, J. S. Gaston, K. Tasken, P. Bunyard, and K. Okkenhaug.** PI3K p110delta regulates T-cell cytokine production during primary and secondary immune responses in mice and humans. *Blood* **115**:2203-13.
- 456. Spitaler, M., and D. A. Cantrell.** 2004. Protein kinase C and beyond. *Nat Immunol* **5**:785-90.
- 457. Spitaler, M., E. Emslie, C. D. Wood, and D. Cantrell.** 2006. Diacylglycerol and protein kinase D localization during T lymphocyte activation. *Immunity* **24**:535-46.
- 458. Sprent, J.** 2005. Proving negative selection in the thymus. *J Immunol* **174**:3841-2.
- 459. Starr, T. K., S. C. Jameson, and K. A. Hogquist.** 2003. Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol* **21**:139-76.
- 460. Stefanova, I., B. Hemmer, M. Vergelli, R. Martin, W. E. Biddison, and R. N. Germain.** 2003. TCR ligand discrimination is enforced by competing ERK positive and SHP-1 negative feedback pathways. *Nat Immunol* **4**:248-54.
- 461. Strasser, A., and P. Bouillet.** 2003. The control of apoptosis in lymphocyte selection. *Immunol Rev* **193**:82-92.
- 462. Straus, D. B., and A. Weiss.** 1992. Genetic evidence for the involvement of the lck tyrosine kinase in signal transduction through the T cell antigen receptor. *Cell* **70**:585-93.
- 463. Sudo, T., S. Nishikawa, N. Ohno, N. Akiyama, M. Tamakoshi, and H. Yoshida.** 1993. Expression and function of the interleukin 7 receptor in murine lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:9125-9.
- 464. Sugawara, T., T. Moriguchi, E. Nishida, and Y. Takahama.** 1998. Differential roles of ERK and p38 MAP kinase pathways in positive and negative selection of T lymphocytes. *Immunity* **9**:565-74.
- 465. Sultana, D. A., J. J. Bell, D. A. Zlotoff, M. E. De Obaldia, and A. Bhandoola.** Eliciting the T cell fate with Notch. *Semin Immunol* **22**:254-60.
- 466. Sun, G., X. Liu, P. Mercado, S. R. Jenkinson, M. Kyriotou, L. Feigenbaum, P. Galera, and R. Bosselut.** 2005. The zinc finger protein cKrox directs CD4 lineage differentiation during intrathymic T cell positive selection. *Nat Immunol* **6**:373-81.
- 467. Sun, S. Y., L. M. Rosenberg, X. Wang, Z.**

- Zhou, P. Yue, H. Fu, and F. R. Khuri. 2005. Activation of Akt and eIF4E survival pathways by rapamycin-mediated mammalian target of rapamycin inhibition. *Cancer Res* **65**:7052-8.
468. Sun, Z., C. W. Arendt, W. Ellmeier, E. M. Schaeffer, M. J. Sunshine, L. Gandhi, J. Annes, D. Petrzilka, A. Kupfer, P. L. Schwartzberg, and D. R. Littman. 2000. PKC-theta is required for TCR-induced NF-kappaB activation in mature but not immature T lymphocytes. *Nature* **404**:402-7.
469. Surh, C. D., and J. Sprent. 2008. Homeostasis of naive and memory T cells. *Immunity* **29**:848-62.
470. Suzuki, A., M. T. Yamaguchi, T. Ohteki, T. Sasaki, T. Kaisho, Y. Kimura, R. Yoshida, A. Wakeham, T. Higuchi, M. Fukumoto, T. Tsubata, P. S. Ohashi, S. Koyasu, J. M. Penninger, T. Nakano, and T. W. Mak. 2001. T cell-specific loss of Pten leads to defects in central and peripheral tolerance. *Immunity* **14**:523-34.
471. Suzuki, H., J. A. Punt, L. G. Granger, and A. Singer. 1995. Asymmetric signaling requirements for thymocyte commitment to the CD4+ versus CD8+ T cell lineages: a new perspective on thymic commitment and selection. *Immunity* **2**:413-25.
472. Swan, K. A., J. Alberola-Ila, J. A. Gross, M. W. Appleby, K. A. Forbush, J. F. Thomas, and R. M. Perlmutter. 1995. Involvement of p21ras distinguishes positive and negative selection in thymocytes. *EMBO J* **14**:276-85.
473. Swat, W., M. Dessing, H. von Boehmer, and P. Kisielow. 1993. CD69 expression during selection and maturation of CD4+8+ thymocytes. *Eur J Immunol* **23**:739-46.
474. Swat, W., V. Montgrain, T. A. Doggett, J. Douangpanya, K. Puri, W. Vermi, and T. G. Diacovo. 2006. Essential role of PI3Kdelta and PI3K-gamma in thymocyte survival. *Blood* **107**:2415-22.
475. Szallasi, Z., K. Bogi, S. Gohari, T. Biro, P. Acs, and P. M. Blumberg. 1996. Non-equivalent roles for the first and second zinc fingers of protein kinase Cdelta. Effect of their mutation on phorbol ester-induced translocation in NIH 3T3 cells. *J Biol Chem* **271**:18299-301.
476. Taghon, T., M. A. Yui, R. Pant, R. A. Diamond, and E. V. Rothenberg. 2006. Developmental and molecular characterization of emerging beta- and gammadelta-selected pre-T cells in the adult mouse thymus. *Immunity* **24**:53-64.
477. Tai, X., F. Van Laethem, A. H. Sharpe, and A. Singer. 2007. Induction of autoimmune disease in CTLA-4-/- mice depends on a specific CD28 motif that is required for in vivo costimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:13756-61.
478. Takada, K., and S. C. Jameson. 2009. Naive T cell homeostasis: from awareness of space to a sense of place. *Nat Rev Immunol* **9**:823-32.
479. Takahama, Y., T. Nitta, A. Mat Ripen, S. Nitta, S. Murata, and K. Tanaka. Role of thymic cortex-specific self-peptides in positive selection of T cells. *Semin Immunol* **22**:287-93.
480. Tan, I., K. T. Seow, L. Lim, and T. Leung. 2001. Intermolecular and intramolecular interactions regulate catalytic activity of myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase alpha. *Mol Cell Biol* **21**:2767-78.
481. Tanaka, N., M. Kamanaka, H. Enslen, C. Dong, M. Wysk, R. J. Davis, and R. A. Flavell. 2002. Differential involvement of p38 mitogen-activated protein kinase kinases MKK3 and MKK6 in T-cell apoptosis. *EMBO Rep* **3**:785-91.
482. Tanaka, S., S. Maeda, M. Hashimoto, C. Fujimori, Y. Ito, S. Teradaira, K. Hirota, H. Yoshitomi, T. Katakai, A. Shimizu, T. Nomura, N. Sakaguchi, and S. Sakaguchi. Graded attenuation of TCR signaling elicits distinct autoimmune diseases by altering thymic T cell selection and regulatory T cell function. *J Immunol* **185**:2295-305.
483. Taniuchi, I., M. Osato, T. Egawa, M. J. Sunshine, S. C. Bae, T. Komori, Y. Ito, and D. R. Littman. 2002. Differential requirements for Runx proteins in CD4 repression and epigenetic silencing during T lymphocyte development. *Cell* **111**:621-33.
484. Tarakhovsky, A., S. B. Kanner, J. Hombach, J. A. Ledbetter, W. Muller, N. Killeen, and K. Rajewsky. 1995. A role for CD5 in TCR-mediated signal transduction and thymocyte selection. *Science* **269**:535-7.
485. Taylor, S. J., H. Z. Chae, S. G. Rhee, and J. H. Exton. 1991. Activation of the beta 1 isozyme of phospholipase C by alpha subunits of the Gq class of G proteins. *Nature* **350**:516-8.
486. Tazmini, G., N. Beaulieu, A. Woo, B. Zahedi, R. E. Goulding, and R. J. Kay. 2009. Membrane localization of RasGRP1 is controlled by an EF-hand, and by the GEF domain. *Biochim Biophys Acta* **1793**:447-61.
487. Teh, S. J., N. Killeen, A. Tarakhovsky, D. R. Littman, and H. S. Teh. 1997. CD2 regulates the positive selection and function of antigen-specific CD4- CD8+ T cells. *Blood* **89**:1308-18.
488. Telfer, J. C., E. E. Hedblom, M. K. Anderson, M. N. Laurent, and E. V. Rothenberg. 2004. Local-

- ization of the domains in Runx transcription factors required for the repression of CD4 in thymocytes. *J Immunol* **172**:4359-70.
- 489.** Thien, C. B., F. D. Blystad, Y. Zhan, A. M. Lew, V. Voigt, C. E. Andoniou, and W. Y. Langdon. 2005. Loss of c-Cbl RING finger function results in high-intensity TCR signaling and thymic deletion. *EMBO J* **24**:3807-19.
- 490.** Thuille, N., I. Heit, F. Fresser, N. Krumbock, B. Bauer, S. Leuthaeusser, S. Dammeier, C. Graham, T. D. Copeland, S. Shaw, and G. Baier. 2005. Critical role of novel Thr-219 autophosphorylation for the cellular function of PKC θ in T lymphocytes. *EMBO J* **24**:3869-80.
- 491.** Tognon, C. E., H. E. Kirk, L. A. Passmore, I. P. Whitehead, C. J. Der, and R. J. Kay. 1998. Regulation of RasGRP via a phorbol ester-responsive C1 domain. *Mol Cell Biol* **18**:6995-7008.
- 492.** Toullec, D., P. Pianetti, H. Coste, P. Bellevue, T. Grand-Perret, M. Ajakane, V. Baudet, P. Boissin, E. Boursier, F. Loriolle, and et al. 1991. The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *J Biol Chem* **266**:15771-81.
- 493.** Trampont, P. C., A. C. Tosello-Trampont, Y. Shen, A. K. Duley, A. E. Sutherland, T. P. Bender, D. R. Littman, and K. S. Ravichandran. CXCR4 acts as a costimulator during thymic beta-selection. *Nat Immunol* **11**:162-70.
- 494.** Trobridge, P. A., K. A. Forbush, and S. D. Levin. 2001. Positive and negative selection of thymocytes depends on Lck interaction with the CD4 and CD8 coreceptors. *J Immunol* **166**:809-18.
- 495.** Trop, S., P. De Sepulveda, J. C. Zuniga-Pflucker, and R. Rottapel. 2001. Overexpression of suppressor of cytokine signaling-1 impairs pre-T-cell receptor-induced proliferation but not differentiation of immature thymocytes. *Blood* **97**:2269-77.
- 496.** Trop, S., A. M. Steff, F. Denis, D. L. Wiest, and P. Hugo. 1999. The connecting peptide domain of pT alpha dictates weak association of the pre-T cell receptor with the TCR zeta subunit. *Eur J Immunol* **29**:2187-96.
- 497.** Truneh, A., F. Albert, P. Golstein, and A. M. Schmitt-Verhulst. 1985. Early steps of lymphocyte activation bypassed by synergy between calcium ionophores and phorbol ester. *Nature* **313**:318-20.
- 498.** Trushin, S. A., K. N. Pennington, E. M. Carmona, S. Asin, D. N. Savoy, D. D. Billadeau, and C. V. Paya. 2003. Protein kinase Calpha (PKC α) acts upstream of PKC θ to activate IkappaB kinase and NF-kappaB in T lymphocytes. *Mol Cell Biol* **23**:7068-81.
- 499.** Tseng, S. Y., J. C. Waite, M. Liu, S. Vardhana, and M. L. Dustin. 2008. T cell-dendritic cell immunological synapses contain TCR-dependent CD28-CD80 clusters that recruit protein kinase C theta. *J Immunol* **181**:4852-63.
- 500.** Turner, M., P. J. Mee, A. E. Walters, M. E. Quinn, A. L. Mellor, R. Zamoyska, and V. L. Tybulewicz. 1997. A requirement for the Rho-family GTP exchange factor Vav in positive and negative selection of thymocytes. *Immunity* **7**:451-60.
- 501.** Ueda, H., J. M. Howson, L. Esposito, J. Heward, H. Snook, G. Chamberlain, D. B. Rainbow, K. M. Hunter, A. N. Smith, G. Di Genova, M. H. Herr, I. Dahlman, F. Payne, D. Smyth, C. Lowe, R. C. Twells, S. Howlett, B. Healy, S. Nutland, H. E. Rance, V. Everett, L. J. Smink, A. C. Lam, H. J. Cordell, N. M. Walker, C. Bordin, J. Hulme, C. Motta, F. Cucca, J. F. Hess, M. L. Metzker, J. Rogers, S. Gregory, A. Allahabadi, R. Nithiyananthan, E. Tuomilehto-Wolf, J. Tuomilehto, P. Bingley, K. M. Gillespie, D. E. Undlien, K. S. Ronningen, C. Guja, C. Ionescu-Tirgoviste, D. A. Savage, A. P. Maxwell, D. J. Carson, C. C. Patterson, J. A. Franklyn, D. G. Clayton, L. B. Peterson, L. S. Wicker, J. A. Todd, and S. C. Gough. 2003. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* **423**:506-11.
- 502.** Ueno, T., F. Saito, D. H. Gray, S. Kuse, K. Hieshima, H. Nakano, T. Kakiuchi, M. Lipp, R. L. Boyd, and Y. Takahama. 2004. CCR7 signals are essential for cortex-medulla migration of developing thymocytes. *J Exp Med* **200**:493-505.
- 503.** Valverde, A. M., J. Sinnott-Smith, J. Van Lint, and E. Rozengurt. 1994. Molecular cloning and characterization of protein kinase D: a target for diacylglycerol and phorbol esters with a distinctive catalytic domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:8572-6.
- 504.** Van De Wiele, C. J., J. H. Marino, B. W. Murray, S. S. Vo, M. E. Whetsell, and T. K. Teague. 2004. Thymocytes between the beta-selection and positive selection checkpoints are nonresponsive to IL-7 as assessed by STAT-5 phosphorylation. *J Immunol* **172**:4235-44.
- 505.** Verbeek, S., D. Izon, F. Hofhuis, E. Robanus-Maandag, H. te Riele, M. van de Wetering, M. Oosterwegel, A. Wilson, H. R. MacDonald, and H. Clevers. 1995. An HMG-box-containing T-cell factor required for thymocyte differentiation. *Nature* **374**:70-4.
- 506.** Vicente-Manzanares, M., and F. Sanchez-Madrid. 2004. Role of the cytoskeleton during leukocyte responses. *Nat Rev Immunol* **4**:110-22.

- 507.** Villalba, M., N. Coudronniere, M. Deckert, E. Teixeira, P. Mas, and A. Altman. 2000. A novel functional interaction between Vav and PKCtheta is required for TCR-induced T cell activation. *Immunity* **12**:151-60.
- 508.** Villar, A. V., F. M. Goni, and A. Alonso. 2001. Diacylglycerol effects on phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity and vesicle fusion. *FEBS Lett* **494**:117-20.
- 509.** von Essen, M., M. W. Nielsen, C. M. Bonefeld, L. Boding, J. M. Larsen, M. Leitges, G. Baier, N. Odum, and C. Geisler. 2006. Protein kinase C (PKC) alpha and PKC theta are the major PKC isoforms involved in TCR down-regulation. *J Immunol* **176**:7502-10.
- 510.** Wada, I., M. Kai, S. Imai, F. Sakane, and H. Kanoh. 1996. Translocation of diacylglycerol kinase alpha to the nuclear matrix of rat thymocytes and peripheral T-lymphocytes. *FEBS Lett* **393**:48-52.
- 511.** Wagner, D. H., Jr., J. Hagman, P. S. Linsley, W. Hodsdon, J. H. Freed, and M. K. Newell. 1996. Rescue of thymocytes from glucocorticoid-induced cell death mediated by CD28/CTLA-4 costimulatory interactions with B7-1/B7-2. *J Exp Med* **184**:1631-8.
- 512.** Wang, C. Y., A. Davoodi-Semiromi, W. Huang, E. Connor, J. D. Shi, and J. X. She. 1998. Characterization of mutations in patients with autoimmune polyglandular syndrome type 1 (APS1). *Hum Genet* **103**:681-5.
- 513.** Wang, H., C. Yang, F. C. Leskow, J. Sun, B. Canagarajah, J. H. Hurley, and M. G. Kazanietz. 2006. Phospholipase Cgamma/diacylglycerol-dependent activation of beta2-chimaerin restricts EGF-induced Rac signaling. *EMBO J* **25**:2062-74.
- 514.** Wang, Q. J. 2006. PKD at the crossroads of DAG and PKC signaling. *Trends Pharmacol Sci* **27**:317-23.
- 515.** Ward, S. G., J. Westwick, N. D. Hall, and D. M. Sansom. 1993. Ligation of CD28 receptor by B7 induces formation of D-3 phosphoinositides in T lymphocytes independently of T cell receptor/CD3 activation. *Eur J Immunol* **23**:2572-7.
- 516.** Warren, J. R., D. L. Leatherman, and J. F. Metzger. 1975. Evidence for cell-receptor activity in lymphocyte stimulation by staphylococcal enterotoxin. *J Immunol* **115**:49-53.
- 517.** Watanabe, N., H. Arase, M. Onodera, P. S. Ohashi, and T. Saito. 2000. The quantity of TCR signal determines positive selection and lineage commitment of T cells. *J Immunol* **165**:6252-61.
- 518.** Watanabe, N., Y. H. Wang, H. K. Lee, T. Ito, W. Cao, and Y. J. Liu. 2005. Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+CD25+ regulatory T cells in human thymus. *Nature* **436**:1181-5.
- 519.** Watts, J. D., J. S. Sanghera, S. L. Pelech, and R. Aebersold. 1993. Phosphorylation of serine 59 of p56lck in activated T cells. *J Biol Chem* **268**:23275-82.
- 520.** Webb, L. M., E. Vigorito, M. P. Wymann, E. Hirsch, and M. Turner. 2005. Cutting edge: T cell development requires the combined activities of the p110gamma and p110delta catalytic isoforms of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Immunol* **175**:2783-7.
- 521.** Weiss, A., G. Koretzky, R. C. Schatzman, and T. Kadlecik. 1991. Functional activation of the T-cell antigen receptor induces tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:5484-8.
- 522.** Werlen, G., B. Hausmann, and E. Palmer. 2000. A motif in the alphabeta T-cell receptor controls positive selection by modulating ERK activity. *Nature* **406**:422-6.
- 523.** White, J., A. Herman, A. M. Pullen, R. Kubo, J. W. Kappler, and P. Marrack. 1989. The V beta-specific superantigen staphylococcal enterotoxin B: stimulation of mature T cells and clonal deletion in neonatal mice. *Cell* **56**:27-35.
- 524.** Wiest, D. L., J. M. Ashe, T. K. Howcroft, H. M. Lee, D. M. Kemper, I. Negishi, D. S. Singer, A. Singer, and R. Abe. 1997. A spontaneously arising mutation in the DLAARN motif of murine ZAP-70 abrogates kinase activity and arrests thymocyte development. *Immunity* **6**:663-71.
- 525.** Wildin, R. S., A. M. Garvin, S. Pawar, D. B. Lewis, K. M. Abraham, K. A. Forbush, S. F. Ziegler, J. M. Allen, and R. M. Perlmutter. 1991. Developmental regulation of lck gene expression in T lymphocytes. *J Exp Med* **173**:383-93.
- 526.** Wildin, R. S., S. Smyk-Pearson, and A. H. Filipovich. 2002. Clinical and molecular features of the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome. *J Med Genet* **39**:537-45.
- 527.** Winandy, S., L. Wu, J. H. Wang, and K. Georgopoulos. 1999. Pre-T cell receptor (TCR) and TCR-controlled checkpoints in T cell differentiation are set by Ikaros. *J Exp Med* **190**:1039-48.
- 528.** Winkler, D. G., I. Park, T. Kim, N. S. Payne, C. T. Walsh, J. L. Strominger, and J. Shin. 1993. Phosphorylation of Ser-42 and Ser-59 in the N-terminal region of the tyrosine kinase p56lck. *Proc Natl Acad*

Sci U S A **90**:5176-80.

- 529. Wong, W. F., M. Nakazato, T. Watanabe, K. Kohu, T. Ogata, N. Yoshida, Y. Sotomaru, M. Ito, K. Araki, J. Telfer, M. Fukumoto, D. Suzuki, T. Sato, K. Hozumi, S. Habu, and M. Satake.** Over-expression of Runx1 transcription factor impairs the development of thymocytes from the double-negative to double-positive stages. *Immunology* **130**:243-53.
- 530. Wood, C. D., U. Marklund, and D. A. Cantrell.** 2005. Dual phospholipase C/diacylglycerol requirement for protein kinase D1 activation in lymphocytes. *J Biol Chem* **280**:6245-51.
- 531. Woolf, E., C. Xiao, O. Fainaru, J. Lotem, D. Rosen, V. Negreanu, Y. Bernstein, D. Goldenberg, O. Brenner, G. Berke, D. Levanon, and Y. Groner.** 2003. Runx3 and Runx1 are required for CD8 T cell development during thymopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:7731-6.
- 532. Woronicz, J. D., B. Calnan, V. Ngo, and A. Winoto.** 1994. Requirement for the orphan steroid receptor Nur77 in apoptosis of T-cell hybridomas. *Nature* **367**:277-81.
- 533. Wu, J. N., S. Gheith, N. A. Bezman, Q. H. Liu, L. V. Fostel, A. M. Swanson, B. D. Freedman, G. A. Koretzky, and E. J. Peterson.** 2006. Adhesion- and degranulation-promoting adapter protein is required for efficient thymocyte development and selection. *J Immunol* **176**:6681-9.
- 534. Wylie, D. C., J. Das, and A. K. Chakraborty.** 2007. Sensitivity of T cells to antigen and antagonism emerges from differential regulation of the same molecular signaling module. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:5533-8.
- 535. Xiao, S. Y., Y. Li, and W. F. Chen.** 2003. Kinetics of thymocyte developmental process in fetal and neonatal mice. *Cell Res* **13**:265-73.
- 536. Xu, R. X., T. Pawelczyk, T. H. Xia, and S. C. Brown.** 1997. NMR structure of a protein kinase C-gamma phorbol-binding domain and study of protein-lipid micelle interactions. *Biochemistry* **36**:10709-17.
- 537. Yamasaki, S., E. Ishikawa, M. Sakuma, K. Ogata, K. Sakata-Sogawa, M. Hiroshima, D. L. West, M. Tokunaga, and T. Saito.** 2006. Mechanistic basis of pre-T cell receptor-mediated autonomous signaling critical for thymocyte development. *Nat Immunol* **7**:67-75.
- 538. Yamasaki, S., and T. Saito.** 2007. Molecular basis for pre-TCR-mediated autonomous signaling. *Trends Immunol* **28**:39-43.
- 539. Yamashita, I., T. Nagata, T. Tada, and T. Nakayama.** 1993. CD69 cell surface expression identifies developing thymocytes which audition for T cell antigen receptor-mediated positive selection. *Int Immunol* **5**:1139-50.
- 540. Yamazaki, T., H. Arase, S. Ono, H. Ohno, H. Watanabe, and T. Saito.** 1997. A shift from negative to positive selection of autoreactive T cells by the reduced level of TCR signal in TCR-transgenic CD3 zeta-deficient mice. *J Immunol* **158**:1634-40.
- 541. Yang, C., and M. G. Kazanietz.** 2007. Chimaerins: GAPs that bridge diacylglycerol signalling and the small G-protein Rac. *Biochem J* **403**:1-12.
- 542. Yang, C., and M. G. Kazanietz.** 2003. Divergence and complexities in DAG signaling: looking beyond PKC. *Trends Pharmacol Sci* **24**:602-8.
- 543. Yang, L., G. Qiao, H. Ying, J. Zhang, and F. Yin.** TCR-induced Akt serine 473 phosphorylation is regulated by protein kinase C-alpha. *Biochem Biophys Res Commun* **400**:16-20.
- 544. Yankee, T. M., T. J. Yun, K. E. Draves, K. Ganesh, M. J. Bevan, K. Murali-Krishna, and E. A. Clark.** 2004. The Gads (GrpL) adaptor protein regulates T cell homeostasis. *J Immunol* **173**:1711-20.
- 545. Yashiro-Ohtani, Y., Y. He, T. Ohtani, M. E. Jones, O. Shestova, L. Xu, T. C. Fang, M. Y. Chiang, A. M. Intlekofer, S. C. Blacklow, Y. Zhuang, and W. S. Pear.** 2009. Pre-TCR signaling inactivates Notch1 transcription by antagonizing E2A. *Genes Dev* **23**:1665-76.
- 546. Yashiro-Ohtani, Y., T. Ohtani, and W. S. Pear.** Notch regulation of early thymocyte development. *Semin Immunol* **22**:261-9.
- 547. Yasuda, S., R. L. Stevens, T. Terada, M. Takeida, T. Hashimoto, J. Fukae, T. Horita, H. Kataoka, T. Atsumi, and T. Koike.** 2007. Defective expression of Ras guanyl nucleotide-releasing protein 1 in a subset of patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* **179**:4890-900.
- 548. Yin, X., E. Ladi, S. W. Chan, O. Li, N. Killeen, D. J. Kappes, and E. A. Robey.** 2007. CCR7 expression in developing thymocytes is linked to the CD4 versus CD8 lineage decision. *J Immunol* **179**:7358-64.
- 549. Yoder, J., C. Pham, Y. M. Iizuka, O. Kanagawa, S. K. Liu, J. McGlade, and A. M. Cheng.** 2001. Requirement for the SLP-76 adaptor GADS in T cell development. *Science* **291**:1987-91.
- 550. Yokosuka, T., W. Kobayashi, K. Sakata-Sogawa, M. Takamatsu, A. Hashimoto-Tane, M. L. Dustin, M. Tokunaga, and T. Saito.** 2008. Spatiotemporal regulation of T cell costimulation by

- TCR-CD28 microclusters and protein kinase C theta translocation. *Immunity* **29**:589-601.
- 551. Yokosuka, T., and T. Saito.** The immunological synapse, TCR microclusters, and T cell activation. *Curr Top Microbiol Immunol* **340**:81-107.
- 552. Yu, Q., B. Eрман, J. H. Park, L. Feigenbaum, and A. Singer.** 2004. IL-7 receptor signals inhibit expression of transcription factors TCF-1, LEF-1, and RORgammat: impact on thymocyte development. *J Exp Med* **200**:797-803.
- 553. Yuan, J., D. Bae, D. Cantrell, A. E. Nel, and E. Rozengurt.** 2002. Protein kinase D is a downstream target of protein kinase Ctheta. *Biochem Biophys Res Commun* **291**:444-52.
- 554. Yucel, R., H. Karsunky, L. Klein-Hitpass, and T. Moroy.** 2003. The transcriptional repressor Gfi1 affects development of early, uncommitted c-Kit+ T cell progenitors and CD4/CD8 lineage decision in the thymus. *J Exp Med* **197**:831-44.
- 555. Zanin-Zhorov, A., Y. Ding, S. Kumari, M. Attur, K. L. Hippen, M. Brown, B. R. Blazar, S. B. Abramson, J. J. Lafaille, and M. L. Dustin.** Protein kinase C-theta mediates negative feedback on regulatory T cell function. *Science* **328**:372-6.
- 556. Zha, Y., R. Marks, A. W. Ho, A. C. Peterson, S. Janardhan, I. Brown, K. Praveen, S. Stang, J. C. Stone, and T. F. Gajewski.** 2006. T cell anergy is reversed by active Ras and is regulated by diacylglycerol kinase-alpha. *Nat Immunol* **7**:1166-73.
- 557. Zhang, G., M. G. Kazanietz, P. M. Blumberg, and J. H. Hurley.** 1995. Crystal structure of the cys2 activator-binding domain of protein kinase C delta in complex with phorbol ester. *Cell* **81**:917-24.
- 558. Zhang, J., A. K. Somani, D. Yuen, Y. Yang, P. E. Love, and K. A. Siminovitch.** 1999. Involvement of the SHP-1 tyrosine phosphatase in regulation of T cell selection. *J Immunol* **163**:3012-21.
- 559. Zhang, W., C. L. Sommers, D. N. Burshtyn, C. C. Stebbins, J. B. DeJarnette, R. P. Tribble, A. Grinberg, H. C. Tsay, H. M. Jacobs, C. M. Kessler, E. O. Long, P. E. Love, and L. E. Samelson.** 1999. Essential role of LAT in T cell development. *Immunity* **10**:323-32.
- 560. Zhang, W., R. P. Tribble, M. Zhu, S. K. Liu, C. J. McGlade, and L. E. Samelson.** 2000. Association of Grb2, Gads, and phospholipase C-gamma 1 with phosphorylated LAT tyrosine residues. Effect of LAT tyrosine mutations on T cell antigen receptor-mediated signaling. *J Biol Chem* **275**:23355-61.
- 561. Zheng, Y., S. Z. Josefowicz, A. Kas, T. T. Chu, M. A. Gavin, and A. Y. Rudensky.** 2007. Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. *Nature* **445**:936-40.
- 562. Zhong, X. P., E. A. Hainey, B. A. Olenchock, M. S. Jordan, J. S. Maltzman, K. E. Nichols, H. Shen, and G. A. Koretzky.** 2003. Enhanced T cell responses due to diacylglycerol kinase zeta deficiency. *Nat Immunol* **4**:882-90.
- 563. Zhong, X. P., E. A. Hainey, B. A. Olenchock, H. Zhao, M. K. Topham, and G. A. Koretzky.** 2002. Regulation of T cell receptor-induced activation of the Ras-ERK pathway by diacylglycerol kinase zeta. *J Biol Chem* **277**:31089-98.
- 564. Zikherman, J., C. Jenne, S. Watson, K. Doan, W. Raschke, C. C. Goodnow, and A. Weiss.** CD45-Csk phosphatase-kinase titration uncouples basal and inducible T cell receptor signaling during thymic development. *Immunity* **32**:342-54.
- 565. Zugaza, J. L., M. J. Caloca, and X. R. Bustelo.** 2004. Inverted signaling hierarchy between RAS and RAC in T-lymphocytes. *Oncogene* **23**:5823-33.
- 566. Zugaza, J. L., J. Sinnott-Smith, J. Van Lint, and E. Rozengurt.** 1996. Protein kinase D (PKD) activation in intact cells through a protein kinase C-dependent signal transduction pathway. *EMBO J* **15**:6220-30.

Anexo

Spatial compartmentalization of RasGRP1 is dictated by Ras interaction and diacylglycerol recruitment.

Silvia Carrasco, María Almena and Isabel Mérida*

Department of Immunology and Oncology, Centro Nacional de Biotecnología/CSIC, E-28049 Madrid, Spain

*Corresponding author: Isabel Mérida

Dept Immunology and Oncology

Centro Nacional de Biotecnología/CSIC, Darwin, 3

UAM Campus de Cantoblanco. E-28049 Madrid, Spain

Tel.: (+34) 915854702. Fax: (+34) 913720493

E-mail: imerida@cnb.uam.es

Running head: Ras and DAG binding to RasGRP1

Abbreviations: TCR, T cell receptor. PLC γ , phospholipase C γ . IP₃, inositol-3,4,5-triphosphate. DAG, diacylglycerol. RasGRP1, Ras guanine releasing protein 1. GEF, guanine exchange factor. APC, antigen-presenting cell. RBD, Ras binding domain. GFP, green fluorescent protein. SEE, staphylococcal enterotoxin E. WT, wild type.

Abstract

RasGRP1 is an exchange factor containing calcium and diacylglycerol (DAG) binding motifs that mediates Ras/ERK signaling in different subcellular compartments of the T cells, the plasma membrane and/or Golgi apparatus. Here we have used fluorescent DAG and Ras-GTP biosensors and GFP-RasGRP1 to correlate the kinetics of RasGRP1 compartmentalization, Ras activation and DAG generation during TCR activation. We found that RasGRP1 localizes to the T cell-antigen presenting cell contact in the absence of antigen. This localization does not require of diacylglycerol generation and is largely dictated by RasGRP1 interaction with its substrate Ras. The use of Ras-binding deficient RasGRP1 mutants reveals that, following TCR triggering, localization of RasGRP1 at the T cell synapse is strictly dictated by diacylglycerol dependent binding. Experiments carried out in antibody-coated plates reveals that in the absence of sustained membrane diacylglycerol elevation, RasGRP1 is recruited to the Golgi. In summary these experiments reveal that the high affinity of RasGRP1 C1 domain for Golgi diacylglycerol can only be counteracted by the polarized accumulation of this lipid as a result of synapse formation. The characterization of Ras-interaction as a mechanism to localize RasGRP1 at the site where diacylglycerol is generated throws new light to the mechanism responsible for RasGRP1 spatial distribution and clarifies most of the existing controversy regarding its localization in T lymphocytes. We propose that, differently from other classical DAG-effectors, RasGRP1 ability to bind DAG is not essential for membrane recruiting but to translate signal strength, defined as DAG elevation at the plasma membrane, into Ras activation.

Introduction

The Ras pathway illustrates the central role of signal intensity in the final cell response (Murphy and Blenis, 2006). Studies in worms, flies and mammals show that differences in the relative level and timing of Ras activation are critical to control cell fate. Whereas regulation of cell commitment by Ras signal intensity is well established, the precise molecular mechanisms that control the quantitative output of Ras signaling remains poorly understood.

Activation of the Ras pathway in T lymphocytes represents a classical example where final responses are critically ligated to the intensity of the signals, triggered by the T cell receptor (TCR). The current model for thymocyte differentiation links the final outcome, dictated by signal intensity, to differences in T cell receptor (TCR) affinity (Hogquist, 2001; Miosge and Zamoyska, 2007). High affinity TCR binding drives cells to death in a process known as negative selection. Only when the TCR binds peptides with low-intermediate affinity, cells will differentiate into simple positive thymocytes (positive selection). Intermediate affinity TCR binding to ligands comprises a broad intensity range that permits generation of distinct mature T lymphocyte populations (Bommhardt et al., 1999). In the periphery, Ras activation is critical for proper T cell function whereas defective Ras activation leads T cells to an unresponsive state known as anergy (Fields *et al.*, 1996).

How do T cells translate TCR occupancy into a range of intensities? In response to TCR activation, phospholipase C γ (PLC γ) is recruited to the plasma membrane, where it generates diacylglycerol (DAG) and inositol-3,4,5-triphosphate (IP $_3$) (Secrist et al., 1991). The intensity of PLC γ activation, conditioned by TCR affinity, generates a broad range of DAG and Ca $^{2+}$ concentrations. These two messengers are thus perfect candidates to translate TCR affinity into a quantitative response (Ohoka et al., 1997) as it has been described for B cell development (Hoek et al., 2006). PLC γ 1 $^{-/-}$ mice show embryonic lethality (Ji et al., 1997) but when PLC γ 1 activation mechanisms are genetically blocked or modified, alterations are found in thymocyte differentiation (Clements et al., 1998; Sommers et al., 2005).

Downstream of PLC γ , Ras guanine releasing protein 1 (RasGRP1), a guanine exchange factor (GEF) containing a canonical DAG-binding C1 domain, activates Ras (Ebinu et al., 1998; Tognon et al., 1998). RasGRP1 is expressed preferentially in thymocytes and mature T cells, as well as in brain (Ebinu et al., 1998; Ebinu et al., 2000). Analysis of the RasGRP1 $^{-/-}$ mouse phenotype showed the critical role of this protein in positive selection during thymic differentiation and in regulation of mature T cell expansion (Dower *et al.*, 2000; Priatel *et al.*, 2002; Priatel *et al.*, 2006). Given the strict requirement for an intact C1 domain for RasGRP1 activity (Ebinu et al., 1998; Tognon et al., 1998), this RasGEF represent an ideal candidate that could decode DAG concentrations into the classical “on-off” qualitative responses characteristic of the Ras/ERK pathway.

Whereas RasGRP1 function in T cell function is largely accepted, its exact site of action within the cell remains unresolved in spite of the numerous studies that have tried to address this question. PLC γ -dependent RasGRP1 localization to Golgi apparatus is proposed to mediate Ras activation in this compartment, following Jurkat T cell stimulation with soluble anti-CD3 antibody (Bivona et al., 2003; Perez de Castro et al., 2004). In these conditions, when LFA-1 is co-stimulated RasGRP1 activity is detected also in plasma membrane depending on phospholipase D function (Mor *et al.*, 2007). Studies using antibody-coated beads nonetheless, show that RasGRP1 is found at the immune synapse (Carrasco and Merida, 2004), as is also found at the plasma membrane following IgM-induced B cell activation (Caloca *et al.*, 2003; Beaulieu *et al.*, 2007), suggesting that LFA-1 depending signals are not required for plasma membrane localization. Interestingly, studies in thymocytes show internal or plasma membrane RasGRP1 localization depending on affinity of the ligand used for TCR stimulation (Daniels et al., 2006).

In order to find the molecular mechanism that explains the different RasGRP1 localizations described and its correlation with TCR signal intensity, we use Jurkat T cells and distinct TCR stimulation protocols. We show using a fluorescent DAG sensor, that

differences in DAG generation kinetics are detected according to the protocol followed. We analyze then if RasGRP1 localization was related to these changes in DAG level. We show that RasGRP1 localization at the plasma membrane, in the absence of DAG, is largely dictated by its interaction with Ras. Following TCR triggering, PLC-derived signals dictate RasGRP1 localization at the plasma membrane independently on Ras binding. This interplay between Ras/RasGRP1 and DAG/RasGRP1 complexes is controlled by DAG level and provides a mechanism for RasGRP1 localization/activation. As a result Ras is activated as a direct function of DAG production in the plasma membrane, an immediate result of signal intensity.

Materials and methods

Reagents. Poly-DL-lysine and bisindolylmaleimide I hydrochloride (Bim) were from Sigma; U73122 was from Calbiochem and staphylococcal enterotoxin E (SEE) from Toxin Technology. Chamber slides were from Nunc (Lab-Tek). Antibodies used were: anti-CD3 and -CD28 (BD Pharmingen), anti-pan-Ras (Ab3; Oncogene) and anti-RasGRP1 (H-120; Santa Cruz Biotechnology), biotin-conjugated goat anti-mouse and anti-rabbit, and Cy3-goat anti-rabbit (Jackson ImmunoResearch). NeutrAvidin Alexa fluor 488 conjugate, BODIPY-TR-ceramide, CellTrace Far Red DDAO-SE (DDAO) and CellTracker Blue 7-amino-4-chloromethylcoumarin (CMAC) were from Invitrogen.

Cell lines and transient transfections. Jurkat and Raji cells were maintained in growth medium (RPMI 1640 (BioWhittaker) with 10% fetal bovine serum (FBS, Sigma) and 2 mM glutamine (BioWhittaker)). EBV221 cells were cultured in RPMI 1640, 10% FBS, 4 mM glutamine, 50 μ M β -mercaptoethanol, 100 U/ml penicillin/streptomycin, 1x non-essential amino acids and 1 mM sodium pyruvate (all from BioWhittaker). Jurkat cells (1.2×10^7) in 400 μ l of complete medium were transfected by electroporation with 20 μ g DNA using a Gene Pulser (270 V, 975 μ F; BioRad). Cells were immediately transferred to 10 ml of growth medium and assayed 24 h later.

Plasmids and DNA constructs. GFPC1bPKC θ and GFPC1RasGRP1 constructs have been described (Carrasco and Merida, 2004). Rat RasGRP1 cDNA (J.C. Stone, Dept. Biochemistry, Univ. Alberta, CA) was fused at its N-terminus to GFP (pEGFP, Clontech) or to RFP (pmRFP donated by S. Mañes, CNB/CSIC, Spain). All RasGRP1 mutants were generated using Quickchange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) and specific oligonucleotides for each mutation. GFP3xRBD construct to detect endogenous Ras-GTP was generously donated by I. Rubio (Institute of Molecular Cell Biology, Friedrich-Schiller-University Jena, Germany).

Confocal microscopy imaging. At 24 h post-transfection, Jurkat cells were pelleted, suspended in HEPES-balanced salt solution (HBSS; 25 mM HEPES KOH pH 7.4, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 132 mM NaCl, 0.1% bovine serum albumin), transferred to poly-DL-lysine-coated chamber slides, allowed to attach at 37°C, and maintained at 37°C. Cells were imaged with a laser scanning TCS-NT confocal microscope and images processed using ImageJ software.

Analysis of CD69 cell surface expression. CD69 expression on the cell surface of the GFP-positive population was analyzed 24 h after transfection using a PE-conjugated anti-human CD69 mAb (Beckman Coulter). Immunofluorescence intensity of the cells was determined by flow cytometry (FACScalibur, Becton Dickinson). Data was analyzed with FlowJo 8.6 software and presented as contour plots against GFP, as histograms against number of cells or as plots of mean fluorescence intensity (MFI) of CD69 against GFP MFI. For the analysis in the last case, CD69 MFI was normalized to that of the GFP-negative population within each sample, and as a result the data represent MFI increase respect to the control in GFP negative cells.

Stimulation with APC. Raji or EBV221 cells were pelleted and suspended at 10×10^6 cells/ml in HBSS with 1 ng/ml SEE and 50 μ M DDAO or 10 μ M CMAC (2 h). Cells were washed (3x) with RPMI and maintained in growth medium until use, then pelleted and suspended in HBSS. Unpulsed APC were prepared without SEE.

At 24 h post-transfection, Jurkat cells were pelleted, suspended in HBSS, and incubated (15 min) with pulsed or unpulsed APC (Jurkat:APC 1:1). Cells were then recovered and transferred to poly-DL-lysine-coated (50 µg/ml) chamber slides for studies with live cells, or to poly-DL-lysine coated coverslips for fixed cells. Where indicated, Jurkat cells were pretreated with U73122 (1 µM) or Bim (5 µM) in HBSS (15 min) before incubation with APC; inhibitor concentrations were maintained throughout the assay.

Coated chamber slides were mounted on the 37°C plate of an Olympus Fluoview 1000 confocal microscope. Images were processed using Adobe Photoshop software. Percentages were calculated from no less than 100 cells in close contact with APC (detected by DDAO or CMAC staining) in at least three independent experiments. We represent differences between percentages of each experiment as the deviation from the media. For the analysis, we considered protein translocation only when the GFP signal is accumulated in the region of the membrane adjacent to the APC.

Stimulation with antibody-coated coverslips. Antibodies were adsorbed to coverslips by coating the surface with anti-CD3+anti-CD28 antibodies (5 µg/ml each in 100 mM Tris-HCl pH 8; 1 h, 37°C). For stimulation, antibody solution was removed. Transfected cells were treated (30 min, 4°C) with BODIPY-Tr ceramide (5 µM in HBSS; 2 x 10⁶ cells for each 100 µl), washed (x3) with growth medium and maintained in culture for at least 30 min. Transfected cell, treated with BODIPY, or cotransfected cells were dropped onto the coverslips surface and maintained at 37°C for the times indicated. Cells were fixed with 2% paraformaldehyde (PFA), washed (3x) with Tris-HCl 150 mM pH 7.5 and mounted. As a control (time 0), cells were dropped onto poly-DL-lysine-treated plates or coverslips. Coverslips were mounted on an Olympus Fluoview 1000 or a Leica TCS-NT confocal microscope and images were processed with Adobe Photoshop or ImageJ software, respectively. For the quantification of RFPRasGRP1 translocation in cells cotransfected, we counted, in four independent experiments, at least 50 cells in each condition analyzed. Cells were classified in three different populations according to RFPRasGRP1 localization: only at plasma membrane, exclusively at internal membranes or at both membranes. *Immunofluorescence.* Jurkat cells, alone or pre-incubated with APC, were transferred to poly-DL-lysine-coated coverslips and allowed to attach (15 min, 37°C), fixed (4 min) with methanol (-20°C) and washed three times in PBS. When Jurkat cells were stimulated with antibody coated plates same conditions were used for fixing cells at indicated times. Primary antibodies were incubated (18 h, 4°C) and washed three times. Secondary antibodies were incubated (1 h, 25°C) and washed four times. We used biotin-goat anti-mouse for panRas detection, and biotin-goat anti-rabbit or Cy3-goat anti-rabbit antibody for RasGRP1 detection. When required, NeutrAvidin Alexa fluor 488 conjugate was used as a third antibody; cells were incubated (1 h, 25°C) and washed five times. All antibodies were diluted in PBS-3% FBS; all washes were 10 min each in PBS.

Coverslips were mounted on an Olympus Fluoview 1000 confocal microscope and images obtained were processed with Adobe Photoshop. Percentages were calculated from at least 100 cells in close contact with APC (detected by DDAO staining).

Results

DAG generation and Ras activation at the T cell synapse as a result of TCR activation

To be active RasGRP1 must localize to cell membranes, where Ras is located. RasGRP1 has a C1 domain characteristic of DAG binding, and DAG production is considered essential for RasGRP1 translocation through C1-mediated DAG interaction (Tognon *et al.*, 1998; Bivona *et al.*, 2003). The presence of a C1 domain that binds DAG or DAG analogs has suggested a mechanism for RasGRP1 mediated Ras activation encompassing C1-mediated recruitment of RasGRP1 to membranes containing Ras and enriched in DAG. We decided to investigate in detail, using a well-characterized model of T cell activation, if the spatio/temporal recruitment of RasGRP1 to membranes correlated with that of DAG enrichment and Ras activation. We previously showed that the C1bPKC θ domain fused to GFP behaves as a sensor for DAG enrichment at the plasma membrane, (Carrasco and Merida, 2004), so we used the GFPC1bPKC θ construct to assess DAG generation during T cell activation. A commonly used experimental approach to mimic T cell-antigen-presenting cell (APC) interaction consist in incubate Jurkat T cells with staphylococcal enterotoxin E (SEE)-pulsed B cells. SEE, as other bacterial superantigen, is presented in the context of the major histocompatibility complex to the T cell, inducing TCR triggering (Wang *et al.*, 2007). In the presence of SEE-pulsed APC, GFPC1bPKC θ was recruited to the cell:cell contact zone and retained for at least 1 h (not shown), whereas no GFPC1bPKC θ was recruited in control cells incubated with unpulsed APC (Figure 1A, left).

Ras activation is rapidly elicited during T cell activation so we next investigated the site where Ras-GTP accumulated during T cell-APC interaction. Jurkat cells were transfected with a construct (GFP3xRBD) that allows the detection of endogenous Ras-GTP thanks to the combination of three Ras binding domain (RBD) of Raf fused in tandem to GFP (Augsten *et al.*, 2006). We observed endogenous Ras-GTP at the synapse, determined by probe accumulation, only in the presence of pulsed APC. Pharmacological inhibition of PLC with the specific inhibitor U73122 prevented accumulation of Ras-GTP at the immune synapse (Figure 1A, right), confirming previous studies that correlate Ras-GTP production, due to RasGRP1 activation, with DAG accumulation (Roose *et al.*, 2005; Roose *et al.*, 2007). As a PLC inhibition control, we examined GFPC1bPKC θ , which did not relocate to the membrane in the presence of U73122 (Figure 1A, left).

RasGRP1 relocates to the T cell synapse even in the absence of SEE loading

The previous experiments show that membrane DAG levels increase at the T cell synapse, the same localization where Ras-GTP accumulates as a consequence of T cell interaction with pulsed APC. We next investigated RasGRP1 localization under the same experimental conditions. In the absence of stimulation, endogenous RasGRP1 localized in cytosol, and accumulated partially in cellular membranes (Supplemental data 1). When cells were incubated with unpulsed APC, at distinct from GFPC1bPKC θ , we found RasGRP1 accumulation at the contact zone (Figure 1B, left). However, RasGRP1 translocation increased when cells were in contact with SEE-pulsed APC (-SEE: 55%; +SEE: 81%).

These results suggested that RasGRP1 recruitment to membranes is independent on the DAG generated after PLC γ activation, and raised the question of DAG dependence under conditions known to promote membrane DAG accumulation. We therefore examined RasGRP1 localization in Jurkat cells pre-treated with the PLC inhibitor U73122 prior to incubation with SEE-pulsed APC. We found U73122 treatment reduced the percentage of cells showing protein translocation to the synapse (-U73: 81%; +U73: 51%; Figure 1B, left).

We next analyzed whether ectopically expressed GFP-RasGRP1 and the endogenous protein showed similar behavior. GFP-RasGRP1 show similar localization in Jurkat T cells (Supplemental data 1) and clearly localized to the T cell synapse, in the

presence of both SEE-pulsed and unpulsed APC (Figure 1B, middle). GFP_{RasGRP1} localization to the T cell synapse was apparently independent of PLC activity, since no major differences in GFP_{RasGRP1} translocation were observed in the presence of U73122 (-U73: 87%; +U73: 80%; Figure 1B, middle).

Although RasGRP1 contains a C1 domain that binds DAG analogs, we have previously demonstrated that this domain recognizes the DAG mostly at internal localization (Carrasco and Merida, 2004). We next examined the ability of the RasGRP1 C1 domain to recognize DAG generated at the T cell synapse in response to TCR stimulation. As it is shown, the localization of GFP_{C1RasGRP1} at internal membranes observed in the presence of unpulsed APC was maintained and no redistribution was observed (Figure 1B, right). These results indicate that, differently from the PKC θ C1b domain, the isolated RasGRP1 C1 domain cannot detect the DAG accumulated as a result from TCR-mediated PLC γ activation.

Triggering of the Ras-ERK-CD69 pathway by RasGRP1 relies on DAG-regulated signals.

In response to TCR stimulation, PLC γ activation increased DAG levels and induced an increment in intracellular Ca²⁺ levels (Secrist et al., 1991). Both second messengers can affect RasGRP1 directly, due to the presence of a C1 domain and two EF hands in its primary sequence (Ebinu et al., 1998). However, our data indicate that both endogenous and ectopically expressed RasGRP1 relocate to the cell-cell contact region independently of PLC γ activity but Ras-GTP production requires a functional PLC γ . These results differ from the consensus model of RasGRP1 activation mechanism in which the proximity to the membrane, induced by DAG accumulation, is enough to induce Ras-GTP production. To further analyze this discrepancy and the relevance of PLC γ activity for RasGRP1 function and/or localization we generated a panel of GFP fused RasGRP1 constructs bearing punctual mutation that impaired either the C1 domain or each of the EF hands function. Localization was assessed by confocal microscopy whereas RasGRP1 activity was determined by analyzing the surface expression, on resting Jurkat cells, of the early activation marker CD69, previously described as a direct target of Ras pathway (D'Ambrosio et al., 1994).

Expression of GFP_{RasGRP1} induced CD69 expression confirming its positive function in Ras signal input (Figure 2A). RasGRP1F554G bears a point mutation in the RasGRP1 C1 domain previously reported to impair DAG binding in PKC δ (Kazanietz et al., 1995). Mutation at this residue prevented phorbol ester-dependent RasGRP1 translocation in live Jurkat cells, confirming the lack of C1 domain responsiveness (not shown). Cells expressing this mutant show a marked decrease in CD69 expression, confirming that the positive input of RasGRP1 on Ras signal relies on an intact RasGRP1 C1 domain (Figure 2A). In contrast, mutation of each EF-hand domain that impaired their Ca²⁺ binding capacity (Lewit-Bentley and Rety, 2000) did not alter CD69 expression (Figure 2A). Due to the lower GFP_{RasGRP1F544G} expression compared to the other constructs studied (Figure 2A), a further analysis was done using the mean fluorescence intensity (MFI) parameter to group cells with same GFP expression (Figure 2B) and compare then the effect in terms of CD69. The results were confirmed.

When spatial localization of each mutant was examined, we found a slight decrease in the number of cells showing synapse localization of the C1 domain mutant (GFP_{RasGRP1F544}) in the presence of unpulsed cells (WT: 71%; F544G: 56%): The number did not increase when cells were pulsed (WT: 87%; F544G: 56%; Figure 2C), suggesting a role for the C1 domain in protein stabilization at the plasma membrane, independently of receptor-induced DAG production. Mutation of the second EF-hand also revealed a slight decrease in the number of cells showing synapse localization, whereas this effect was not observed for the first EF-hand (Figure 2C). These results suggest that, whereas essential for RasGRP1 function, the C1 domain is dispensable for RasGRP1 recruitment at the cell-cell contact zone when cells are in contact with unpulsed APC.

PLC-mediated DAG generation during T cell activation has been proposed to modulate RasGRP1 GEF activity through PKC-mediated phosphorylation (Roose et al., 2005). Thr184 in RasGRP1 has been characterized as a direct PKC target (Zheng et al.,

2005). Accordingly, a non-phosphorylatable RasGRP1 mutant (GFPRasGRP1T184A) showed marked reduction in CD69 expression (Figure 2A and 2B). Whereas RasGRP1 function appears to rely on PKC-dependent regulation, we did not observe any relevant changes in protein translocation nor in the percentage of cells showing protein at the contact zone with pulsed or unpulsed APC (Figure 2C).

These experiments suggested that, whereas RasGRP1 activity relies on the second messenger DAG, its recruitment to the cell contact zone is independent on DAG accumulation. The high percentage of cells, (never lower than 50%, Supplemental table 1), showing plasma membrane localization of either endogenous RasGRP1 or ectopically expressed wild type or mutants GFPRasGRP1 under conditions where no DAG is generated, suggest that RasGRP1 behavior differs from that of other DAG-effectors. Contrary to the classical activation mechanism described for other C1 containing proteins, characterized by protein relocation from cytosol to membranes in response to stimulus-dependent DAG generation, RasGRP1 appears to be recruited to the plasma membrane in a stimulus-independent manner.

RasGRP1 localization at the cell contact zone under basal conditions depends on Ras interaction

When T cells contact unpulsed APC they form stable B/T cell conjugates, long lasting and resistant to mechanical stress, that resemble the formation of antigen-independent synapses described between mouse primary T cells and unpulsed dendritic cells (Revy et al., 2001). Analysis of the antigen-independent T cell-dendritic synapses revealed that, as we observed for GFPRasGRP1 in the Jurkat:unpulsed APC contact zone, several molecules such as CD3, CD4 or CD8, talin or CD45 do not require antigen-specific stimulation to become clustered (Revy et al., 2001).

As RasGRP1 localization to the synapse appears independent of DAG binding, we considered RasGRP1 association to a membrane-localized protein. Ras family members are the substrates of RasGRP1 activity (Tognon et al., 1998) and thus, possible RasGRP1 partners; these proteins are farnesylated and palmitoylated, modifications that allow membrane association (Hancock, 2003). So we next investigated if Ras was recruited to the synapse independently of receptor stimulation by investigating endogenous Ras distribution in Jurkat cells before and after T cell contact with unpulsed APC. In isolated cells we observed homogenous distribution of Ras and RasGRP1 in plasma membrane and cytosol. When cells were in contact with unpulsed APC, we detect some Ras accumulation at the cell-cell contact site that colocalized with endogenous RasGRP1 (Figure 3A).

To further investigate if RasGRP1 localization to the synapse in the absence of stimulation was a result of its binding to Ras, we generated two different Ras binding deficient RasGRP1 mutants. Studies in yeast Cdc25 have identified two residues necessary for Ras binding (Arg1374 and Arg1444, Figure 3B) (Park *et al.*, 1994). One is conserved in human Sos1 (Arg1374 corresponds to Arg849, Figure 3B) but both in RasGRP1 (Arg1374 and Arg1444 correspond to Arg271 and Arg341 respectively, Figure 3B). We analyzed the effect of the mutation of these Arg to Glu in the expression of CD69 on the surface of transfected Jurkat cells. We confirmed the previous described inactivity of the mutant GFPRasGRP1R271E (Park *et al.*, 1994; Tognon *et al.*, 1998) and validated the use of the new construct GFPRasGRP1R341E as an inactive mutant (Supplemental data 2).

Jurkat T cells expressing any of these mutants (GFPRasGRP1R271E or GFPRasGRP1R341E) showed no signal in plasma membrane when compared with cells transfected with WT GFPRasGRP1 (Supplemental data 2). The percentage of cells with mutant localization at the Jurkat:APC contact region was greatly reduced when cells were incubated with unpulsed APC (WT: 71%; R271E: 9%; R341E: 12% Figure 3C). These data demonstrate that the RasGRP1 membrane recruiting observed in the absence of stimulation relies on its activity or on its interaction with Ras. To distinguish between these two possibilities we

generated a new mutant in the residue Arg308 which equivalent mutation in yeast Cdc25 impairs GEF activity but not Ras binding (Park *et al.*, 1994). This mutant (GFPRasGRP1R308E) was inactive (Supplemental data 2), localized partially to plasma membrane (Supplemental data 2) and the percentage of cells incubated with unpulsed APC, which showed protein accumulation to the contact zone, was similar to the one of WT transfected cells (WT: 71%; R308E:83%) (Figure 3C). These results confirm that GFPRasGRP1 localization to the plasma membrane, in the absence of TCR triggering and DAG production, is due to its binding to Ras.

Incubation with pulsed APC revealed a large increase in the percentage of cells showing Ras binding-defective mutants translocation to the synapse (R271E: -SEE: 9%, +SEE: 71%; R341E: -SEE: 12%, +SEE: 83%; Figure 3C). Comparison of the percentage of cells (Supplemental table 1) showing GFPRasGRP1R271E translocation (-SEE: 9%; +SEE: 71%) or GFPRasGRP1R341E (-SEE: 12%; +SEE: 83%) with that of inactive mutant GFPRasGRP1R308E (-SEE: 83%; +SEE: 92%) or WT protein-transfected cells (-SEE: 71%; +SEE: 87%) demonstrated that the Ras binding-defective mutants discriminated between pulsed or unpulsed APC. To analyze whether this discrimination was a direct consequence of PLC activation we preincubated GFPRasGRP1R271E-transfected Jurkat cells with U73122 before contact with pulsed APC. The percentage of cells showing translocation was markedly reduced in pharmacologically inhibited cells (-U73: 71%; +U73: 38%; Figure 3C). These results demonstrate that, if Ras binding is impaired, RasGRP1 membrane recruiting relies on receptor-triggered PLC activation. These results revealed a novel, relevant function for Ras/RasGRP1 interaction suggesting that this is important not only for catalysis, but also to facilitate GFPRasGRP1 recruiting to membranes in the absence of TCR-triggered signals.

In the absence of Ras interaction, RasGRP1 recruiting to the T cell synapse requires of functional C1 domain and EF hands

The previous experiments suggested that, whereas TCR-triggered PLC activation provides the signals necessary for RasGRP1 activation, its contribution to RasGRP1 membrane localization only becomes apparent if RasGRP1/Ras interaction is impaired. We therefore analyzed the nature of PLC-derived signals required to induce membrane translocation of one of the Ras binding-defective mutant, GFPRasGRP1R271E. For this, we generated double mutants that combined the R271E mutation with mutations described in figure 2 that impairs DAG (F544G) and Ca²⁺ binding (E494A and E521A).

The percentage of cells showing RasGRP1R271E translocation in the presence of pulsed APC was notably reduced for RasGRP1R271E_F544G, bearing the additional C1 domain mutation (Figure 4, supplemental data 3). Membrane localization was also impaired in mutants comprising a functional C1 domain and mutations in either EF hand (Figure 4, supplemental data 3). These results demonstrate, for the first time, that not only the C1 domain but also the EF hands have a function in RasGRP1 membrane translocation.

To analyze whether PKC phosphorylation participated in RasGRP1 translocation, we treated Jurkat cells with the pan-PKC inhibitor Bim, prior to incubation with APC. The percentage of cells that showed GFPRasGRP1R271E translocation was reduced with pulsed APC (-Bim: 71%; +Bim: 30%). Since WT GFPRasGRP1-transfected cells treated with Bim, showed no notable differences in the percentage of cells with translocation (not shown) this suggest that the contribution of PKC activity to RasGRP1 translocation is observed when the protein cannot bind Ras (Figure 4, supplemental data 3). To further assess the contribution of PKC-dependent phosphorylation to RasGRP1 translocation, we used the double mutant with impaired Ras binding and phosphorylation at Thr184, and studied its translocation. We observed only a partial reduction in the percentage of cells showing protein translocation (R271E: 71%; R271E_T184A: 47%; Figure 4, supplemental data 3). This suggested either the need for additional PKC-phosphorylated residues in RasGRP1 or a different requirement for PKC-dependent regulation.

Subcellular RasGRP1 distribution depends on Ras interaction and intracellular DAG levels

The strict requirement of a functional C1 domain for RasGRP1 activity confirms previous observations showing that DAG binding to RasGRP1 promotes its GEF activity. Our experiments here demonstrate for the first time that, in the absence of receptor-triggered DAG elevation, Ras binding to RasGRP1 favors its stabilization at the membrane. The Ras guanine nucleotide exchange mechanism catalyzed by the GEFs has been intensively investigated. The current GEFs action mechanism propose that GEFs promote nucleotide exchange by competing with the nucleotide for binding to the G protein (Bos *et al.*, 2007). The interaction of a GEF weakens the affinity for the nucleotide and, in turn, the nucleotide weakens the affinity for the GEF. Given the DAG binding requirement for RasGRP1 activity and the release of GTP loaded Ras as a consequence of this activation, DAG and Ras might be considered “opposite partners” of RasGRP1. Inactive RasGRP1 would stabilize at the membrane by virtue of its interaction with Ras, whereas DAG binding to the RasGRP1 C1 domain would result in RasGRP1 activation, which would in turn release Ras-GTP.

As we have shown above, mimicking the T cell:APC synapse causes both Ras accumulation and DAG generation at the cell:cell contact site so, a different experimental model was needed to test our hypothesis. In a different classical T cell activation protocol (Bunnell *et al.*, 2001) Jurkat T cells are allowed to settle onto surfaces coated with anti-CD3 plus anti-CD28 antibodies. When investigated, this stimulation protocol revealed differences for DAG production and clearance compared to APC stimulation. We observed rapid DAG accumulation at the plasma membrane, which later decreased, since GFPC1bPKC θ was detected in perinuclear membranes with no apparent signal at the plasma membrane (Figure 5A, left). As for Ras activation, RasGTP accumulation was observed at the plasma membrane during the first 15 min (Figure 5A, right). Different stimulation conditions thus resulted in distinct spatio/temporal DAG production and Ras activation kinetics, sustained in APC and transient in protocols using antibody-coated plates.

As plating of Jurkat cells onto antibody-coated plates caused transient accumulation of the DAG sensor at the plasma membrane (Figure 5A), we studied subcellular GFPRasGRP1 distribution in these conditions. When Jurkat cells were stimulated on antibody-coated plates, RasGRP1 or GFPRasGRP1 were found at the plasma membrane during the first 5 minutes, and then slowly accumulated at intracellular membranes (Figure 5B and supplemental data 4).

Although similar, subcellular distribution of GFPRasGRP1 did not mirror that of GFPC1bPKC θ (Figure 5A, B). Both proteins localized to the plasma membrane with similar kinetics but GFPRasGRP1 persisted, suggesting that the decrease in plasma membrane DAG levels did not cause RasGRP1 release. As our hypothesis predicted that a DAG decrease would promote the stabilization of the RasGRP1/Ras interaction, we analyzed translocation of the GFPRasGRP1R271E Ras-binding defective mutant, which, at 15 min post-stimulation, did not localize at plasma membrane and accumulated in internal membranes in a pattern similar to that of GFPC1RasGRP1 (Figure 6A and 1B). To demonstrate the importance of the C1 domain for internal GFPRasGRP1 localization, we examined translocation of the C1 domain mutant, GFPRasGRP1F544G. At the times tested, this mutant did not accumulate in internal membranes and was only detected at the plasma membrane (Figure 6B, left panels). The GFPRasGRP1R271E_F544G double mutant, which cannot bind Ras or DAG, was found in the cytosol and did not localize at either plasma or internal membranes in response to stimulation (Figure 6B, right panels). These data confirm our hypothesis and demonstrate that Ras binding contributes to plasma membrane localization of RasGRP1, whereas a functional C1 domain is responsible for RasGRP1 recruiting to internal membranes at later times, when PLC γ derived-DAG is consumed.

PKC θ C1b or RasGRP1 C1 domain overexpression alters membrane localization of RasGRP1

Our previous characterization of C1 domains revealed that specific C1 domains can discriminate among different DAG species, providing a mechanism of relocation to different membranes to the proteins that contains them (Carrasco and Merida, 2004). To further investigate whether C1 domain-mediated recruitment of RasGRP1 to internal membranes was due to recognition of a specific DAG pool, we examined the kinetics of RasGRP1 distribution in the presence of distinct C1 domains. Expression

of the RasGRP1 C1 domain, with higher affinity for DAG species present in internal membranes, resulted in the displacement of RFP RasGRP1 from this localization (Figure 7). This confirms that the high affinity of the RasGRP1 C1 domain for DAG species present in internal membranes (Bivona et al., 2003; Carrasco and Merida, 2004), directs RasGRP1 recruiting to this localization. Overexpression of GFPC1bPKC θ , with high affinity for unsaturated DAG, did not prevent RFP RasGRP1 localization (Figure 7), although it accelerated the kinetics of protein accumulation at internal membranes that was detected at 5 min post-stimulation. This suggests that the RasGRP1 C1 domain, spite of its high affinity for DAG species present in internal membranes, mediates RasGRP1 binding to PLC-derived DAG when this lipid accumulates in plasma membrane.

Discussion

The identification of RasGRP1 as a GEF for Ras in T cells ended a long search for the mechanism linking DAG generation with Ras activation (Izquierdo et al., 1992). By analogy with the PKC family, it was early assumed that RasGRP1 membrane recruiting relied on DAG binding (Bivona et al., 2003), although new elements implicated in protein translocation are still being characterized (Caloca et al., 2003; Beaulieu et al., 2007). Since RasGRP1 cDNA was cloned in 1998 the spatial localization of RasGRP1 within T cells has been a matter of intense debate. Initially, ectopically expressed RasGRP1 was shown to relocate to internal membranes by virtue of its C1 domain suggesting that Golgi localization was the main site of Ras activation in response to DAG-mediated RasGRP1 activation (Bivona et al., 2003). Lately, it has been shown how TCR and LFA-1 co-stimulation induced protein accumulation and activation both at internal and plasma membranes (Mor et al., 2007). However, we have previously described that RasGRP1 localization at plasma membrane did not require other signals distinct from TCR triggering induced by antibody coated beads (Carrasco and Merida, 2004) or by antibody coated plates and how this localization changed from plasma to internal membranes when diacylglycerol kinase alpha, an enzyme that reduces DAG levels at the plasma membrane, was overexpressed (Sanjuan et al., 2003). Interestingly, studies in thymocytes have shown same changes in RasGRP1 subcellular localization depending on the TCR affinity of the peptide presented to the cell (Daniels et al., 2006). Our studies here reveal novel aspects of the mechanisms governing RasGRP1 membrane recruitment and help us to understand how RasGRP1 senses signal intensity, translating it into Ras activation and, consequently, cell outcome.

The use of a well-established T cell model has allowed us to explore in detail the role of DAG and of the distinct RasGRP1 domains in the activity and subcellular localization of this protein. Our experiments show that, in the absence of receptor-triggered DAG elevation, Ras interaction is largely responsible for directing RasGRP1 localization. These results suggest that some of the studies using ectopically expressed Ras could affect RasGRP1 localization. Elimination of Ras binding shows the strict dependence of RasGRP1 on its regulatory domains for membrane translocation, suggesting that the two products of PLC activation, Ca²⁺ and DAG, are needed to provide the correct clues for RasGRP1 localization at the plasma membrane.

Our experiments confirm the utility of GFPC1bPKC θ domain as a sensor to probe DAG generation kinetics at the plasma membrane and show that DAG accumulation at this particular localization is highly dependent on stimulation conditions. The use of SEE-loaded APC demonstrates that relocation of this probe to the contact zone is a consequence of SEE priming, since no relocation is observed in contact with unpulsed APC. T cell stimulation by SEE-pulsed APC thus provides an excellent model in which to study the consequences of polarized, sustained DAG accumulation at the T cell synapse. DAG generation kinetic differ markedly when cells are dropped onto plates coated with stimulatory antibodies. In this assay, immediate cell contact with the stimulatory surface results in TCR clustering, followed by recruitment and colocalization of various signaling molecules such as LAT and SLP-76 (Bunnell et al., 2002). In these stimulation conditions, DAG generation at the plasma membrane, detected as GFPC1bPKC θ relocation, is rapid and transient, followed by accumulation at internal membranes. This is probably related

to rapid internalization of SLP-76, which is first recruited to TCR-based clusters and then transported by vesicles to internal membranes (Barda-Saad et al., 2005). Characterization of distinct DAG generation kinetics provides an ideal opportunity to analyze the role of this lipid in the control of RasGRP1 membrane localization.

As a result of contact with SEE-loaded cells the potent activation of PLC triggers the signals responsible for exposure of RasGRP1 C1 domain (Figure 8). Membrane binding of the C1 domain would result in greater membrane penetration, fostering protein activation, as described for some PKC isoforms (Bazzi and Nelsestuen, 1988; Bittova et al., 2001) and for β 2-chimaerin (Canagarajah et al., 2004). PKC-dependent phosphorylation would also promote an active/C1 domain-exposed conformation. In its active conformation, RasGRP1 catalyzes GDP-GTP exchange; this in turn would prevent stable Ras/ RasGRP1 interaction, favoring continuous Ras-GTP production at the membrane site at which RasGRP1 is located. Signal termination would result in reduction in DAG levels that would impair membrane binding and facilitate dephosphorylation. The protein would then return to an inactive state where the C1 domain would be masked. This inactive conformation would again support interaction with Ras.

This Ras/RasGRP1 interaction could facilitate partial RasGRP1 activation, as it places the protein in the context of membrane rafts, in which saturated fatty acid composition of DAG resembles that of the internal membranes (Brown and London, 1998). Although our data and those from other groups (Bivona et al., 2003) indicate that the RasGRP1 C1 domain must be masked in the full-length protein to prevent internal localization, some exposed RasGRP1 C1 domains could detect DAG in rafts, which would induce protein activation. Such basal activation would help to explain the requirement for RasGRP1 dependent Ras-GTP generation for priming and activation of the GEF SOS, prior to TCR stimulation (Roose et al., 2007). Our hypothesis of a pool of RasGRP1 bound to DAG in rafts is supported by differences in percentages of WT or C1 domain mutant transfected cells showing protein accumulation in Jurkat:unpulsed APC contact zone (WT: 71%; F544G: 56%). This postulated RasGRP1 regulation, dependent on Ras binding and detection of DAG in rafts, would also explain how RasGRP1 induces cell transformation when overexpressed (Klinger et al., 2005).

This model, in which DAG is not only responsible for RasGRP1 translocation but activates and stabilizes this protein at the membrane, is confirmed by RasGRP1 translocation kinetics in conditions of transient DAG generation. In these conditions, there is insufficient DAG to maintain RasGRP1 at the membrane once it is activated, and the protein accumulates at internal membranes in a C1 domain-dependent manner (Figure 8). This model, where RasGRP1 activation at the plasma membrane would be regulated by DAG production concurs with recent experiments in thymocytes showing that membrane localization of endogenous RasGRP1 is signal intensity-dependent (Daniels et al., 2006).

Our experiments in T cells confirm studies in B cells (Beaulieu et al., 2007) and reveal that the concentration of DAG generated at the T cell synapse is not enough to displace the RasGRP1 C1 domains from internal membranes. The question thus remains as to how RasGRP1 detects PLC-derived DAG in the plasma membrane whereas its isolated C1 domain does not. Additional regions in RasGRP1 have been proposed to contribute to plasma membrane localization. In response to phorbol ester, RasGRP1 plasma membrane localization is lost when N- and C-terminal sequences are deleted (Tognon et al., 1998). RasGRP2 N-terminal actin binding is necessary for its plasma membrane localization (Caloca et al., 2004), and RasGRP1 and actin association is also described in response to stimulus (Caloca et al., 2003). Interestingly, other studies have identified a region at the RasGRP1 C-terminal domain that it is necessary for RasGRP1 plasma membrane localization (Beaulieu et al., 2007).

RasGRP1 regulation by DAG provides a link between TCR signal intensity, level of ERK activation and the consequent correct cell decision: death or differentiation. In the thymus the timing of ERK activation has been proposed to help to distinguish between positive and negative selection (Mariathasan et al., 2001). Experiments in RasGRP1^{-/-} mice have shown the role of RasGRP1 in positive selection (Dower et al., 2000; Priatel et al., 2002; Priatel et al., 2006). While negative selection it is apparently

intact, autoimmune disease appearance in adult mice suggests that some T cell populations are selected incorrectly (Layer et al., 2003). This function of RasGRP1 decoding intensity into specific level of ERK activation could also be important in neurons, where expression of RasGRP family members is also tissue-dependent and low Ras-GTP levels trigger proliferation and high levels trigger differentiation (Marshall, 1995). This property of the RasGRP family may have been conserved throughout evolution, since deletion of the *Caenorhabditis elegans* RasGRP orthologue by RNAi alters the specification of vulva cells (Fraser et al., 2000).

In this study we have characterized the molecular mechanism that confer on RasGRP1 the ability to modulate the intensity and duration of Ras activation based on differences on DAG generation in response to TCR stimulation. The role of RasGRP1 as a sensor of signal intensity at the initiation of the Ras signaling cascade may have a critical role in modulate the functional output of this pathway.

Acknowledgments

We thank Prof. JC. Stone and IM group members for stimulating discussion and C. Mark for excellent editorial assistance. This work was supported in part by grants G03/79 from the Instituto de Salud Carlos III (Spanish Ministry of Health) and BFU2004-01756 (Spanish Ministry of Education) to I.M. The Department of Immunology and Oncology was founded and is supported by the Spanish National Research Council (CSIC) and by Pfizer.

References

- Augsten, M., Pusch, R., Biskup, C., Rennert, K., Wittig, U., Beyer, K., Blume, A., Wetzker, R., Friedrich, K., and Rubio, I. (2006). Live-cell imaging of endogenous Ras-GTP illustrates predominant Ras activation at the plasma membrane. *EMBO Rep* 7, 46-51.
- Barda-Saad, M., Braiman, A., Titerence, R., Bunnell, S.C., Barr, V.A., and Samelson, L.E. (2005). Dynamic molecular interactions linking the T cell antigen receptor to the actin cytoskeleton. *Nat Immunol* 6, 80-89.
- Bazzi, M.D., and Nelsestuen, G.L. (1988). Properties of membrane-inserted protein kinase C. *Biochemistry* 27, 7589-7593.
- Beaulieu, N., Zahedi, B., Goulding, R.E., Tazmini, G., Anthony, K.V., Omeis, S.L., de Jong, D.R., and Kay, R.J. (2007). Regulation of RasGRP1 by B Cell Antigen Receptor Requires Cooperativity between Three Domains Controlling Translocation to the Plasma Membrane. *Mol Biol Cell* 18, 3156-3168.
- Bittova, L., Stahelin, R.V., and Cho, W. (2001). Roles of ionic residues of the C1 domain in protein kinase C- α activation and the origin of phosphatidylserine specificity. *J Biol Chem* 276, 4218-4226.
- Bivona, T.G., Perez De Castro, I., Ahearn, I.M., Grana, T.M., Chiu, V.K., Lockyer, P.J., Cullen, P.J., Pellicer, A., Cox, A.D., and Philips, M.R. (2003). Phospholipase C γ activates Ras on the Golgi apparatus by means of RasGRP1. *Nature* 424, 694-698.
- Bommhardt, U., Basson, M.A., Krummrei, U., and Zamoyska, R. (1999). Activation of the extracellular signal-related kinase/mitogen-activated protein kinase pathway discriminates CD4 versus CD8 lineage commitment in the thymus. *J Immunol* 163, 715-722.

- Bos, J.L., Rehmann, H., and Wittinghofer, A. (2007). GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell* 129, 865-877.
- Brown, D.A., and London, E. (1998). Structure and origin of ordered lipid domains in biological membranes. *J Membr Biol* 164, 103-114.
- Bunnell, S.C., Hong, D.I., Kardon, J.R., Yamazaki, T., McGlade, C.J., Barr, V.A., and Samelson, L.E. (2002). T cell receptor ligation induces the formation of dynamically regulated signaling assemblies. *J Cell Biol* 158, 1263-1275.
- Bunnell, S.C., Kapoor, V., Tribble, R.P., Zhang, W., and Samelson, L.E. (2001). Dynamic actin polymerization drives T cell receptor-induced spreading: a role for the signal transduction adaptor LAT. *Immunity* 14, 315-329.
- Caloca, M.J., Zugaza, J.L., Matallanas, D., Crespo, P., and Bustelo, X.R. (2003). Vav mediates Ras stimulation by direct activation of the GDP/GTP exchange factor Ras GRP1. *EMBO J* 22, 3326-3336.
- Caloca, M.J., Zugaza, J.L., Vicente-Manzanares, M., Sanchez-Madrid, F., and Bustelo, X.R. (2004). F-actin-dependent translocation of the Rap1 GDP/GTP exchange factor RasGRP2. *J Biol Chem* 279, 20435-20446.
- Canagarajah, B., Leskow, F.C., Ho, J.Y., Mischak, H., Saidi, L.F., Kazanietz, M.G., and Hurley, J.H. (2004). Structural mechanism for lipid activation of the Rac-specific GAP, beta2-chimaerin. *Cell* 119, 407-418.
- Carrasco, S., and Merida, I. (2004). Diacylglycerol-dependent binding recruits PKCtheta and RasGRP1 C1 domains to specific subcellular localizations in living T lymphocytes. *Mol Biol Cell* 15, 2932-2942.
- Clements, J.L., Yang, B., Ross-Barta, S.E., Eliason, S.L., Hrstka, R.F., Williamson, R.A., and Koretzky, G.A. (1998). Requirement for the leukocyte-specific adapter protein SLP-76 for normal T cell development. *Science* 281, 416-419.
- D'Ambrosio, D., Cantrell, D.A., Frati, L., Santoni, A., and Testi, R. (1994). Involvement of p21ras activation in T cell CD69 expression. *Eur J Immunol* 24, 616-620.
- Daniels, M.A., Teixeira, E., Gill, J., Hausmann, B., Roubaty, D., Holmberg, K., Werlen, G., Hollander, G.A., Gascoigne, N.R., and Palmer, E. (2006). Thymic selection threshold defined by compartmentalization of Ras/MAPK signalling. *Nature* 444, 724-729.
- Dower, N.A., Stang, S.L., Bottorff, D.A., Ebinu, J.O., Dickie, P., Ostergaard, H.L., and Stone, J.C. (2000). RasGRP is essential for mouse thymocyte differentiation and TCR signaling. *Nat Immunol* 1, 317-321.
- Ebinu, J.O., Bottorff, D.A., Chan, E.Y., Stang, S.L., Dunn, R.J., and Stone, J.C. (1998). RasGRP, a Ras guanyl nucleotide-releasing protein with calcium- and diacylglycerol-binding motifs. *Science* 280, 1082-1086.
- Ebinu, J.O., Stang, S.L., Teixeira, C., Bottorff, D.A., Hooton, J., Blumberg, P.M., Barry, M., Bleakley, R.C., Ostergaard, H.L., and Stone, J.C. (2000). RasGRP links T-cell receptor signaling to Ras. *Blood* 95, 3199-3203.
- Fields, P.E., Gajewski, T.F., and Fitch, F.W. (1996). Blocked Ras activation in anergic CD4+ T cells. *Science* 271, 1276-1278.
- Fraser, A.G., Kamath, R.S., Zipperlen, P., Martinez-Campos, M., Sohrmann, M., and Ahringer, J. (2000). Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference. *Nature* 408, 325-330.
- Hancock, J.F. (2003). Ras proteins: different signals from different locations. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 373-384.
- Hoek, K.L., Antony, P., Lowe, J., Shimmers, N., Sarmah, B., Wente, S.R., Wang, D., Gerstein, R.M., and Khan, W.N. (2006). Transitional B cell fate is associated with developmental stage-specific regulation of diacylglycerol and calcium signaling upon B cell receptor engagement. *J Immunol* 177, 5405-5413.
- Hogquist, K.A. (2001). Signal strength in thymic selection and lineage commitment. *Curr Opin Immunol* 13, 225-231.
- Izquierdo, M., Downward, J., Graves, J.D., and Cantrell, D.A. (1992). Role of protein kinase C in T-cell antigen receptor regulation of p21ras: evidence that two p21ras regulatory pathways coexist in T cells. *Mol Cell Biol* 12, 3305-3312.
- Ji, Q.S., Winnier, G.E., Niswender, K.D., Horstman, D., Wisdom, R., Magnuson, M.A., and Carpenter, G. (1997). Essential role of the tyrosine kinase substrate phospholipase C-gamma1 in mammalian growth and development. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 2999-3003.
- Kazanietz, M.G., Wang, S., Milne, G.W., Lewin, N.E., Liu, H.L., and Blumberg, P.M. (1995). Residues in the second cysteine-rich

- region of protein kinase C delta relevant to phorbol ester binding as revealed by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* *270*, 21852-21859.
- Klinger, M.B., Guilbault, B., Goulding, R.E., and Kay, R.J. (2005). Deregulated expression of RasGRP1 initiates thymic lymphomagenesis independently of T-cell receptors. *Oncogene* *24*, 2695-2704.
- Layer, K., Lin, G., Nencioni, A., Hu, W., Schmucker, A., Antov, A.N., Li, X., Takamatsu, S., Chevassut, T., Dower, N.A., Stang, S.L., Beier, D., Buhlmann, J., Bronson, R.T., Elkon, K.B., Stone, J.C., Van Parijs, L., and Lim, B. (2003). Autoimmunity as the consequence of a spontaneous mutation in *Rasgrp1*. *Immunity* *19*, 243-255.
- Lewit-Bentley, A., and Rety, S. (2000). EF-hand calcium-binding proteins. *Curr Opin Struct Biol* *10*, 637-643.
- Mariathasan, S., Zakarian, A., Bouchard, D., Michie, A.M., Zuniga-Pflucker, J.C., and Ohashi, P.S. (2001). Duration and strength of extracellular signal-regulated kinase signals are altered during positive versus negative thymocyte selection. *J Immunol* *167*, 4966-4973.
- Marshall, C.J. (1995). Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* *80*, 179-185.
- Miosge, L., and Zamoyska, R. (2007). Signalling in T-cell development: is it all location, location, location? *Curr Opin Immunol* *19*, 194-199.
- Mor, A., Campi, G., Du, G., Zheng, Y., Foster, D.A., Dustin, M.L., and Philips, M.R. (2007). The lymphocyte function-associated antigen-1 receptor costimulates plasma membrane Ras via phospholipase D2. *Nature cell biology* *9*, 713-719.
- Murphy, L.O., and Blenis, J. (2006). MAPK signal specificity: the right place at the right time. *Trends Biochem Sci* *31*, 268-275.
- Ohoka, Y., Kuwata, T., Asada, A., Zhao, Y., Mukai, M., and Iwata, M. (1997). Regulation of thymocyte lineage commitment by the level of classical protein kinase C activity. *J Immunol* *158*, 5707-5716.
- Park, W., Mosteller, R.D., and Broek, D. (1994). Amino acid residues in the CDC25 guanine nucleotide exchange factor critical for interaction with Ras. *Mol Cell Biol* *14*, 8117-8122.
- Perez de Castro, I., Bivona, T.G., Philips, M.R., and Pellicer, A. (2004). Ras activation in Jurkat T cells following low-grade stimulation of the T-cell receptor is specific to N-Ras and occurs only on the Golgi apparatus. *Mol Cell Biol* *24*, 3485-3496.
- Priatel, J.J., Chen, X., Dhanji, S., Abraham, N., and Teh, H.S. (2006). RasGRP1 transmits prodifferentiation TCR signaling that is crucial for CD4 T cell development. *J Immunol* *177*, 1470-1480.
- Priatel, J.J., Teh, S.J., Dower, N.A., Stone, J.C., and Teh, H.S. (2002). RasGRP1 transduces low-grade TCR signals which are critical for T cell development, homeostasis, and differentiation. *Immunity* *17*, 617-627.
- Revy, P., Sospedra, M., Barbour, B., and Trautmann, A. (2001). Functional antigen-independent synapses formed between T cells and dendritic cells. *Nat Immunol* *2*, 925-931.
- Roose, J.P., Mollenauer, M., Gupta, V.A., Stone, J., and Weiss, A. (2005). A diacylglycerol-protein kinase C-RasGRP1 pathway directs Ras activation upon antigen receptor stimulation of T cells. *Mol Cell Biol* *25*, 4426-4441.
- Roose, J.P., Mollenauer, M., Ho, M., Kurosaki, T., and Weiss, A. (2007). Unusual interplay of two types of Ras activators, RasGRP and SOS, establishes sensitive and robust Ras activation in lymphocytes. *Mol Cell Biol* *27*, 2732-2745.
- Sanjuan, M.A., Pradet-Balade, B., Jones, D.R., Martinez, A.C., Stone, J.C., Garcia-Sanz, J.A., and Merida, I. (2003). T cell activation in vivo targets diacylglycerol kinase alpha to the membrane: a novel mechanism for Ras attenuation. *J Immunol* *170*, 2877-2883.
- Secrist, J.P., Karnitz, L., and Abraham, R.T. (1991). T-cell antigen receptor ligation induces tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma 1. *J Biol Chem* *266*, 12135-12139.
- Sommers, C.L., Lee, J., Steiner, K.L., Gurson, J.M., Depersis, C.L., El-Khoury, D., Fuller, C.L., Shores, E.W., Love, P.E., and Samelson, L.E. (2005). Mutation of the phospholipase C-gamma1-binding site of LAT affects both positive and negative thymocyte selection. *J Exp Med* *201*, 1125-1134.

Tognon, C.E., Kirk, H.E., Passmore, L.A., Whitehead, I.P., Der, C.J., and Kay, R.J. (1998). Regulation of RasGRP via a phorbol ester-responsive C1 domain. *Mol Cell Biol* 18, 6995-7008.

Wang, L., Zhao, Y., Li, Z., Guo, Y., Jones, L.L., Kranz, D.M., Mourad, W., and Li, H. (2007). Crystal structure of a complete ternary complex of TCR, superantigen and peptide-MHC. *Nat Struct Mol Biol* 14, 169-171.

Zheng, Y., Liu, H., Coughlin, J., Zheng, J., Li, L., and Stone, J.C. (2005). Phosphorylation of RasGRP3 on threonine 133 provides a mechanistic link between PKC and Ras signaling systems in B cells. *Blood* 105, 3648-3654.

Figure legends

Figure 1. *RasGRP1* translocation to the T cell synapse in the presence of *SEE*-pulsed and -unpulsed APC. Jurkat cells were transfected with GFPC1bPKC θ (A, left), GFP3xRBD (A, right), GFPRasGRP1 (B, middle) or GFPC1RasGRP1 (B, right) and after 24 h, incubated (15 min) at a 1:1 proportion with *SEE*-pulsed or -unpulsed (+*SEE* or -*SEE*) APC (*) in HBSS. Conjugates were then transferred to poly-DL-lysine-coated chamber slides, which were mounted on a confocal microscope 37°C plate and analyzed. For the study of endogenous RasGRP1 (B, left) Jurkat cells, after incubation with APC, were placed on poly-DL-lysine-coated coverslips, fixed for immunodetection and analyzed. When indicated, cells were pretreated with U73122 (1 μ M; 15 min) before incubation with APC. U73122 concentration was maintained throughout the assay. Phase contrast images (overlay) show cell:cell contact. The percentage of cells that show protein localization at the cell-cell contact zone is indicated for each condition.

Figure 2. *The requirements for PLC-triggered signals differ for RasGRP1 activity and localization.* Jurkat cells were transfected with GFP, GFPRasGRP1, GFPRasGRP1F544G, GFPRasGRP1E494A, GFPRasGRP1E521A or GFPRasGRP1T184A and 24 h later were stained for cell surface CD69. CD69 expression was analyzed by flow cytometry and plotted either in contour plots against GFP expression (A) or plots of CD69 MFI (normalized to that of the GFP-negative population within each sample) against GFP MFI (B). Results are representative of three independent experiments. (C) Jurkat cells transfected with GFPRasGRP1F544G, GFPRasGRP1E494A, GFPRasGRP1E521A or GFPRasGRP1T184A were processed as in Figure 1. Phase contrast images (overlay) show cell:cell contact. The percentage of cells that show protein localization at the cell-cell contact zone is indicated for each condition.

Figure 3. *Ras binding directs GFPRasGRP1 localization to the contact zone with unpulsed APC.* (A) Jurkat cell were either incubated (15 min) with APC (+APC -*SEE*) as in Figure 1 or not (-APC), then placed on poly-DL-lysine-coated coverslips and fixed to stain endogenous Ras (green, Cy2) and RasGRP1 (red, Cy3). Merged Cy2/ Cy3 fluorescence is shown. Phase contrast images (overlay) show cell:cell contact. Representative images are shown for each condition. (B) Alignment of the catalytic domain of yeast Cdc25 (NP_013413, residues 1351-1499), human Sos1 (NP_005624, residues 826-972) and rat RasGRP1 (NP_062084, residues 248-394). Blue head arrows indicate residues described in yeast Cdc25 (Park *et al.*, 1994), as relevant for GEF activity and Ras binding and the green ones show residues necessary for GEF activity but not Ras binding. Alignment was done with CLC free Workbench 4 software. (C) Cells were transfected with GFPRasGRP1R271E, GFPRasGRP1R341E or GFPRasGRP1R308E and 24 h later incubated with APC as in Figure 1. When indicated, cells were pretreated with U73122 (1 μ M; 15 min) before incubation with APC. U73122 concentration was maintained throughout the assay. Phase contrast images (overlay) show cell:cell contact. The percentage of cells that show protein localization at the cell-cell contact zone is indicated for each condition.

Figure 4. *Translocation of GFPRasGRP1 mutants in the presence of SEE-pulsed and -unpulsed APC.* Percentage of cells showing

construct translocation to the SEE-pulsed (gray) or -unpulsed (white) APC:Jurkat cell contact zone for each GFP_{RasGRP1} mutant analyzed, alone (-) or in the presence of inhibitors U73122 (1 μM) or Bim (5 μM). For each condition, a minimum of 100 cells in contact with APC was counted in at least three independent experiments; error bars show differences in the percentages for each experiment. RasGRP1 domains are depicted as boxes in a linear sequence; crosses mark the position of mutated residues. REM: Ras exchange motif, Cdc25: Cdc25 homology domain, EF: EF hands, C1: C1 domain.

Figure 5: *RasGRP1* translocation in response to anti-CD3+anti-CD28 antibody-coated plates. (A) Jurkat cells were transfected with GFPC1bPKCθ (left) or GFP3xRBD (right) and 24 h later were resuspended in HBSS and dropped onto coverslips pre-incubated with anti-CD3+anti-CD28 and maintained at 37°C throughout the experiment. Cells were fixed at times indicated. Phase contrast images (overlay) show cell spreading and outline. (B) Jurkat cells were transfected with GFP_{RasGRP1} and cultured (24 h), then treated for internal membrane staining with BODIPY-TR-ceramide, pelleted, resuspended in HBSS and dropped onto anti-CD3+anti-CD28-pretreated coverslips. Cells were fixed at indicated times for confocal microscopy analysis. Merged GFP and Cy3 fluorescence is shown to ensure that the confocal plane observed comprises internal membranes. Representative images are shown for each condition.

Figure 6. *GFP_{RasGRP1} translocation requires Ras binding and a functional C1 domain when cells are laid onto anti-CD3+anti-CD28-coated plates.* Jurkat cells transfected with GFP_{RasGRP1R271E} (A), GFP_{RasGRP1F544G} (B, left) or GFP_{RasGRP1R271E_F544G} (B, right) were processed as in Figure 5B. Merged GFP and Cy3 fluorescence is shown to ensure that the confocal plane observed comprises internal membranes. Where necessary, phase contrast images show cell spreading and outline. Representative images are shown for each condition.

Figure 7. *GFPC1_{RasGRP1} or GFPC1bPKCθ expression modifies RFP_{RasGRP1} localization.* Jurkat cells were cotransfected with RFP_{RasGRP1} and GFPC1_{RasGRP1} or GFPC1bPKCθ, cultured (24 h), then pelleted, resuspended in HBSS and dropped onto anti-CD3+anti-CD28-coated coverslips. Cells were fixed at indicated times for confocal microscopy analysis. Merged GFP and RFP fluorescence is shown. Representative images are shown for each condition. For the quantification, a minimum of 50 cells were counted for each stimulation time in four independent experiments. The percentage of cells that showed RFP_{RasGRP1} localization only at the plasma membrane (PM), only at internal membranes (IM) or at both (PM/IM) was plotted.

Figure 8. *Model for RasGRP1 localization and activation.* When cells contact SEE-pulsed APC, PLC is activated, increasing DAG at the plasma membrane. This second messenger and probably additional signals, activate RasGRP1, exposing its C1 domain (1). The C1 domain recognizes PLC-derived DAG (2), inducing Ras-GTP release (3). The continuous DAG production, in concert with the RasGRP1 C-terminal region and actin binding, maintains RasGRP1 at the membrane, where it is available for binding to new Ras-GDP molecules. During stimulation with antibody-coated plates, DAG concentration decreases at the plasma membrane and RasGRP1 prematurely loses its anchorage (4) leaving the plasma membrane (5) before masking its C1 domain. This domain then recognizes the internal DAG pool retaining the protein at internal membranes (6).

Supplemental material

Supplemental data 1: *RasGRP1 and GFP_{RasGRP1} localization.* Jurkat cells were resuspended in HBSS, placed on poly-DL-lysine-coated coverslips and fixed for immunodetection of endogenous RasGRP1. Jurkat cells transfected with GFP_{RasGRP1} were

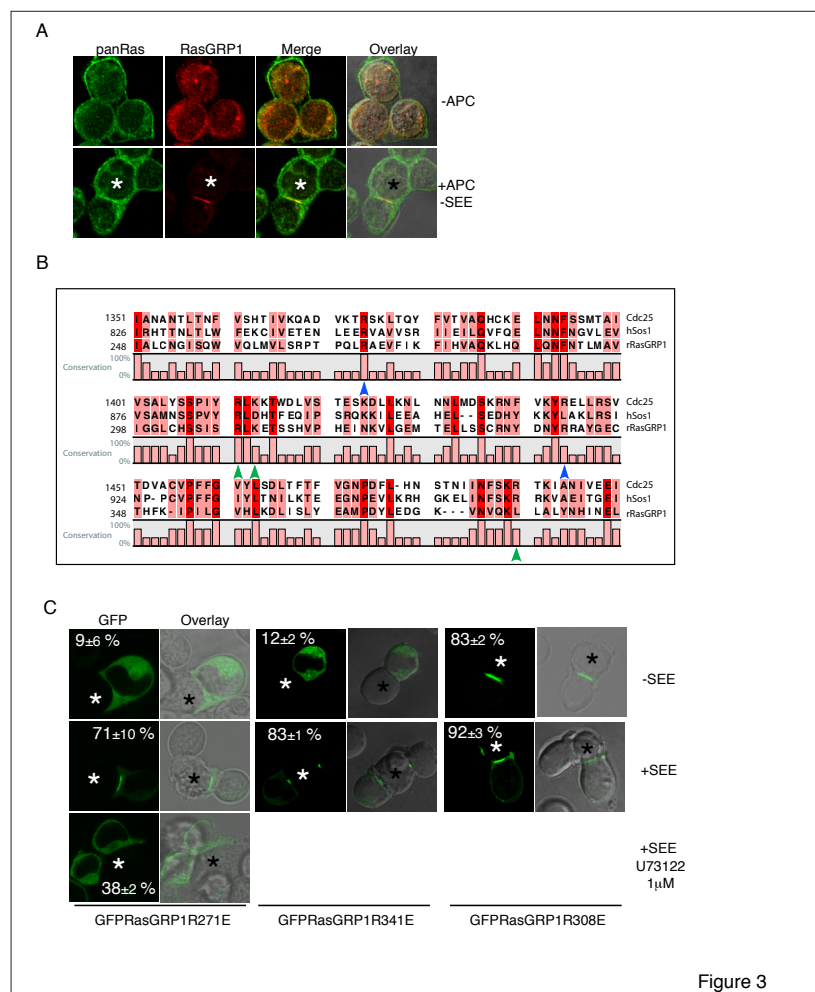
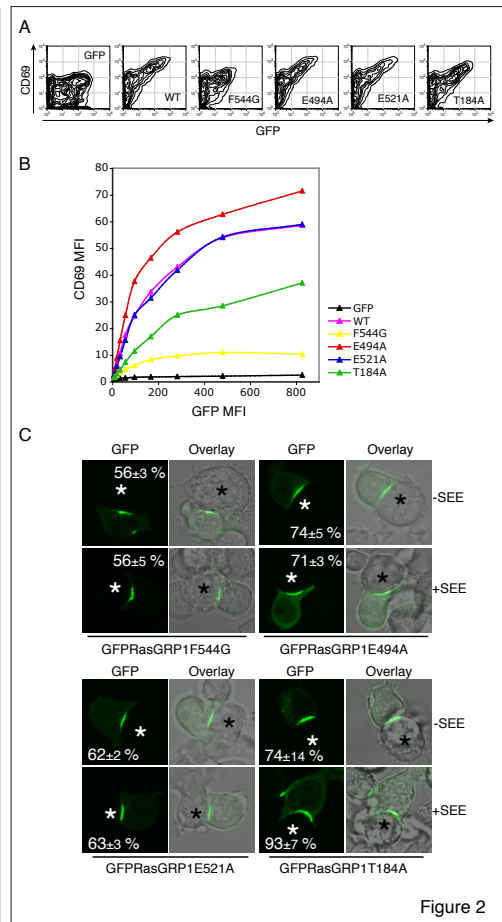
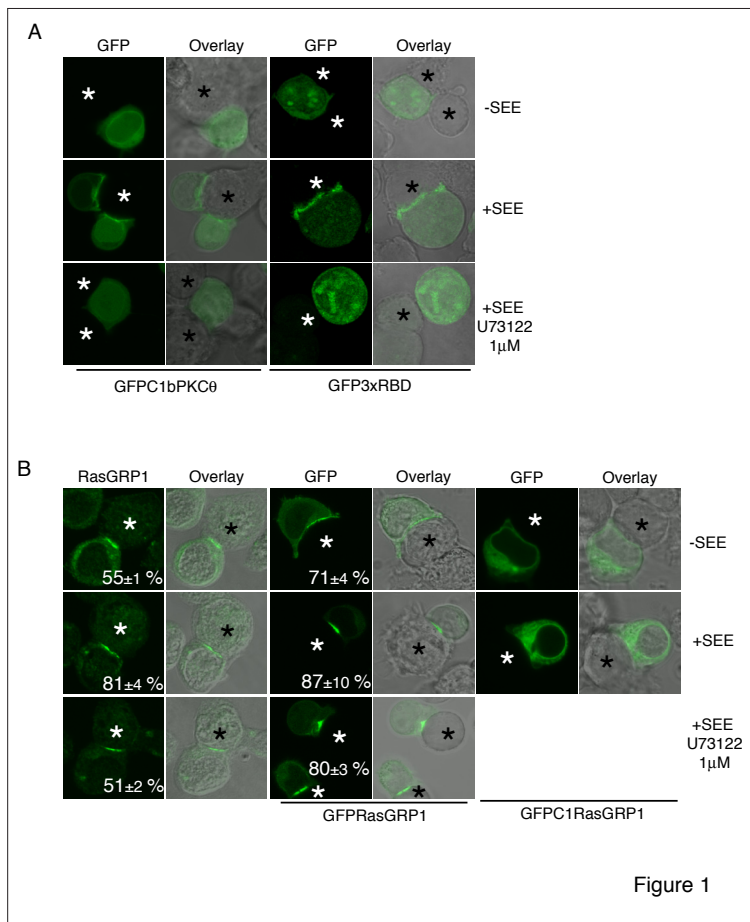
resuspended in HBSS and transferred to poly-DL-lysine-coated chamber slides, which were mounted on a confocal microscope 37°C plate and analyzed. Representative images are shown for each condition.

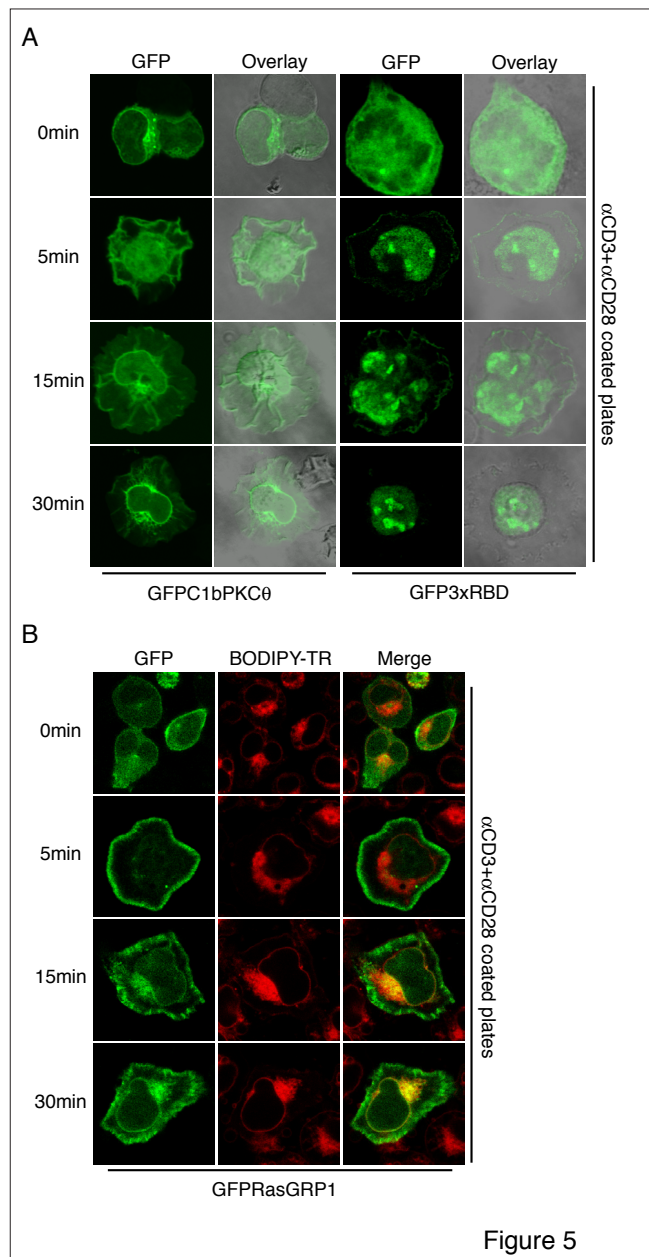
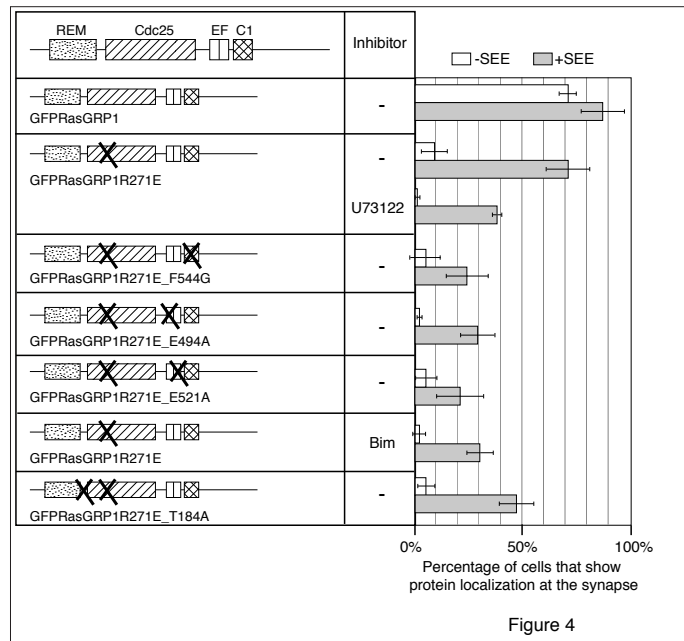
Supplemental data 2: *GFPRasGRP1 Ras-binding defective mutant lack plasma membrane localization*. Jurkat cells were transfected with GFPRasGRP1, GFPRasGRP1R271E, GFPRasGRP1R341E or GFPRasGRP1R308E and 24 h later were stained for cell surface CD69 and analyzed by flow cytometry. The obtained data was plotted to compare the level of CD69 expression in GFP positive cells, according to the construct transfected. Transfected cells were resuspended in HBSS and transferred to poly-DL-lysine-coated chamber slides, which were mounted on a confocal microscope 37°C plate and analyzed. Representative images are shown for each condition.

Supplemental data 3: *Localization of RasGRP1 mutants in response to pulsed and unpulsed APC*. (A, B) Jurkat cells were transfected with GFPRasGRP1R271E_F544G (A), GFPRasGRP1R271E_E494A or GFPRasGRP1R271E_E521A (B), cultured (24 h), then pelleted, resuspended in HBSS, and incubated (15 min) at a 1:1 proportion with SEE-pulsed or -unpulsed (+SEE or -SEE) APC (*). Conjugates were transferred to poly-DL-lysine-coated chamber slides, mounted on a confocal microscope 37°C plate and analyzed. Phase contrast images (overlay) show cell:cell contact. (C) Cells were transfected with GFPRasGRP1R271E, cultured (24 h), then pelleted and resuspended in Bim (5 µM) in HBSS (15 min). Cells were then incubated (15 min) as in (B) with APC. Bim concentration was maintained throughout the assay. (D) Cells were transfected with GFPRasGRP1R271E_T184A and processed as in A. Representative images are shown. The percentage of cells that show protein localization at the cell-cell contact zone is indicated for each condition.

Supplemental data 4: *Localization of endogenous RasGRP1 in response to anti-CD3+anti-CD28 coated plates*. Jurkat cells were pelleted, resuspended in HBSS and dropped onto anti-CD3+anti-CD28-pretreated coverslips. Cell were fixed at indicated times and processed to stain endogenous RasGRP1 (green, Cy2). Phase contrast images (overlay) show cell spreading and outline. Representative images are shown.

Supplemental table 1: *Translocation of RasGRP1 and GFPRasGRP1 mutants in the presence of SEE-pulsed and -unpulsed APC*. Percentage of cells showing construct translocation to the SEE-pulsed (+SEE) or -unpulsed (-SEE) APC:Jurkat cell contact zone for RasGRP1 or each GFPRasGRP1 mutant analyzed, alone (-) or in the presence of inhibitors U73122 (1 µM) or Bim (5 µM). For each condition, a minimum of 100 cells in contact with APC was counted in at least three independent experiments; ± show differences in the percentages for each experiment. RasGRP1 domains are depicted as boxes in a linear sequence; crosses mark the position of mutated residues. REM: Ras exchange motif, Cdc25: Cdc25 homology domain, EF: EF hands, C1: C1 domain.





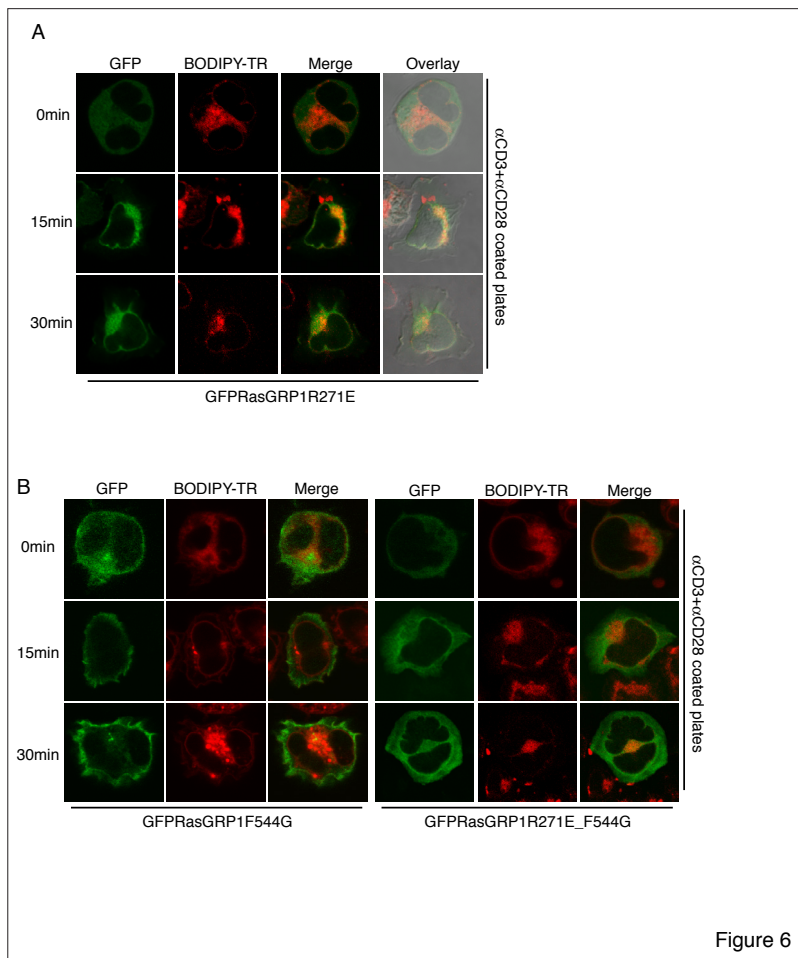


Figure 6

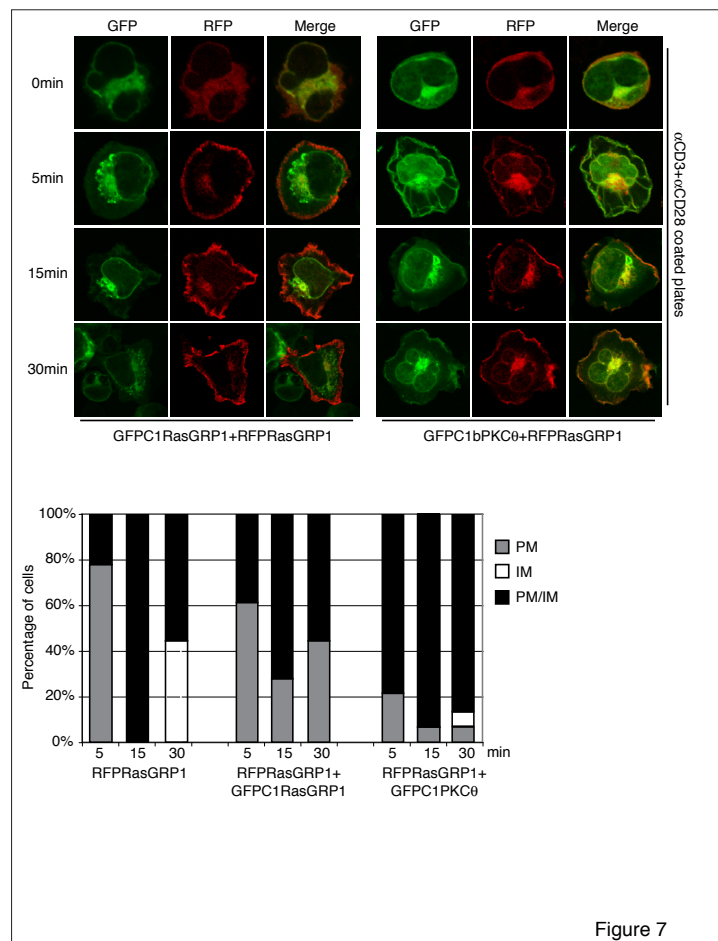
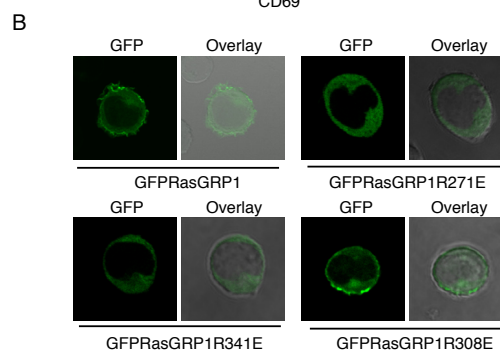
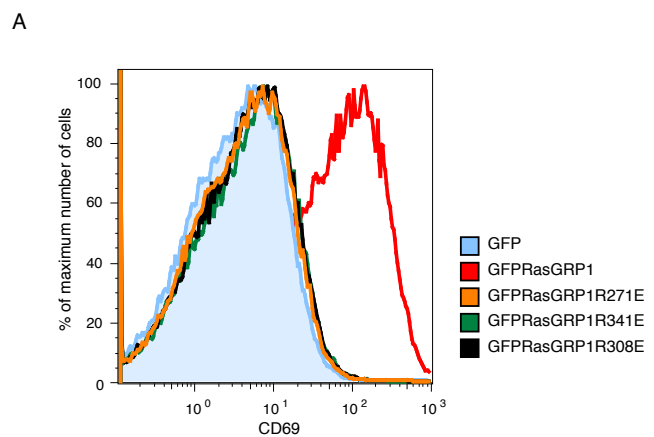
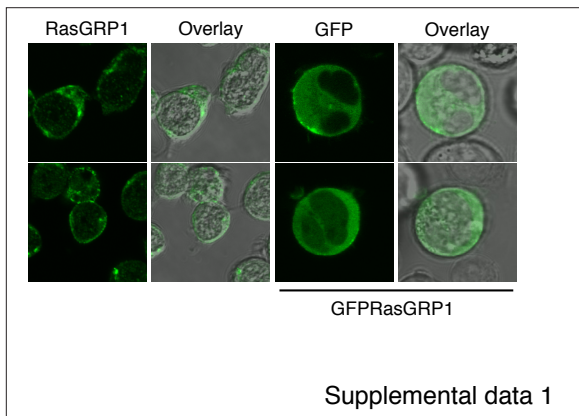
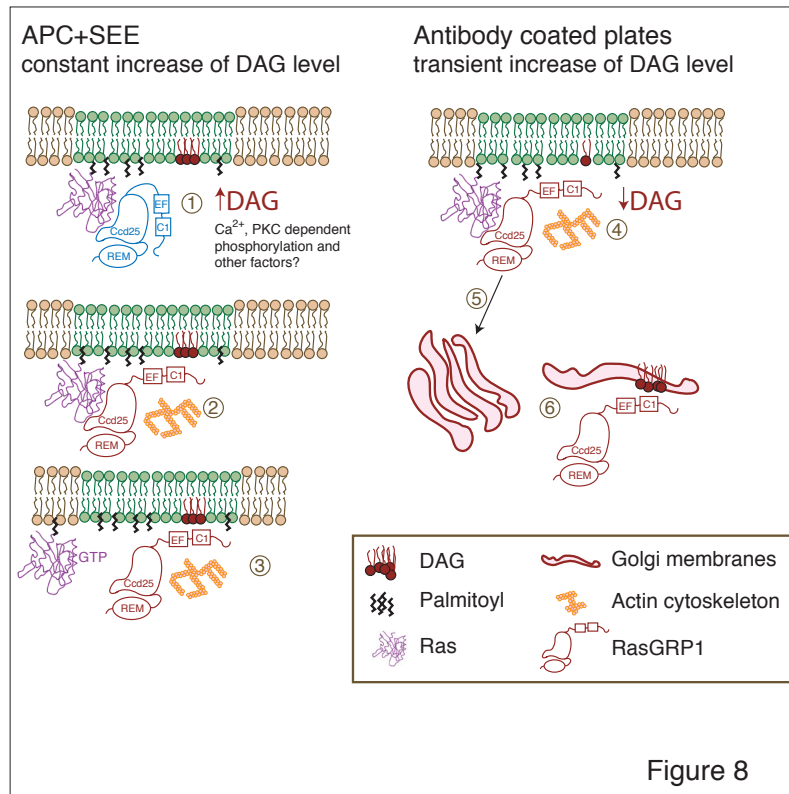
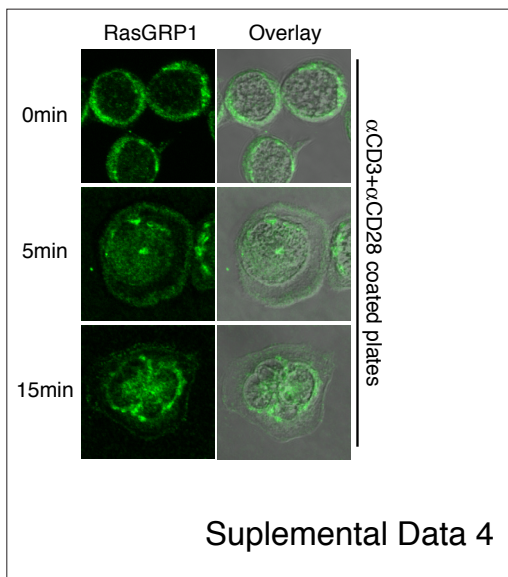
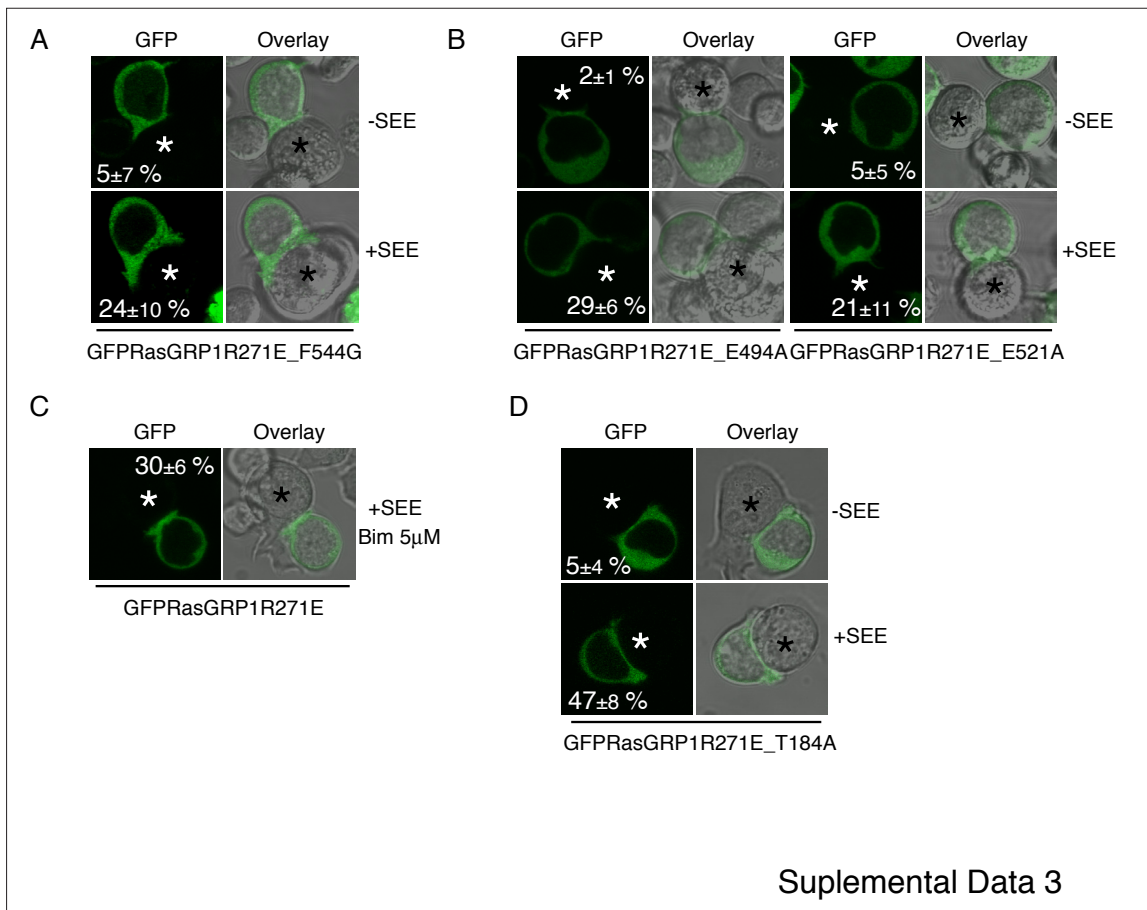


Figure 7



Supplemental data 2



	-SEE	+SEE
RasGRP1	55±1 %	81±4 % +U73: 51±2 %
GFP RasGRP1	71±4 %	87±10 % +U73: 80±3 %
GFP RasGRP1F544G	56±3 %	56±5 %
GFP RasGRP1E494A	74±5 %	71±3 %
GFP RasGRP1E521A	62±2 %	63±6 %
GFP RasGRP1T184A	74±14 %	93±7 %
GFP RasGRP1R308E	83±2 %	92±3 %
GFP RasGRP1R341E	12±2 %	83±1 %
GFP RasGRP1R271E	9±6 %	71±10 % +U73: 38±2 % +Bim: 30±6 %
GFP RasGRP1R271E_F544G	5±7 %	24±10 %
GFP RasGRP1R271E_E494A	2±1 %	29±6 %
GFP RasGRP1R271E_E521A	5±5 %	21±11 %
GFP RasGRP1R271E_T184A	5±4 %	47±8 %

Supplemental data 5