



Universidad de Valladolid

Facultad de Medicina

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Fisiología

TESIS DOCTORAL

**“Caracterización de nuevos sustratos de la fosfatasa
Lyp en linfocitos T”**

**Presentada por Virginia Ruiz Martín para optar al grado de
doctor por la Universidad de Valladolid**

Dirigida por:

Dr. Andrés Alonso García

Dra. Yolanda Bayón Prieto

*“El objeto del mundo es el desarrollo de la inteligencia,
y la primera condición para favorecer
este desarrollo es la libertad”*

Ernest Renan

Índice

Índice	5
Abreviaturas	11
Introducción	17
1. Señalización por el TCR.....	20
2. <i>Microclusters</i> de SLP76.....	23
2.1. Interacción SLP76-Fyb-SKAP55.....	25
2.2. Interacción SLP76-Vav1.....	26
3. Proteínas reguladoras del citoesqueleto en la señalización del TCR.....	27
3.1. <i>Hematopoietic lineage cell-specific protein 1 (HS1)</i>	27
4. Fosfatasa de tirosina (PTPs)	30
4.1. Clasificación.....	30
4.2. Mecanismo catalítico de las PTPs clásicas.....	32
5. Subfamilia de fosfatasa de tirosinas PEST.....	34
5.1. PTP-PEST.....	37
5.2. PTP-HSCF.....	38
5.3. Lyp.....	39
5.3.1. Posibles sustratos de Lyp.....	40
5.3.2. Asociación de Lyp con enfermedades autoinmunes.....	41
5.3.3. Regulación de la señalización del TCR por Lyp.....	43
5.3.4. Diferencias funcionales entre Lyp R620 y W620.....	44
Objetivos	49
Material y Métodos	53
1. Materiales.....	55
1.1. Soluciones y tampones.....	55
1.2. Anticuerpos.....	57
1.3. Plásmidos.....	59
2. Métodos experimentales con líneas celulares.....	61
2.1. Mantenimiento de líneas celulares.....	61
2.2. Métodos de transfección transitoria.....	62
2.2.1. Transfección con fosfato cálcico.....	62
2.2.2. Transfección por electroporación.....	62
2.2.3. Transfección por nucleofección.....	63
2.3. Obtención de líneas estables.....	63
2.4. Tratamiento con pervanadato.....	64
2.5. Activación de linfocitos T.....	64
3. Técnicas moleculares.....	64

Índice

3.1.ADN plasmídico.....	64
3.2.Valoración de la concentración de proteína.....	65
3.3.Inmunoprecipitación de proteínas.....	65
3.4. <i>Western Blot</i>	66
3.5.Purificación de Lyp.....	67
4.Ensayos enzimáticos.....	68
4.1.Ensayos de actividad fosfatasa.....	68
4.2.Ensayos de desfosforilación <i>in vitro</i>	68
4.3.Ensayos de luciferasa.....	69
5.Técnicas de Inmunocitoquímica.....	70
5.1.Tratamiento de cristales con Poly-L-Lisina.....	70
5.2.Fijación de células.....	70
5.3.Tinción de núcleos.....	71
5.4.Estimulación para la formación de <i>microclusters</i>	71
5.5.Inmunofluorescencia.....	71
6.Técnicas de análisis de imagen.....	72
6.1.Microscopía confocal.....	72
6.2.Análisis de colocalización.....	72
Resultados	75
1.Identificación de nuevos sustratos de la fosfatasa Lyp.....	77
2.Modulación de la fosforilación de los posibles sustratos de Lyp <i>in vivo</i>	81
3.Desfosforilación de los posibles sustratos de Lyp <i>in vitro</i>	82
3.1.Estudio de la interacción entre Lyp y HS1.....	88
4.Identificación de los sitios de desfosforilación de Lyp en sus potenciales sustratos.....	90
4.1.Identificación de los sitios de desfosforilación de Lyp en SKAP-HOM.....	92
4.2.Identificación de los sitios de desfosforilación de Lyp en SKAP55.....	92
4.3.Identificación de los sitios de desfosforilación de Lyp en Fyb.....	93
4.4.Identificación de los sitios de desfosforilación de Lyp en SLP76.....	94
4.5.Identificación de los sitios de desfosforilación de Lyp en HS1.....	95
5.Expresión y localización subcelular de Lyp.....	97
6.Colocalización de Lyp y sus posibles sustratos en HEK-293.....	98
7.Efecto de Lyp en la formación de <i>microclusters</i>	102
7.1.Cinética de formación de <i>microclusters</i> en células Jurkat.....	102
7.2.Formación de <i>microclusters</i> en la línea 49.4 (KO Lyp)	104
7.3.Formación de <i>microclusters</i> tras el restablecimiento de la expresión de Lyp (R y W) en la línea 49.4.....	106

7.4.Regulación de la formación de <i>microclusters</i> por la actividad catalítica de Lyp.....	110
7.5.Formación de <i>microclusters</i> en PBLs.....	111
8.Otros efectos de Lyp.....	114
8.1.Efecto de Lyp en la fosforilación de otras proteínas importantes en la señalización por el TCR.....	114
8.2.Efecto de Lyp en la activación del promotor de IL-2.....	115
Discusión	119
1.Lyp desfosforila proteínas adaptadoras involucradas en la señalización del TCR.....	121
2.Diferencias entre Lyp R y W en la desfosforilación de sus sustratos.....	126
3.Lyp se localiza en los <i>microclusters</i> de SLP76 y regula su formación.....	128
4.Interacción de Lyp con HS1.....	129
5.Efecto de Lyp en la señalización del TCR posterior a la formación de <i>microclusters</i>	130
Conclusiones	133
Bibliografía	137

Abreviaturas

Abreviatura	Definición
ABL	<i>Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario o copia
AP1	<i>Activator protein-1</i>
APCs	<i>Antigen presenting cells</i>
AR	Artritis reumatoide
ARN	Ácido ribonucleico
Arp2/3	<i>Actin-related proteins 2/3</i>
ASC	<i>Apoptosis-associated speck-like protein</i>
BCA	Ácido bicinconínico
BCR	<i>B cell receptor</i>
BSA	Álbumina de suero bovino
Cas	<i>Cellular apoptosis susceptibility</i>
CBL	<i>Casitas B-lineage lymphoma</i>
CC	<i>Coiled-coil domain</i>
CRKL	<i>V-crk avian sarcoma virus CT10 oncogene homolog-like</i>
Csk	<i>C-src tyrosine kinase</i>
CTH	<i>C-terminal homology motif</i>
DAG	<i>Diacylglycerol</i>
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DOK1	<i>Docking protein 1</i>
DOK2	<i>Docking protein 2</i>
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ácido etildiaminotetraacético
Erk	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
FAK	<i>Focal adhesion kinase</i>
FBSi	Suero fetal bovino inactivado
Fyb	<i>Fyn binding protein</i>
Fyn	<i>Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Fyn</i>
Gads	<i>Grb2-Related Adaptor Downstream of Shc</i>
GEF	<i>Guanine Exchange Factor</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
Grb2	<i>Growth factor receptor bound protein 2</i>
GST	<i>Glutathion S-transferase</i>
HA	<i>Hemagglutinin</i>
Hck	<i>Tyrosine-protein kinase HCK</i>
HEBS	<i>HEPES-buffered saline solution</i>

Abreviaturas

HEK-293	<i>Human embryonic kidney 293 cells</i>
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineetanesulfónico
HPK1	<i>Hematopoietic progenitor kinase 1</i>
HS1	<i>Hematopoietic lineage cell-specific protein 1</i>
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
IF	Inmunofluorescencia
IgM	Inmunoglobulina M
IL2	<i>Interleukin 2</i>
IP3	<i>Inositol triphosphate</i>
ITAM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
Itk	<i>Interleukin-2-inducible T-cell kinase</i>
Jak1	<i>Janus kinase 1</i>
JK	<i>Jurkat cells</i>
KO	<i>Knock-Out</i>
LAT	<i>Linker for activation of T cells</i>
Lck	<i>Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase</i>
LFA-1	<i>Lymphocyte function-associated antigen 1</i>
LP	Dominio fosfatasa de Lyp
Lyp	<i>Lymphoid tyrosine phosphatase</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MTS	<i>5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulfophenyl) tetrazolium, inner salt</i>
Nck	<i>Non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 1</i>
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T-cells</i>
NFκB	<i>Nuclear factor immunoglobulin kappa chain enhancer B cells transcription</i>
NK	<i>Natural killer</i>
NRPTPs	<i>Non-receptor protein-tyrosine phosphatases</i>
NTA	Dominio ácido N-terminal
O/N	<i>Overnight</i>
PBS	Tampón fosfato salino
PBLs	<i>Peripheral blood lymphocytes</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEP	<i>PEST domain-enriched tyrosine phosphatase</i>
PHA	<i>Phytohemagglutinin</i>
PKA	<i>Protein Kinase A</i>
PKC	<i>Protein Kinase C</i>
PLCγ1	<i>Phospholipase C, gamma 1</i>
PMA	<i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i>

PMSF	<i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
pNPP	<i>para-Nitrophenylphosphate</i>
PRR	<i>Proline Rich Region</i>
PSTPIP1	<i>Proline, serine, threonine, phosphatase interacting protein1</i>
PTKs	<i>Protein tyrosine kinases</i>
PTPs	<i>Protein tyrosine phosphatases</i>
PTP-HSCF	<i>Protein tyrosine phosphatase-hematopoietic stem cell fraction</i>
PTP-PEST	<i>Protein tyrosine phosphatase containing PEST motif</i>
PV	Pervanadato
PY	Fosfotirosina
Pyk2	<i>Protein tyrosine kinase 2 beta</i>
Rap-1	<i>Ras-related protein 1</i>
RHO-GTPasas	<i>Ras homologous-guanosine triphosphatase</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
RTPPs	<i>Receptor Protein-Tyrosine Phosphatases</i>
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico
SFKs	<i>Src Family Kinases</i>
SH2	<i>Src Homology2</i>
SH3	<i>Src Homology3</i>
siRNA/ARNsi	<i>Small interfering RNA</i>
SKAP55	<i>Src kinase-associated protein of 55kDa</i>
SKAP-HOM	<i>Src kinase-associated protein of 55kDa-Homologous</i>
SLP76	<i>SH2 domain containing leukocyte protein of 76kDa</i>
Syk	<i>Spleen tyrosine kinase</i>
T1D	Diabetes tipo 1
TBS	Solución salina tamponada con TRIS
TCR	<i>T-Cell receptor</i>
THP-1	<i>Human acute monocytic leukemia cell line</i>
TRIS	Tri (hidroximetil) aminometano
TTBS	<i>Tween-TBS</i>
Tyk2	<i>Tyrosine kinase 2</i>
Vav1	<i>Vav 1 guanine nucleotide exchange factor</i>
WASP	<i>Wiskott-Aldrich syndrome protein</i>
WAVE	<i>WASP family verprolin homologous protein2</i>
WB	<i>Western Blot</i>
VCP	<i>Valosin containing protein</i>
Zap70	<i>70 kDa Zeta associated protein</i>

Abreviaturas

Aminoácido	Símbolo de una letra	Abreviatura común
Alanina	A	Ala
Arginina	R	Arg
Asparagina	N	Asn
Ácido aspártico	D	Asp
Cisteína	C	Cys
Fenilalanina	F	Phe
Glicina	G	Gly
Glutamina	Q	Gln
Ácido glutámico	E	Glu
Histidina	H	His
Isoleucina	I	Ile
Leucina	L	Leu
Lisina	K	Lys
Metionina	M	Met
Prolina	P	Pro
Serina	S	Ser
Tirosina	Y	Tyr
Treonina	T	Thr
Triptófano	W	Trp
Valina	V	Val

Introducción

Bajo el término de sistema inmunitario se engloban todos los procesos biológicos que un organismo posee para protegerse de agentes extraños. Así, la respuesta inmune puede clasificarse como innata o adaptativa. La inmunidad innata se caracteriza por ser rápida e inespecífica, ya que es capaz de identificar y eliminar distintos patógenos (por ejemplo bacterias, virus u hongos) en el foco de infección, gracias a los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) que identifican patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y/o asociados a daño (DAMPs). Una vez activados, estos receptores inician la producción de citoquinas que servirán de reclamo a las células que se encargan de la inmunidad adaptativa, es decir, linfocitos B y T que llevarán a cabo una respuesta más lenta pero específica mediante el reconocimiento de antígenos; así el organismo quedará protegido frente a futuros ataques por esos mismos agentes infecciosos. El reconocimiento de estos antígenos específicos por parte de los linfocitos, se produce gracias a la existencia de receptores de membrana denominados BCR (*B Cell Receptor*) y TCR (*T Cell Receptor*).

Los linfocitos T son los principales protagonistas en los procesos de inmunidad adaptativa, y alteraciones en los mecanismos de transducción de señales de estas células pueden provocar enfermedades en el sistema inmune. En los últimos años se han identificado y caracterizado un gran número de proteínas implicadas en las vías de señalización iniciadas por este receptor; y gracias a estos avances, ahora somos capaces de comprender cómo el linfocito T decodifica señales en la membrana para producir distintas respuestas, como proliferación, apoptosis, producción de citoquinas o tolerancia a antígenos.

El TCR es esencial en este proceso, pues es el responsable del reconocimiento de antígenos unidos al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC; *Major Histocompatibility Complex*) de células presentadoras de antígenos (APCs, *Antigen Presenting Cells*).

1. Señalización por el TCR.

El receptor de los linfocitos T o TCR, es una proteína heterodimérica anclada a membrana, que normalmente se compone de dos cadenas altamente variables denominadas α y β , cada una de las cuales consta de dos dominios extracelulares: la región variable (V) que se unirá al péptido antigénico, y la región constante (C) que va seguida de una región transmembrana y una corta cola citoplasmática. El TCR además se asocia con tres dímeros moduladores de la señalización (CD3 δ/ϵ , CD3 γ/ϵ y CD247 ζ/ζ o ζ/η), formando todos ellos un complejo octomérico (Figura 1). Estas moléculas son vitales en la propagación de la señal desencadenada por el TCR, al interior celular.

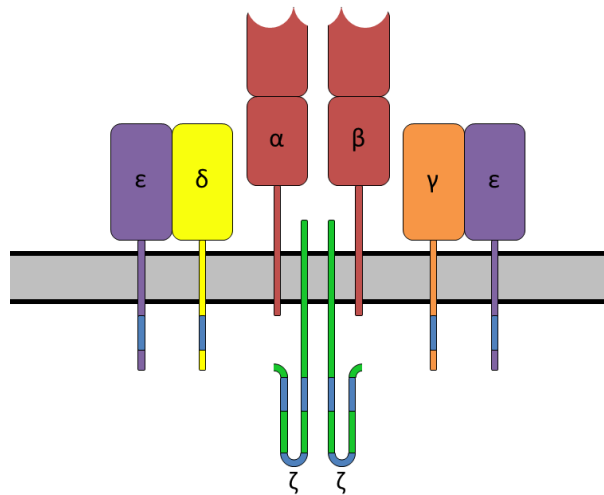


Figura 1. Complejo señalizador del TCR. En rojo las cadenas α y β , sus regiones variables (superior) reconocen el péptido antigénico, mientras que las regiones constantes son importantes para que se inicie la señalización. El complejo octomérico se completa con tres dímeros: $\delta\epsilon$ (morado-amarillo), $\gamma\epsilon$ (naranja-morado) y $\zeta\zeta$ (verde); estas moléculas presentan motivos ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*) en sus regiones intracelulares (azul).

En cambio, para que se produzca la correcta activación de los linfocitos T por antígenos, no basta con que los péptidos antigénicos interaccionen con el TCR; sino que, además, lo deben hacer en presencia de una segunda señal proporcionada por la unión del receptor CD28 del linfocito T con la molécula B7 (CD80/CD86) de la célula presentadora de antígeno. La ausencia de esta segunda señal conduce a la célula T a un estado de anergia, en el que no responde a los antígenos y que el sistema inmune usa para evitar respuestas inadecuadas frente a antígenos propios. Sin embargo, la activación de los linfocitos T a través de los receptores TCR y CD28 en la respuesta

antigénica, conduce a la proliferación de estas células iniciando su expansión clonal y con ello la respuesta inmune adaptativa.

Esta unión entre los receptores TCR y CD28 y sus ligandos dará lugar a la formación de la sinapsis inmunológica, término con el que se designa la compleja estructura tridimensional que se origina en la región de contacto del linfocito T y la célula presentadora de antígeno; en la cual existe un gran dinamismo y una intensa actividad de señalización bioquímica. Así, en esta región de contacto entre ambas células será dónde se inicie la cascada de señalización intracelular que conduce a la activación del linfocito T, en la que la fosforilación de proteínas en tirosinas es crucial.

De este modo, tras la formación de la sinapsis inmunológica, se produce la activación de la kinasa de tirosinas de la familia Src, Lck (*Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*) que fosforila los ITAM de las subunidades γ , δ y ϵ del complejo CD3 y de la cadena ζ asociada a este complejo (Figura 1, en azul). Lck se encuentra asociada con los receptores CD4 y CD8 en los linfocitos T, los cuales interaccionan con el MHC de la célula presentadora de antígenos. En consecuencia, la interacción del péptido presentado por el complejo MHC con el TCR aumenta la concentración de esta kinasa junto a sus sustratos, los motivos ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*). La fosforilación de estos motivos permite reclutar la kinasa Zap70 (70 kDa *Zeta Associated Protein*) a la membrana a través sus dominios SH2 (*Src Homology2*) (Samelson 2002). Zap70, una vez en la membrana, es fosforilada y activada por Lck (Palacios y Weiss 2004), y amplifica la señal fosforilando proteínas adaptadoras, principalmente LAT (*Linker for Activation of T cells*) (Zhang *et al.* 1998) y SLP76 (*SH2 domain containing Leukocyte Protein of 76kDa*) (Bubeck Wardenburg *et al.* 1996). Estas proteínas adaptadoras, reclutan otras proteínas formando complejos multiproteicos denominados “*microclusters de SLP-76*”, que serán los encargados de que la señal iniciada en la membrana plasmática se transmita al interior de la célula mediante vías de señalización en las que la fosforilación desempeña un papel esencial, como son las rutas de MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*), RHO-GTPasas (*Ras Homologous-Guanosine TriPhosphatase*) e IP3/DAG (*Inositol triphosphate/ Diacylglycerol*) (Bilal y Houtman, 2015) (Figura 2). Estas vías de señalización afectan a distintos procesos celulares, tales como la migración celular o la expresión de genes,

Introducción

que en definitiva conducen a la activación de los linfocitos T en el contexto de la respuesta inmune.

Se ha observado que tanto la localización subcelular de los *microclusters* de SLP76, como las proteínas que los componen, varían a medida que avanza la señalización (Ophir *et al.* 2013). En este sentido, varios estudios recientes revelan que estos *microclusters* son estructuras estrechamente ligadas al citoesqueleto (Campi *et al.* 2005), y que la polimerización de la actina inducida por la activación del TCR les proporciona parte de su dinamismo. Por otra parte, la fosforilación tras la activación del TCR parece ser un factor esencial en el ensamblaje de estos complejos (Coussens *et al.* 2013), aunque un estudio revela que la kinasa HPK1 (*Hematopoietic Progenitor Kinase 1*) se recluta en estas microestructuras para facilitar el desensamblaje de sus componentes, hecho que conduciría al apagado de la señal (Lasserre *et al.* 2011). De igual manera y en contraposición a la función activadora que en general tienen las quinasas de tirosina, las fosfatasas de tirosina contribuirían a la inhibición de la señalización del TCR mediante la desfosforilación de proteínas adaptadoras y efectoras implicadas en este proceso.

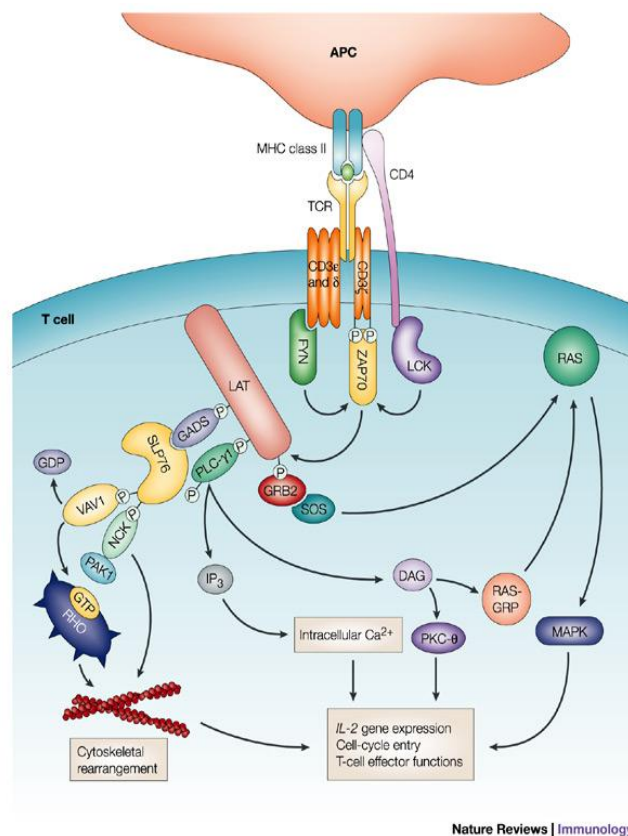


Figura 2. Inicio de la señalización por el TCR. Tras el reconocimiento del péptido antigénico se desencadena una cascada de señalización intracelular en la que la fosforilación en tirosinas es indispensable para que el linfocito T lleve a cabo todas sus funciones efectoras. (Abraham *et al.* 2004)

2. Microclusters de SLP76.

SLP76 es un adaptador presente en numerosas células del linaje hematopoyético como linfocitos T, plaquetas, neutrófilos, mastocitos, macrófagos y células NK (*Natural killer*). Existen dos proteínas homólogas: SLP65 o BLNK (*B cell linker protein*), que se expresa en linfocitos B y monocitos; y CLNK (*Cytokine dependent hematopoietic cell linker*), también denominado MIST (*Mast cell immunoreceptor signal transducer*), que se expresa en mastocitos, linfocitos T activados y NK.

SLP76 se identificó como un sustrato de Zap70 tras la estimulación del TCR mediante ensayos de *pull-down* (Jackman *et al.* 1995). Desde entonces, se ha visto que es crítico en el desarrollo de células T y la propagación de señales *downstream* tanto del TCR como de otros receptores presentes en las células hematopoyéticas.

Los primeros estudios sobre la función de esta proteína en la señalización del TCR se realizaron sobreexpresándola en células Jurkat, demostrándose que el aumento en la expresión de esta proteína producía un aumento en la señalización del TCR. Posteriormente, se desarrollaron, por un lado, la línea celular derivada de Jurkat deficiente en SLP-76, denominada J14 (Yablonski *et al.* 1998); y por otro lado, los ratones KO (*Knock-Out*) de SLP76 (Clements *et al.* 1998; Pivniouk *et al.* 1998). Los estudios de pérdida de función basados en estos modelos revelaron el papel esencial de SLP76 en la biología de la célula T. Así en la línea J14 tras la estimulación por el TCR, pese a la activación de Lck y Zap70, otros componentes esenciales como PLC γ 1 (*Phospholipase C, gamma 1*) no se activan (Yablonski *et al.* 1998); lo que lleva a una disminución del flujo de Ca²⁺, disminución de la fosforilación de Erk (*Extracellular signal-regulated kinases*) y menor activación de numerosos factores de transcripción como NFAT (*Nuclear factor of activated T-cells*) y AP-1 (*Activator Protein-1*) (Yablonski *et al.* 1998; Herndon *et al.* 2001). En el caso de los ratones KO, la eliminación de SLP76 impide la generación de LT maduros quedando su desarrollo bloqueado en un estadio doble negativo (Clements *et al.* 1998; Pivniouk *et al.* 1998). Asimismo, los linfocitos T

Introducción

de estos ratones presentaban muchos de los defectos bioquímicos encontrados en la línea J14 (Maltzman *et al.* 2005).

Estructuralmente, esta proteína se compone de tres dominios funcionales: el extremo amino-terminal ácido, la región central rica en prolinas (PRR), y el dominio SH2 en el extremo carboxilo (Figura 3). En el amino terminal SLP76 posee tres tirosinas, en las posiciones 113, 128 y 145, que se fosforilan tras la estimulación del TCR. Al mutarlas por fenilalaninas (mutante 3YF), SLP76 pierde su capacidad para favorecer la activación de PLC γ 1, el flujo de Ca²⁺ y la fosforilación de Erk (Musci *et al.* 1997; Yablonski *et al.* 1998; Herndon *et al.* 2001). Esta pérdida de función, se piensa que se debe al menos en parte a la incapacidad de SLP76 3YF para asociarse a Vav1 (*Vav 1 guanine nucleotide exchange factor*), Nck (*Non-Catalytic region of tyrosine Kinase adaptor protein 1*) e Itk (*Interleukin-2-inducible T-cell Kinase*); proteínas implicadas en la reorganización de la actina y en la activación de PLC γ 1 (Wu *et al.* 1996; Raab *et al.* 1997; Bubeck Wardenburg *et al.* 1998; Bunnell *et al.* 2000).

La región PRR central contiene un motivo RxxK por el cual se une constitutivamente al dominio SH3 del extremo carboxilo de Gads (*Grb2-Related Adaptor Downstream of Shc*) (Asada *et al.* 1999; Liu *et al.* 1999). A su vez, Gads se asocia por su dominio SH2 con LAT fosforilada (Asada *et al.* 1999; Liu *et al.* 1999), la cual se localiza constitutivamente en regiones de la membrana enriquecidas en glicolípidos (Bunnell *et al.* 2006). Asimismo, la disrupción de la interacción SLP76/Gads produce una disminución en el flujo de Ca²⁺, en la generación de IP3 y en la activación de Erk y NFAT (Musci *et al.* 1997; Yablonski *et al.* 2001).

El dominio SH2 por su parte, permite la interacción con fosfotirosinas de Fyb (*Fyn binding protein*), proteína también conocida con los nombres de ADAP (*Adhesion and Degranulation promoting Adapter Protein*) y SLAP130 (*SLP76 Associated Phosphoprotein of 130 kDa*); y también con la kinasa de serinas y treoninas HPK1 (Musci *et al.* 1997; Sauer *et al.* 2001). Los estudios funcionales han demostrado que la ausencia de este dominio produce una disminución modesta de la activación de PLC γ 1 y Erk (Yablonski *et al.* 2001). Otros estudios muestran la importancia de este dominio para la activación de HPK1 aunque las consecuencias a nivel celular de esta función no están claras (Liou *et al.* 2000; Sauer *et al.* 2001). Por otra parte, el fenotipo observado en ratones KO a los que se les reconstituye la expresión de SLP76 con el SH2

delecionado (Myung *et al.* 2001; Kumar *et al.* 2002), es muy similar al de ratones KO de Fyb (Griffiths *et al.* 2001; Peterson *et al.* 2001); lo cual sugiere que la importancia de este dominio reside en que permite la colaboración de SLP76 con Fyb en la activación de integrinas.

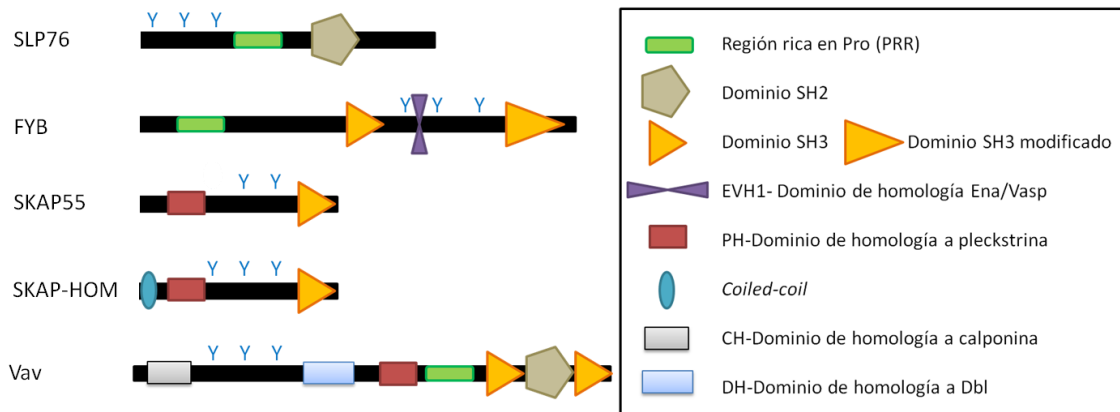


Figura 3. Estructura primaria de SLP76, Fyb, SKAP55, SKAP-HOM y Vav1. En la imagen se muestran los dominios estructurales presentes en cada una de estas proteínas, así como las Y implicadas en las interacciones que establecen con otras proteínas.

2.1. Interacción SLP76-Fyb-SKAP55.

Tras la activación del TCR, se produce la unión multipuntual de SLP76 mediante su dominio SH2 con tres fosfotirosinas presentes en la región central de Fyb (Tyr595, Tyr651 y Tyr771). Dicha unión multipuntual es esencial para la oligomerización de SLP76 y la formación de los *microclusters* (Cousens *et al.* 2013). Además esta interacción regula la señalización de integrinas (Rudd, 1999). La disrupción de esta interacción bloquea la proliferación de células T y la migración sobre una superficie recubierta con ligandos de ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule 1*) (Baker *et al.* 2009; Wang *et al.* 2009). Por otra parte, se ha observado que esta vía de señalización es independiente del complejo LAT-Gads (Baker *et al.* 2009).

Las células T deficientes en Fyb muestran defectos en la adhesión celular mediada por integrinas $\beta 1$ y $\beta 2$, en la agrupación de LFA-1 (*Lymphocyte function-associated antigen 1*) y en la formación de conjugados de linfocitos T-APCs. Este defecto en la adhesión se ve acompañado de una reducción en la proliferación de células T y en la producción de IL-2 (*Interleukin 2*) (Wang *et al.* 2003; Griffiths *et al.* 2001; Peterson *et al.* 2001).

Introducción

Fyb interacciona directamente con SKAP55 (*Src kinase-associated protein of 55kDa*). Esta interacción está mediada inicialmente por el dominio SH3 de SKAP55 y la región rica en prolinas de Fyb; y además, puede tener lugar una segunda interacción por el dominio SH3 de Fyb y el motivo RKXXYXXY de SKAP55 (Da Silva *et al.* 1997; Kang *et al.* 2000; Liu *et al.* 1998; Duke-Cohan *et al.* 2006). SKAP55 se expresa únicamente en células T, donde actúa como un regulador positivo de la activación de integrinas, la adhesión celular y la formación de conjugados de células T-APCs (Wang *et al.* 2003; Jo *et al.* 2005; Wang *et al.* 2007). Existe una proteína homóloga, SKAP-HOM, que se caracteriza por ser ubicua y formar homodímeros, gracias a una región de homodimerización presente en su extremo amino terminal que no comparte con SKAP55 (Figura 3). Esta proteína homóloga, pese a interactuar con Fyb, no reemplaza a SKAP55 en su papel regulatorio de la activación de integrinas (Jo *et al.* 2005; Marie-Cardine *et al.* 1998).

La disrupción de la interacción de Fyb-SKAP55, inducida por la delección de dominio SH3 de SKAP55 o la delección del PRR de Fyb, produce defectos en la formación de conjugados de linfocitos T-APCs, en la adhesión mediada por LFA-1 y podría impedir la translocación de Rap-1, proteína G clave en la activación de integrinas, a la membrana (Wang *et al.* 2003; Kliche *et al.* 2006).

2.2. Interacción SLP76-Vav1.

El papel central de SLP76 como proteína adaptadora se debe también en parte a su asociación con el factor intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF), Vav1; interacción que se produce tras la fosforilación de SLP76 por Zap70 (Wu *et al.* 1996; Raab *et al.* 1997; Gross *et al.* 1999). La asociación de estas dos proteínas media, al menos en parte, la activación de las integrinas $\beta 1$ y $\beta 2$ en células T, neutrófilos y plaquetas.

Las células deficientes en Vav1 presentan defectos en la adhesión, proliferación y producción de especies reactivas de oxígeno en respuesta a la estimulación con ligandos de integrinas en la señalización “*outside-in*” (Gakidis *et al.* 2004; Graham *et al.* 2007; Krawczyk *et al.* 2002; Pearce *et al.* 2007). Además, Vav1 media la agrupación de integrinas inducida por el TCR y la formación de conjugados de células T-APCs (Krawczyk *et al.* 2002). Por otro lado, dado que se trata de un GEF, Vav1 activa la

GTPasa Rac1, la cual regula la adhesión mediante el control directo del balance entre la protusión mediada por actina y la contracción mediada por miosina II. Para llevar a cabo esta función Vav1 interacciona con el complejo WASP/WAVE (*Wiskott-Aldrich syndrome protein/ WASP family verprolin homologous protein2*), lo cual activa el complejo Arp2/3 (*Actin-Related Proteins 2/3*) (Nobes *et al.* 1995; Kovacs and Yap 2002) implicado en el control de la disposición de actina en el citoesqueleto celular.

3. Proteínas reguladoras del citoesqueleto en la señalización del TCR.

La activación del TCR inicia una robusta respuesta de polimerización de actina y, además, el dinamismo de los filamentos de actina es necesario para que se produzca una respuesta efectiva en el linfocito T (Valitutti *et al.* 1995; Delon *et al.* 1998; Tskvitaria-Fuller *et al.* 2003). Esto se debe a que la actina tiene un importante papel en la formación y migración de los complejos señalizadores (Yokosuka *et al.* 2005; Campi *et al.* 2005). La polimerización de los filamentos de actina (F-actina) se regula a través de factores promotores de la nucleación de actina como: WASP, WAVE y HS1 (*Hematopoietic lineage cell-specific protein 1*); los cuales actúan de forma cooperativa con el complejo Arp 2/3 (Nolz *et al.* 2006; Gomez *et al.* 2007).

3.1. Hematopoietic lineage cell-specific protein 1 (HS1)

HS1 se descubrió en 1989 en líneas celulares linfoides, mieloides, monoblastoides y eritroblastoides. Sin embargo, esta proteína es indetectable en tejidos no hematopoyéticos; por este motivo se la denominó proteína específica de linajes hematopoyéticos (HS1) (Kitamura *et al.* 1989). Posteriormente, se identificó el gen que la codificaba en el cromosoma humano 3q13 y se determinó que esta proteína era sustrato de la kinasa Lyn (Egashira *et al.* 1996); por este motivo HS1 también se conoce con el nombre de HCLS1 (*Haematopoietic cell-specific Lyn substrate 1*).

HS1 es una proteína paróloga de la proteína ubicua cortactina. Ambas proteínas promueven la polimerización de actina mediante la activación del complejo Arp2/3; en este sentido HS1 participa en múltiples procesos del remodelado de la actina del citoesqueleto, incluyendo la formación de la sinapsis inmunológica, la adhesión y

Introducción

migración celular (Rottner *et al.* 2011). La comunidad científica ha asumido que HS1 y cortactina presentan patrones de expresión mutuamente excluyentes y que ambas realizan las mismas funciones en los distintos tipos celulares donde se expresan (Fischer *et al.* 2005); sin embargo estos hechos no se han estudiado en profundidad.

Estructuralmente (Figura 4), HS1 se compone de 486 aminoácidos, lo que se correspondería con un peso molecular de unos 54 kDa, en cambio se ha observado que migra con una movilidad electroforética de 75 kDa en SDS-PAGE; lo cual sugiere que está sometida a modificaciones postraduccionales que podrían regular su actividad. De hecho, varios estudios demuestran que las Src kinasas fosforilan en tirosinas a HS1, y se ha propuesto un modelo de la regulación de su actividad basado en el control por fosforilación secuencial (Ruzzene *et al.* 1996). Así, Syk fosforilaría HS1 en su Y397, creando un sitio de unión para los dominios SH2 presentes en otras SFKs (*Src Family Kinases*) que posteriormente fosforilarían otras tirosinas. Entre las kinasas que podrían unirse a la pY397 de HS1 se encuentran Zap70 y Abl (*Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1*) (Huang *et al.* 2008).

HS1 posee un dominio ácido N-terminal (NTA) que se une directamente y activa al complejo Arp2/3; en este sentido HS1 se comporta como un factor promotor y estabilizador de la polimerización de actina (Michelot *et al.* 2013). A este dominio NTA le siguen repeticiones de aminoácidos en tándem, y a continuación un dominio *coiled-coil* (CC). Las repeticiones en tándem y el CC se unen sinérgicamente a F-actina (Hao *et al.* 2005). En el extremo C-terminal presenta además un dominio SH3 que tiene gran homología con el existente en cortactina.

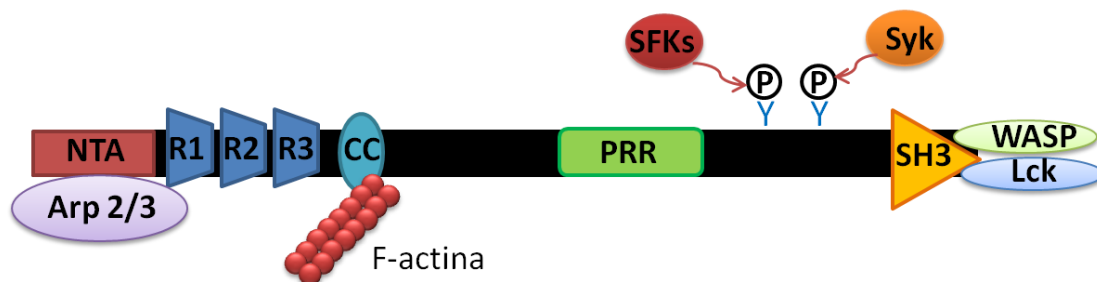


Figura 4. Estructura primaria de HS1. En la figura se muestran los principales dominios y sitios de fosforilación en Tyr, así como las regiones de interacción con otras proteínas.

Se han realizado estudios de pérdida de función en ratones KO para HS1, los cuales han mostrado un desarrollo normal de la mayoría de subpoblaciones de células linfoides, aunque la selección negativa en el timo es defectuosa y la producción de anticuerpos más baja. Los resultados de este estudio muestran que HS1 tiene un importante papel en la señalización mediada por receptores antigénicos (Taniuchi *et al.* 1995). En células T murinas se ha observado que HS1 se fosforila tras la estimulación del TCR (Takemoto *et al.* 1995; Takemoto 1996), mientras que en Jurkat es posible observar dicha fosforilación por estimulación con anti-CD3, pero no en respuesta a la activación de CD28 o CD2 (Hutchcroft *et al.* 1998). Además, se han realizado estudios para valorar en profundidad el papel de HS1 en la formación de la sinapsis inmunológica (Gomez *et al.* 2006) que muestran como las células carentes de HS1 son incapaces de ensamblar la F-actina de forma organizada y estable. Asimismo se ha observado que también se requiere HS1 para la movilización de Ca^{2+} y la transcripción génica de IL-2. En ausencia de HS1, Vav1 se recluta en la sinapsis inmunológica, pero esta proteína no se retiene allí; lo que sugiere que HS1 podría estabilizar la sinapsis inmunológica promoviendo la retención de Vav1 en esa región.

Ensayos de *pull-down in vitro* indican que HS1 se une a los dominios SH2 de Lck, PLC γ 1 y Vav1; además, HS1 también interacciona con Lck mediante su dominio SH3. Todo esto apunta a que HS1 puede formar diferentes complejos moleculares para lograr especificidad en la señalización (Huang *et al.* 2008).

Finalmente, cabe destacar que defectos en HS1 han sido relacionados con enfermedades como la leucemia y la neutropenia; en cambio, aún no existe una asociación clara entre mutaciones en esta proteína y enfermedades inmunes. Un estudio reveló que una mujer con lupus eritematoso sistémico presentaba una deleción de 37 aminoácidos en la región de repeticiones en tándem de HS1 (Sawabe *et al.* 2003). Del mismo modo, se han encontrado variantes polimórficas de HS1 en pacientes que presentaban esta misma enfermedad (Otsuka *et al.* 2004).

4. Fosfatasas de tirosina (PTPs).

Como acabamos de ver, en la señalización iniciada por el TCR, la fosforilación de proteínas en tirosina ejerce una función esencial. El estado de fosforilación de las proteínas está controlado por kinasas y fosfatasas, enzimas que catalizan la fosforilación y la desfosforilación de proteínas respectivamente. La unión de un grupo fosfato puede provocar importantes cambios en la proteína aceptora, ya que altera su estructura y, con ello, su función. La fosforilación en tirosina de una proteína, modifica su actividad y/o su interacción con otras proteínas a través de dominios de unión a tirosinas fosforiladas, por ejemplo dominios SH2 y PTB (*PhosphoTyrosine Binding*) (Yaffe y Elia 2001; Yaffe 2002).

Las fosfatasas de tirosina o PTPs (*Protein tyrosine phosphatases*) son enzimas encargadas de eliminar grupos fosfato de sus sustratos y, al igual que las kinasas de tirosina, desempeñan un importante papel en numerosos procesos celulares, entre ellos la diferenciación y división celular (Soulsby y Bennett 2009; Lee *et al.* 2015). En el genoma humano 107 genes codifican para fosfatasas de tirosina y 90 para kinasas de tirosina (Manning *et al.* 2002). De los genes que codifican para fosfatasas de tirosina, 11 son inactivos, 2 desfosforilan el ARN mensajero y 13 actúan sobre fosfolípidos de inositol, con lo cual, solo son capaces de desfosforilar proteínas 81 fosfatasas. Por otro lado, de las 90 kinasas de tirosina, solo son catalíticamente activas 85, de manera que el genoma humano contiene un número similar de fosfatasas y kinasas de tirosina activas.

4.1. Clasificación.

Las fosfatasas de tirosina se agrupan en cuatro clases según su secuencia de aminoácidos y la topología de sus dominios catalíticos (Figura 5) (Alonso *et al.* 2004). En las fosfatasas de la Clase I, II y III, el aminoácido esencial para la catálisis es una cisteína del centro activo mientras que en las fosfatasas de la Clase IV, el aminoácido esencial es un ácido aspártico (Li *et al.* 2003; Rayapureddi *et al.* 2003; Tootle *et al.* 2003).

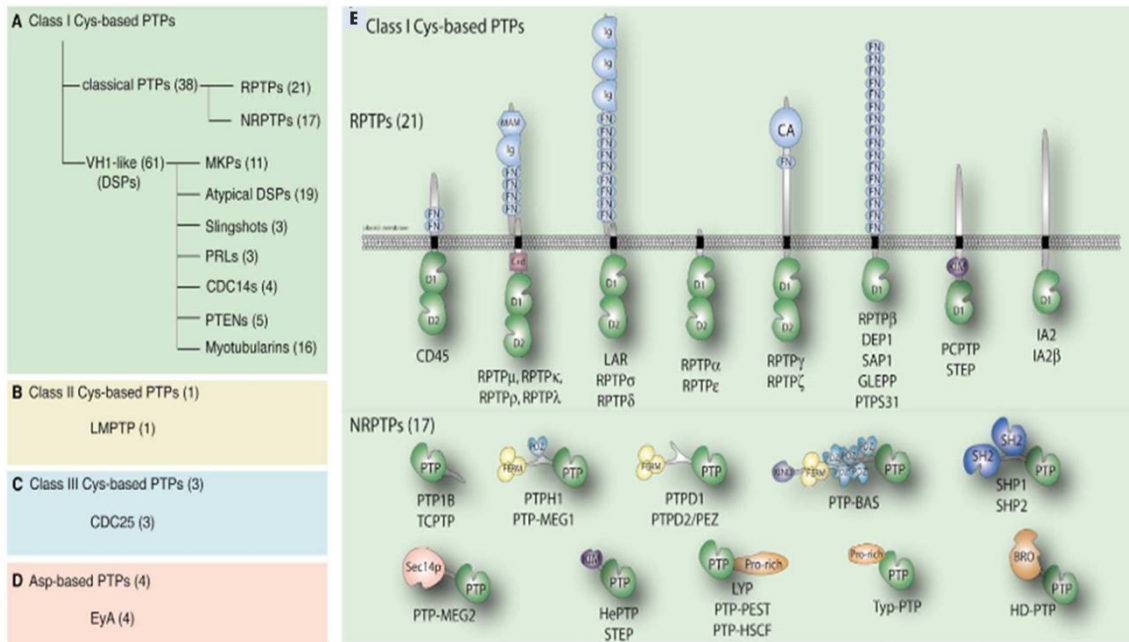


Figura 5. Clasificación de la superfamilia de las fosfatasa de tirosina. A la izquierda aparecen los cuatro grandes grupos en los que se clasifican las PTPs y, a la derecha (E), se especifican las PTPs clásicas. Modificado de Alonso *et al.* 2004.

La **Clase I** está formada por dos subgrupos que han evolucionado de un ancestro común. El primer subgrupo de 38 proteínas es conocido como fosfatasa de tirosina clásicas (Andersen *et al.* 2004) cuyos sustratos son estrictamente fosfotirosinas y todas ellas tienen ortólogos en ratón. Las PTPs clásicas a su vez se dividen en fosfatasa de tipo receptor (RPTPs, *Receptor Protein-Tyrosine Phosphatases*) y en fosfatasa citosólicas (NRPTPs, *Non-Receptor Protein-Tyrosine Phosphatases*) (Andersen *et al.* 2004). El segundo subgrupo dentro de las PTPs de Clase I está formado por 61 proteínas con similitud a VH1 (*Vaccinia virus H1 gene product*); estas son fosfatasa que poseen una gran diversidad de sustratos.

La **Clase II** está formada solo por una proteína de bajo peso molecular, LMPTP (*Low Molecular weigh Protein Tyrosine Phosphatase*), más ancestral que las fosfatasa de la clase I ya que se encuentran homólogos en todos los *phylum*, incluyendo plantas, numerosos procariontas y el subreino *Archaea*. Su estructura está relacionada con las arseniato reductasa de bacterias.

Las fosfatasa de tirosina de la **Clase III** tienen especificidad por proteínas fosforiladas en tirosina y treonina, y su dominio catalítico es un dominio *rhodanese*, nombre de la enzima con actividad sulfotransferasa donde se describió este dominio.

Introducción

Esta clase está formada por 3 proteínas involucradas en la regulación del ciclo celular, las Cdc (*Cell division cycle*) 25 A, B y C.

Pese a las similitudes en el mecanismo catalítico y en la secuencia del sitio activo, las fosfatasa de las clases I, II y III han evolucionado de forma independiente. Sin embargo, una comparación estructural indica que pueden haber evolucionado a partir de un ancestro común (Alonso *et al.* 2004).

La **Clase IV** usa un mecanismo catalítico diferente ya que utiliza un ácido aspártico como nucleófilo para desfosforilar los sustratos, tanto en tirosinas como en serinas, en una reacción metal-dependiente (Li *et al.* 2003; Rayapureddi *et al.* 2003; Tootle *et al.* 2003; Rayapureddi *et al.* 2005). Su secuencia sugiere que pertenecen a la familia de fosfohidrolasas haloácido deshalogenasas (HAD). Los primeros miembros que se identificaron de esta familia recibieron el nombre de proteínas Eya (*Eyes absent*) que además de tener actividad fosfatasa son cofactores transcripcionales que participan en la regulación de la expresión de genes implicados en la formación de tejidos y órganos.

4.2. Mecanismo catalítico de las PTPs clásicas.

El dominio catalítico de las fosfatasa de tirosina clásicas de la Clase I está formado aproximadamente por 300 aminoácidos. Dentro de este dominio cabe destacar el **bucle P** (Figura 6) que contiene la secuencia HCX2GX2R, altamente conservada, donde la cisteína (C) y la arginina (R) son esenciales para la actividad catalítica de la enzima. El grupo tiol de la Cys catalítica realiza un ataque nucleofílico sobre el grupo fosfato del sustrato, mientras que la arginina estabiliza el intermediario cisteína-fosfato (Zhang *et al.* 1994). En algunas fosfatasa de tirosina como PTP1B, se ha identificado también un segundo sitio de unión a fosfotirosinas, próximo al sitio activo, que está implicado en el reconocimiento de los sustratos y, por este motivo, se ha utilizado para diseñar inhibidores selectivos que se unen al sitio activo y a este segundo sitio de reconocimiento (Tautz *et al.* 2006).

Por otra parte, en el dominio fosfatasa también se encuentra el **bucle o motivo WPD**, una secuencia muy variable en la que los aminoácidos más conservados son el triptófano (W), la prolina (P) y el aspártico (D) que dan nombre a este motivo, donde

este último aminoácido es esencial en la catálisis. El bucle WPD cambia de conformación encerrando o atrapando la fosfotirosina del sustrato en el bolsillo catalítico donde se encuentra la cisteína que realiza el ataque nucleofílico, a la vez que el ácido aspártico del motivo WPD actúa como donador de protones, facilitando la salida del sustrato desfosforilado. Después, el mismo ácido aspártico actúa como aceptor de protones de una molécula de agua, recuperando su estado inicial y permitiendo que dicha molécula de agua ataque al grupo fosforilo unido a la cisteína catalítica. Finalmente, esta cisteína se reduce de nuevo liberando la molécula de fosfato inorgánico. En este último paso, es crucial la participación de una glutamina conservada que se localiza dentro del **bucle Q**, que coordina la molécula de agua (Zhang *et al.* 1994).

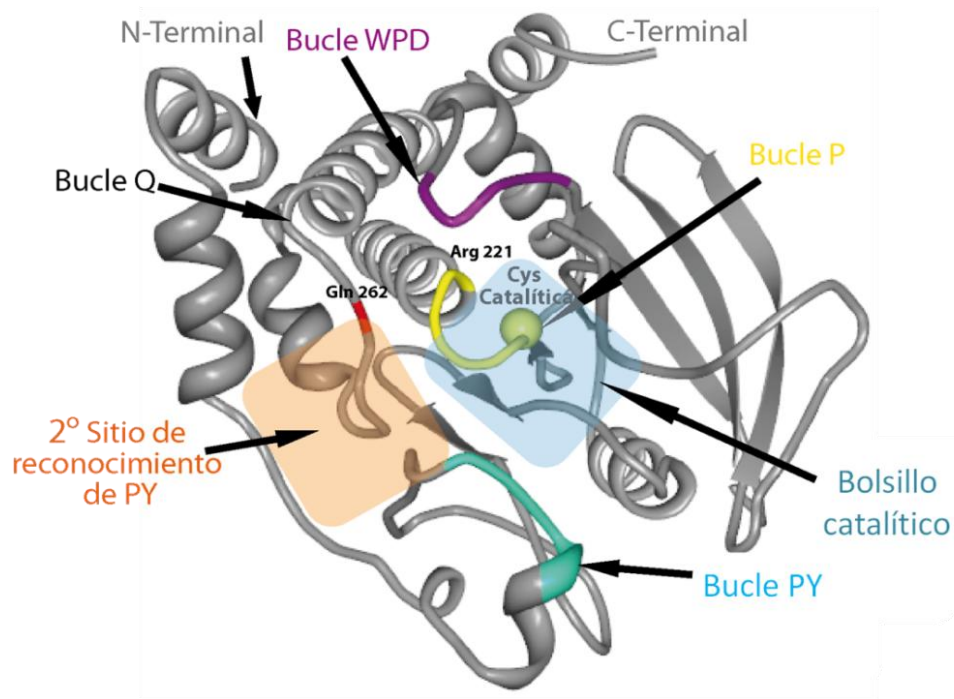


Figura 6: Estructura terciaria del dominio fosfatasa de la fosfatasa clásica PTP1B (PDB: 1SUG). En el diagrama de cintas se han destacado en diferentes colores elementos clave de la estructura secundaria. En amarillo, se ha señalado el bucle P, rodeándolo se encuentran los aminoácidos que forman parte del bucle de reconocimiento de tirosina (KNRY₆₀); en azul se muestra el bucle PY; el recuadro azul corresponde al bolsillo catalítico donde encajan los sustratos; en morado se muestra el bucle WPD, el recuadro naranja corresponde al segundo sitio de reconocimiento de sustratos y por último el bucle Q, donde se muestra la Glu 262 necesaria para la catálisis. Figura modificada de Barr *et al.* 2009.

Introducción

El conocimiento detallado de la estructura del dominio catalítico de las fosfatasa de tirosina y de los aminoácidos implicados en la catálisis ha sido útil en el desarrollo de mutantes que permiten identificar los sustratos de estas enzimas. Así, mutaciones en la cisteína catalítica del bucle P por una serina o alanina (C/S o C/A) y en el ácido aspártico del bucle WPD por una alanina (D/A) se han utilizado para identificar sustratos de las fosfatasa. La primera mutación da lugar a una enzima catalíticamente inactiva (Jia *et al.* 1995; Salmeen *et al.* 2000; Sarmiento *et al.* 2000; Yang *et al.* 2000) y la segunda mutación permite la formación del intermediario cisteína-fosfato, paso en el que queda bloqueada la catálisis por la falta del ácido aspártico, por lo que la enzima es capaz de retener a los sustratos unidos a ella (Flint *et al.* 1997) y por ello ha recibido el nombre de mutante atrapador de sustratos.

5. Subfamilia de fosfatasa de tirosinas PEST.

La subfamilia PEST se encuentra dentro de las fosfatasa de tirosina clásicas de la clase I de tipo no receptor y está formada por tres miembros, Lyp (*Lymphoid Tyrosine Phosphatase*), PTP-PEST (*Protein Tyrosine Phosphatase containing PEST motif*) y PTP-HSCF (*Protein Tyrosine Phosphatase-Hematopoietic Stem Cell Fraction*) también llamada BDP1 (*Brain-derived phosphatase 1*), codificadas por los genes *PTPN22*, *PTPN12* y *PTPN18*, respectivamente. A grandes rasgos, todas contienen en el extremo amino terminal una secuencia de entre 20 y 26 aminoácidos seguida del dominio fosfatasa (dominio PTP), con aproximadamente 300 aminoácidos, y una región carboxilo terminal de longitud variable, de 167 a 516 aminoácidos, que es rica en aminoácidos de prolina (P), ácido glutámico (E), serina (S) y treonina (T) y que, por ello, recibe el nombre de dominio PEST, el cual da nombre a esta subfamilia (Figura 7). En general, las proteínas con secuencias PEST se caracterizan por tener una vida media corta ya que son rápidamente degradadas en el interior de las células eucariotas (Rogers *et al.* 1986). Sin embargo, a pesar de la presencia de las regiones PEST en estas fosfatasa, no se ha encontrado que estas secuencias afecten a la vida media de PEP (Flores *et al.* 1994), ortólogo murino de Lyp, ni de PTP-PEST (Charest *et al.* 1995).

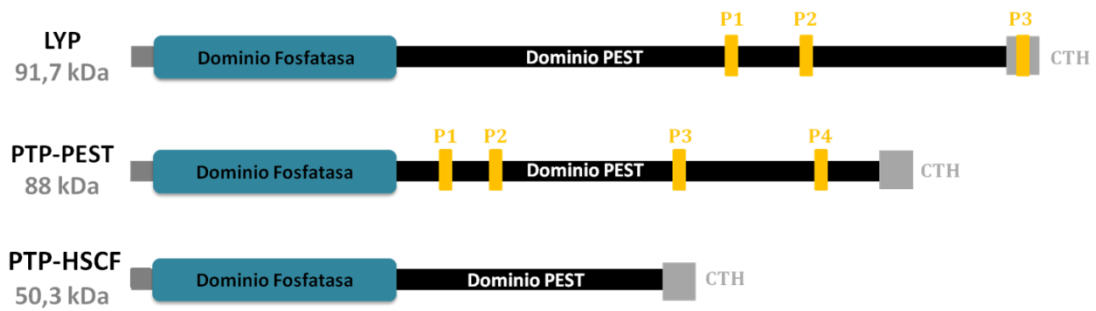


Figura 7: Estructura primaria de la subfamilia PEST. En la imagen se muestran el dominio catalítico, el dominio PEST con los motivos ricos en prolinas (P1 a P4 según la proteína) y el dominio de homología del extremo carboxilo terminal (CTH).

Las fosfatasas de la subfamilia PEST presentan diferentes potenciales electrostáticos en la superficie de sus respectivos dominios fosfatasa (Figura 8). Mientras PTP-PEST y Lyp presentan una conformación del motivo WPD atípicamente abierto con las superficies que rodean al centro catalítico electropositivas (azul), PTP-HSCF presenta una conformación abierta con menos zonas electropositivas. Esta diferencia entre las tres fosfatasas de la familia podría traducirse en el reconocimiento de diferentes sustratos o en la interacción con distintas proteínas reguladoras.

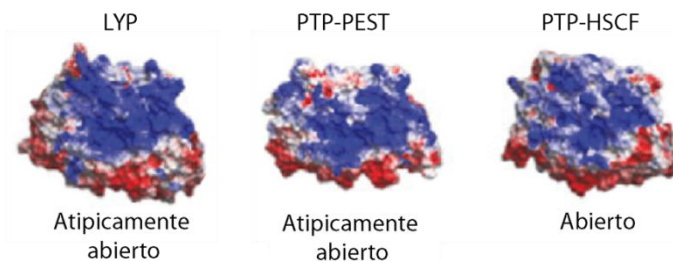


Figura 8: Distribución del potencial electrostático en el dominio catalítico de las fosfatasas PTP-PEST, PTP-HSCF y Lyp. Las estructuras de Lyp y PTP-HSCF se han obtenido por cristalización; sin embargo, la estructura de PTP-PEST es un modelo obtenido basándose en su homología de secuencia con las fosfatasas anteriores. Las zonas rojas hacen referencia a una superficie electronegativa y las zonas azules a una superficie electropositiva. En la parte inferior de cada imagen se indica la conformación del bucle WPD. Imagen modificada de Barr *et al.* 2009.

Las fosfatasas PEST poseen en el extremo amino de su dominio PTP una secuencia conservada característica de este grupo (STKYKADK); dicha secuencia contiene una serina, en Lyp la S35 (Figura 11), que se fosforila por la protein kinasa C (PKC) produciendo un cambio conformacional que altera el reconocimiento de sustratos e impide que la fosfatasa actúe sobre sus dianas, afectando de este modo a

Introducción

su función celular (Yu *et al.* 2007). Asimismo, la fosforilación de esta serina de PTP-PEST (S39), ya sea mediada por la PKC o por la PKA, reduce la actividad y la afinidad de dicha proteína por sus sustratos (Garton y Tonks 1994). En el caso de PTP-HSCF, la secuencia que rodea a esta serina (S37) no se ajusta al consenso de los sitios de fosforilación de PKC y además no hay evidencias de que esta serina se fosforile (Pearson y Kemp 1991).

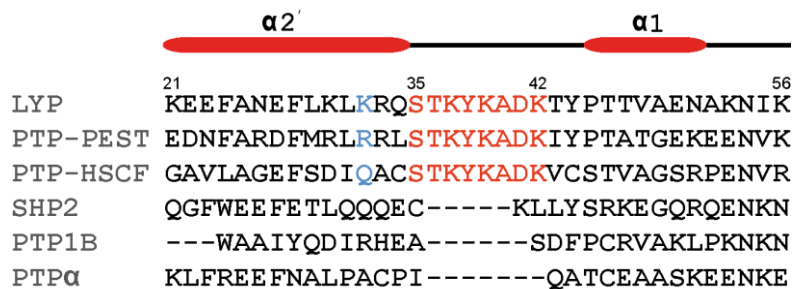


Figura 11: Alineamiento parcial del dominio catalítico de distintas PTPs. En rojo, se destaca el segmento específico presente en estas proteínas y en azul, el primer aminoácido de la secuencia consenso para la fosforilación por PKC. Modificado de Yu *et al.* (Yu *et al.* 2007).

Por otra parte, en el dominio no catalítico de estas proteínas se han descrito varias motivos ricos en prolina de clase I (R/KX ψ PXXP) y de clase II (PX ψ PXR/K). Estas secuencias, como es sabido, interaccionan con dominios SH3 (Matthews *et al.* 1992). Además de estos motivos de prolina, esta subfamilia también comparte en el extremo carboxilo terminal un motivo denominado CTH (*C-Terminal Homology*) (Figura 7), que se ha demostrado que interacciona con PSTPIP1 (*Proline, Serine, Threonine, Phosphatase Interacting Protein 1*), una proteína del citoesqueleto identificada por Spencer *et al.* en 1997 (Spencer *et al.* 1997). PSTPIP1 es una proteína homóloga a CDC15 (*Cell Division Control 15*) de *Schizosaccharomyces pombe* implicada en el ensamblaje de anillos de actina en la citocinesis. En este sentido, Coté *et al.* describieron la desfosforilación de WASP, proteína también implicada en la organización del citoesqueleto, por PTP-PEST mediada a través de la interacción mutua con PSTPIP1 (Cote *et al.* 2002).

Lyp, PTP-PEST y PTP-HSCF se diferencian en su patrón de expresión, en su estructura, en las interacciones con otras proteínas y por tanto, presumiblemente, en su función fisiológica.

5.1. PTP-PEST.

La fosfatasa PTP-PEST humana fue clonada por Yang *et al.* en 1993 y su homólogo murino por Charest *et al.* en 1995. Esta fosfatasa se expresa de forma ubicua aunque presenta niveles más elevados en células hematopoyéticas (Yang *et al.* 1993; Charest *et al.* 1995; Davidson *et al.* 1997; Davidson y Veillette 2001).

PTP-PEST se asocia predominantemente con proteínas implicadas en la regulación del citoesqueleto y con proteínas adaptadoras transductoras de señales (Playford *et al.* 2006; Ayoub *et al.* 2013). Por otro lado, PTP-PEST desempeña un papel esencial en el desarrollo embrionario, ya que su ausencia provoca una muerte temprana debida a defectos en la vascularización, en la formación del mesenterio, en la neurogénesis y en el desarrollo temprano del hígado. Asimismo, la eliminación de PTP-PEST produce una hiperfosforilación de Cas (*Cellular apoptosis susceptibility*), lo que sugiere que estas alteraciones en el desarrollo embrionario son debidas a una organización aberrante del citoesqueleto (Sirois *et al.* 2006). Se ha comprobado en estudios de sobreexpresión y eliminación de PTP-PEST en fibroblastos de embriones de ratón, que esta fosfatasa causa una inhibición de la motilidad celular (Angers-Loustau *et al.* 1999; Garton y Tonks 1999; Sastry *et al.* 2002; Jamieson *et al.* 2005; Sastry *et al.* 2006) reduciendo la migración celular inducida por integrinas, posiblemente por su papel en la desfosforilación de proteínas como Cas y FAK (*Focal Adhesion Kinase*), que se localizan en los focos de adhesión.

PTP-PEST también tiene un papel relevante en linfocitos ya que controla la señalización a través de los inmunorreceptores de células T y B reduciendo la fosforilación de proteínas como Lck (Arimura *et al.* 2008), WASP (Badour *et al.* 2004), Shc, Cas, Pyk2 y FAK (Davidson y Veillette 2001). La desfosforilación de estas proteínas conlleva un bloqueo de procesos tales como la reorganización de la actina, la formación de la sinapsis inmunológica (Badour *et al.* 2004), la activación de la cascada de señalización Ras-MAPK (Davidson y Veillette 2001), la activación de los factores de transcripción NFAT y NFκB (*Nuclear factor immunoglobulin kappa chain enhancer B cells transcription*) (Arimura *et al.* 2008) y, por tanto, la inducción de IL-2, que en conjunto participan en la activación linfocitaria. Así PTP-PEST estaría actuando como un regulador negativo de la señalización en los linfocitos T y B. Por otro lado, el grupo

Introducción

de Veillette ha generado un modelo murino *knockout* condicional en el que la eliminación de un alelo de PTP-PEST se vio que no afectaba al desarrollo de los linfocitos T ni a las respuestas primarias; en cambio, PTP-PEST a través de la regulación de la fosforilación de Pyk2, es esencial para las respuestas secundarias de la célula T (Davidson *et al.* 2010). Asimismo, se ha descrito que la expresión de esta fosfatasa está regulada negativamente en respuesta a la activación a través del TCR de los linfocitos T vírgenes CD4⁺ y CD8⁺ (Arimura *et al.* 2008).

5.2. PTP-HSCF.

En 1996 Kim *et al.* aislaron el gen *PTPN18*, que correspondía a otra fosfatasa de este grupo, PTP-HSCF, también llamada BDP1 (*Brain-derived phosphatase 1*) porque se describió primero en cerebro y colon, aunque posteriormente se detectó en diferentes tipos celulares derivados de tumores (Aoki *et al.* 1996; Cheng *et al.* 1996; Dosil *et al.* 1996; Huang *et al.* 1996; Kim *et al.* 1996). Además se ha visto que esta fosfatasa regula la actividad del protooncogén HER2, modulando su fosforilación (Gensler *et al.* 2004) y su ubiquitinación (Wang *et al.* 2014).

La sobreexpresión de PTP-HSCF en células PC12 de rata aumenta la rapidez en la formación de neuritas inducidas por el factor de crecimiento neuronal (Aoki *et al.* 1996). Además, en células de la granulosa del ovario, su sobreexpresión provoca la reorganización del citoesqueleto (Shiota *et al.* 2003) y la disminución de la fosforilación en tirosinas de p190^{RhoGAP} (proteína guanósina trifosfato activadora). Por el contrario, la expresión del dominante negativo de PTP-HSCF en la línea celular K562, una línea de eritroleucemia, tratada con éster de forbol PMA, produce la inhibición de la adhesión y propagación de estas células (Dosil *et al.* 1996). Respecto a las células inmunes, se ha descrito que la sobreexpresión de PTP-HSCF en la línea celular de linfocitos B, Ramos, causa la inhibición de la inducción del promotor c-fos provocada por el BCR (Aoki *et al.* 2004) y este efecto coincide con la disminución de la fosforilación de las proteínas tirosina kinasas, Tec (*Tec tyrosine kinase*) y Btk (*Bruton's tyrosine kinase*).

5.3. Lyp.

El gen *PTPN22* que codifica para Lyp se localiza en el cromosoma 1p13.3-13.1. La proteína fue descrita por Cohen *et al.* (Cohen *et al.* 1999) y recibió este nombre porque se expresaba en linfocitos, aunque posteriormente también se detectó su expresión en otras células de origen hematopoyético. Hasta el momento se han descrito seis isoformas resultantes de su procesamiento alternativo, pero solo se ha demostrado experimentalmente la expresión de cuatro de ellas. Lyp1 es la más abundante de las todas, conteniendo la secuencia completa de 807 aminoácidos. Asimismo, es la isoforma objeto de la mayoría de los estudios funcionales realizados hasta la fecha. Lyp2 es una variante más corta, su secuencia difiere de la de Lyp1 en que contiene únicamente el primer motivo rico en prolina (P1) y además presenta siete aminoácidos exclusivos en el extremo C-terminal. Por su parte, Lyp3 tiene delecionados 28 aminoácidos situados entre el P1 y el P2. Las funciones de las isoformas 2 y 3 son desconocidas (Wang *et al.* 2010). Más recientemente se describió la isoforma 6 (*PTPN22.6*), la cual tiene delecionado gran parte del dominio fosfatasa y funciona como una variante dominante negativa (Chang *et al.* 2012).

Lyp comparte un 70% de identidad de secuencia de aminoácidos con PEP, su ortólogo murino (Matthews *et al.* 1992); sin embargo, la identidad de secuencia que existe en los distintos dominios, considerados de forma aislada, es diferente. Así, el dominio catalítico presenta un 89% de identidad, mientras que en el resto es solo del 61%, porcentaje menor del que suelen presentar otras fosfatasas homólogas de humano y ratón.

En linfocitos, se ha observado que Lyp se localiza fundamentalmente en el citosol, rodeando al núcleo, muy poco en la membrana plasmática y una pequeña cantidad en balsas lipídicas (Bottini *et al.* 2006). Estudios anteriores en células HEK-293 transfectadas con Lyp describieron la localización de esta fosfatasa en el núcleo (Flores *et al.* 1994). De hecho, se ha identificado una secuencia de localización nuclear (PVKRTK) (Dang y Lee 1988; Garcia-Bustos *et al.* 1991) entre la posición 446 y 451 de PEP (Flores *et al.* 1994), pero esta localización nuclear no se ha verificado para la proteína endógena en células hematopoyéticas.

5.3.1. Posibles sustratos de Lyp.

La búsqueda de sustratos de Lyp o de su homólogo murino, PEP, mediante el empleo de mutantes atrapadores de sustratos en células Jurkat, indican que Lyp podría interaccionar con varias proteínas que intervienen en la señalización cercana al TCR.

Lck, Fyn, Zap70 y la cadena ζ asociada al TCR han sido descritos como sustratos directos de Lyp (Wu *et al.* 2006). En el caso de Lck, Lyp desfosforila la Tyr394, que se encuentra en el bucle de activación (Palacios y Weiss 2004; Wu *et al.* 2006), al igual que lo hace con la Tyr417 de Fyn (Cloutier y Veillette 1999) y con la Tyr493 de Zap70 (Wu *et al.* 2006).

Wu y colaboradores, además de identificar Lck, Zap70 y la cadena ζ asociada al TCR por espectrometría de masas, han identificado también otras proteínas que interaccionan con Lyp: Vav1, CD3 ϵ y VCP (*Valosin containing protein*), que podrían ser o no sustratos de Lyp. Por otra parte, Cbl (*Casitas B-lineage lymphoma*) también se ha propuesto como sustrato de Lyp, dado que ambas proteínas interaccionan en linfocitos T y se ha observado una reducción en su fosforilación cuando se sobreexpresa la fosfatasa (Cohen *et al.* 1999).

Mediante la inmunoprecipitación a partir de lisados de células HEK-293 transfectadas, Hill *et al.* han descrito la interacción de Lyp con Grb2 (*Growth factor receptor bound protein 2*). En este mismo trabajo, observan que Lyp actúa como regulador negativo sobre la actividad transcripcional en la señalización del TCR iniciada por la activación del receptor CD3 y/o CD28 (Hill *et al.* 2002). Se cree que Grb2 podría dirigir a Lyp hacia sus sustratos, pero Bottini *et al.* no han observado una buena estequiometría en dicha interacción por lo que su relevancia fisiológica es dudosa (Bottini *et al.* 2006).

En un estudio más reciente, mediante la aplicación de una estrategia de “*inverse alanine scanning*”, Yu y colaboradores determinaron la preferencia de Lyp por determinados aminoácidos en la secuencia flanqueante de la fosfotirosina. Se observó la preferencia por aminoácidos ácidos en las posiciones -1, -2, +1 y +2. Por su parte, en las posiciones -4 y -3 se determinó mayor afinidad de Lyp por los péptidos que contenían Tyr/Trp y Gly en esas posiciones respectivamente. En cuanto a los aminoácidos que ocupan las posiciones +3 y +4 parecen existir menos restricciones, lo

que lleva a pensar que no son aminoácidos esenciales en la interacción con el dominio catalítico de la fosfatasa (Yu *et al.* 2011).

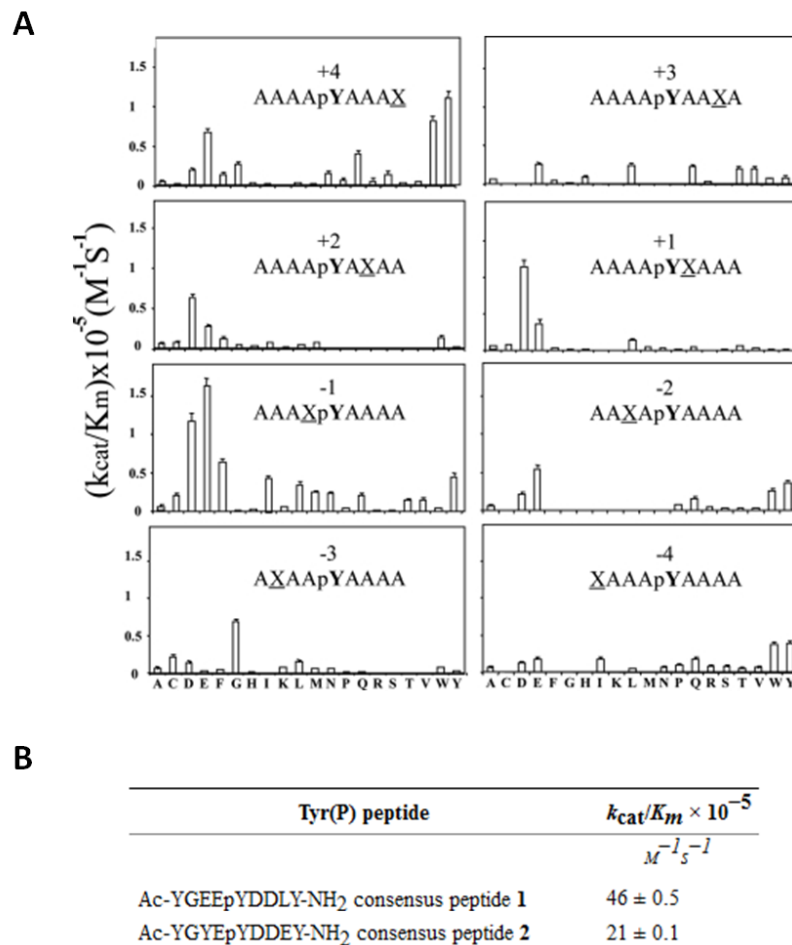


Figura 12: Inverse alanine scanning para Lyp. A) Se muestran el cociente de Kcat/Km para Lyp frente a 153 péptidos en los que se varía un aminoácido de la secuencia flanqueante a la fosfotirosina entre las posiciones -4 y +4. **B)** Péptidos consenso que mejor se adaptan al sitio activo de Lyp. Imagen tomada de Yu *et al.* 2011.

Con este análisis, determinaron las dos secuencias peptídicas consenso que mejor se adaptarían al sitio activo de la fosfatasa y, además, en este mismo trabajo predicen que SKAP-HOM, proteína adaptadora que regula la adhesión de linfocitos, es un sustrato *bona-fide* de Lyp, a la cual desfosforilaría en la Y75 (Yu *et al.* 2011).

5.3.2. Asociación de Lyp con enfermedades autoinmunes.

En el año 2004 se describió la existencia del polimorfismo rs2476601, que consiste en la sustitución de una citosina por una timina en la posición 1858 (C1858T). Esta variación produce el cambio aminoacídico de arginina por triptófano en posición

Introducción

620 (R620W). Dicho polimorfismo altera la región P1 rica en prolinas (DDEIPPLPV**R620**TPESFIVVEE) implicada en la interacción con Csk (*C-src tyrosine kinase*), afectando a la asociación entre ambas proteínas (Bottini *et al.* 2004).

Paralelamente a su descubrimiento, el polimorfismo R620W de Lyp se asoció con un aumento en el riesgo de padecer diabetes tipo I, una enfermedad autoinmune (Bottini *et al.* 2004). Posteriormente, se ha confirmado esta asociación en numerosos estudios genéticos y se ha demostrado su implicación en otras enfermedades autoinmunes. Así, se ha descrito que este polimorfismo también está asociado con artritis reumatoide, artritis idiopática juvenil (Begovich *et al.* 2004; Criswell *et al.* 2005; Hinks *et al.* 2005; Lee *et al.* 2005; Orozco *et al.* 2005; Viken *et al.* 2005), lupus eritematoso sistémico (Kyogoku *et al.* 2004; Criswell *et al.* 2005; Orozco *et al.* 2005), enfermedad de Graves (Smyth *et al.* 2004; Velaga *et al.* 2004), miastenia grave (Vandiedonck *et al.* 2006), vitíligo generalizado (Canton *et al.* 2005) y granulomatosis de Wegener (Jagiello *et al.* 2005). También se ha demostrado que no se encuentra asociado con otras enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple (Begovich *et al.* 2005; Criswell *et al.* 2005; Hinks *et al.* 2005), enfermedades inflamatorias del intestino como la enfermedad de Crohn (Martin *et al.* 2005; van Oene *et al.* 2005) o la colitis ulcerosa (Martin *et al.* 2005; Prescott *et al.* 2005), enfermedad celiaca (Rueda *et al.* 2005; Viken *et al.* 2005), colangitis esclerosante primaria (Viken *et al.* 2005), cirrosis biliar primaria (Milkiewicz *et al.* 2006), psoriasis y artritis psoriática (Hinks *et al.* 2005). En general, el polimorfismo de Lyp parece estar relacionado con un grupo de enfermedades autoinmunes caracterizadas por la presencia de autoanticuerpos circulantes. Los individuos que muestran más susceptibilidad a desarrollar dichas enfermedades suelen ser individuos homocigotos o heterocigotos que portan esta mutación, aunque es muy poco probable que por sí mismo este polimorfismo cause autoinmunidad, y por tanto, sería necesaria la participación de otros factores genéticos, especialmente los que afectan al MHC, además de factores ambientales. Un estudio reciente realizado en el modelo murino de lupus eritematoso sistémico BXSB, también apoya la idea de que Lyp actúa de forma conjunta con otros factores o genes que predisponen al desarrollo de enfermedades autoinmunes (Maine *et al.* 2015).

La distribución mundial de este polimorfismo muestra un gradiente geográfico. Las poblaciones que presentan con más frecuencia este polimorfismo se encuentran en el norte de Europa (8% Reino Unido, 12% en Suecia y un 15% en Finlandia). En cambio, la presencia de este polimorfismo es relativamente rara en el sur de Europa (2% Italia y un 6% España) y casi inexistente en poblaciones africanas, americanas y asiáticas. Estos datos sugieren que este polimorfismo apareció tarde en la evolución humana y se seleccionó en poblaciones europeas, probablemente porque confería alguna ventaja adaptativa (Vang *et al.* 2008). En este sentido, varios estudios han analizado si R620W podría proteger a sus portadores de ciertas enfermedades infecciosas, observándose que esta variante puede proteger frente a la tuberculosis (Lopez-Escamez 2010, Lamsyah *et al.* 2009), mientras que sería un alelo de riesgo en el desarrollo de enfermedades invasivas por pneumococos (Chapman *et al.* 2006). Asimismo, otros estudios que trataron de establecer relación entre este polimorfismo y la susceptibilidad a ser infectado por Hepatitis C (Montes-Cano *et al.* 2008), *Trypanosma cruzi* (Robledo *et al.* 2007) y *Brucella* (Bravo *et al.* 2009) han demostrado que no existen diferencias entre el grupo control y los portadores de R620W.

En 2009 se describió otro polimorfismo de nucleótido simple, el cual produce la sustitución de una arginina por una glutamina (R263Q) en el dominio catalítico, lo que provoca una pérdida de función. El polimorfismo R263Q (G788A, rs33996649) (Orri *et al.* 2009) tendría una función de protección ante el desarrollo de enfermedades autoinmunes, como por ejemplo el lupus eritematoso sistémico. Esta función protectora viene dada por una reducción en la actividad fosfatasa, siendo así menos efectiva en la reducción de la señalización del TCR.

Los polimorfismos R620W y el R263Q no son sinónimos y están presentes en diferentes haplotipos (Carlton *et al.* 2005; Zoledziewska *et al.* 2008), es decir se heredan en distintos bloques. Son variantes independientes y no tienen el mismo efecto en cuanto a la susceptibilidad a padecer lupus eritematoso sistémico.

5.3.3. Regulación de la señalización del TCR por Lyp.

Lyp parece tener como dianas varios intermediarios en la señalización por el TCR y podría estar regulando distintos puntos de la cascada de señalización de este

Introducción

receptor. Las familias de las Src y Syk kinasas son activadores clave en la señalización y se regulan negativamente por Lyp (Wu *et al.* 2006, Gjorloff-Wingren *et al.* 2000).

Una de las Src kinasas esenciales en el inicio de la señalización por el TCR es Lck, cuya actividad parece estar regulada por Csk y Lyp, que interaccionan en linfocitos T. El complejo Lyp/Csk actúa sobre Lck, inhibiéndola, de forma que Csk fosforila a Lck en su tirosina inhibidora (Y505) generando un sitio de unión a su propio dominio SH2, lo que le confiere una conformación inactiva (Bergman *et al.* 1992; Nika *et al.* 2007), mientras que Lyp desfosforilaría su tirosina activadora (Y394) (Wu *et al.* 2006). Csk se localiza en el citosol pero puede asociarse a la membrana plasmática mediante su asociación directa con CBP. Se ha propuesto que Lyp podría dirigirse a la membrana plasmática mediante su asociación con Csk. El posicionamiento de Lyp y Csk en las proximidades de la membrana plasmática facilitaría la interacción con sus sustratos que se localizan en la misma región, para que así estos complejos de Csk/Lyp actúen de forma sinérgica inhibiendo la señalización proximal del TCR a través del control de la fosforilación de Lck (Cloutier *et al.* 1999, Gregorieff *et al.* 1998).

Por otra parte, Zap70 se recluta en la sinapsis inmunológica a través de su interacción con los ITAM fosforilados por Lck, presentes en el complejo CD3 y la cadena ζ . Zap70 es una kinasa de la familia Syk que presenta múltiples tirosinas inhibidoras (Tyr292 y Tyr492) y activadoras (Tyr319 y Tyr493) (Lupher *et al.* 1997; Wange *et al.* 1995). Se piensa que Lyp puede desfosforilar esta proteína en sus tirosinas activadoras, interaccionando a través de Cbl (Mustelin *et al.* 2004). Además Zap70 fosforila otros intermediarios de la señalización proximal por el TCR que a su vez podrían ser sustratos de Lyp tales como Vav1 o Grb2.

Estas observaciones implican que Lyp tiene una importante función en la inhibición basal de la señalización por el TCR, así como el apagado de esta señalización tras la formación de la sinapsis inmunológica.

5.3.4. Diferencias funcionales entre Lyp R620 y W620.

El estudio de cómo R620W contribuye al desarrollo de enfermedades autoinmunes suscita un gran interés tanto desde un punto de vista biológico, como terapéutico; en cambio, la poca información disponible sobre la importancia funcional de la proteína nativa, complica dichos estudios. Además, el perfil de expresión de la

fosfatasa en los distintos precursores y células del sistema inmune también dificulta la predicción acerca de cuál sería el tipo celular prioritario en el que se debería estudiar la mutación.

Como ya se ha comentado anteriormente, se sabe que esta mutación disminuye la afinidad de la fosfatasa por Csk. Dado el importante papel de los complejos de Csk/Lyp en la inhibición de la señalización por el TCR, la disrupción de estos complejos a causa de la mutación podría llevar a la alteración de los umbrales de señalización de los receptores antigénicos, afectando a la maduración y activación de los linfocitos. En cambio, el estudio detallado de la interacción de estas dos proteínas, mostró que la interacción Lyp/Csk es inducible por la estimulación del TCR, e involucra los dominios SH3 y SH2 de Csk y los motivos P1 y P2 de Lyp. En consecuencia, la mutación R620W no impide la regulación de la señalización del TCR por estas proteínas (de la Puerta *et al.* 2013).

Dos grupos han descrito efectos funcionales del polimorfismo empleando líneas celulares inmortalizadas. Vang *et al.*, mediante ensayos de luciferasa, han observado que R620W presenta una mayor eficiencia en la inhibición del promotor NFAT/AP1 tras la estimulación a través del TCR y CD28 (Vang *et al.* 2005). Además, a través de ensayos de fosfatasa con un péptido de Lck que contiene la Y394 fosforilada, se monitorizó la cinética enzimática de Lyp R y W y se demostró que W620 era catalíticamente más activa. Estos datos apoyarían la hipótesis de que se trata de una mutación de ganancia de función. En cambio, Zikherman *et al.* valoraron el estado de fosforilación de Erk tras la transfección de la fosfatasa de forma independiente o junto con Csk, y la posterior estimulación del complejo TCR/CD3; y observaron que Erk se encontraba más fosforilada en los casos en los que se transfectaba W620. Asimismo, la movilización de Ca^{2+} era más eficiente en las células que coexpresaban Csk con la variante W620. Estos hechos apuntarían a que la fosfatasa mutante es una variante de pérdida de función (Zikherman *et al.* 2009).

Los estudios realizados en células humanas primarias por Vang *et al.* demostraron que los linfocitos T portadores de la mutación, tras la estimulación de los receptores TCR y CD28, ven reducida la producción de IL-2, la actividad de los factores de transcripción NFAT/AP-1 y la movilización de Ca^{2+} (Vang *et al.* 2005). Sin embargo, la interpretación de estos resultados debe ser cuidadosa, ya que las células primarias se

Introducción

tomaron de pacientes que padecían T1D, por lo que es posible que estos efectos se deban a mutaciones en otros genes asociados a autoinmunidad. Otros dos grupos han descrito reducción en la señalización del TCR en individuos portadores de la mutación tanto sanos, como enfermos de T1D, tiroiditis autoinmune y AR (Aarnisalo *et al.* 2008 y Rieck *et al.* 2007). Ambos estudios revelaron que los efectos sobre la movilización de Ca^{2+} eran más acusados en los portadores de la mutación en heterocigosis. En cambio, la proliferación de linfocitos T se vio disminuida solamente en el estudio de Aarnisalo *et al.*, pero no en el de Rieck *et al.* que sí confirmaron la disminución en los niveles de IL-4 e IL-10 y en la expansión de la población de linfocitos T de memoria en los portadores de R620W sanos.

La presencia de autoanticuerpos en las enfermedades a las que el polimorfismo está asociado puede ser debida a una pérdida de la tolerancia de los linfocitos T, aunque el polimorfismo de Lyp puede contribuir también a la autoinmunidad afectando la señalización en los linfocitos B. Hasegawa *et al.*, en 1999, demostraron que PEP regulaba la señalización del BCR en linfocitos B inmaduros mediante el uso de ADNc antisentido de PEP (Hasegawa *et al.* 1999). En este estudio, observaron que la reducción de la expresión de PEP rescataba parcialmente la inhibición de la síntesis de ADN mediada por el BCR después de ser estimulado con anti-IgM, y también se inhibía el bloqueo en fase G1 y la apoptosis, eventos cruciales para la eliminación de los linfocitos B inmaduros autorreactivos. Posteriormente, se describió que los linfocitos B portadores del polimorfismo R620W poseen una baja capacidad de respuesta al estimular el BCR, lo que puede afectar a la maduración, a la selección y a la función de dichos linfocitos (Rieck *et al.* 2007; Arechiga *et al.* 2009).

Además de estos cambios que el polimorfismo produce en la respuesta inmune adaptativa, recientemente se ha postulado que este alelo de riesgo para enfermedades autoinmunes puede actuar a nivel de la respuesta inmune innata, ya que se ha demostrado que Lyp regula selectivamente la producción de interferon tipo 1 (IFN1) tras la activación de los receptores tipo Toll (TLRs) en células mieloides (Wang *et al.* 2013).

Finalmente, existen estudios en ratones KO para PEP (Hasegawa *et al.* 2004) en los que se ha observado un fenotipo menos severo de lo esperado. En estos ratones, la señalización a través del TCR se mantiene intacta en los linfocitos inmaduros, siendo la

fosforilación de las protein kinasas de la familia Src completamente normal tanto en su tirosina reguladora como en la inhibidora. Solo se observó un incremento marginal de la expresión de CD5 en linfocitos doble positivos CD4/CD8, sugiriendo un papel inhibitorio de PEP en la selección positiva pero no en la negativa. Únicamente una segunda estimulación de los linfocitos T (efectores y de memoria) mostró algunos de los efectos esperados como el mantenimiento del estado fosforilado así como una hiperactivación de los linfocitos T, que como hemos mencionado no se produce en los linfocitos T inmaduros. Estos resultados indican que PEP no es crítica para la señalización del TCR en linfocitos inmaduros, aunque esto podría ser debido al efecto redundante de otras fosfatasa de tirosina como PTP-PEST que compensen la ausencia de PEP.

Debido a que en el KO de PEP no se observa un desarrollo de autoinmunidad claro, se ha desarrollado un modelo animal que represente la situación genética del polimorfismo Lyp R620W. Arthur Weiss y su equipo han generado una mutación equivalente en PEP, R619W, observando que el polimorfismo, en este caso, podría comprometer la habilidad de PEP para inhibir la activación de los linfocitos T (Veillette *et al.* 2009). De nuevo esto apuntaría a que la mutación provoca la pérdida de función.

Objetivos

El objetivo general de este trabajo consiste en la caracterización de la proteína Lyp, fosfatasa de tirosinas linfocitaria importante en la señalización del TCR. La relevancia a nivel clínico de esta fosfatasa recae en el hecho de que existe un polimorfismo (R620W) que se ha asociado a diversas enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide, el lupus eritematoso sistémico o la enfermedad de Graves. El estudio se divide en tres objetivos:

1. Identificar nuevos sustratos de Lyp.
2. Estudiar la localización subcelular de Lyp y su implicación en la formación de *microclusters* de SLP76.
3. Analizar la importancia de Lyp en la señalización por el TCR.

Material y Métodos

Materiales.

1.1. Soluciones y tampones

LAEMMLI BUFFER 4X

- Tris-HCl (Merck) 240 mM, pH 6,8
- SDS (Sigma) 8%
- Glicerol (Fluka) 40%
- β -Mercaptoetanol (Sigma) 5%
- Azul de bromofenol (0,008%)

PERVANADATO 100mM

- Ortovanadato sódico (Sigma) 100mM
- H_2O_2 (Sigma) 0,34%

TAMPÓN FOSFATO SALINO (PBS) pH 7,4

- NaCl (Scharlab) 136 mM
- KCl (Merk) 2,7 mM
- Na_2HPO_4 (Scharlab) 8 mM
- KH_2PO_4 (Merk) 1,5 mM

TAMPÓN TRIS SALINO (TBS) 1X, pH 7,6

- TRIS (Merk) 10 mM
- NaCl (Scharlab) 135 mM

TBS-TWEEN (TTBS) 1X

- TBS 10X
- Tween (Sigma) 0,05%

Material y Métodos

TAMPÓN DE ELECTROFORESIS 1X pH 8,3

- TRIS (Merck) 25 mM
- Glicina (Scharlab) 0,2 M
- SDS (Sigma) 1% (p/v)

TAMPÓN DE TRANSFERENCIA 1X

- TRIS (Merck) 25 mM
- Glicina (Scharlab) 0,2 M
- SDS 1% (p/v)
- Metanol (Panreac) 20% (v/v)

TAMPÓN DE LISIS CELULAR (TNE) 2X

- Tris-HCl (Merk) 20 mM pH=7,4
- NaCl (Scharlab) 150 mM
- EDTA (Sigma) 5 mM
- NP-40 (Fluka) 1%
- Añadido fresco al TNE 1X:
 - PMSF 1 mM
 - Na₃VO₄ 1 mM
 - NaF 5 mM
 - Aprotinina 10 µg/ml
 - Leupeptina 10 µg/ml

CaCl₂ 2,5 M

- CaCl₂-2H₂O (Merck)

TAMPÓN DE TRANSFECCIÓN (HEBS 2X) pH 7.05

- HEPES (Sigma) 50 mM
- NaCl (Scharlab) 140 mM
- Na₂HPO₄-2 H₂O (Scharlab) 1,5 mM

TAMPÓN FOSFATASA pH 6

- Acetato sódico 100 mM
- TRIS (Merk) 50 mM
- Bis-Tris 50 mM
- Añadir fresco
 - EDTA (Sigma) 5 mM
 - DTT 5 mM

1.2. Anticuerpos.

Anticuerpo (Casa comercial)	Origen	Antígeno	Dilución	Conjugado
Anti-Abl (BD Biosciences)	Ratón	ABL	1:100 WB	N/A
Anti-β-actina (Sigma)	Ratón	β-actina	1:5000 WB	N/A
Anti-CD28 (BD Biosciences)	Ratón	CD28.2	1:500 Estimulación TCR	N/A
Anti-CD3(UCHT1) (BD Biosciences)	Ratón	CD3	1:500 Estimulación TCR	N/A
Anti-Csk (Santa Cruz)	Conejo	Csk	1:500 WB	N/A
Anti-Erk-2 (Santa Cruz)	Conejo	Erk-2	1:1000 WB	N/A
Anti-P-Erk (Cell Signaling)	Conejo	pT202/pY204 Erk1/2	1:1000 WB	N/A
Anti-Flag (Sigma)	Ratón	Flag	1:1000 WB	N/A
Anti-Fyb (BD Biosciences)	Ratón	Fyb	1:1000 WB	N/A
Anti-Fyb (Santa Cruz)	Ratón	Fyb	1:2000 WB	N/A
Anti-Fyn (Santa Cruz)	Ratón	Fyn	1:1000 WB	N/A
Anti-GFP (eBioscience)	Conejo	GFP	1:1000 WB	N/A
Anti-GST (Santa Cruz)	Ratón	GST	1:100 WB	N/A
Anti-HA (COVANCE)	Ratón	HA	1:1000 WB	N/A
Anti-Hck (BD Biosciences)	Ratón	Hck	1:000 WB	N/A
Anti-HPK1 (Cell Signaling)	Conejo	HPK1	1:1000 WB	N/A
Anti-HS1 (Cell Signaling)	Conejo	HS1	1:1000 WB	N/A

Anticuerpo (Casa comercial)	Origen	Antígeno	Dilución	Conjugado
Anti-Lck (Santa Cruz)	Ratón	Lck	1:1000 WB	N/A
Anti-Lyp (R&D Systems)	Cabra	Lyp	1:3000 WB	N/A
Anti-c-Myc (Santa Cruz)	Ratón	Myc	1:100 WB	N/A
Anti-PLCy1 (Cell Signaling)	Conejo	PLCy1	1:1000 WB	N/A
Anti-pY873-PLCy1 (Cell Signaling)	Conejo	pY873 PLCy1	1:1000 WB	N/A
Anti-Phosphotyrosine (Millipore)	Ratón	Tirosina Fosforilada	1:1000 WB	N/A
Anti-PSTPIP1 (Sigma)	Conejo	PSTPIP1	1:200 WB	N/A
Anti-PSTPIP1 (Biomedal)	Conejo	PSTPIP1	1:100 WB	N/A
Anti-Pyk2 (Cell Signaling)	Conejo	Pyk2	1:1000 WB	N/A
Rabbit-Anti-Mouse (Millipore)	Conejo	IgG de ratón	1:500 Estimulación TCR	N/A
Anti-SKAP55 (Santa Cruz)	Cabra	SKAP55	1:1000 WB	N/A
Anti-SLP76 (BD Biosciences)	Ratón	SLP76	1:1000 WB	N/A
Anti-Syk (Santa Cruz)	Conejo	Syk	1:1000 WB	N/A
Anti-V5 (Invitrogen)	Ratón	V5	1:5000 WB	N/A
Anti-Vav1 (Santa Cruz)	Conejo	Vav1	1:200 WB	N/A
Anti-Zap70 (Cell Signaling)	Ratón	Zap70	1:1000 WB	N/A
Anti-Goat (Santa Cruz)	Ratón	Fc de Cabra	1:4000 WB	HRP
Anti-Mouse (GE Healthcare)	Oveja	Fc de Ratón	1:3000 WB	HRP
Anti-Rabbit (GE Healthcare)	Mono	Fc de Conejo	1:3000 WB	HRP
Alexa Fluor anti Mouse (Invitrogen)	Mono	Fc de Ratón	1:100 IF	Alexa 594
Alexa Fluor anti Rabbit (Invitrogen)	Cabra	Fc de Conejo	1:100 IF	Alexa 594
Alexa Fluor anti Goat (Molecular Probes)	Conejo	Fc de Cabra	1:50 IF	Alexa 488
Alexa Fluor anti Mouse (Molecular Probes)	Mono	Fc de Ratón	1:100 IF	Alexa 488
Alexa Fluor anti Rabbit (Molecular Probes)	Cabra	Fc de Conejo	1:100 IF	Alexa 488

Tabla 1: Anticuerpos empleados en *Western Blot* e Inmunofluorescencia.

1.3. Plásmidos.

Para realizar nuestro estudio, en el laboratorio hemos generado una amplia colección de ADNc de las proteínas de interés clonados en distintos vectores de expresión en eucariotas como muestra la Tabla 2.

Proteína	Epítipo	Mutación
Lyp	3xmyc	- R620W ΔPRM ΔCTH
	3xflag	- DACS (D195A/C227S) R620W-DACS
	3xHA	-
	EGFP	-
Dominio fosfatasa (LP)	3xflag	- DACS
	3xmyc	DACS
	3xHA	DACS
	GST	-
ABL	-	-
CBL	HA	-
CSK	-	-
	3xmyc	-
DOK1	3xHA	-
DOK2	3xHA	-
Fyb	3xHA	- Y595F Y651F Y771F Y595/651F Y595/771F 3YF (Y595/651/771F) 4YF (Y462/595/651/771F)
	3xmyc	-
	EGFP	-
Fyn	-	-
HCK	-	-
HPK1	HA	-
HS1	3xmyc	- Y378F Y397F 2YF (Y378/397F) ΔSH3
	3xHA	-
Itk	-	-
Jak1	-	-

Material y Métodos

Lck	-	- Y505F
	V5	- Y192F Y394F Y505F
Pirina	3xHA	-
PSTPIP1	3xHA	-
	3xmyc	-
	EGFP	-
SKAP55	3xmyc	-
SKAP-HOM	3xmyc	- Y75F Y237F Y261F
	3xflag	-
SLP76	3xmyc	- Y113F Y128F Y145F 2YF (Y113/128F) 3YF (Y113/128/145F)
	OFP	-
Tyk2	-	-
Vav1	-	-
	3xmyc	-
WASP	3xHA	-
Zap70	-	-
AP1	Luciferasa	
IL-2	Luciferasa	
NFAT	Luciferasa	
Renila	-	

Tabla 2: Plásmidos y mutaciones utilizadas en el estudio.

Asimismo, se emplearon dos ARNsi específicos (QUIAGEN) para el silenciamiento de Lyp en PBLs cuyas secuencias diana fueron las siguientes:

ARNsi_Lyp_1: 5'-CCGGGTAGAACTATCCCTGAT-3'

ARNsi_Lyp_3: 5'-TACGTAATGCCTCTAATGTAA-3'

2. Métodos experimentales con líneas celulares.

2.1. Mantenimiento de líneas celulares.

En este trabajo se han utilizado tanto líneas celulares que crecen adheridas como otras que lo hacen en suspensión.

Una de las herramientas principales empleadas en el estudio ha sido la línea celular procedente de células embrionarias de riñón humano, **HEK-293**; la cual se caracteriza por su fácil crecimiento y alta eficiencia de transfección. Estas células se cultivan en medio DMEM (Lonza Group Ltd, Switzerland) suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino previamente inactivado (FBSi), 1% de L-Glutamina y 100 U/mL de Penicilina-Estreptomicina, a 37°C y una saturación de CO₂ del 5%.

Por otro lado, como modelo celular linfoide, hemos empleado la línea **Jurkat** (N^o ATCC: TIB-152TM), procedente de una leucemia linfoide aguda, cultivada en medio RPMI 1640 (Lonza Group Ltd, Switzerland) suplementado con un 10% de FBSi, 1% de L-Glutamina y 100 U/mL de Penicilina-Estreptomicina. En estas mismas condiciones se cultivó la línea celular **49.4**, desarrollada y cedida amablemente por el laboratorio de Miguel Ángel de la Fuente. Se trata de una línea celular *knock-out* de Lyp obtenida a partir de células Jurkat mediante una estrategia de “*gene targeting*” utilizando un virus adenoasociado AAV-2 y empleando cassettes de resistencia a blasticidina para la selección celular.

También se utilizaron linfocitos de sangre periférica humana (PBLs), facilitados por el Centro de Hemoterapia y Hemodonación de Castilla y León. Los linfocitos se obtuvieron a partir de bolsas de concentrados leucocitarios, o *buffy coats*, procedentes de sangre periférica de cinco donantes sanos. El contenido de cada *buffy coat* se diluyó en proporción 1:1 con PBS 1X estéril, se homogeneizó y se añadieron 30 mL de dicha mezcla sobre 15 mL de Ficoll-Paque. Se centrifugaron los tubos durante 30 min a 1900 rpm sin freno, de tal manera que se obtuvo una separación por gradiente gracias a la cual se pudo recoger la fase mononuclear (anillo blanquecino entre el Ficoll y el PBS con el plasma). Las células mononucleares se lavaron tres veces con PBS 1X y posteriormente, se resuspendieron en RPMI completo y se plaquearon con el fin de

separar los monocitos, que tras dos horas se encuentran adheridos, de los linfocitos que permanecen en suspensión.

2.2. Métodos de transfección transitoria.

2.2.1. Transfección con fosfato cálcico.

Este método se basa en la obtención de un precipitado de fosfato cálcico que facilita la entrada del ADN en las células y se utilizó para transfectar células HEK-293.

Se sembraron las células en placas de 10 cm de diámetro entre 1 y 3 días antes de la transfección, adecuando el número de células con el fin de obtener una confluencia del 80%. Dos horas antes de transfectar se cambió el medio a las células dejándolas en 5 ml de DMEM completo. Se preparó una mezcla de ADN plasmídico de 2-10 μg y 500 μl de una solución de CaCl_2 (2,5 M) diluído 1:10 en agua, sobre la que se añadieron, gota a gota, 500 μl de una solución HEBS 2X. Esta mezcla se incubó a temperatura ambiente 10 min. Transcurrido ese tiempo, el contenido del tubo se mezcló y se añadió, gota a gota, a las células adheridas a la placa distribuyéndolo homogéneamente. Las células se incubaron a 37°C y 5% de CO_2 durante 48h.

2.2.2. Transfección por electroporación.

Las células en suspensión fueron transfectadas por electroporación usando un electroporador *Gene pulser* de *Bio-Rad*, este equipo genera un pulso eléctrico que modifica la permeabilidad de la membrana originando poros, a través de los cuales se introducirá el ADN.

Por cada condición experimental se usaron aproximadamente 20×10^6 células lavadas y resuspendidas en un volumen final de 400 μl de medio RPMI sin suplementar que se mezclaron con 5-50 μg de ADN plasmídico. La mezcla se introdujo en cubetas de electroporación de 0.4 cm donde se sometieron a pulsos eléctricos de 240 V y 950 μF . A continuación, las células se diluyeron en 10,5 mL de medio completo junto con 4,5 ml del medio en el que se encontraban las células antes de ser lavadas y electroporadas. Finalmente, se mantuvieron de 24-48 horas a 37°C en atmósfera al 5% de CO_2 .

2.2.3. Transfección por nucleofección.

Para el silenciamiento de Lyp en PBLs, se llevó a cabo la nucleofección de ARNsi en estas células. En esta técnica se empleó el “Human T Cell Nucleofector® Kit” de Amaxa Biosystems y se siguieron las instrucciones aconsejadas por el proveedor. Así en cada transfección se emplearon $5-10 \times 10^6$ células y 3 μg de ARNsi, siendo el programa predeterminado elegido en nuestro caso: “U-14*/U-014** for high viability.”

2.3. Obtención de líneas estables.

Se generaron líneas estables tanto en suspensión como adherentes. Para ello las células HEK-293 o JK se transfectaron con el plásmido de interés, empleando el método anteriormente descrito en cada caso.

-HEK-293: 3xflagLyp R / 3xflagLyp W

-JK: shLyp38/shLyp240

A las 24 horas de la transfección, se cambió el medio a las células sustituyéndolo por DMEM/RPMI completo con 10 mM de HEPES y 2 mg/ml de antibiótico G418-Gentamicina-sulfato (Gibco Inc, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA), para seleccionar la población celular positiva. El proceso de selección se prolongó durante aproximadamente un mes en el que se fueron realizando sucesivos pases. En este punto se realizó un *Western Blot* para comprobar la expresión de los plásmidos transfectados y se guardó una muestra de las células en nitrógeno líquido.

Posteriormente, en aquellos casos en los que, en vez de trabajar con una población heterogénea, nos interesaba seleccionar las células que más expresaban la proteína transfectada; se llevó a cabo una selección clonal. Para ello se sembraron las células en placas de 96 pocillos a razón de 0.2 células por pocillo, manteniendo la concentración de G418. Tras varias semanas de selección y expansión clonal, los clones positivos fueron aislados y analizados de nuevo por *Western Blot*. Tras esta comprobación, los clones de interés se expandieron y congelaron en nitrógeno líquido.

2.4. Tratamiento con pervanadato.

El pervanadato es utilizado como inhibidor de la actividad de las tirosin fosfatasas. Este compuesto se preparó a una concentración de 100 mM por oxidación del ortovanadato sódico. Una vez preparado se empleó a una concentración de 1 mM durante 5 min a 37°C y posteriormente se procesaron las células según correspondiese.

2.5. Activación de linfocitos T.

Para estimular las líneas linfoides por el TCR se emplearon anticuerpos anti-CD28 (0,25 µg/mL) y anti-CD3 (0,25 µg/mL) en el caso de PBLs o el sobrenadante purificado del hibridoma C305 para las JK; ambos estímulos se mantuvieron en hielo durante 10 min y después, se añadió un anticuerpo *rabbit anti mouse* (RaM) (0,5 µg/mL) que permitiría la formación del complejo señalizador. Por último, las células se incubaron a 37°C durante el tiempo necesario.

3. Técnicas moleculares.

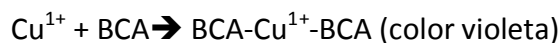
3.1. ADN plasmídico.

Para generar la colección de ADNc de las proteínas de interés en distintos vectores de expresión se emplearon técnicas de clonación molecular. Inicialmente, se introdujeron las secuencias de los genes codificantes de las proteínas en el vector de interés mediante digestión con enzimas de restricción y posterior ligación. A continuación, para obtener los distintos mutantes se empleó el kit comercial *QuikChange Site Directed Mutagenesis* (Stratagene) utilizando oligonucleótidos específicos y siguiendo las instrucciones indicadas por el proveedor. El producto de la ligación o la PCR se transformó en células competentes XL-1-Blue siguiendo el protocolo descrito por Hanahan en 1983 (Hanahan, 1983). Posteriormente, se extrajo el ADN plasmidico utilizando el kit *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* de Promega, y se analizó tanto su expresión por *Western Blot* como su secuencia por secuenciación cíclica directa.

3.2. Valoración de la concentración de proteína.

La concentración de la proteína total obtenida de los extractos celulares se cuantificó según el método colorimétrico BCA con el kit BCATM Protein Assay Kit distribuido por *Pierce*. El ácido bicinconínico (BCA) es un compuesto capaz de formar un complejo púrpura intenso con el catión (Cu^{1+}) en medio alcalino. Este método combina la reducción del ión cúprico (Cu^{2+}) a ión cuproso (Cu^{1+}) en un medio alcalino (reacción de Biuret) y la detección de este catión (Cu^{1+}) usando un reactivo que contiene el ácido bicinconínico.

La estabilidad del producto hidrosoluble final (dos moléculas de BCA unidas al ión cuproso) (Smith *et al.* 1985) proporciona un método para la cuantificación de proteínas que es sencillo, rápido, muy sensible y que muestra una gran tolerancia a compuestos que afectan a otros métodos. Se realizó también una recta de calibrado con diluciones crecientes de albúmina de suero bovino (BSA) y la absorbancia fue medida a una longitud de onda de 562 nm en placas de 96 pocillos en el espectrofotómetro VERSAmax (Molecular Devices).



3.3. Inmunoprecipitación de proteínas.

Esta técnica permite la precipitación de una proteína procedente de un lisado celular a través de la formación del complejo antígeno-anticuerpo. Este complejo antígeno-anticuerpo se precipita gracias a microesferas de sefarosa unidas covalentemente a Proteína G o Proteína A.

Para realizar estos ensayos se lisaron las células en tampón de lisis TNE 1X, con los inhibidores de proteasas antes mencionados, durante 10 min a 4°C. Posteriormente, se centrifugaron a 13.200 rpm durante 10 min a 4°C en la microcentrífuga 5415 (Eppendorf). Los sobrenadantes obtenidos se inmunoprecipitaron durante al menos 1 hora, en agitación y a 4°C junto con 1-2 μg del anticuerpo de interés y 20 μl de Proteína G-Sefarosa (GE Healthcare) 1:5 en PBS. En otros casos, cuando la proteína a inmunoprecipitar estaba marcada con los epítomos myc, HA o flag, se utilizaron 20 μl

Material y Métodos

de anticuerpos unidos covalentemente a las bolas de Proteína A (Sigma-Aldrich. EZview Red Anti-c-Myc, EZview Red Anti-HA, EZview Red Anti-FLAG® M2).

Una vez retirado el sobrenadante, los inmunoprecipitados se lavaron 3 veces en tampón de lisis TNE 1X y después las bolas se resuspendieron en 30 µl de tampón de *Laemmli* 1X, se hirvieron durante 5 min y se procedió a la detección de las proteínas adheridas a las bolas mediante *Western Blot*.

3.4. Western Blot.

La técnica conocida como *Western Blot* permite la identificación de proteínas atendiendo a su peso molecular mediante la unión específica antígeno-anticuerpo.

Las proteínas procedentes de lisados celulares se separaron mediante electroforesis vertical en geles desnaturizantes de poliacrilamida que contienen SDS (SDS-PAGE). La electroforesis se realizó en el sistema Criterion™ Cell (BioRad, Hercules, CA) conectándola a la fuente PowerPac™ (BioRad, Hercules, CA), aplicando una corriente de 120 V. A continuación se realizó la transferencia en el sistema semi-seco Trans-Blot® Turbo™ Transfer System, (BioRad, Hercules, CA).

Finalizada la transferencia, se bloqueó la membrana durante al menos 1 hora en una solución de TBS-Tween (TTBS) con 5% leche en polvo y/o 3% de BSA según el anticuerpo utilizado. A continuación, se incubó la membrana O/N a 4°C con el correspondiente anticuerpo primario (Tabla 1) diluido en su correspondiente solución de bloqueo. Al día siguiente, se retiró el anticuerpo y se realizaron cuatro lavados de 10 min cada uno con TTBS. Posteriormente, se incubó la membrana con el anticuerpo secundario correspondiente, que se muestra en la Tabla 1, durante 1 hora a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se lavó nuevamente la membrana al igual que se hizo cuando se retiró el anticuerpo primario.

A continuación se procedió a la inmunodetección de las proteínas mediante el kit de revelado *ECL Western Blotting Substrate* (Thermo Scientific, Wilmington, UK), el cual se basa en la reacción química de la peroxidasa que origina un producto quimioluminiscente detectado por la película autorradiográfica Fuji Medical X-Ray Film (Fujifilm). Para el revelado de las películas se utilizó el sistema Curix 60, AGFA, BEL. La

cuantificación de las bandas obtenidas se realizó por densitometría con la ayuda del software Quantity One (BioRad, Hercules, CA).

Por último, las membranas que debían ser incubadas con otro anticuerpo fueron sometidas a un proceso de deshibridación utilizando la solución *Stripping Buffer* (Pierce, Rockford).

3.5.Purificación de Lyp.

Para la purificación de Lyp, tanto *wild-type* (Lyp R) como R620W (Lyp W), se lisaron $250-300 \times 10^6$ células HEK-293, que expresaban de forma estable estas proteínas etiquetadas con 3xflag en su amino terminal, con 6-8 mL de buffer de lisis que contenía, además del TNE 1X y los inhibidores, glicerol al 10% (v/v) y DTT 0,5 mM; durante 1h a 4°C.

A continuación, el lisado celular se centrifugó 10 min a 12600 rpm a 4°C y nuestra fosfatasa se inmunoprecipitó durante 1h a 4°C, empleando 1 mL de bolas (1:5) EZview Red Anti-FLAG® M2. Tras este proceso, se lavaron las bolas 3 veces con tampón de lisis con NaCl 0,5 M y otras 3 veces con tampón de lisis normal.

Finalmente, la proteína se eluyó por competición utilizando el péptido comercial 3xflag de Sigma-Aldrich. Se realizaron 3 incubaciones con 250 µL del péptido a una concentración de 0,2 mg/mL en el buffer empleado para la lisis, durante 20 min a 4°C y en agitación. Transcurrido este tiempo, se centrifugó brevemente la muestra y se recogió el sobrenadante, dónde se encontraba la proteína eluída. El volumen final recogido tras las tres eluciones era de unos 700-750 µL, por lo que se procedió a concentrar la proteína. Para ello se emplearon filtros Amicon Ultra-0.5 mL 30K (Ultracel®-30K Membrane) siguiendo las instrucciones que la casa comercial indica para que el volumen final sea de unos 25-30 µL.

La proteína una vez concentrada se guardó a 4°C hasta su empleo en los ensayos de desfosforilación *in vitro*.

Para la valoración de la concentración de proteína purificada y concentrada se corrió un gel de poliacrilamida en el que se cargaron 5 µL de las muestras de proteína

purificada junto con una recta patrón de BSA desde 0,2 µg hasta 10 µg. Este gel se tiñó con plata según el protocolo descrito por Yan *et al.* (Yan *et al.* 2000).

4. Ensayos enzimáticos.

4.1. Ensayos de actividad fosfatasa.

Los ensayos para medir la actividad fosfatasa de Lyp se realizaron con el sustrato artificial para-nitrofenil fosfato (pNPP) de Sigma a 20 mM en tampón fosfatasa. Lyp se inmunoprecipitó tras la lisis celular y se incubó con el pNPP, a 37°C durante al menos 1h, en placas de 96 pocillos y utilizando un volumen de reacción de 200 µl. Transcurrido el tiempo de incubación, la reacción se detuvo con 20 µl de NaOH 0.5 N. La hidrólisis del pNPP se midió por absorbancia a una longitud de onda de 405 nm empleando el equipo Versamax microplate reader (Molecular Devices).

4.2. Ensayos de desfosforilación *in vitro*.

Estos ensayos se desarrollaron con el fin de comprobar si Lyp era capaz de desfosforilar *in vitro* las proteínas candidatas a ser sus sustratos.

Se transfectaron células HEK-293 con la proteína a estudiar, y a las 48h se trataron con PV para favorecer la fosforilación. Transcurrido ese tiempo, se lisaron las células y se inmunoprecipitó la proteína empleando las técnicas anteriormente descritas. Tras la inmunoprecipitación, se realizaron tres lavados con TNE 1X y otros tres lavados con el tampón de fosfatasa. Una vez retirado todo el sobrenadante, las bolas se resuspendieron en 105 µL de buffer de fosfatasa y se añadieron 2 µL de proteína 3xflagLyp R o 3xflagLyp W purificada y concentrada (aproximadamente 0,25 µg). Las muestras se incubaron a 37°C y se recogieron fracciones de 24 µL a tiempos de 0, 5, 15 y 30 min, que se mezclaron con 8 µL de Laemmli Buffer 4X. Finalmente, se observó el estado de fosforilación de la proteína transfectada mediante *Western blot*.

4.3. Ensayos de luciferasa.

Los ensayos de luciferasa se realizaron en células Jurkat y 49.4 mediante transfección transitoria de nuestros plásmidos de interés junto con los plásmidos que expresan el gen de la luciferasa de la luciérnaga bajo el control del promotor de IL-2, NFAT o AP-1. La enzima luciferasa no necesita modificaciones postraduccionales para ser catalíticamente activa y oxidar a la luciferina (sustrato) hasta oxiluciferina en una reacción bioluminiscente. La técnica se basa en cuantificar la expresión de la luciferasa a través de la reacción de bioluminiscencia que esta cataliza (Figura 13A). La reacción es lineal en un amplio rango de concentraciones, dentro del cual la cantidad de luz emitida será proporcional a la expresión de la luciferasa. La actividad luciferasa puede normalizarse para corregir diferencias debidas a la eficiencia de la transfección, para ello se cotransfecta el vector pRL-0 (Promega) que expresa la luciferasa de *Renilla reniformis* que cataliza una reacción luminiscente (Figura 13B) y que es muy diferente a la luciferasa en cuanto a estructura y requerimientos de sustratos debido a su distinto origen evolutivo. Estas diferencias hacen posible discriminar eficazmente entre la señal de uno u otro enzima de forma que podemos medir la actividad luciferasa y posteriormente bloquear dicha reacción y medir la actividad de la luciferasa de *R. reniformis* en el mismo tubo evitando la dispersión provocada por errores de pipeteo.

A las 24 horas de transfección, la muestra se dividió en dos triplicados, uno control y otro estimulado durante 6 horas a través del TCR (anti-CD3 y anti-CD28). Transcurrido este tiempo, se recogieron las células y se lisaron en 100 µl del tampón de lisis *Passive Lysis Buffer 1X* (Promega). Del extracto celular se tomaron 50 µl para realizar el ensayo de luciferasa en placa de 96 pocillos con el *Dual-Luciferase Assay System* (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. El resto del extracto se utilizó para la visualización, mediante WB, de las proteínas transfectadas. Los resultados muestran la inducción o represión de la actividad transcripcional de los diferentes factores de transcripción utilizados expresada como veces de activación, tomando como unidad la actividad de las células transfectadas con pEF sin estimular.

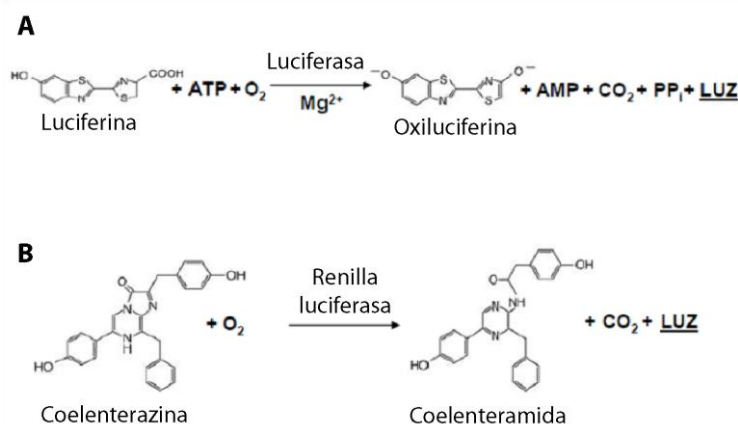


Figura 13: Esquema representativo de la reacción Luciferasa y Renilla.

5. Técnicas de inmunocitoquímica.

5.1. Tratamiento de cristales con Poly-L-Lisina.

Se utilizaron cubre-objetos circulares de 12 mm de diámetro (QUIMILID, S.L. ES) como soporte para las células adherentes. Estos cristales se autoclavaron y, para incrementar la adherencia de las células al soporte, se trataron con Poly-L-Lisina (Sigma-Aldrich ST. Lois, MO, USA). Para ello, se sumergieron los cristales durante 10 min en Poly-L-Lisina diluída 1:10 en agua, y a continuación se lavaron otros 10 min en agua Milli-Q. Tras este proceso, se dejaron secar y se guardaron a 4°C.

5.2. Fijación de células.

Para llevar a cabo la fijación, se quitó el medio y se lavó una vez con PBS 1X. A continuación, se añadió paraformaldehído (Merck, GE) al 2,4% en PBS 1X, con sumo cuidado: sobre la pared del pocillo en el caso de las células adherentes, o gota a gota sobre la pared del eppendorf manteniendo una agitación muy suave el caso de las células en suspensión. Este proceso se prolongó durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se retiró el paraformaldehído y se realizó un lavado con PBS 1X.

5.3.Tinción de núcleos.

Como marcador nuclear fluorescente se utilizó 4',6-diamidin-2-fenilindol dihidroclorhídrico, DAPI (Sigma-Aldrich ST. Lois, MO, USA). Las células, una vez fijadas, se incubaron con este compuesto diluido 1:10000 en PBS 1X durante al menos 10 min a temperatura ambiente y en oscuridad. A continuación, se lavó la muestra para eliminar el exceso de DAPI.

5.4.Estimulación para la formación de *microclusters*.

Para poder visualizar la formación de *microclusters* es necesario estimular el TCR. Para ello utilizamos cubre-objetos circulares de 12 mm de diámetro (QUIMILID, S.L. ES) que cubrimos con anti-CD3 a una concentración de 10 µg/mL en PBS y lo incubamos durante toda la noche a 4°C. A la mañana siguiente se retiró esta solución, se lavó el cristal con sumo cuidado y, sobre él, se depositaron las células a estimular. Estas células se incubaron a 37°C durante los tiempos elegidos y una vez transcurrido el tiempo de estimulación, la reacción se paró poniendo la placa en hielo para su posterior fijación.

5.5.Inmunofluorescencia.

La técnica de Inmunofluorescencia indirecta (IFI o IF) permitió la detección de una proteína específica presente en una muestra de células fijadas, mediante el uso de anticuerpos conjugados con un fluoróforo.

Inicialmente, se lavaron las células, empleando como solución de lavado albúmina de suero bovino (BSA) al 0,2% en PBS 1X. Una vez lavadas se fijaron con paraformaldehído. A continuación, se permeabilizó la membrana durante 10 min con Tritón X-100 (Sigma-Aldrich ST. Lois, MO, USA) al 0,3%, y posteriormente se realizó otro lavado. Después, con el fin de evitar posibles uniones inespecíficas se bloqueó con suero fetal bovino inactivado (FBSi) al 10% en PBS 1X, durante 20 min a temperatura ambiente; y tras realizar dos lavados, la muestra se incubó con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla 1) diluido en BSA 1%, durante 1 hora a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se lavó dos veces para eliminar el exceso de anticuerpo y se incubó con el anticuerpo secundario diluido en BSA 1% durante 50 min a temperatura

ambiente y en oscuridad, además, junto con el anticuerpo secundario se añadió el DAPI para visualizar los núcleos. Finalmente, se realizó un lavado y se procedió a montar y sellar la preparación, que se guardó a 4°C y en oscuridad hasta su visualización.

6. Técnicas de análisis de imágenes.

6.1. Microscopía confocal.

Una vez que las muestras estuvieron preparadas se procedió a la captura de imágenes empleando el microscopio confocal LEICA TCS SP5, con los láseres WLL (*White light laser*) y 405 Diode. La selección de la célula de interés en el campo elegido se realizó con una resolución de 512x512 con el fin de no dañar la preparación. Se capturaron entre 3 y 6 imágenes (*slices*) por célula de 0,772 µm de sección, a una resolución de 1024x1024 y una profundidad de 8 bits por pixel, dirigido por el programa LAS AF LITE (Leica Microsystems, GE).

Para la captura de las imágenes, se utilizó el objetivo de aceite de inversión 63X (1,4 AN) y un zoom de 4. Se utilizaron los canales correspondientes a los tres canales cromáticos RGB (Red, Green & Blue): TRITC (558-625 nm), GREEN (500-531 nm), DAPI (449-464 nm). Las imágenes se procesaron con ayuda del programa de tratamiento de imágenes ImageJ (National Institutes of Health, NIH).

6.2. Análisis de colocalización.

El estudio de colocalización de dos proteínas se realizó con la herramienta *Colocalization finder* del programa ImageJ, que hace uso del coeficiente de Pearson para el establecimiento de la correlación entre dos intensidades. El rango de valores del coeficiente de Pearson comprende de -1 a +1, donde valores próximos al negativo hacen referencia a una colocalización inexistente y valores próximos a +1, a una buena colocalización. El coeficiente de Pearson se acompañó de la representación gráfica de la colocalización, el ScatterPlot (Figura 14).

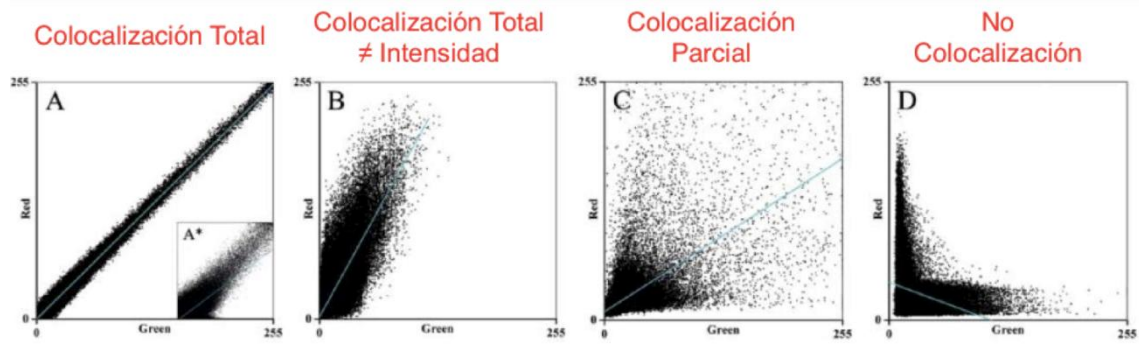


Figura 14: Representación gráfica de la colocalización mediante Scatterplots. Se muestran distintos Scatterplots representativos de distintos niveles de colocalización. Descargado de: Introducción a la colocalización cuantitativa. Servicio de Microscopía Óptica y Confocal (SMOC), y Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM), 2011.

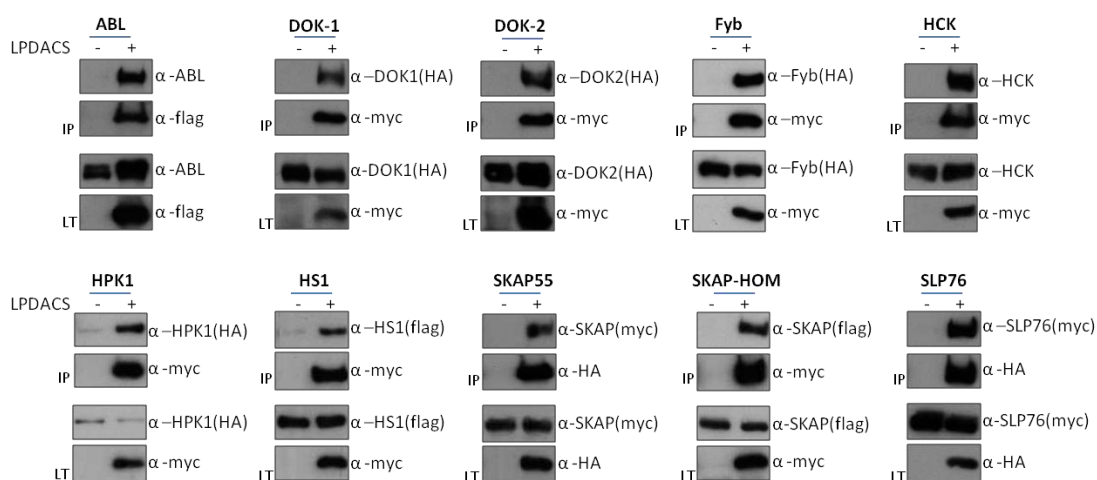
Resultados

Este trabajo se centra en la caracterización de la proteína Lyp. Dado el escaso conocimiento que se tiene sobre las funciones celulares de esta fosfatasa, el punto de partida desde el que abordamos nuestro estudio fue la identificación de nuevos sustratos, para así determinar cuáles son sus dianas celulares y los procesos que podría estar regulando.

1. Identificación de nuevos sustratos de la fosfatasa Lyp.

En la identificación de sustratos de cualquier enzima, un requisito indispensable es que el potencial sustrato interactúe con el dominio catalítico de la misma. Así, para facilitar la búsqueda de nuevos sustratos de Lyp, en lugar de identificar las proteínas que interactuaban *in vivo* con la proteína completa, buscamos aquellas que lo hacían con el dominio fosfatasa que contenía las mutaciones D195A y C227S de su centro activo; es decir, con un mutante del dominio fosfatasa atrapador de sustratos y catalíticamente inactivo, que denominaremos de ahora en adelante LP-DACS. Esta construcción se cotransfectó en células HEK-293 junto con plásmidos que contenían las secuencias codificantes de distintas proteínas implicadas en enfermedades autoinmunes y/o en la señalización del TCR, ya que si Lyp participa en dichos procesos es muy probable que lo haga desfosforilando algunas de las proteínas implicadas en ellos. Seguidamente, se evaluó si dichas proteínas coprecipitaban con el fragmento LP-DACS.

A



Resultados

B

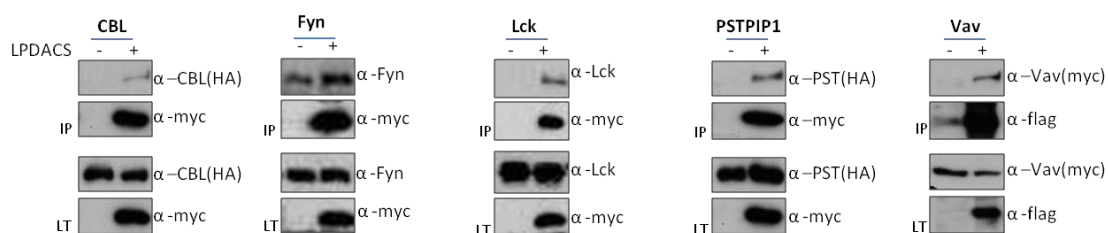


Figura 15. Proteínas que interaccionan con LP-DACS. Se cotransfectaron células HEK-293 con LP-DACS junto con las proteínas a ensayar y se trataron con pervanadato. A continuación se inmunoprecipitó LP-DACS y se detectaron las proteínas que coprecipitaban con dicho fragmento mediante WB. Se muestra un experimento representativo de al menos tres independientes. **A)** Proteínas que presentan una mayor interacción con LP-DACS. **B)** Proteínas que presentan una interacción menor con LP-DACS.

Así, tras realizar estos experimentos podemos agrupar las proteínas que se han incluido en este estudio en tres grandes grupos:

- Proteínas que interaccionan fuertemente con LP-DACS (Figura 15A): ABL, DOK1, DOK2, Fyb, HCK, HPK1, HS1, SKAP55, SKAP-HOM y SLP76.
- Proteínas que interaccionan débilmente con LP-DACS (Figura 15B): CBL, Fyn, Lck, PSTPIP1 y Vav1.
- Proteínas que no interaccionan específicamente con LP-DACS: CRKL, Pirina, WASP, ASC, Csk, Grb2, Itk, Syk, p85, PKA y Zap70.

Con el fin de comprobar que estas interacciones no eran artefactos debidos a la sobreexpresión en un modelo celular que no expresa muchas de estas proteínas, llevamos a cabo la transfección de LP-DACS en una línea celular linfocítica y estudiamos qué proteínas endógenas coprecipitaban con esta construcción. Para evitar la competencia por los sustratos que ocasionaría la propia Lyp endógena, optamos por emplear la línea 49.4 derivada de Jurkat y KO para Lyp (Figura 16A).

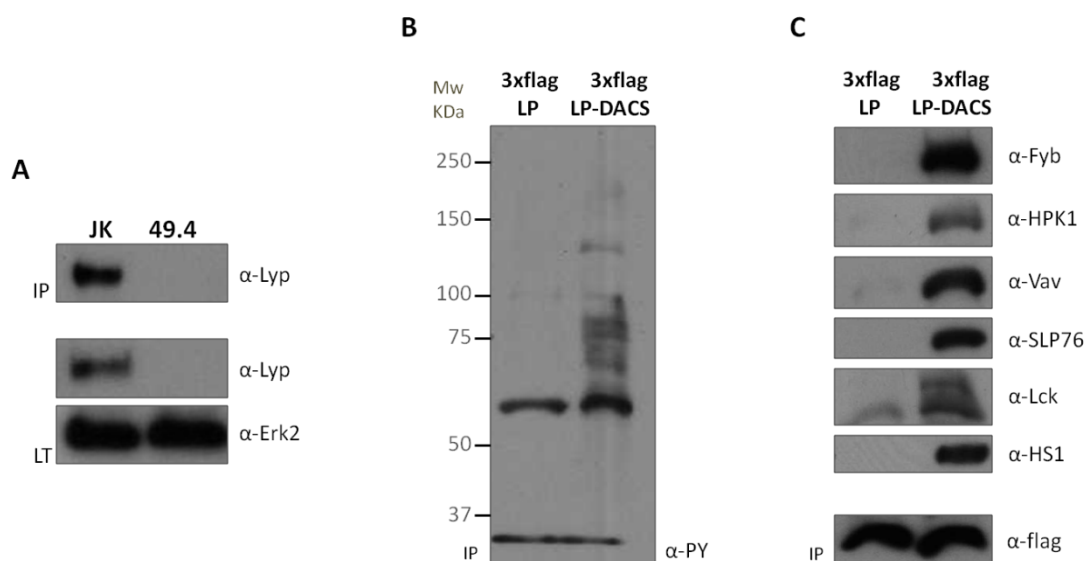


Figura 16. Identificación de proteínas que interactúan con LP-DACS en células 49.4. **A)** Expresión de Lyp en células Jurkat y 49.4 mediante inmunoprecipitación y WB. Se utilizó Erk2 como control de carga. Se muestra un experimento representativo de dos independientes. **B) y C)** Transfección e inmunoprecipitación del dominio fosfatasa de Lyp (LP) y de su mutante atrapador de sustratos (LP-DACS) en la línea 49.4, y posterior detección de las proteínas endógenas coprecipitadas mediante WB con anticuerpo anti-fosfotirosina (B) o anticuerpos específicos (C).

Las bandas que se observan en la Figura 16B corresponden a proteínas que interactúan con el mutante atrapador de sustratos del dominio catalítico de Lyp y se encuentran hiperfosforiladas en tirosinas en ausencia de Lyp endógena, por lo que podemos considerarlas potenciales sustratos de Lyp. Por ese motivo, se procedió a su identificación utilizando anticuerpos específicos correspondientes a las proteínas que anteriormente vimos que interactuaban con LP-DACS (Figura 15). Así, nos fue posible detectar proteínas como Fyb, HPK1, Vav1, SLP76, Lck o HS1 (Figura 16B). Sin embargo, no pudimos detectar otras proteínas como SKAP55, ABL o PSTPIP1.

A continuación, quisimos estudiar la interacción entre las proteínas que habían coprecipitado con LP-DACS y la proteína completa de Lyp, tanto catalíticamente activa (Lyp R) como su mutante atrapador de sustratos (R-DACS); con el fin de corroborar que las interacciones observadas con el fragmento LP-DACS eran reproducibles al emplear la secuencia completa de la proteína. Además, dada la presencia de distintos dominios en estas proteínas, estos experimentos nos serían útiles para tener algún indicio sobre si pueden interactuar con Lyp por otras regiones a parte de su dominio catalítico. El procedimiento fue idéntico al empleado anteriormente. En este caso, se utilizaron como controles positivos de la interacción con Lyp R proteínas cuya

Resultados

coimmunoprecipitación había sido previamente descrita en la literatura: Csk (Cohen *et al.* 1999) y PSTPIP1 (Marcos *et al.* 2014).

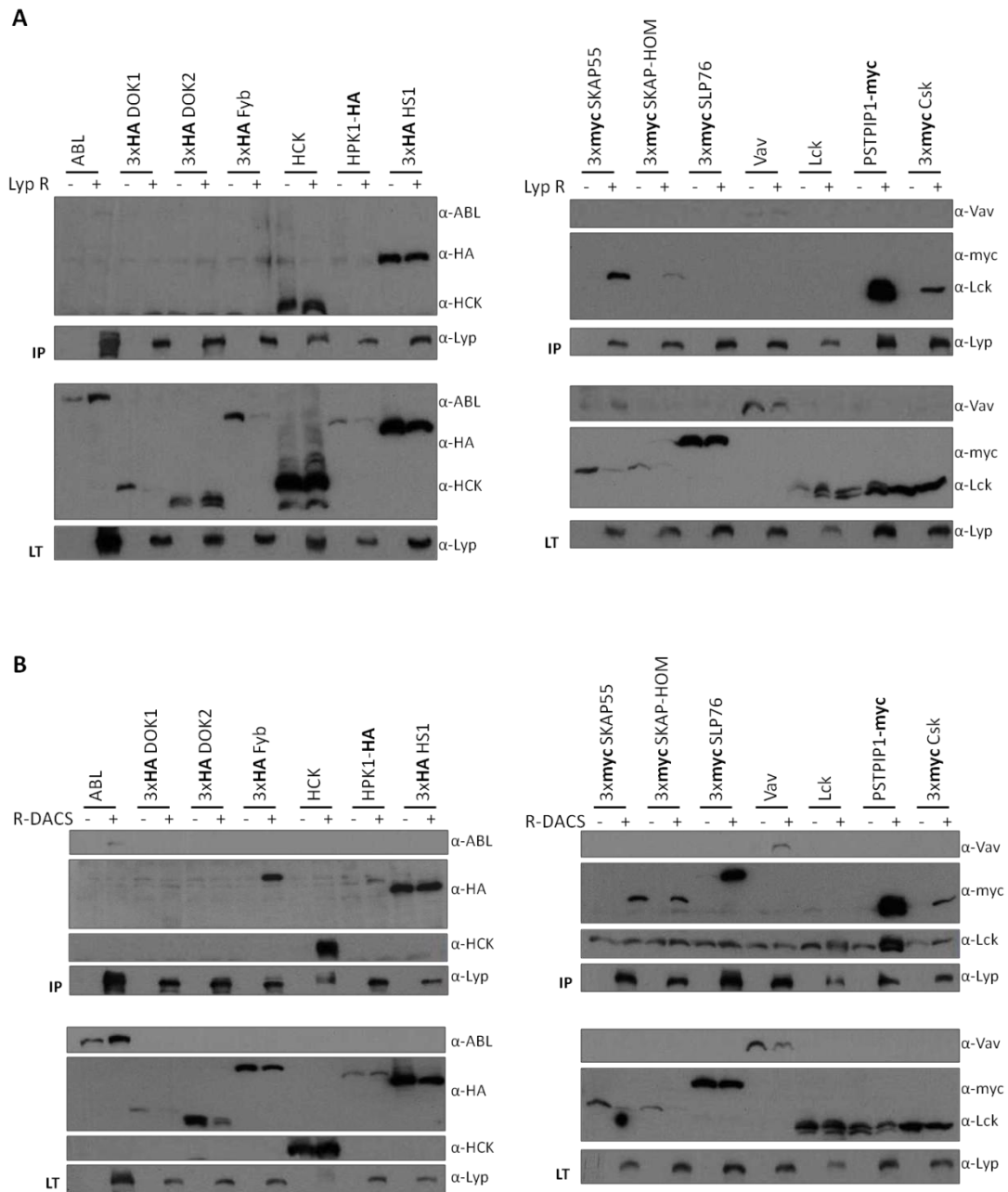


Figura 17. Interacción de Lyp (R y R-DACS) con las proteínas que interaccionaron con LP-DACS. Se cotransfectaron células HEK-293 con Lyp R (A) o Lyp RDACS (B), junto con cada uno de los potenciales sustratos de la fosfatasa. Las células se trataron con PV y se inmunoprecipitó Lyp; posteriormente se detectó la interacción con las distintas proteínas mediante WB.

Como se observa en la Figura 17A, además de Csk y PSTPIP1, solo logramos detectar la interacción de Lyp R con SKAP55 y SKAP-HOM, así como una interacción muy débil con ABL; este hecho podría deberse a que dichas proteínas interaccionan con la fosfatasa por otras regiones, además de hacerlo por el dominio catalítico. Por su

parte HCK, HS1 y Vav1 interaccionaron inespecíficamente con las bolas de agarosa empleadas para inmunoprecipitar Lyp. En cambio, al utilizar el mutante atrapador de sustratos R-DACS (Figura 17B), se observó interacción específica con la mayoría de las proteínas ensayadas, a excepción de: DOK1 y DOK2, que no interaccionan en absoluto con R-DACS por lo que se puso en duda que fueran sustratos de la fosfatasa; y HS1 que de nuevo interaccionó inespecíficamente con las bolas de agarosa empleadas en la inmunoprecipitación.

2. Modulación de la fosforilación de los posibles sustratos de Lyp *in vivo*.

El hecho de que dos proteínas interaccionen es necesario pero no suficiente para poder afirmar que entre ambas existe una relación enzima-sustrato. En nuestro caso, para confirmar que las proteínas que inmunoprecipitan con LP-DACS son sustratos de Lyp, es necesario que ésta enzima sea capaz de desfosforilarlas tanto *in vivo* como *in vitro*. Para llevar a cabo los experimentos de desfosforilación *in vivo* se electroporaron células Jurkat con una kinasa que nos proporcionara un estado inicial hiperfosforilado de la proteína de interés, para así poder compararlo con el estado de fosforilación al cotransfectarla con Lyp. Elegimos como kinasa para realizar estos ensayos el mutante Y505F de Lck que, al tener mutada su tirosina inhibitoria, es un mutante constitutivamente activo (Xu *et al.* 1997), al que nosotros denominaremos de forma abreviada Lck505.

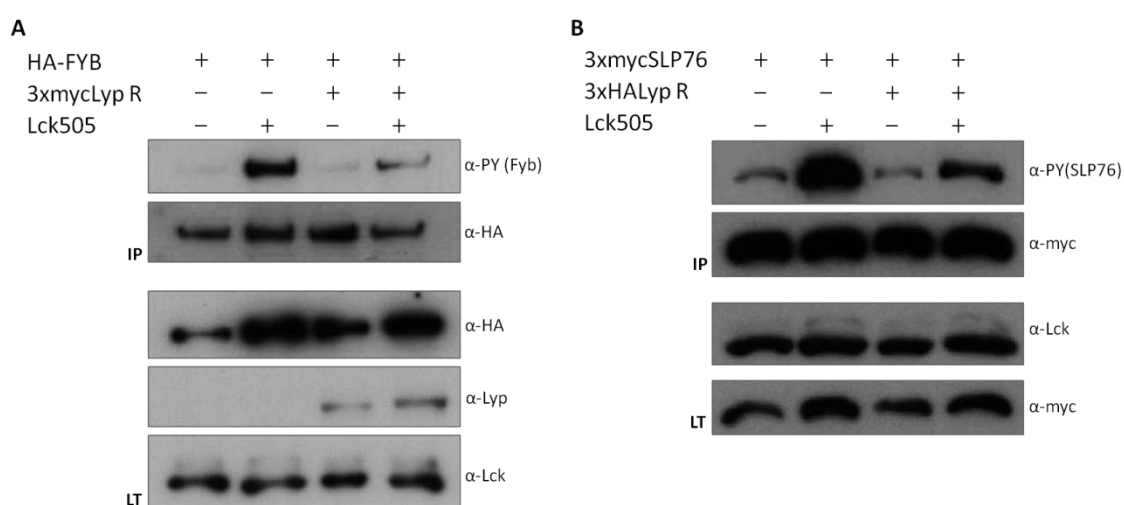


Figura 18. Modulación por Lyp del estado de fosforilación de Fyb y SLP76. Se electroporaron células Jurkat con plásmidos que expresan Fyb (A) o SLP76 (B), junto con Lck505 y/o Lyp; después se inmunoprecipitaron los dos potenciales sustratos y se observó su estado de fosforilación mediante WB. Se muestra un experimento representativo de tres independientes.

Así, Fyb se fosforiló en tirosinas al cotransfectarse con Lck505, y esta fosforilación se revirtió al cotransfectar también Lyp; este mismo efecto se observó para SLP76, que a diferencia de Fyb, se encontraba de forma basal ligeramente fosforilado (Figura 18). Por tanto, la sobreexpresión de Lck505 y/o Lyp altera notablemente los niveles de fosforilación de las proteínas candidatas a ser sustratos de Lyp. Este efecto es tal, que aunque el incremento en los niveles de kinasa/fosfatasa sea muy bajo, o incluso indetectable por *Western Blot* en los lisados celulares; los cambios en la fosforilación son patentes. Aunque los efectos de la sobreexpresión de Lyp son claros, no podemos atribuirle la desfosforilación directa de estas proteínas; ya que dada la compleja maquinaria celular existente, Lyp podría estar ejerciendo su función sobre otras dianas celulares que a su vez influyen en el estado de fosforilación de estas proteínas.

3. Desfosforilación de los posibles sustratos de Lyp *in vitro*.

El siguiente punto en nuestro estudio fue purificar Lyp y llevar a cabo ensayos de desfosforilación *in vitro* con las proteínas inmunoprecipitadas para demostrar la desfosforilación directa y evitar la acción que otras kinasas y/o fosfatasas celulares puedan ejercer sobre estas proteínas en los ensayos *in vivo*.

Las bacterias son una herramienta ampliamente utilizada para la expresión y purificación de proteínas dada su fácil transformación y crecimiento. No obstante, debemos ser conscientes de que no llevan a cabo todas las modificaciones postraduccionales propias de los organismos eucariotas. En ocasiones puede no ser necesario dicho procesado, pero otras veces resulta imprescindible para la correcta conformación y función final de la proteína. Por todo esto, lo primero que hicimos fue comparar la actividad del dominio fosfatasa de Lyp purificado de bacterias frente al purificado de células eucariotas (HEK-293) transfectadas con Lyp. En este ensayo de desfosforilación *in vitro* se empleó el sustrato artificial de fosfatasas pNPP, cuya

hidrólisis puede cuantificarse midiendo la absorbancia a 405 nm y dicha medida será reflejo de la actividad enzimática de la fosfatasa.

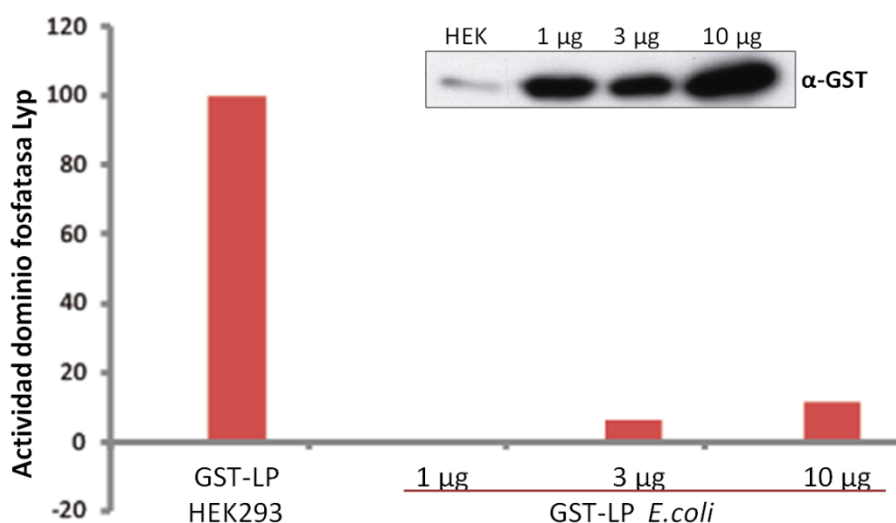


Figura 19. Comparación de la actividad del dominio fosfatasa de Lyp obtenido de células eucariotas y procariotas. Las células HEK-293 se transfectaron con el plásmido pEBG-LP que codifica el dominio fosfatasa de Lyp unido a GST; tras lisar las células se hizo un pull-down de la proteína de fusión, que se empleó para comparar su actividad sobre el pNPP con 1, 3 y 10 µg de la misma proteína de fusión recombinante purificada de *E. coli*. Además se realizó un WB con las muestras empleadas en el ensayo de fosfatasa.

Como resultado de este ensayo de desfosforilación *in vitro* (Figura 19), se constató que la actividad del dominio fosfatasa de Lyp obtenido en células eucariotas era mucho mayor que la del obtenido en bacterias, aún cuando la cantidad de proteína empleada en el ensayo era muy inferior. En vista de este resultado, consideramos que la purificación de Lyp debía hacerse partiendo de células eucariotas. Para ello, desarrollamos las líneas estables HEK-293-3xflagLyp R, que expresa constitutivamente Lyp R fusionada al epítipo 3xflag en su amino terminal, y HEK-293-3xflagLyp W, que expresa la variante polimórfica R620W. Partiendo de estas líneas celulares, pusimos a punto un protocolo de purificación y concentración de ambas proteínas, explicado en detalle en el apartado de material y métodos, y gracias al cual obtuvimos en cada purificación entre 3,5-4 µg de proteína activa con un alto grado de pureza (Figura 20).

Resultados

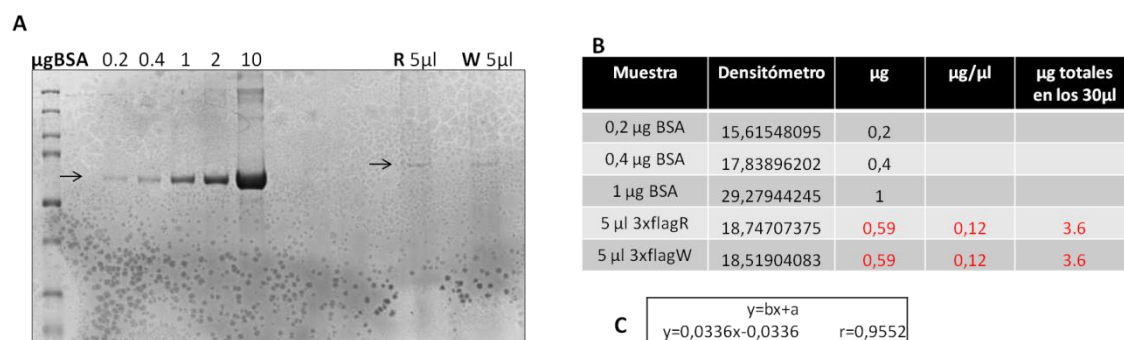


Figura 20. Cuantificación de 3xflagLyp R y 3xflagLyp W purificadas de HEK-293. **A)** Tinción de plata de un gel de poliacrilamida en el que se cargaron 5 µL de cada proteína purificada junto con una recta patrón de BSA con un rango de concentración de 0,2 a 10 µg. Se densitometraron las bandas y se obtuvieron los valores mostrados en **B)** con los que, mediante una regresión lineal, se calculó la ecuación de la recta **C)**, la cual se empleó para calcular la concentración de proteína y los µg totales obtenidos, mostrados en **rojo** en **B)**.

Posteriormente, en HEK-293 se expresaron, trataron con PV e inmunoprecipitaron las proteínas que interactuaban con LP-DACS, y se llevaron a cabo ensayos cinéticos de desfosforilación *in vitro*, en los que se incubaron las distintas proteínas inmunoprecipitadas con 2 µL, aproximadamente 0.25 µg, de fosfatasa purificada y se tomaron muestras a tiempos de 1, 5, 15 y 30 min. Como control en este ensayo se empleó Lck, ya que está descrito en la literatura que Lyp desfosforila la tirosina de activación (Y394) de esta kinasa (Cloutier *et al.* 1995). Aunque Lyp R no es capaz de desfosforilar por completo Lck tras 30 min de incubación a 37°C, a los 15 min la fosforilación de Lck se reduce notablemente (Figura 21). En cambio, en el caso de incubarse con la variante polimórfica R620W, estos efectos se ponen de manifiesto a tiempos más largos.

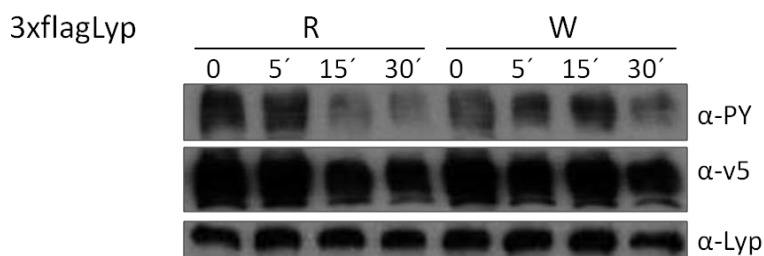


Figura 21. Cinética de desfosforilación de Lck por Lyp R y Lyp W. Lck se obtuvo por inmunoprecipitación a partir de lisados de células HEK-293 transfectadas transitoriamente con Lck-v5 y tratadas con PV. A continuación, Lck se incubó a 37°C con Lyp purificada durante los tiempos indicados. Finalmente, se visualizó su desfosforilación por WB. Se muestra un experimento representativo de cuatro.

Posteriormente, siguiendo el mismo procedimiento, se realizaron ensayos de desfosforilación utilizando el resto de proteínas candidatas a ser sustratos de Lyp (Figura 22). En este caso, con el fin de poder atribuir los cambios observados en la fosforilación de las proteínas a la actividad catalítica de Lyp exclusivamente; se incluyeron controles de las proteínas inmunoprecipitadas incubadas a 37°C durante los mismos tiempos, pero en ausencia de la fosfatasa. Tras llevar a cabo estos experimentos, encontramos un grupo de proteínas a las que Lyp era capaz de desfosforilar más eficientemente que a Lck (Figura 22A); existiendo diferencias en las cinéticas de desfosforilación dentro de las proteínas que integran este grupo. Así, mientras para SKAP-HOM y SKAP55 bastaron 5 min de incubación con la fosfatasa para ser desfosforiladas por completo; Fyb y SLP76 necesitaron tiempos de 15 min. Por último, también formarían parte de este grupo HS1 y Vav1, que a tiempos de 30 min de incubación se desfosforilaron casi por completo. Cabe destacar que no existen diferencias entre Lyp R y Lyp W en la eficiencia de desfosforilación de ninguna de las proteínas englobadas en este grupo.

Paralelamente, se observó como otras proteínas como ABL, DOK1, DOK2, HCK, CBL, Fyn o WASP, que habíamos visto que interaccionaban con LP-DACS, no mostraban cambios en su estado de fosforilación tras 30 min de incubación con cualquiera de las variantes de Lyp (Figura 22B).

Por último, existen tres proteínas que llamaron nuestra atención ya que, aunque solo se desfosforilaban parcialmente, la eficacia catalítica que R y W ejercían sobre ellas fue diferente. Así, HPK1 fue desfosforilada más eficientemente por Lyp R, mientras PSTPIP1 y Pirina lo fueron por el mutante R620W (Figura 22C y D).

Resultados

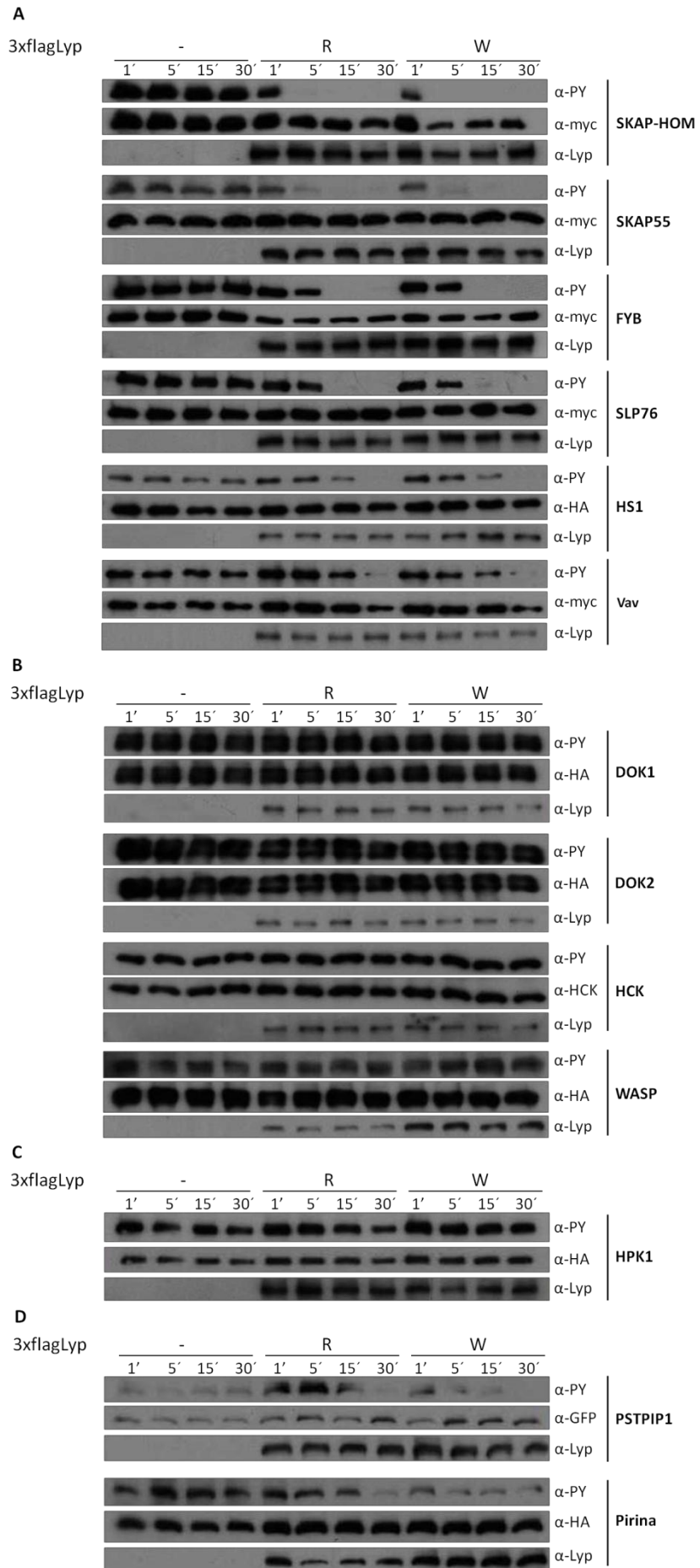


Figura 22. Cinéticas de desfosforilación por Lyp R y Lyp W de las proteínas que interaccionan con LP-DACS. Se siguió el mismo procedimiento que en la Figura 7 y además se incluyó un control incubando las proteínas inmunoprecipitadas a 37°C en ausencia de fosfatasa. **A)** Proteínas que se desfosforilan totalmente tras distintos tiempos de incubación con las fosfatasas. **B)** Proteínas cuyo estado de fosforilación no varía en absoluto. **C)** y **D)** Proteínas sobre las que R y W tienen distinta eficacia catalítica. Se muestra un experimento representativo de al menos tres.

En estos experimentos, observamos que SKAP-HOM, SKAP55, Fyb, SLP76, HS1 y Vav1 son desfosforiladas por Lyp eficientemente. Asimismo, captó nuestra atención el extraño patrón de fosforilación que obtuvimos en el ensayo de desfosforilación *in vitro* para PSTPIP1 y la dificultad que encontramos para reproducir los ensayos de coimmunoprecipitación de esta proteína con LP-DACS. Por su parte, observamos que HS1 interaccionaba inespecíficamente con las bolas de proteína G, lo cual dificulta valorar el grado de afinidad entre ambas proteínas.

Por todo esto, nos propusimos comparar la interacción con LP-DACS de estas proteínas. Para ello cotransfectamos LP-DACS en menor dosis que en ensayos previos junto con cantidades limitantes similares de estos posibles sustratos, que posteriormente se inmunoprecipitaron, y por *Western Blot* se detectó su interacción con LP-DACS (Figura 23). SKAP-HOM, Fyb y SLP76 fueron las proteínas que interaccionaron con mayor afinidad con LP-DACS y, a su vez, eran precisamente las que se desfosforilan por Lyp "*in vitro*" más rápidamente (Figura 22A); mientras que Vav1 o HS1 necesitaron tiempos más largos para desfosforilarse por completo e interaccionaron con menor afinidad con el dominio catalítico de la fosfatasa (Figura 23). Por su parte, para PSTPIP1 no vimos interacción con LP-DACS.

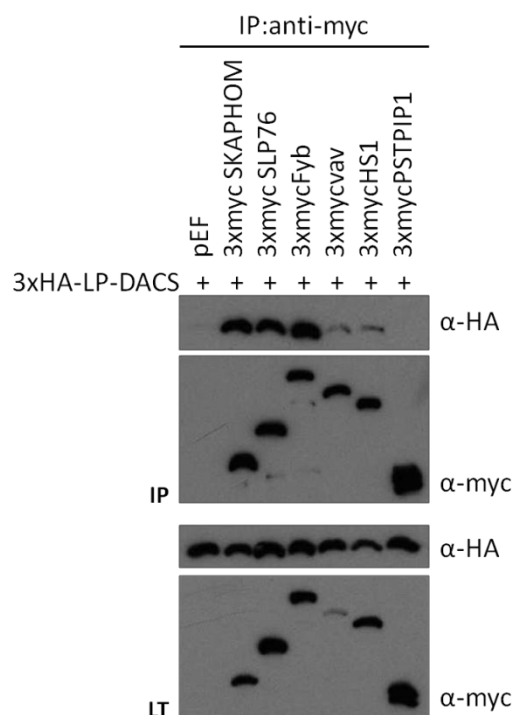


Figura 23. Interacción de los potenciales sustratos de Lyp con LP-DACS. Se transfectaron cantidades limitantes de estas proteínas en células HEK-293 que posteriormente se trataron con PV. Se inmunoprecipitaron las distintas proteínas y se visualizó la interacción de cada una de ellas con LP-DACS por WB.

3.1. Estudio de la interacción entre Lyp y HS1.

Por otro lado, quisimos estudiar más en profundidad la interacción entre Lyp y HS1, ya que pese a que parece que HS1 es sustrato de Lyp; aún no está claro si esta interacción es detectable únicamente con los mutantes atrapadores de sustratos de Lyp o también lo es con la fosfatasa catalíticamente activa. En el caso de que así fuera, ambas proteínas interaccionarían también por otros dominios presentes en su estructura. HS1 presenta un dominio SH3 mediante el cual está descrito que interacciona con WASP y Lck (Martinez-Quiles, 2013). Lyp por su parte presenta motivos ricos en prolina en su extremo carboxi-terminal, de modo que estas proteínas podrían interaccionar por estas regiones.

Para comprobar nuestra hipótesis, primeramente valoramos la interacción de HS1 con Lyp completa, con el fragmento de Lyp que carece de sus tres motivos ricos en prolina (Δ PRM) y con la delección del P3, que se localiza en el extremo carboxilo (Δ CTH). En este experimento se detectó la interacción entre HS1 y Lyp catalíticamente activa (Figura 24A). En cambio, ambas delecciones de los motivos ricos en prolina de Lyp

disminuían esta interacción, siendo el efecto más notable en el caso de Δ PRM. Este hecho apunta a que los motivos P1 y P2 pueden ser de importancia en esta interacción, y cabe la posibilidad de que la mutación asociada a enfermedades autoinmunes R620W, localizada en el P1, produzca cambios en la interacción de la fosfatasa con HS1, de la misma manera que ocurre con Csk (Bottini *et al.* 2004). Por el contrario, al comparar la interacción de la fosfatasa y su mutante con HS1, no observamos diferencias (Figura 24B).

Finalmente, comprobamos que el dominio SH3 de HS1 es el que media la interacción con la fosfatasa activa (Figura 24C), mientras que en la interacción con LP-DACS carece de importancia dado que en este caso lo esencial son las fosfotirosinas presentes en otras regiones de HS1.

Con todo esto podemos afirmar que ambas interacciones (SH3-HS1—PRM-Lyp y pY-HS1—LP-Lyp) coexisten y es probable que el SH3 de HS1, mediante la interacción con Lck y Lyp, sea crucial en la regulación del estado de fosforilación de la proteína.

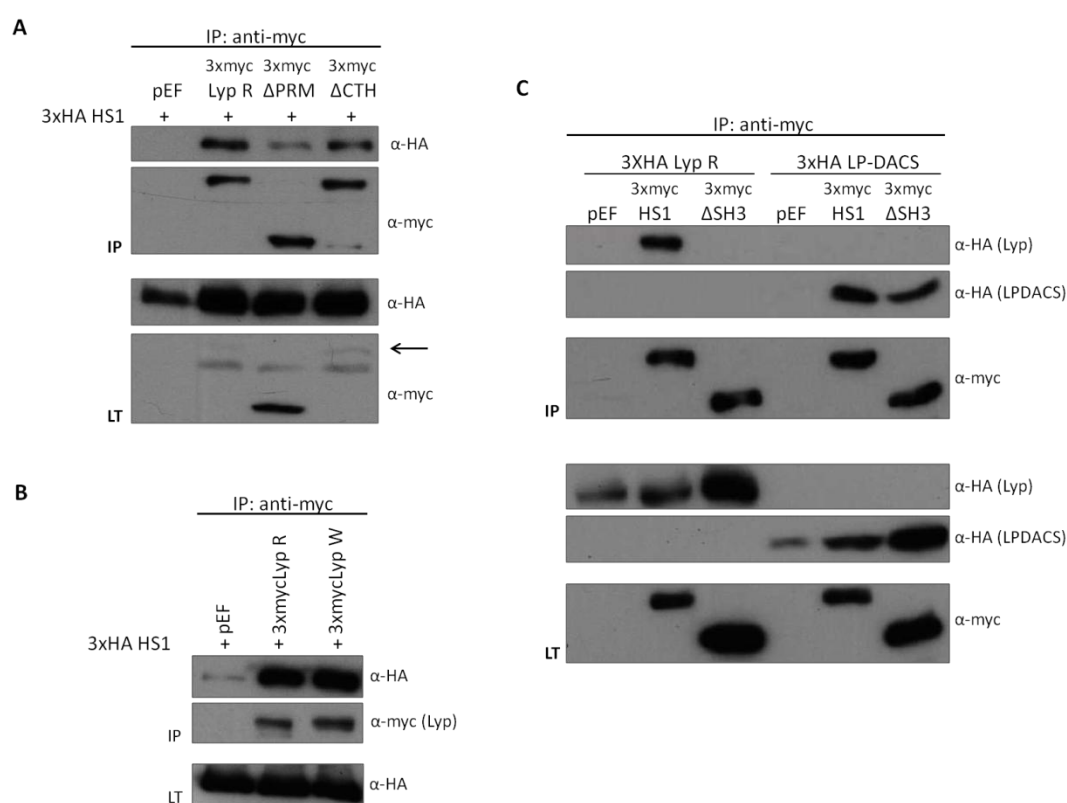


Figura 24. Interacción de Lyp y HS1. Se transfectaron células HEK-293 con los distintos plásmidos que se indican en cada experimento y se valoró la interacción mediante tratamiento con PV, ensayos de coimmunoprecipitación y WB. **A)** Interacción de HS1 con Lyp catalíticamente activa y fragmentos de la enzima en los que se han deletado motivos ricos en prolina. **B)** Interacción de HS1 con Lyp R y Lyp W. **C)** Implicación del dominio SH3 de HS1 en su interacción con Lyp.

4. Identificación de los sitios de desfosforilación de Lyp en sus potenciales sustratos.

Una vez encontradas las proteínas con las que Lyp era capaz de interactuar y desfosforilar con mayor eficacia, dentro de las incluidas en este estudio; nos propusimos identificar cuáles eran las tirosinas que esta enzima desfosforilaba.

Paralelamente a la realización de nuestros experimentos, se publicó un estudio realizado por Yu *et al.*; en el cual, teniendo en cuenta la importancia de los aminoácidos que flanquean la P-Tyr que se une al centro activo de Lyp en el reconocimiento y en la eficacia catalítica de este enzima, decidieron emplear una estrategia de “*inverse alanine scanning*” (Yu *et al.* 2011), gracias a la cual consiguieron determinar las dos secuencias peptídicas consenso que serían reconocidas y desfosforiladas por Lyp con las mayores constantes cinéticas de entre todas las combinaciones posibles (Tabla 3). En este mismo estudio, además se identificó por primera vez la interacción de SKAP-HOM con mutantes D195A y C277S de Lyp, y se postuló la Tyr75 como sitio principal que Lyp desfosforilaría en esta proteína.

Tyr(P) peptide	$k_{cat}/K_m \times 10^{-5}$ $M^{-1}s^{-1}$
Ac-YGEEpYDDL _Y -NH ₂ consensus peptide 1	46 ± 0.5
Ac-YGYEpYDDEY-NH ₂ consensus peptide 2	21 ± 0.1
Ac-DGEEpYDDPF-NH ₂ SKAP-HOM Tyr ⁷⁵ peptide	40 ± 0.3

Tabla 3. Péptidos consenso que Lyp desfosforila con una mayor eficacia catalítica y sitio preferente de desfosforilación en SKAP-HOM. Imagen tomada de (Yu *et al.* 2011).

Empleamos estos péptidos consenso como “*query*” para realizar una búsqueda utilizando la herramienta bioinformática *Site Search* de *PhosphositePlus* (<http://www.phosphosite.org/siteSearchAction.do>). Como resultado obtuvimos una lista de péptidos pertenecientes a distintas proteínas que presentaban la fosfotirosina flanqueada por una secuencia similar a las consenso. De todas ellas fijamos nuestra atención en las fosfotirosinas de SKAP-HOM, Fyb, SLP76, HS1 y Vav1. (Tabla 4).

CONSENSUS ZHANG	YGEEYDDL
SKAP-HOM Y75-p	DAEDGEEYDDPFAGP
HS1 Y378-p	EPEPENDYEDVEEMD
HS1 Y397-p	EDEPEGDYEEVLEPE
SLP76 Y113-p	SSFEEDDYESPNDDQ
SKAP-HOM Y261-p	QPIDDEIYEE LPEEE
VAV1 Y174-p	EAEGDEIYEDLMRSE
FYB Y462-p	QDSEGETYEDIEASK
FYB Y651-p	LDMGDEVYDDVDTSD
SKAP-HOM Y237-p	YDERGELYDDVDHPL
FYB Y595-p	IEDDQEVYDDVAEQD
FYB Y771-p	ADNDGFIYDDIADGC
SLP76 Y128-p	DGEDDGDYESPNEEE
SLP76 Y145-p	PVEDDADYEPSPND
VAV1 Y192-p	MPPKMTIYDKRCCCL
VAV1 Y160-p	VEEDEDLYDCVNEEE
FYB Y625-p	PPPDDIYDGIEED

Tabla 4: Péptidos pertenecientes a los sustratos de Lyp, con una secuencia similar a la encontrada por Yu *et al.* 2011. Resultado de la búsqueda en Phosphosite del NCBI, los péptidos se encuentran ordenados por el número de aminoácidos ácidos que coinciden con el consenso y están destacados en rojo.

En base a esto, mediante mutagénesis dirigida, obtuvimos vectores que expresaban mutantes simples o múltiples en los que las tirosinas de interés se habían sustituido por fenilalaninas, y se estudió la interacción de dichos mutantes con LP-DACS; de modo que si al mutar una de estas tirosinas se abole la interacción entre Lyp y la proteína mutada, dicha tirosina sería un sitio de desfosforilación por Lyp, como ocurre con el mutante Y394F de Lck (Figura 25).

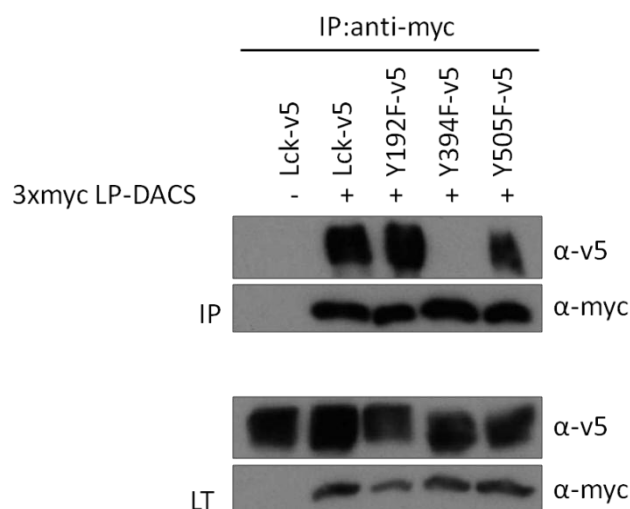


Figura 25. Interacción de LP-DACS con Lck y sus mutantes en Y. Se cotransfectaron células HEK-293 con los plásmidos de interés, se trataron con PV y se inmunoprecipitó LP-DACS. Finalmente se valoró la importancia de las distintas Tyr en la interacción mediante WB. Se muestra un experimento representativo de tres independientes.

4.1. Identificación de los sitios de desfosforilación de Lyp en SKAP-HOM.

El estudio de 2011 de Yu *et al.*, sugiere que la Tyr75 de SKAP-HOM es sustrato de Lyp. En cambio, en nuestra búsqueda, las tirosinas Tyr237 y Tyr261 también presentan aminoácidos flanqueantes similares a las secuencias consenso descritas, destacando la presencia de aminoácidos ácidos en las posiciones -2, +1 y +2.

Por ello, generamos los mutantes simples de estas tres tirosinas y evaluamos su interacción con LP-DACS (Figura 26). Nuestros experimentos mostraron que el principal sitio de interacción con Lyp es la Tyr237, mientras que los sitios Tyr261 y Tyr75 serían sitios menos importantes para la interacción y desfosforilación por Lyp.

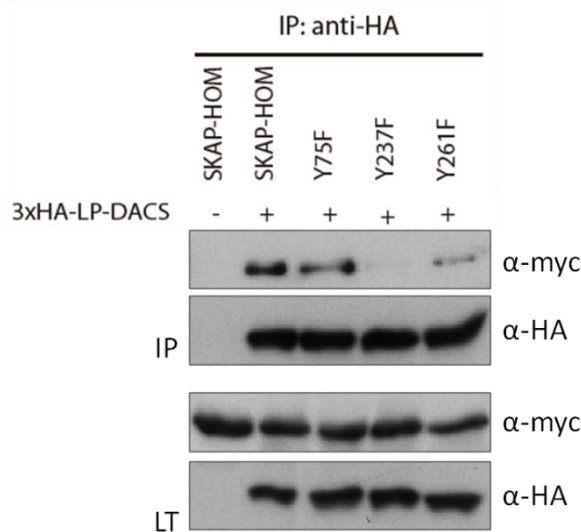


Figura 26. Interacción de LP-DACS con SKAP-HOM y sus mutantes en Y. Se cotransfectaron células HEK-293 con los plásmidos de interés, se trataron con PV y se inmunoprecipitó LP-DACS. Finalmente se valoró la importancia de las distintas Tyr en la interacción mediante WB. Se muestra un experimento representativo de tres independientes.

4.2. Identificación de los sitios de desfosforilación de Lyp en SKAP55.

Dada la homología existente entre SKAP-HOM y SKAP55, decidimos comparar las secuencias de ambas proteínas para determinar si las tirosinas identificadas en SKAP-HOM estaban conservadas en ambas proteínas.

Q86WV1	SKAP1_HUMAN	1	-----MQAAALPEEIRWLEDAEEFLAEGLRNENLSAVARDHRDHILRGFQQIKARYY	53
O75563	SKAP2_HUMAN	1	MPNPSSTSSPYLPEEIRNLADVETFFVADILKGENLSKKAKEKRESLIKKIKDVKSIYL	60
			***** * * * * : * : * * * * * : : : : : * : *	
Q86WV1	SKAP1_HUMAN	54	WDFQPQGGDIGQDSDDNHSGLTGLSLTSDAPFLS--DYQDEGMEDIVKGAQELDNVIKQ	111
O75563	SKAP2_HUMAN	61	QEFQDKGDAEDGEHYDDPFAGPPDITISLASERYDKDDEAPSDGAQFPPIAAQDLPFVFKA	120
			: * * : * : : * : * : * : : : : : * : * : * * * * * * * * * * * * * * *	
Q86WV1	SKAP1_HUMAN	112	GYLEKSKDHSFFGSEWQKRCVVSRLGFYYYANEKSKQPKGTFLIKGYGVRMAPHLRRD	171
O75563	SKAP2_HUMAN	121	GYLEKRRKDHSLGFEWQKRCALSKTIVFYYYGSDKDKQKGEFAIDGYSVRMNTLRKD	180
			***** : ***** * * * * * : : * * * * * : * * * * * * * * * * * * * * *	
Q86WV1	SKAP1_HUMAN	172	SKKESCFELTSQDRRSYEFTATSPAARDWVDQISFLLKDLSSLTIPYEEDEEEEEEKEET	231
O75563	SKAP2_HUMAN	181	GKKDCCFEISAPDKRIYQFTAASPKDAEAWVQQLKFLVQDMESDIIPEDYDER---GEEL	236
			. * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * * * * * * * * * * *	
Q86WV1	SKAP1_HUMAN	232	YDDIIGFDSPSCGSCQCRPTILPGSVGIKEPTEEKEEEDYFVLRFDEEHDLEE-----	283
O75563	SKAP2_HUMAN	237	YDDVHPLP-----ISNPLT----SSQPIDEEYFELPEEEDSAPVKVEEQRK	281
			: * * : * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * * *	
Q86WV1	SKAP1_HUMAN	284	-----DESGTRRKGVDYASYOGLWDCGDPDELSFORGDLIRILSKEYNMYGWWVWVDEL	338
O75563	SKAP2_HUMAN	282	MSQDSVHHTSGDKSTDIYANFYQGLWDCIGAFSDLELSFKRGDVIYILSKEYNRYGWWVWVEM	341
			: * : * * : *	
Q86WV1	SKAP1_HUMAN	339	NSLVGIVPKAYLTITFAFEVEER	359
O75563	SKAP2_HUMAN	342	KGAIGLVKAYIMEMYDI---	359
			: . : * * * * * : * : *	

Figura 27. Alineamiento de las secuencias de SKAP55 y SKAP-HOM destacando las Y que Lyp podría desfosforilar. Se realizó un BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) con las secuencias de SKAP55 (SKAP1) y de SKAP-HOM (SKAP2). En rojo se han destacado las tirosinas 75, 237 y 261 de SKAP-HOM y sus equivalentes en la proteína homóloga; en negro sus aminoácidos flanqueantes, y en amarillo se ha destacado la presencia de aminoácidos ácidos en regiones cercanas.

Como se observa en el alineamiento de las secuencias de ambas proteínas (Figura 27), la Tyr237 que habíamos caracterizado como sitio preferente de interacción con Lyp en SKAP-HOM, seguida de la Tyr261; se corresponderían con la Tyr232 y Tyr271 de SKAP55. Además los aminoácidos flanqueantes de ambas tirosinas están bastante conservados (recuadro negro), existiendo una mayor presencia de aminoácidos ácidos en las secuencias que preceden a las tirosinas de SKAP55 (amarillo). Por otra parte, la Tyr75 de SKAP-HOM no está conservada.

4.3. Identificación de los sitios de desfosforilación de Lyp en Fyb.

En el caso de Fyb, la aproximación bioinformática empleada nos aportó cinco posibles sitios en los que Lyp podría desfosforilar a esta proteína. Cuatro de ellos (Tyr462, Tyr595, Tyr651 y Tyr771) estaban flanqueados por tres aminoácidos ácidos en las posiciones -2, +1 y +2; mientras que la Tyr625 solo estaba rodeada por dos, los aspárticos en las posiciones -2 y +1.

De entre todas las posibilidades existentes, inicialmente decidimos mutar las tirosinas 595, 651 y 771, ya que eran las que mejor se ajustaban al consenso. En cambio, ninguno de los mutantes simples presentó disminución de su interacción con LP-DACS (Figura 28A) por lo que generamos los dobles y el triple mutante. De todos

Resultados

ellos, para el único que se observó un efecto claro de disminución de la interacción fue el mutante triple (Y595/651/771F); que, a pesar de todo, seguía interaccionando débilmente con LP-DACS, lo que sugiere que existen otras tirosinas adicionales que son posibles sitios de desfosforilación por Lyp.

Ante este resultado, decidimos mutar la Tyr462 tomando como molde el triple mutante del que ya disponíamos, para así generar Fyb-4YF (Y462/595/651/771F) y evaluar su interacción con LP-DACS. Este mutante 4YF interacciona con LP-DACS con la misma afinidad que lo hace el 3YF (Figura 28B), por lo que la Tyr462 no parece un sitio importante para interaccionar con Lyp y la débil interacción observada en el triple mutante se debería a otras tirosinas, como puede ser la Tyr625 u otras tirosinas con secuencias flanqueantes menos similares a las empleadas como *query*.

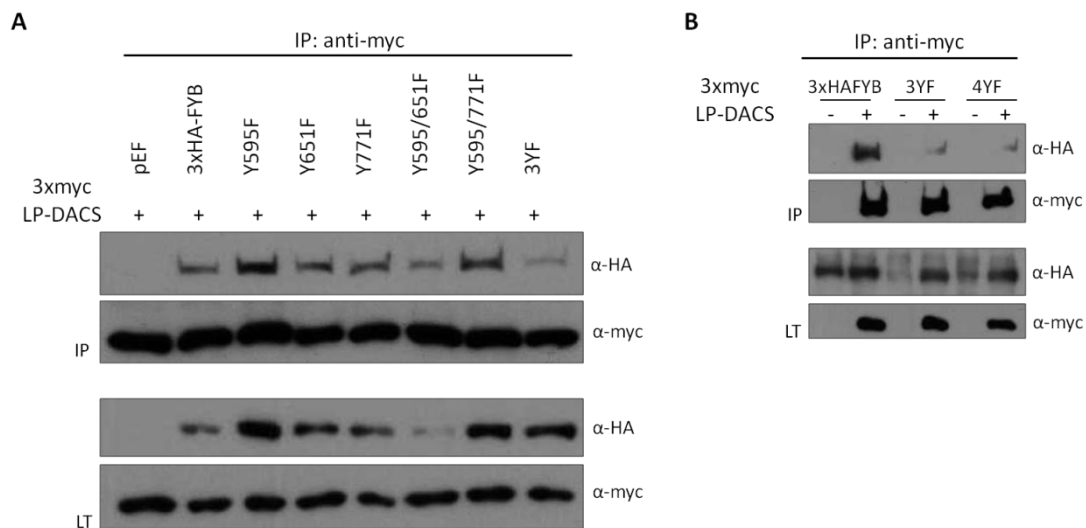


Figura 28. Interacción de LP-DACS con Fyb y sus mutantes en Y. Se cotransfectaron células HEK-293 con los plásmidos de interés, se trataron con PV y se inmunoprecipitó LP-DACS. Finalmente se valoró la importancia de las distintas Tyr en la interacción mediante WB. Se muestra un experimento representativo de tres independientes. **A)** Estudio de la interacción con mutantes simples y múltiples de las tirosinas 595,651 y 771. **B)** Estudio de la relevancia de la Tyr462 en la interacción con LP-DACS.

4.4. Identificación de los sitios de desfosforilación de Lyp en SLP76.

La aproximación bioinformática empleada nos proporcionó tres sitios susceptibles a ser desfosforilados por Lyp (Tyr113, Tyr128 y Tyr145) en SLP76, de los cuales la Tyr113 presentaban tres aminoácidos ácidos flanqueantes (-2,-1 y +1), mientras que las Tyr128 y Tyr145 solo poseían dos (-1 y +1). Dado que los mutantes simples no presentaron cambios detectables en la interacción de SLP76 con LP-DACS

(Figura 29A), se generó el mutante doble (Y113/128F), que presentó una visible disminución en la interacción, y el mutante triple 3YF (Y113/128/145F), para el que no se detectó interacción (Figura 29B). Por lo tanto, los tres aminoácidos estarían implicados en la interacción de SLP76 con el dominio catalítico de Lyp.

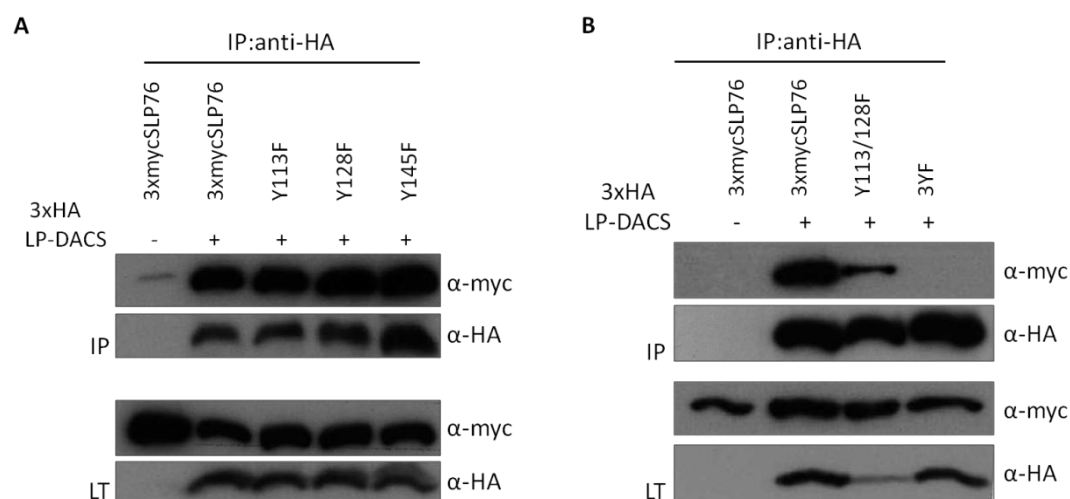


Figura 29. Interacción de LP-DACS con SLP76 y sus mutantes en Y. Se cotransfectaron células HEK-293 con los plásmidos de interés, se trataron con PV y se inmunoprecipitó LP-DACS. Finalmente se valoró la importancia de las distintas Tyr en la interacción mediante WB. Se muestra un experimento representativo de tres independientes. **A)** Estudio de la interacción con mutantes simples. **B)** Estudio de la interacción con un mutante doble y triple.

4.5. Identificación de los sitios de defosforilación de Lyp en HS1.

En el caso de la proteína HS1, solo encontramos dos sitios posibles de defosforilación por Lyp y ambos presentaban aminoácidos ácidos flanqueantes en las posiciones -1, +1 y +2. Los mutantes simples de estas tirosinas (Y378F y Y397F) no produjeron cambios notables en la interacción con LP-DACS (Figura 30); en cambio, cuando utilizamos el mutante doble Y378/397F, dicha interacción se abolió completamente, por lo que parece que ambos sitios participan en la interacción de HS1 con el dominio catalítico de Lyp y, en consecuencia, serían susceptibles de ser defosforilados por esta fosfatasa.

Resultados

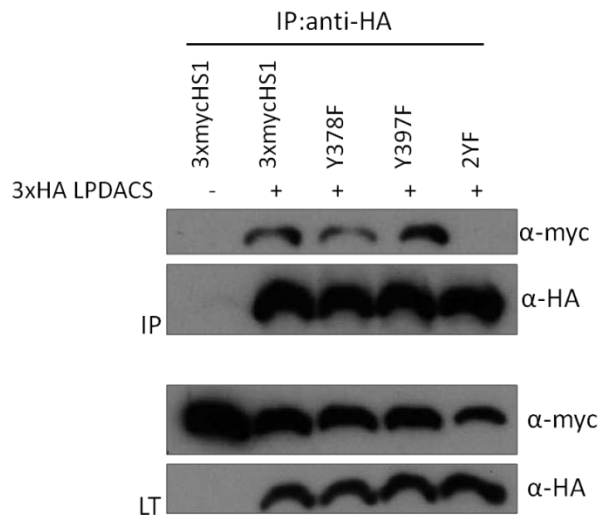


Figura 30. Interacción de LP-DACS con HS1 y sus mutantes en Y. Se cotransfectaron células HEK-293 con los plásmidos de interés, se trataron con PV y se inmunoprecipitó LP-DACS. Finalmente se valoró la importancia de las distintas Tyr en la interacción mediante WB. Se muestra un experimento representativo de tres independientes.

Finalmente, con las secuencias peptídicas que contienen las tirosinas identificadas como sitios de desfosforilación por Lyp y haciendo uso de la herramienta bioinformática WebLogo (<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>), se obtuvo un Logo (Figura 31) en el que se pueden observar los aminoácidos que flanquean a la PY por los que el centro activo de Lyp tiene preferencia.

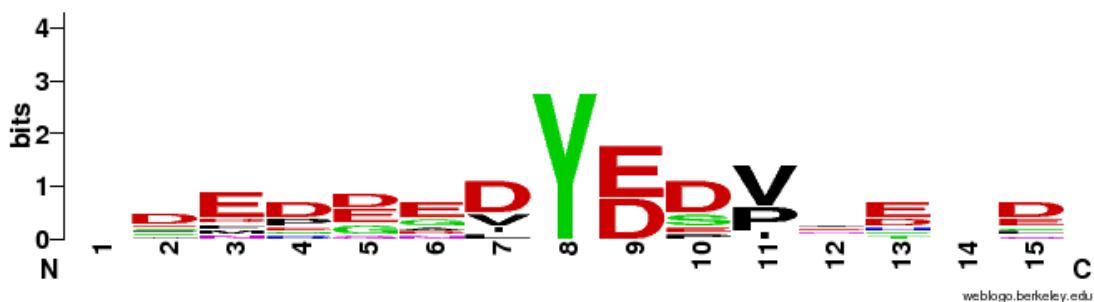


Figura 31. Logo de la secuencia flanquante de las tirosinas desfosforiladas por Lyp. Se empleó la herramienta bioinformática WebLogo y se incluyeron como *inputs* las secuencias peptídicas correspondientes a la Tyr237 de SKAP-HOM; las tirosinas 595, 651 y 771 de Fyb; las tirosinas 113, 128 y 145 de SLP76; y las tirosinas 378 y 397 de HS1.

5. Expresión y localización subcelular de Lyp.

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio compararon la expresión de Lyp en los diferentes tipos celulares del linaje hematopoyético, comprobando que esta fosfatasa es más abundante en líneas celulares establecidas como Jurkat o THP-1 y más escasa en células provenientes de cultivos primarios (Marcos *et al.* 2014). En cuanto a su localización, Lyp se distribuye homogéneamente en el citoplasma celular, mientras que no se observa presencia de esta fosfatasa en el núcleo (Figura 32A); lo cual está en concordancia con estudios previos de localización de esta fosfatasa (Bottini *et al.* 2006).

La línea celular HEK-293, empleada para la identificación de sustratos de Lyp en este trabajo, no expresa esta fosfatasa; por lo que quisimos observar su patrón de localización al transfectarla en este tipo celular. Así, clonamos Lyp unida al fluoróforo EGFP y al visualizarla mediante microscopía confocal (Figura 32B, izquierda), observamos un patrón de localización muy alterado con respecto al normal, encontrándose mayoritariamente agregada en el núcleo; en cambio, si detectábamos mediante inmunofluorescencia la fosfatasa fusionada al epítipo 3xflag su distribución era citoplasmática al igual que en las células que la expresan endógenamente (Figura 32B, centro y derecha).

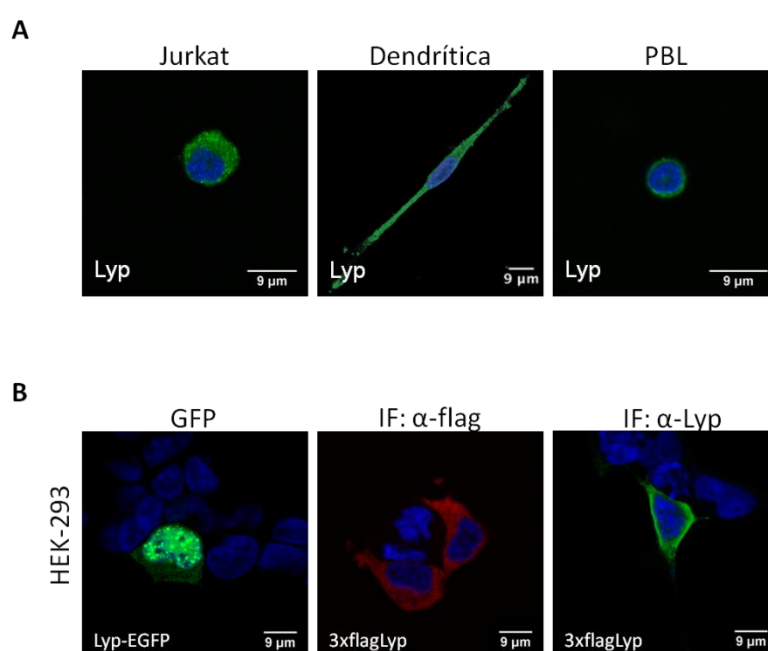


Figura 32. Localización de Lyp en distintos tipos celulares. A) Visualización de la localización de Lyp endógena en JK, dendríticas y PBLs mediante IF. Como anticuerpo primario se empleó anti-Lyp y como secundario Alexa Fluor (488) anti-goat. **B)** Localización en HEK-293 de la

Resultados

construcción Lyp-EGFP vs. 3xflagLyp. Las células se transfectaron con cada uno de los plásmidos, en el caso de que la proteína estuviera marcada con el fluoróforo (izquierda) simplemente se fijaron con PFA y se llevó a cabo la tinción de los núcleos, mientras que cuando la proteína se expresó fusionada al epítipo 3xflag (centro y derecha) fue necesario realizar una IF.

6. Colocalización de Lyp y sus posibles sustratos en HEK-293.

En este punto, quisimos comprobar que las proteínas identificadas como sustratos de Lyp tenían la misma localización subcelular que la fosfatasa para que así fuera posible su interacción *in vivo*.

En primer lugar, evaluamos la localización subcelular de cada una de las proteínas de forma independiente, lo que nos serviría como control a la hora de determinar si su coexpresión producía alguna alteración en su localización. En el caso de Lyp, en base a lo observado anteriormente (Figura 32), decidimos expresar la proteína de fusión 3xflagLyp R y detectarla mediante inmunofluorescencia; además comprobamos que su mutante atrapador de sustratos 3xflagLyp R-DACS, también presentó una localización citoplasmática; concentrándose en zonas próximas a la membrana celular (Figura 33A). En cuanto a las proteínas caracterizadas como sustratos de Lyp (Figura 33B); SKAP-HOM, Fyb y SLP76, se localizan homogéneamente por todo el citoplasma celular. En el caso de SLP76 se observó que cuando se sobreexpresaba en exceso tenía cierta tendencia a acumularse y agregarse en el núcleo (Figura 33B, célula de la izquierda). Lck, HS1 y Vav1 se localizan principalmente en la membrana plasmática; cabe destacar que en el caso de Lck se observaron agregados en la membrana, mientras que HS1 y Vav1 se distribuyen por ésta de una forma más homogénea.

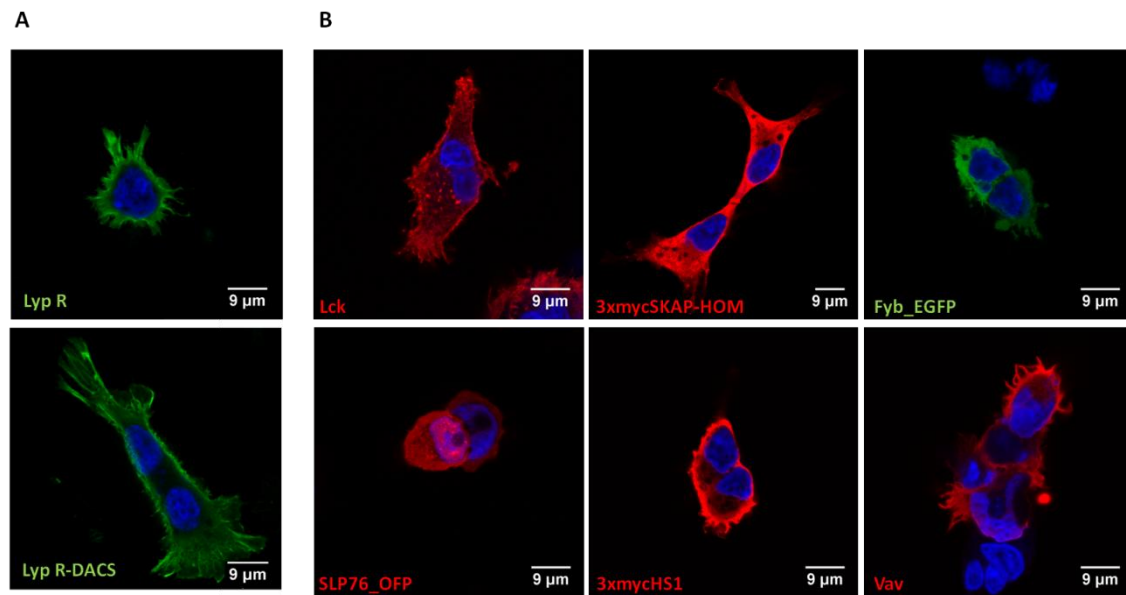


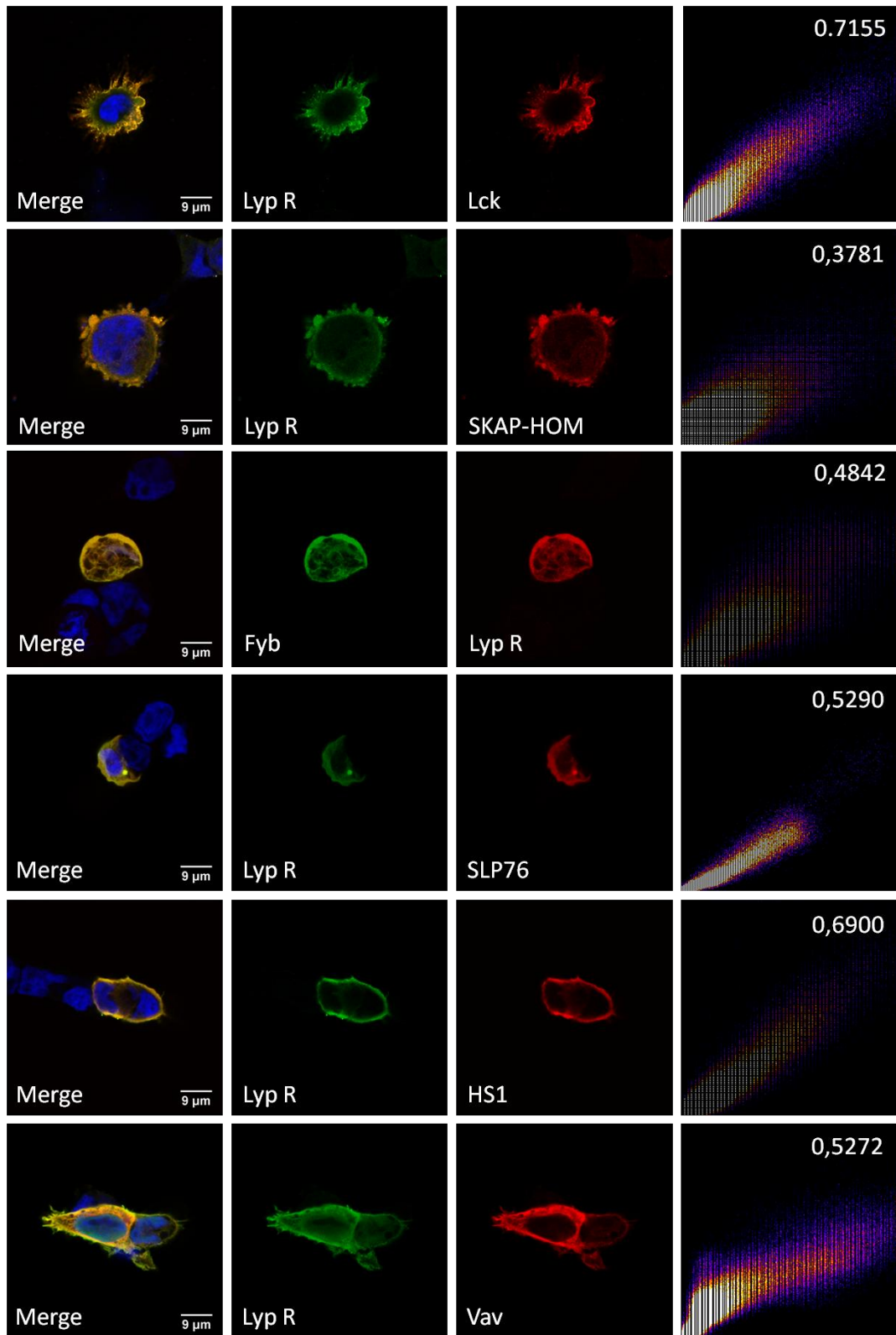
Figura 33. Localización subcelular de Lyp y de sus potenciales sustratos. A) Lyp R y R-DACS fusionadas al epítipo 3xflag se transfectaron en células HEK-293 para su posterior visualización por IF. Se empleó como anticuerpo primario anti-Lyp y como secundario Alexa Fluor (488) anti-goat. **B)** Se transfectaron los potenciales sustratos de Lyp en células HEK-293 y se estudió su localización. En el caso de Fyb y SLP76, la visualización fue directa ya que se expresaron como proteínas de fusión a EGFP y OFP respectivamente. Para 3xmycSKAP-HOM y 3xmycHS1 se realizó una IF empleando como anticuerpo primario anti-myc y como secundario Alexa Fluor (594) anti-mouse. En el caso de la IF de Lck y Vav1 se emplearon anticuerpos primarios específicos para estas proteínas, y como secundarios Alexa Fluor (594) anti-mouse y Alexa Fluor (594) anti-rabbit respectivamente.

Una vez conocido el patrón de localización de estas proteínas de forma independiente, llevamos a cabo los ensayos de colocalización. Todas estas proteínas colocalizaron de igual manera tanto con Lyp R (Figura 34A) como con R-DACS (Figura 34B); sin que el empleo del mutante atrapador de sustratos supusiera cambios relevantes, es decir, la localización de las proteínas sustrato no es dependiente de su interacción con el dominio catalítico de Lyp.

El hecho de que las proteínas que hemos identificado como sustratos tengan la misma localización subcelular que la fosfatasa es necesario para que ambas puedan interactuar y Lyp pueda desfosforilarlas *in vivo*. Los índices de colocalización de Pearson obtenidos tanto para R como R-DACS son bastante similares y las pequeñas diferencias que pueden existir las atribuimos a los distintos niveles de expresión.

Resultados

A



B

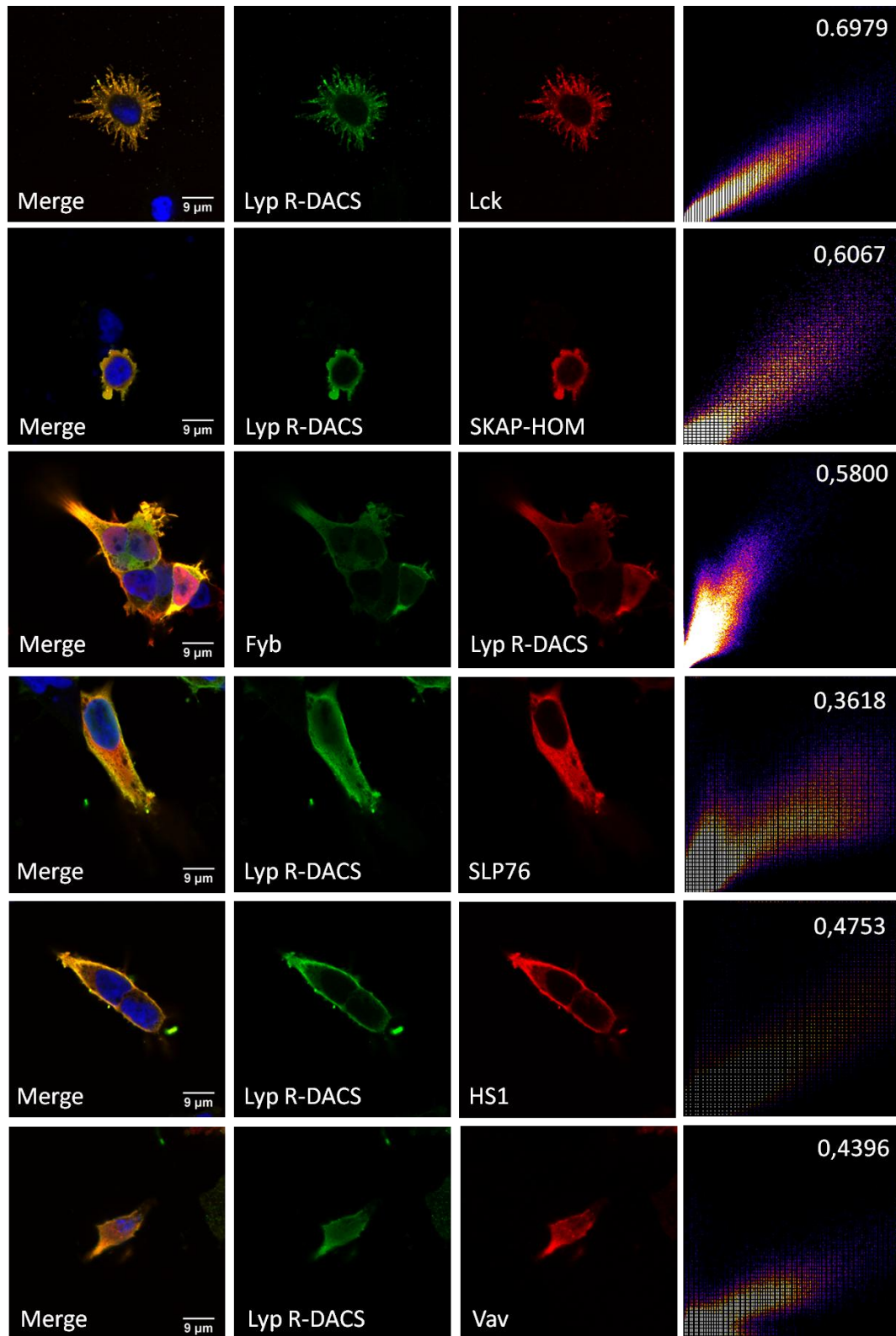


Figura 34. Colocalización de las proteínas identificadas como sustratos con Lyp R y R-DACS, ScatterPlot y Coeficiente de Pearson. A) Cotransfección en HEK-293 de Lyp R con Lck, SKAP-HOM, Fyb, SLP76, HS1 y Vav1. Posterior visualización por microscopía confocal detectando las proteínas siguiendo el mismo procedimiento que en la Figura 33. **B)** Cotransfección en HEK-

293 de Lyp R-DACS con Lck, SKAP-HOM, Fyb, SLP76, HS1 y Vav1. Posterior visualización por microscopía confocal empleando las mismas técnicas para la detección que en la Figura 33.

7. Efecto de Lyp en la formación de *microclusters*.

Las proteínas identificadas en este trabajo como sustratos de Lyp son importantes en el desarrollo de las células T y en la señalización del TCR. En su mayoría, éstas proteínas se fosforilan tras la activación del TCR, como es el caso de SLP76, que es fosforilada y activada por Zap70 (Bubeck Wardenburg *et al.* 1996), y dicha fosforilación es esencial para el ensamblaje de los complejos señalizadores conocidos con el nombre de *microclusters* o *microclusters* de SLP76. Dada la importancia del estado de fosforilación de SLP76 para el ensamblaje de estos complejos multiproteicos, y teniendo en cuenta que Lyp desfosforila esta proteína, pensamos que la sobreexpresión y/o eliminación de esta fosfatasa podría producir alteraciones en la formación, estabilidad o distribución de los *microclusters*.

7.1. Cinética de formación de *microclusters* en células JK.

Los *microclusters* de SLP-76 son estructuras visibles en células Jurkat al microscopio confocal tras la estimulación del TCR con anti-CD3 (Lasserre *et al.* 2010). Inicialmente, nos propusimos ver la formación de estos complejos multiproteicos, así como comprobar si Lyp se localizaba en ellos dada su capacidad para interaccionar y desfosforilar varias de las proteínas que forman parte de estas estructuras.

Para llevar a cabo nuestro objetivo, primeramente estudiamos la colocalización de SLP76 con Lyp en células JK en reposo, para corroborar que, al igual que ocurre en HEK-293, ambas proteínas colocalizan (Figura 35A). Una vez comprobado que ambas proteínas colocalizaban en el citosol, donde se encuentran homogéneamente distribuidas; llevamos a cabo la estimulación de estas células por el TCR para observar la formación de los *microclusters* y determinar si Lyp forma parte de estas microestructuras. Esta estimulación se llevó a cabo dejando que las células se depositaran sobre cristales que habían sido previamente tratados con anti-CD3.

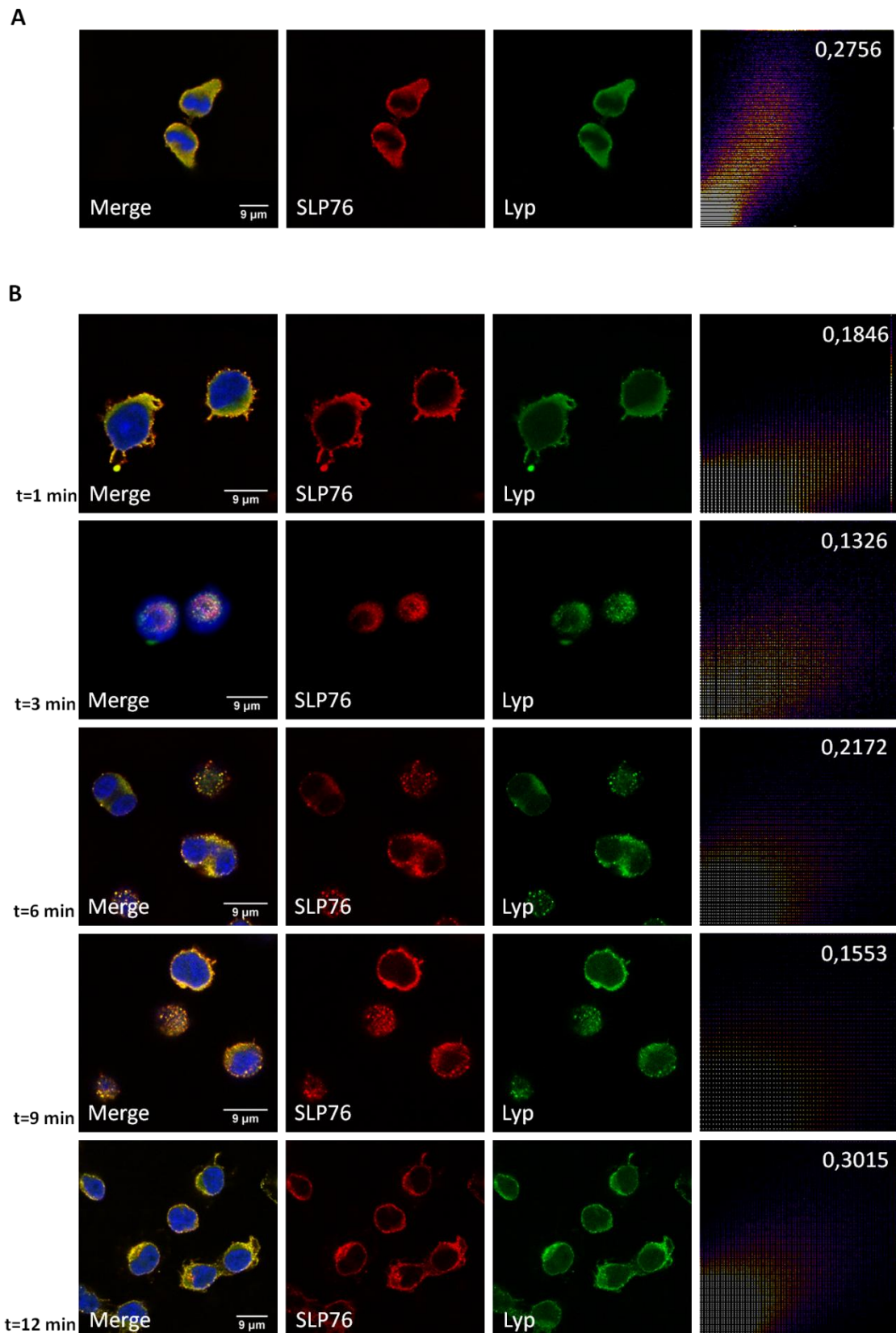


Figura 35. Inmunofluorescencia, ScatterPlot y coeficiente de Pearson correspondientes a la colocalización de Lyp y SLP76 en células Jurkat en reposo y estimuladas por el TCR. A) Lyp y SLP76 se detectaron mediante IF empleando los anticuerpos primarios específicos para estas proteínas y como secundarios los Alexa Fluor 488 (anti-goat) y Alexa Fluor 594 (anti-mouse). **B)** Las células Jurkat se estimularon incubándolas a 37°C en cristales tratados con anti-CD3

Resultados

durante los tiempos indicados. La estimulación se paró poniendo las células a 4°C y fijándolas con PFA para, posteriormente, proceder a la detección de Lyp y SLP-76 empleando la misma metodología que en A).

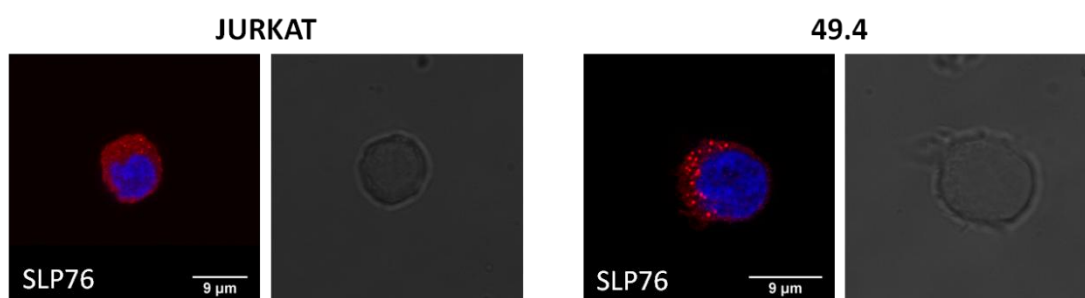
Tras la estimulación, observamos que, en células Jurkat, Lyp colocalizaba con SLP76 en los *microclusters*, que comenzaban a ser visibles en algunas células a partir de los 3 min de estimulación por el CD3 (Figura 35B). Estas microestructuras se observaron prácticamente en el 100% de las células tras 6 min de estimulación, mientras que a tiempos más largos (9 min) comenzaban a desestructurarse y, finalmente, se desorganizaban por completo transcurridos 12 min de estimulación. Con estos datos, fijamos para los experimentos subsecuentes el tiempo de 1 min, como condición control correspondiente a células en reposo que acaban de depositarse sobre el cristal tratado con anti-CD3; y el tiempo de 6 min, como tiempo de estimulación para la visualización de *microclusters*.

7.2. Formación de *microclusters* en la línea 49.4 (KO Lyp).

Tras comprobar que Lyp forma parte de los *microclusters* de SLP76, quisimos estudiar si esta fosfatasa regulaba la formación de estos complejos. Para ello comparamos el patrón de localización de SLP76 en células JK y 49.4, tanto en células en reposo (1 min) como estimuladas (6 min).

Como observamos en la figura 36A, mientras que en las células Jurkat en reposo SLP76 se distribuía homogéneamente por el citosol; en ausencia de Lyp (línea 49.4) SLP76 se encontraba formando *microclusters* aún cuando las células no habían sido estimuladas por el TCR. Tras la estimulación por el CD3 (Figura 36B), ambos tipos celulares presentaban *microclusters*, aunque cabe destacar que en el caso de las 49.4 estos complejos fueron menos numerosos y de mayor tamaño.

A) CONTROL



B) ESTIMULADAS

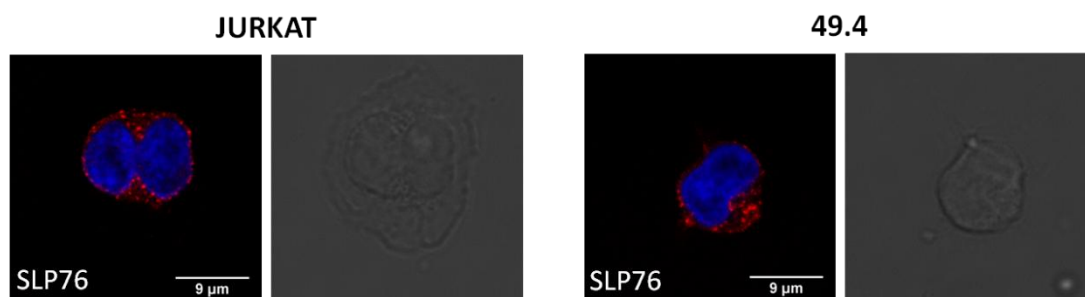


Figura 36. Inmunofluorescencia de SLP76 en células Jurkat y 49.4. Las células se estimularon incubándolas a 37°C en cristales tratados con anti-CD3 durante 1 min (A, condición control) y 6 min (B, condición estimuladas). La estimulación se paró poniendo las células a 4°C y fijándolas con PFA para, posteriormente, proceder a la detección de Lyp y SLP-76 por IF utilizando los anticuerpos primarios específicos para estas proteínas y como secundarios los Alexa Fluor 488 (anti-goat) y Alexa Fluor 594 (anti-mouse).

El resultado mostrado anteriormente parece indicar que Lyp inhibe la formación de *microclusters*, al menos en células en reposo, lo cual estaría de acuerdo con su función inhibitoria en la señalización del TCR.

Dado que la unión multipuntual de los dominios SH2 de SLP76 con fosfotirosinas de Fyb es crítica para la oligomerización de los *microclusters* (Coussens *et al.* 2013), diseñamos un experimento con el que comprobamos que la coexpresión de estas proteínas tanto con Lyp R como con la variante polimórfica R620W, inhibía la interacción entre SLP76 y Fyb (Figura 37). Primeramente se estudió qué kinasas podían fosforilar Fyb y SLP76 en células HEK-293, para lo cual coexpresamos estas proteínas con un grupo de kinasas importantes en la señalización de células del sistema inmune (Figura 37A). HCK resultó la kinasa de elección para el siguiente experimento ya que fue la que fosforiló en mayor medida a ambas proteínas. Así, las células HEK-293 se transfectaron con ambas proteínas adaptadoras, HCK y Lyp R o sus mutantes W, R-DACS y W-DACS. Después se inmunoprecipitó SLP76 y se valoró su interacción con Fyb

Resultados

(Figura 37B), concluyendo que ambas proteínas interactuaban cuando estaban fosforiladas, tanto al coexpresarse con una kinasa capaz de fosforilarlas (2) como al tratar las células con PV (7). Asimismo, se observó que esta interacción se perdía por la coexpresión con Lyp R (3) y/o R620W (4), mientras que se seguía observando cuando utilizabamos sus correspondientes mutantes inactivos (5 y 6). Por lo tanto, podemos concluir que Lyp regula la formación de *microclusters* mediante el control de la interacción de Fyb y SLP76.

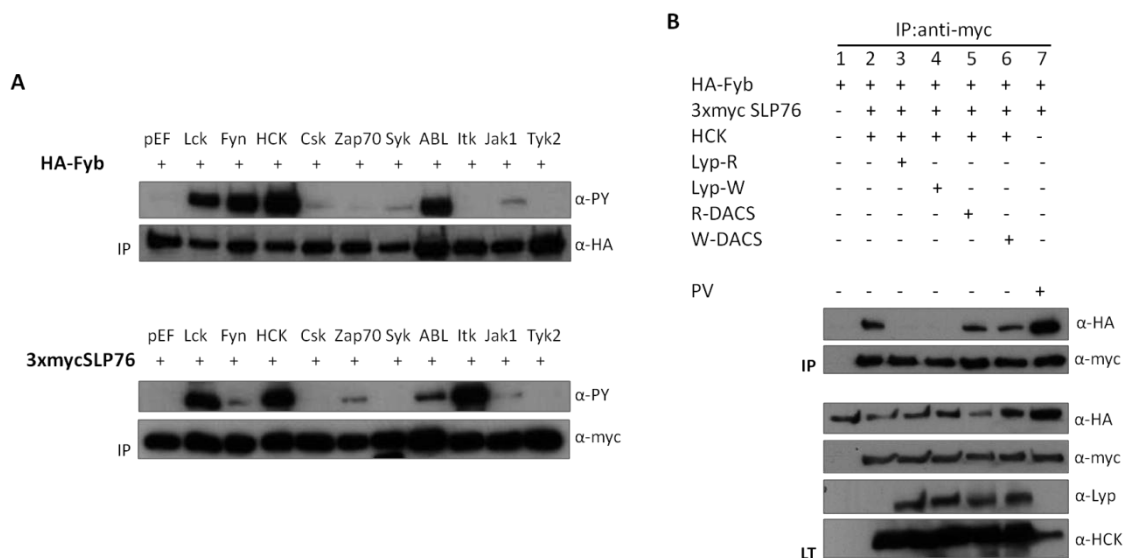


Figura 37. Regulación de la interacción entre Fyb y SLP76 por Lyp. A) Cotransfección en HEK-293 de Fyb y SLP76 con diferentes kinasas de tirosinas, posterior IP y detección de su fosforilación mediante WB. **B)** Las células HEK-293 se transfectaron con los plásmidos indicados y se inmunoprecipitó SLP76. Después, mediante WB, se comprobó la coprecipitación de Fyb. Se muestra un experimento representativo de tres independientes.

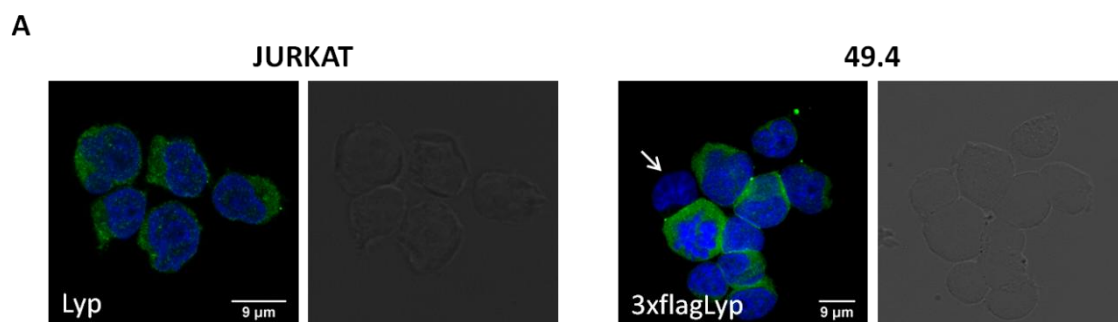
7.3. Formación de *microclusters* tras el restablecimiento de la expresión de Lyp (R y W) en la línea 49.4.

Una vez observado que la línea 49.4 en reposo presentaba *microclusters* de SLP76, para verificar que este efecto se debía exclusivamente a la ausencia de Lyp; nos planteamos reconstituir la expresión de esta fosfatasa y comprobar que se recuperaba el fenotipo observado en Jurkat.

Inicialmente, comprobamos que al realizar una transfección transitoria del plásmido 3xflagLyp R en células 49.4, el patrón de localización de esta proteína era el mismo que el observado en Jurkat (Figura 38A). Posteriormente, activamos por el TCR las células 49.4 transfectadas con Lyp R durante 1 y 6 min, y visualizamos Lyp y SLP76 mediante inmunofluorescencia seguida de microscopía confocal (Figura 38B). De este

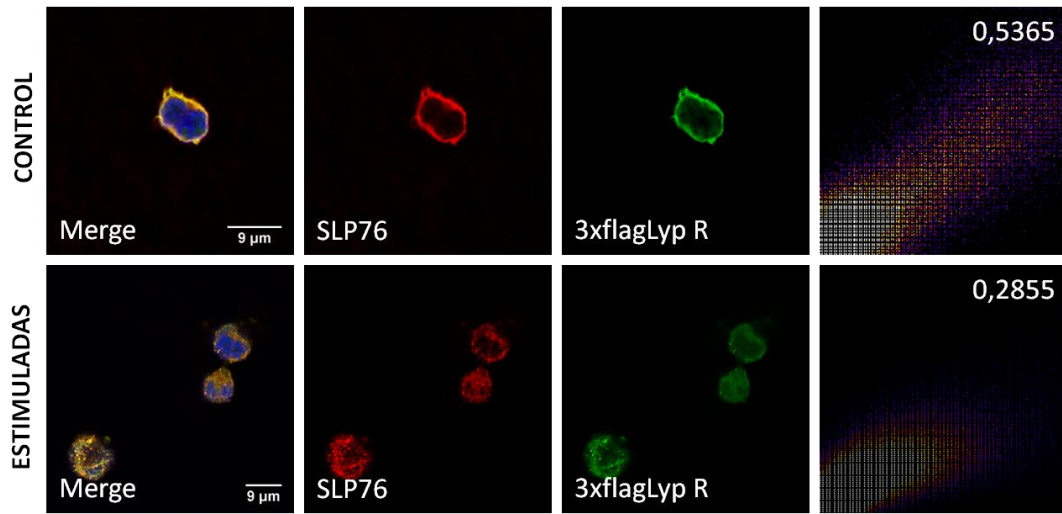
modo, observamos que, en condiciones control (1 min), Lyp colocalizaba con SLP76 y ambas proteínas se distribuían homogéneamente por el citosol, lo cual indicaría que el restablecimiento de la expresión de Lyp en la línea 49.4 conduce a la recuperación de la localización que SLP76 presenta en células Jurkat sin estimular (Figura 35B t=1min). Asimismo, tras 6 min de estimulación por el TCR estas células presentaron *microclusters* de SLP76 en los que también se localizaba la fosfatasa Lyp. Cabe destacar que los *microclusters* formados en este caso fueron de menor tamaño que en el caso de Jurkat (Figura 35B t=6min).

Paralelamente, estudiamos los efectos de la reconstitución de la expresión de la variante de Lyp R620W en la línea 49.4 en la formación de *microclusters* (Figura 38C). En este caso, las células en reposo recuperaron solo parcialmente el fenotipo de células Jurkat, ya que ni se observaron unos *microclusters* claros como los que vemos en la línea 49.4 (Figura 36A), ni Lyp y SLP76 se localizaron homogéneamente por el citosol como ocurre al transfectar Lyp R en esta línea celular (Figura 38B t=1min). Se puede decir que nos encontramos en una situación intermedia, en la que tanto Lyp W como SLP76 tienden a agregarse sin llegar a formar *microclusters*, o al menos estos no están organizados cómo habíamos visto previamente y son más escasos. Este hecho podría estar indicando que Lyp R inhibe en mayor medida la formación de *microclusters* de lo que lo hace Lyp W. Tras la estimulación del TCR de las 49.4 transfectadas con Lyp R620W, observamos que se forman *microclusters* similares a los observados bajo las mismas condiciones de estimulación al transfectar Lyp R en las 49.4 (Figura 38B t=6min).

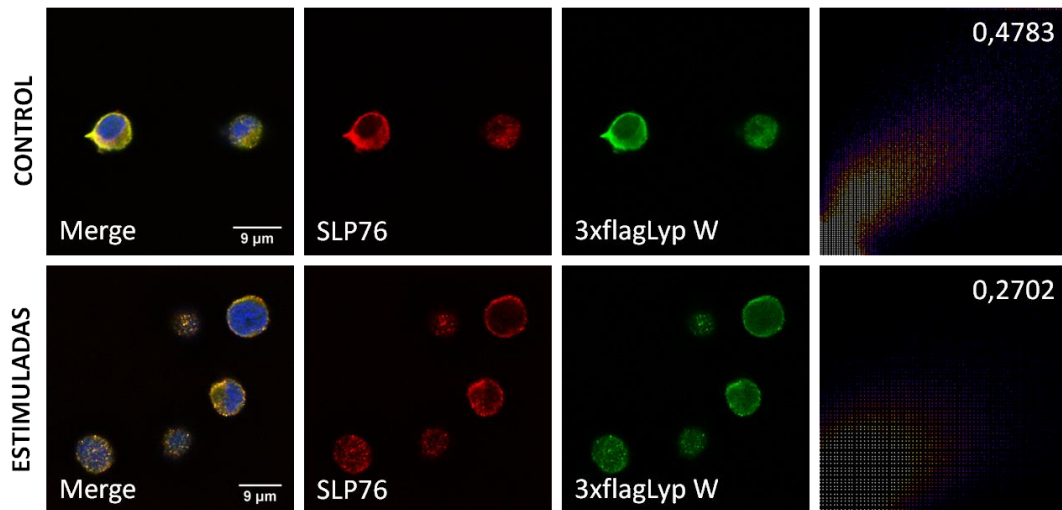


Resultados

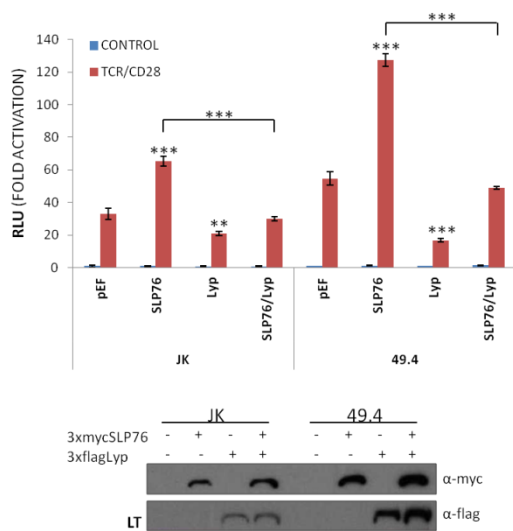
B



C



D



E

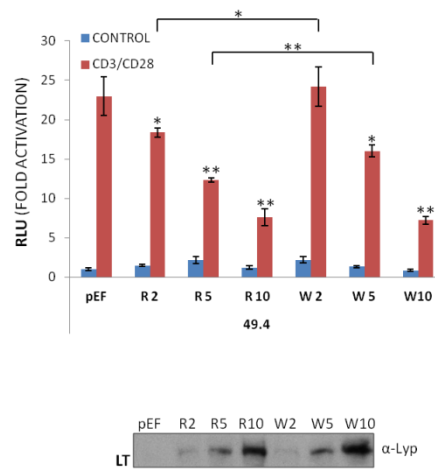


Figura 38. Efecto del restablecimiento de la expresión de Lyp en la línea 49.4. A) Se transfectó 3xflagLyp R en células 49.4 y se comprobó su localización citoplasmática mediante IF. Asimismo se verificó que la variante polimórfica Lyp W mantenía dicha localización subcelular (no mostrado) **B)** Tras la transfección transitoria de la línea 49.4 con el plásmido 3xflagLyp R, las células se estimularon con anti-CD3 y se realizó una IF para comparar la localización subcelular de esta proteína junto con SLP76 en reposo y tras estimular por el TCR. **C)** Idem a B) pero en este caso se transfectó la variante polimórfica 3xflagLyp W. **D)** Las células JK y 49.4 se electroporaron con los plásmidos reporteros a la vez que se sobreexpresaron Lyp y SLP76 de forma independiente y conjunta. Tras la estimulación por el TCR y CD28 se valoró el efecto de la sobreexpresión de ambas proteínas sobre el promotor de IL-2 mediante un ensayo luciferasa. **E)** Ensayo de luciferasa para valorar la expresión del promotor de IL-2 tras la transfección de células JK y 49.4 con distintas cantidades de Lyp R y W, y la posterior estimulación con anti-CD3 y anti-CD28. El análisis estadístico de los datos se realizó mediante la prueba T de Student siendo * $p < 0.1$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Para comprobar los resultados anteriores por otro método, decidimos emplear ensayos de luciferasa, los cuales, debido a su gran sensibilidad, podrían servirnos para corroborar y cuantificar las pequeñas diferencias observadas por microscopía confocal entre R y W. Por consiguiente, transfectamos en células Jurkat y 49.4, junto con los genes reporteros, tanto Lyp como SLP76; y observamos el efecto de ambas proteínas en la activación del promotor de IL-2, tanto por separado como de forma conjunta, respecto a la condición control (pEF) (Figura 38D). Como se observa en el gráfico, tras la estimulación por el TCR/CD28, la sobreexpresión de SLP76 aumentó la activación del promotor de IL-2, mientras que la de Lyp lo disminuyó siendo las diferencias en ambos casos estadísticamente significativas. En la línea celular 49.4, estos cambios fueron aún más acusados que en las células Jurkat, hecho que puede deberse a que la transfección de estas células resultó más eficiente y expresaron cantidades superiores de ambas proteínas (Figura 38D inferior). Por otra parte, al cotransfectar ambos plásmidos, en ninguno de los dos tipos celulares se observaron diferencias con respecto al comportamiento de las células control. Es decir, Lyp fue capaz de contrarrestar el efecto activador de SLP76 sobre el promotor de IL-2. Todo esto podría indicar que Lyp inhibe la señalización por el TCR afectando a la señal activadora que proporciona SLP76 en la respuesta temprana de la señalización por el TCR.

A continuación, comparamos el efecto dosis respuesta de Lyp R y Lyp W en la línea 49.4. Utilizamos esta línea celular para evitar que la propia Lyp endógena interfiriera en el resultado. Como vemos en la figura 38E, Lyp R inhibió en mayor medida la señalización por el TCR de lo que lo hizo la variante R620W. Esta diferencia

Resultados

fue estadísticamente significativa con niveles bajos de expresión de la fosfatasa (2-5 μg), mientras que con niveles más altos de expresión (10 μg), el efecto inhibitorio de ambas proteínas fue prácticamente igual.

Esta menor capacidad de inhibir la activación del promotor de IL-2 a dosis limitantes que presenta la variable polimórfica W indicaría que se trata de una mutación de pérdida de función.

7.4. Regulación de la formación de *microclusters* por la actividad catalítica de Lyp.

Los experimentos mostrados anteriormente parecen indicar que Lyp inhibe la formación de *microclusters* mediante la desfosforilación de proteínas esenciales en este complejo, que como hemos demostrado en este estudio son sustratos *bona fide* de la fosfatasa. En cambio, dadas las complejas interacciones que se establecen entre múltiples proteínas en estas microestructuras, y teniendo en cuenta que las cinéticas de desfosforilación *in vitro* de las proteínas de estos complejos son muy similares para la Lyp R y W (Figura 22A); podría ser que nuestra fosfatasa de estudio estuviera actuando como un adaptador dentro del complejo, y quizás sea así como regula su formación.

Para determinar si la función de Lyp en la formación de *microclusters* dependía de su actividad catalítica, transfectamos la línea 49.4 con la construcción 3xflagLP (Figura 39A), que contiene el dominio fosfatasa de Lyp fusionado al epítipo 3xflag; y, por otro lado, con 3xflagLyp R-DACS, mutante de la proteína completa que carece de actividad fosfatasa (Figura 39B); y observamos el patrón de localización de SLP76 en células en reposo.

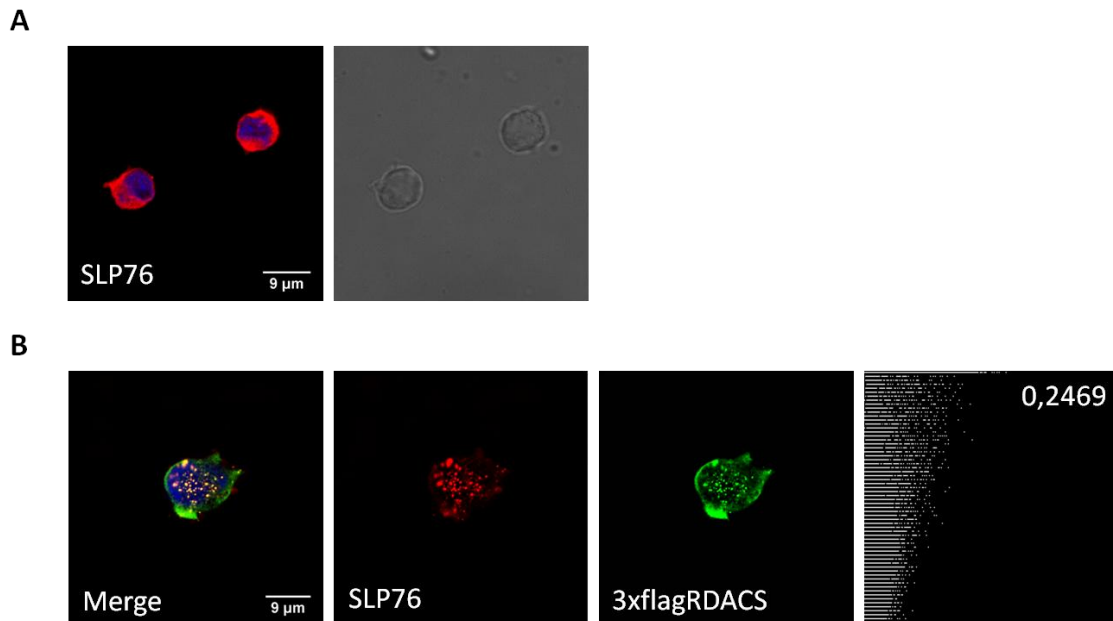


Figura 39. Expresión del dominio fosfatasa de Lyp y del mutante R-DACS en la línea 49.4 y visualización de su efecto en la formación de *microclusters*. A) Las células 49.4 se electroporaron con el plásmido 3xflagLP y se visualizó la localización de SLP76 mediante IF. **B)** Se transfeció 3xflagLyp R-DACS en células 49.4 y se observó la distribución de esta proteína y de SLP76 por microscopía confocal tras realizar una IF de ambas proteínas. Además se realizó el ScatterPlot y se calculó el coeficiente de colocalización de Pearson.

Como se puede ver en la figura 39A, la transfección del dominio fosfatasa de Lyp en células 49.4 fue suficiente para inhibir la formación de *microclusters* del mismo modo que la proteína completa (Figura 38B), mientras que el mutante inactivo de Lyp no consiguió restablecer el fenotipo observado en Jurkat pese a colocalizar con SLP76 (Figura 39B). Estos resultados indicarían que Lyp regula la formación de *microclusters* únicamente a través de su actividad fosfatasa.

7.5. Formación de *microclusters* en PBLs.

Tras estudiar cómo se regula la formación de los *microclusters* de SLP76 en células Jurkat, quisimos comprobar que esta regulación era extensible a PBLs.

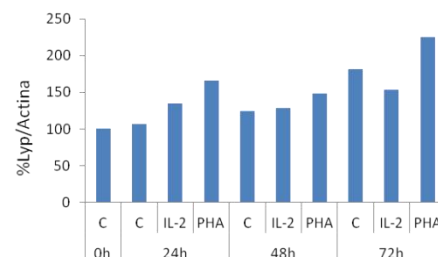
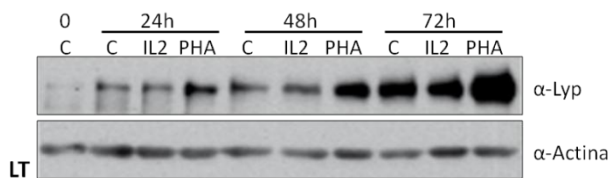
Primeramente se estudió la inducción de la expresión de Lyp mediante diversos estímulos (Figura 40A), observando que, tras tres días en cultivo después de su aislamiento, Lyp aumentaba su expresión 1,8 veces tanto sin tratamiento como al estimular las células con IL-2, y 2,25 veces al tratarlas con PHA. Por ello, decidimos comparar la formación de *microclusters* en PBLs recién aislados, que expresan bajos

Resultados

niveles de Lyp, frente a PBLs mantenidos durante tres días y tratados con PHA, que expresan niveles mayores de Lyp (Figura 40B).

En los PBLs recién aislados se percibió que los niveles de Lyp variaban mucho entre unas células y otras; esto es un hecho inevitable ya que la sangre de la que partimos para el aislamiento proviene de cinco donantes. En cualquier caso se observó que estos linfocitos formaban *microclusters* bajo las mismas condiciones de estimulación que habíamos utilizado anteriormente con las células Jurkat. En cambio, en las células que se han mantenido en cultivo durante 72h en presencia de PHA, (Figura 40B derecha) apenas se formaban *microclusters* tras las condiciones de estimulación habituales, hecho que puede justificarse por el incremento en los niveles de Lyp que presentan estos PBLs con respecto a los recién aislados (Figura 40A). Además se observó que existe mucha menos variación en los niveles expresados de Lyp entre las distintas células encontradas en estas preparaciones, lo cual indicaría que la expresión de esta fosfatasa está regulada.

A



B

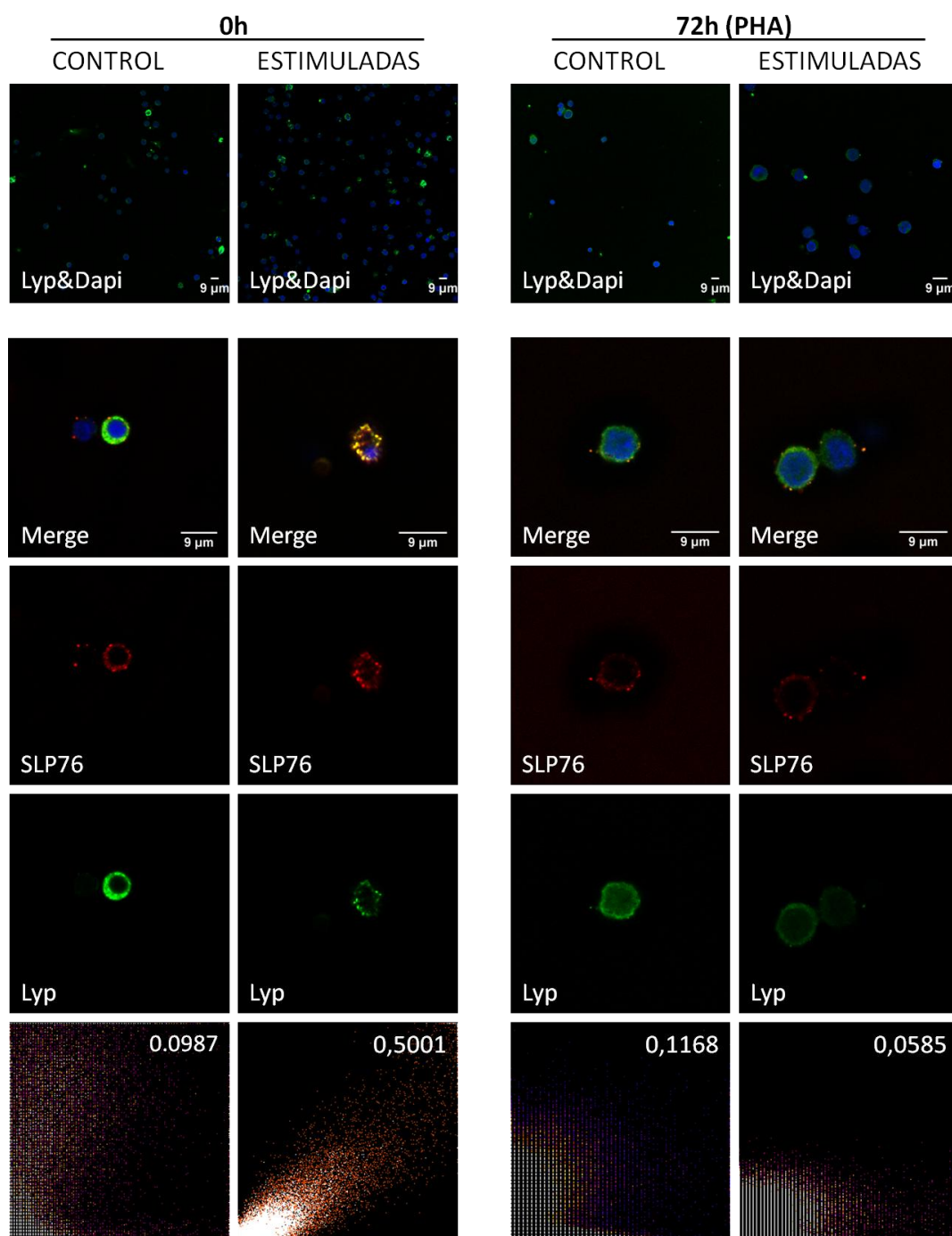


Figura 40. Expresión y localización de Lyp en PBLs. A) Los PBLs se separaron por gradiente de Ficoll y se mantuvieron en cultivo durante tres días sin tratamiento y tratados con IL-2 (5 nM) y PHA (1 μg/ml). Se comparó la expresión de Lyp en estos cultivos por WB tras la lisis y cuantificación por BCA. B) PBLs recién aislados o mantenidos en cultivo durante 72h con PHA se estimularon dejándolas depositar sobre cristales tratados con anti-CD3 durante 1 min (control) o 6 min (estimuladas). Posteriormente se realizó una IF de Lyp y SLP76 para su observación por microscopía confocal.

8. Otros efectos de Lyp.

Una vez estudiada la relevancia de Lyp en el inicio de la señalización por el TCR, quisimos evaluar las diferencias entre las líneas Jurkat y 49.4 en otros eventos más tardíos de la señalización.

8.1. Efecto de Lyp en la fosforilación de otras proteínas importantes en la señalización del TCR.

En este apartado quisimos estudiar si Lyp regulaba, aunque fuese de forma indirecta, el estado de fosforilación de otras proteínas implicadas en la señalización por el TCR.

En primer lugar, partimos de células Jurkat en las cuales sobreexpresamos el dominio fosfatasa de Lyp activo (LP) y, en paralelo, transfectamos también un plásmido vacío (pEF) que nos servirá de control. Transcurridas 48 horas desde la transfección, estimulamos el TCR durante 1 y 5 min y valoramos el estado de fosforilación de varias proteínas (Figura 41A). La sobreexpresión de LP produce, tras 1 min de estimulación, un aumento claro en la fosforilación de PLC γ 1, que tiende a igualarse tras 5 min de estimulación. En cambio, a ambos tiempos de estimulación es visible la disminución en la fosforilación de Erk.

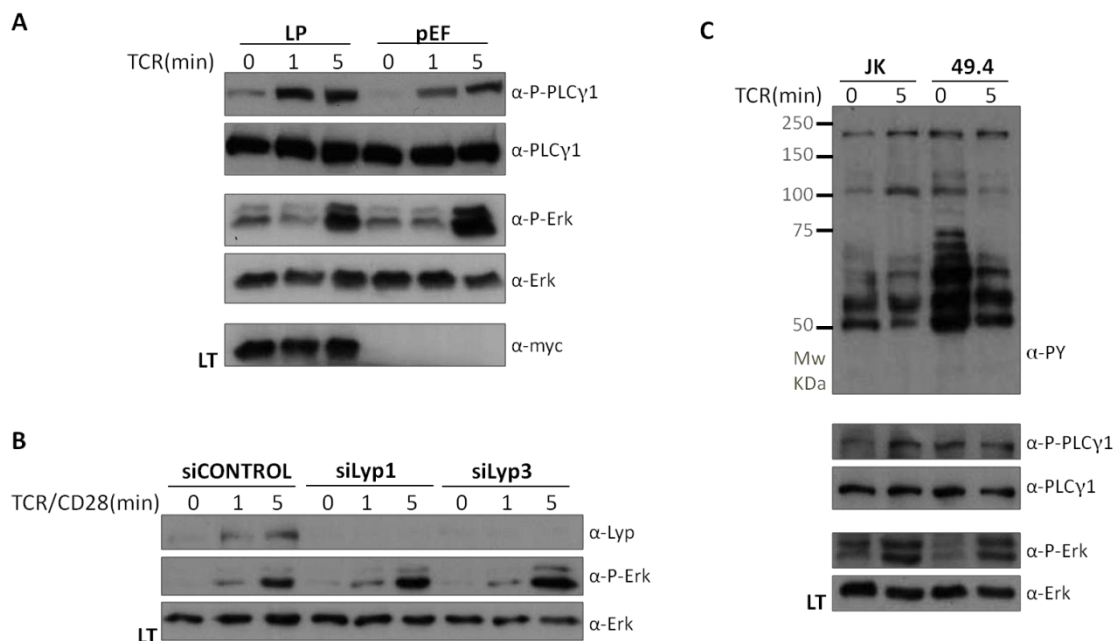


Figura 41. Estudio de la modulación del estado de fosforilación de Erk y PLC γ 1 por Lyp en distintas líneas celulares. A) Se sobreexpresó el dominio fosfatasa de Lyp en Jurkat, se

estimularon por el TCR y se lisaron. Finalmente se detectó la fosforilación de PLC γ 1 y Erk mediante WB. **B)** Tras el aislamiento de PBLs se llevó a cabo el silenciamiento de Lyp con dos ARNs específicos. Posteriormente estos PBLs se estimularon y lisaron, para realizar un WB y detectar los cambios que el silenciamiento produce en la fosforilación de Erk. **C)** Las líneas celulares Jurkat y 49.4 se estimularon por el TCR y tras la lisis se comparó por WB el estado general de fosforilación de sus proteínas, así como de PLC γ 1 y Erk. Se muestra un experimento representativo de al menos tres independientes en cada caso.

Posteriormente quisimos comprobar si estos efectos eran observables en los PBLs y en la línea celular 49.4.

En el caso de los PBLs (Figura 41B), para regular los niveles de expresión de Lyp utilizamos dos ARNs específicos dirigidos a distintas regiones de la secuencia de la fosfatasa. Ambos redujeron visiblemente los niveles de expresión de la fosfatasa y, en ambos casos, observamos un aumento en la fosforilación de Erk tras la estimulación por el TCR, en comparación con los PBLs transfectados con un ARN control. La fosforilación en tirosinas de PLC γ 1 no fue detectable por *Western Blot* en este caso.

Por su parte, la línea 49.4, en comparación con células Jurkat, no presentó cambios en el estado de fosforilación de estas dos proteínas tras la estimulación por el TCR (Figura 41C Inferior). En cambio, en reposo, se observó una mayor fosforilación de Erk en las células Jurkat y de PLC γ 1 en la línea KO para Lyp. En vista a este resultado, comparamos el estado general de fosforilación de las proteínas presentes en el lisado celular de ambas líneas celulares (Figura 41C Superior). Observamos las mayores diferencias en células en reposo, donde la línea 49.4 presenta hiperfosforilación de muchas de sus proteínas con respecto a Jurkat; pero, estas diferencias no son tan notorias tras la estimulación del TCR.

Con todo esto, podemos decir que en células Jurkat y en PBLs; Lyp estaría mediando, de forma indirecta tras la estimulación del TCR, la defosforilación de Erk y el aumento de la fosforilación de PLC γ 1. Estos efectos no son extensibles a la línea 49.4, que podría estar sometida a otros procesos de regulación para compensar la deficiencia de esta fosfatasa.

8.2. Efecto de Lyp en la activación del promotor de IL-2.

Dado que las vías de señalización en las que intervienen PLC γ 1 y Erk confluyen en la activación del promotor de IL-2, quisimos estudiar el efecto producido por los cambios observados en la fosforilación de estas proteínas.

Resultados

Anteriormente comprobamos que la sobreexpresión de Lyp disminuye la activación del promotor de IL-2 (Figura 38D) y, además, mediante la reconstitución de la expresión de Lyp en la línea 49.4, observamos que Lyp R inhibe dicha activación en mayor medida de lo que lo hace su variante polimórfica W (Figura 38E). En este apartado del estudio se valoró la activación de NFAT, AP-1 e IL-2 en células Jurkat, la línea 49.4 y la línea celular sh240.2; la cual se caracteriza por ser una línea derivada de Jurkat, que expresa un "short-hairpin de ARN" de forma estable que logra reducir un 97,2% los niveles de expresión de nuestra fosfatasa de estudio. Elegimos este clon para los experimentos de luciferasa ya que era el que silenciaba en mayor medida la fosfatasa (Figura 42A).

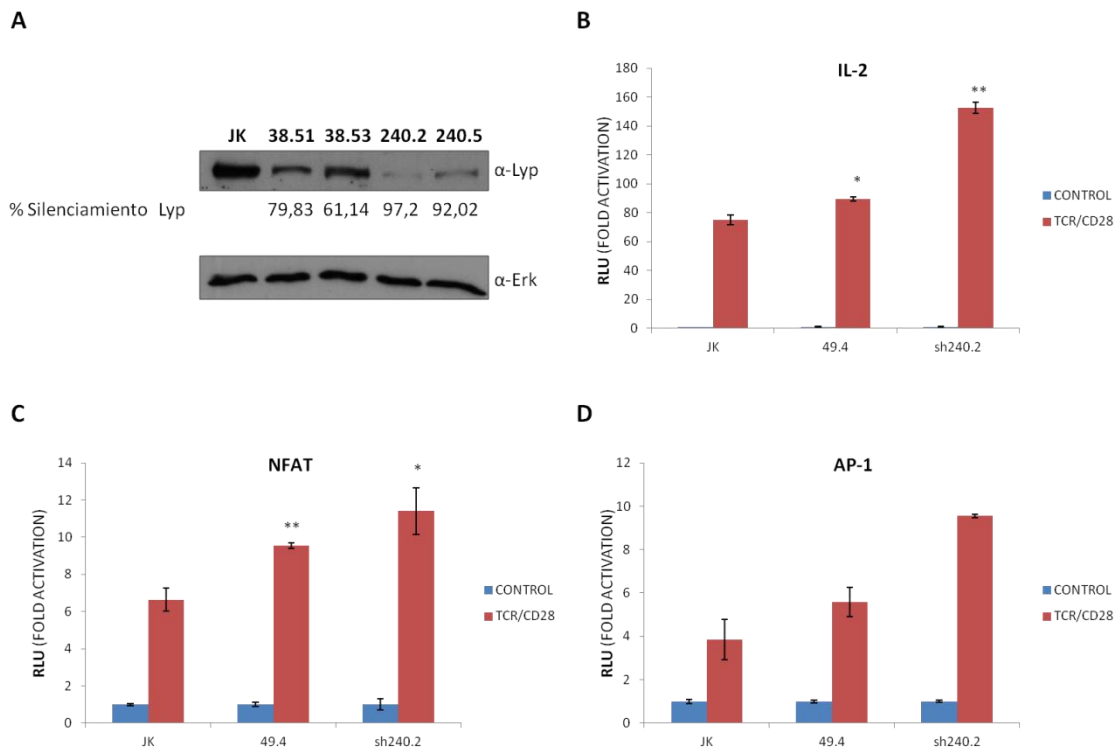


Figura 42. Efecto del silenciamiento de Lyp en la activación de los promotores de IL-2, NFAT y AP-1 tras la estimulación TCR-CD28. A) Western Blot de los lisados celulares de las líneas que expresan de forma estable un "short-hairpin ARN" para el silenciamiento de Lyp. **B)** Ensayo de luciferasa para el promotor de IL-2 empleando células Jurkat, 49.4 y sh240.2. **C)** Ensayo de luciferasa para el promotor NFAT empleando células Jurkat, 49.4 y sh240.2. **D)** Ensayo de luciferasa para el promotor AP-1 empleando células Jurkat, 49.4 y sh240.2. El análisis estadístico de los datos se realizó mediante la prueba T de Student siendo * $p < 0.1$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Con los ensayos de luciferasa realizados, observamos que tanto el silenciamiento de la fosfatasa como la eliminación del gen que la codifica producen un aumento de la señalización por el TCR que se reflejaría en una mayor activación del promotor de IL-2 tras la estimulación del receptor de células T (Figura 42B). Este hecho pone de manifiesto nuevamente el papel que desempeña Lyp en la inhibición de la señalización por el TCR. Asimismo, como puede verse en las figuras 42C y 42D, el aumento en la activación del promotor de IL-2 estaría mediado por diversos mecanismos, ya que tanto la activación del factor de transcripción NFAT como AP-1 se ven afectados por la deficiencia de Lyp, siendo más notable en el caso de NFAT.

Discusión

La fosfatasa Lyp ha sido objeto de numerosos estudios desde el descubrimiento de la asociación de su variante polimórfica R620W con numerosas enfermedades autoinmunes (Bottini *et al.* 2004); pese a esto, a día de hoy, no está claro cómo esta mutación contribuye al desarrollo de estas enfermedades. De hecho, ni siquiera existe un consenso sobre si se trata de una variante de ganancia o de pérdida de función. Este problema podría deberse en parte a que R620W tenga efectos opuestos en células de diferentes linajes, o a que su actividad se vea incrementada o disminuida con respecto a la de Lyp R, en diferentes rutas de señalización. La asociación de R620W con múltiples enfermedades autoinmunes podría indicar la existencia de un mecanismo común, hasta ahora desconocido, subyacente al desarrollo de este tipo de enfermedades. Por ello, determinar la función fisiológica de Lyp tendría importantes implicaciones en la comprensión de los procesos de autoinmunidad y podría ser útil para diseñar terapias más adecuadas para el tratamiento de estas enfermedades.

Con este trabajo se ha querido esclarecer cuales son las dianas de Lyp en la señalización por el TCR, así como estudiar las diferencias funcionales entre R620 y W620.

1. Lyp desfosforila proteínas adaptadoras involucradas en la señalización por el TCR.

Los estudios realizados hasta el momento en linfocitos T humanos y de ratón muestran que *PTPN22* es un potente inhibidor de la activación de estas células, tras la estimulación del TCR. Este efecto inhibitorio se debe a la desfosforilación que Lyp lleva a cabo sobre mediadores de la transducción de señales, que se fosforilan y activan inmediatamente después de que se produce el reconocimiento del péptido antigénico; y son los encargados de desencadenar múltiples señales intracelulares (Standford *et al.* 2012). Según este modelo, Lyp inhibiría la señalización proximal del TCR desfosforilando directamente la tirosina del bucle de activación de Lck, Fyn, Zap70 y los ITAM de las cadenas ζ del CD3. Como consecuencia de esto, la inhibición de la expresión de *PTPN22* o la inhibición farmacológica de su actividad, conduce a un aumento de la señalización por el TCR (Hasegawa *et al.* 2004; Stanford *et al.* 2011; Vang *et al.* 2012).

Discusión

Los resultados obtenidos en este trabajo apuntan a que las dianas sobre las que actúa Lyp serían no solo proteínas efectoras en la señalización del TCR sino también moléculas adaptadoras que forman parte de los complejos multiproteicos encargados de transmitir la señal iniciada por el TCR al interior de la célula, como son: SKAP55, SKAP-HOM, SLP76, Fyb, Vav1 y HS1. Todas ellas presentan una fuerte interacción con LP-DACS y además se desfosforilan rápidamente al incubarse con la fosfatasa (Figuras 15 y 22). Por otra parte, los resultados de colocalización de Lyp con estas proteínas mediante microscopía confocal ponen de manifiesto que la interacción de la fosfatasa con todas ellas *in vivo* es factible ya que sus patrones de localización son semejantes. Además, hemos identificado los principales sitios de desfosforilación en SKAP-HOM, SLP76, Fyb y HS1 (Figuras 26, 28, 29 y 30); observando que al mutar estas tirosinas a fenilalanina se perdía la interacción con los mutantes atrapadores de sustratos. En el caso de SKAP55 predecimos, en base al resultado obtenido para SKAP-HOM y dada la homología existente entre ambas proteínas, que el sitio preferente de desfosforilación por Lyp sería su Tyr232, equivalente a la Tyr237 de SKAP-HOM (Figura 27). Además, las secuencias flanqueantes de ambas tirosinas están muy conservadas, e incluso la Tyr232 de SKAP55 está rodeada por un ambiente más ácido que la Tyr237 de SKAP-HOM, lo cual favorecería su unión al bolsillo catalítico de Lyp. Este resultado está en contraposición con lo publicado por Yu *et al.* ya que, mediante su estrategia de búsqueda bioinformática, predecían la Tyr75 como el sitio de desfosforilación preferente de Lyp en SKAP-HOM (Yu *et al.* 2011). Dicha hipótesis no fue demostrada en el estudio y pese a que los aminoácidos flanqueantes a esta tirosina se ajustan al bolsillo catalítico de Lyp, puede que dicho aminoácido no esté accesible en la conformación tridimensional que adquiere la proteína al plegarse.

Por otro lado, al comparar la secuencia consenso descrita por Yu *et al.* con el Logo que obtuvimos a partir de las secuencias flanqueantes de las tirosinas que interaccionan con Lyp en distintos sustratos, no parece ser estrictamente necesario que los aminoácidos que ocupan las posiciones -2,-1,+1 y +2 sean ácidos como ellos proponen. En base a nuestros resultados, parece que efectivamente el hecho de que la fosfotirosina esté inmersa en un ambiente ácido favorece su unión al centro activo de Lyp (Tabla 5). Si observamos en detalle las secuencias flanqueantes de las tirosinas identificadas en este estudio como sustratos de Lyp, en todos los casos encontramos

un glutámico o aspártico en la posición +1, y también en la mayoría de los casos en la posición +2. En cambio, parecen existir menos restricciones en los aminoácidos que inmediatamente preceden la tirosina, ya que como muestra la Tabla 5, la posición -1 puede estar ocupada indistintamente por un aminoácido apolar o ácido. Si bien es cierto que en todos los casos en los que un aminoácido apolar ocupa esta posición, el aminoácido en la posición -2 es un glutámico. Por otro lado, al igual que ocurre en la secuencia consenso predicha por Yu *et al.*, el aminoácido que ocupa la posición +3 es siempre apolar, bien sea Val, Pro o Ile.

CONSENSUSZHANG	YGEEYDDL ^Y
SKAP-HOM Y237-p	YDERGEL ^Y DDVDHPL
SLP76 Y113-p	SSF ^E EDD ^Y ES ^P NDDQ
SLP76 Y128-p	DGEDDGD ^Y ES ^P N ^E EE
SLP76 Y145-p	PVEDDAD ^Y EP ^P PSND
FYB Y595-p	I ^E DDQ ^E V ^Y DD ^V AEQD
FYB Y651-p	LDMGDE ^V YDD ^V DTSD
FYB Y771-p	ADNDGE ^I YDD ^I ADGC
HS1 Y378-p	E ^P EPEND ^Y ED ^V EEMD
HS1 Y397-p	E ^D E ^P E ^G D ^Y EE ^V LEPE

Tabla 5. Secuencias flanqueantes de las tirosinas identificadas como sustratos de Lyp. Las secuencias se han ordenado en función de la eficiencia catalítica que Lyp demostró para las distintas proteínas. En rojo se han destacado los aminoácidos ácidos y en azul los aminoácidos apolares en la posición -1 y +3.

En conjunto, nuestros datos indican que estas seis proteínas: SKAP55, SKAP-HOM, SLP76, Fyb, Vav1 y HS1 son sustratos *bona-fide* de Lyp ya que esta fosfatasa modula su fosforilación en tirosinas, las desfosforila *in vitro* y presentan una fuerte interacción con los mutantes atrapadores de sustratos de la fosfatasa, que se pierde al mutar las tirosinas diana (Tiganis y Bennett, 2007). La caracterización de estas proteínas como sustratos de Lyp y la identificación de los sitios de desfosforilación que hemos llevado a cabo es novedosa, ya que ningún estudio previo ha analizado tan la relación entre Lyp y estas proteínas; aunque existen trabajos que muestran cierta relación entre la fosfatasa y las vías de señalización que regulan estas proteínas adaptadoras. Por ejemplo, un estudio realizado en 2012 por el grupo de Brownlie (Brownlie *et al.* 2012) reveló un aumento de las propiedades de adhesión de los linfocitos T murinos KO para Lyp. Estos cambios podrían explicarse desde la

Discusión

perspectiva de que Lyp regula el estado de fosforilación de proteínas implicadas en la reorganización del citoesqueleto y la adhesión como HS1, Fyb y SKAP55. Por otra parte, Vav1 se identificó como posible sustrato de Lyp mediante espectrometría de masas (Wu *et al.* 2006) y otro estudio mostró por citometría de flujo, que Lyp modulaba la fosforilación de SLP76 (Standford *et al.* 2011). En cambio, estas proteínas nunca antes habían sido bien caracterizadas como sustratos de Lyp.

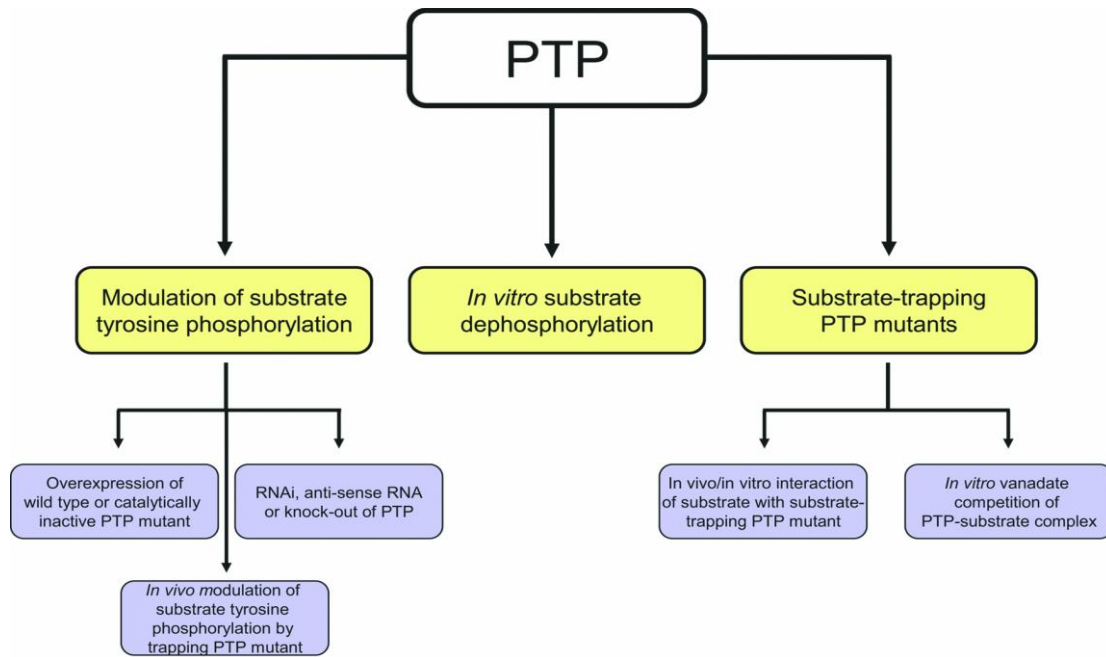


Figura 43. Criterios de identificación de sustratos de fosfatasa. Imagen tomada de Tiganis y Bennett, 2007

En este trabajo, además se ha analizado la interacción y desfosforilación de Lck, Fyn y Zap70; tres proteínas que en estudios previos se proponen como sustratos de Lyp. Como resultado, observamos que solamente Lck presentó una interacción específica con LP-DACS; mientras que no detectó interacción con Zap70 y con Fyn la interacción fue de baja afinidad y especificidad (Figura 15). Por lo tanto, de acuerdo con nuestros datos, estas dos últimas proteínas no pueden ser consideradas sustratos de Lyp. En cuanto a la cinética de desfosforilación de Lck, no se logró ver una desfosforilación total como ocurría en el caso de los nuevos sustratos identificados en este trabajo; esto puede deberse a que tal y como está descrito en la literatura (Cloutier *et al.* 1995), existen varias tirosinas reguladoras de la actividad de Lck, de las cuales Lyp únicamente desfosforila la tirosina activadora (Tyr394), mientras que no

actuaría sobre otras tirosinas (Tyr192, Tyr505). Este hecho, además estaría de acuerdo con los ensayos de coimmunoprecipitación de los distintos mutantes que hemos realizado, ya que al mutar las Tyr192, Tyr394 y Tyr505 de Lck, observamos que únicamente el mutante de la Tyr394 pierde totalmente su interacción con LP-DACS (Figura 25).

En cuanto al resto de proteínas ensayadas solamente mostraron una fuerte interacción con LP-DACS al coexpresarlas en HEK-293: ABL, DOK1, DOK2, HCK y HPK1 (Figura 15). En cambio la interacción con LP-DACS de estas proteínas endógenas en la línea celular 49.4 solo fue detectable en el caso de HPK1 (Figura 16); no obstante, esto podría deberse a que las interacciones con ABL, DOK1, DOK2 y HCK pueden ser de menor afinidad, con lo cual solo son detectables cuando sobreexpresamos las proteínas mediante transfección transitoria ya que la técnica del *Western Blot* presenta ciertas limitaciones como es su sensibilidad, que en este caso dependería de los niveles basales de proteína expresados en la línea 49.4, así como también de la especificidad y afinidad de los anticuerpos utilizados.

Además de evaluar la interacción de las distintas proteínas con LP-DACS, que nos sirvió para determinar cuáles se unían al centro activo de Lyp; estudiamos también la coimmunoprecipitación con el mutante atrapador de sustratos de la proteína completa (R-DACS), para comprobar que las proteínas que interaccionaban con el dominio catalítico de Lyp aislado, también se unían a él cuando forma parte de la fosfatasa y posee su estructura y conformación final. Tras realizar los ensayos de coexpresión en HEK-293 empleando Lyp R-DACS, no se observó interacción ni con DOK-1, ni con DOK-2 (Figura 17B), hecho que apunta a que estas dos proteínas no son capaces de interaccionar con el centro activo de la fosfatasa Lyp completa; ya que además ninguna de ellas resultó ser desfosforilada *in vitro* por Lyp (Figura 22B). Por su parte, HCK, pese a interaccionar tanto con LP-DACS como con R-DACS, no se desfosforiló en absoluto al incubarla con Lyp *in vitro*. Por tanto, los datos actuales no apoyan que estas tres proteínas (DOK1, DOK2 y HCK) sean sustratos de Lyp. HPK1 y ABL, en cambio sí podrían serlo ya que ambas interaccionaron con R-DACS, aunque con menor afinidad que con LP-DACS; y Lyp R desfosforila levemente a HPK1 *in vitro*. En el caso de ABL no pudimos evaluar su desfosforilación, ya que no conseguimos obtener suficiente cantidad de sustrato fosforilado con el que realizar el experimento.

Otra de las proteínas que suscitó interés como posible sustrato de Lyp fue PSTPIP1, ya que mostró interacción con LP-DACS, aunque este ensayo fue difícil de reproducir y solo logramos ver dicha interacción cuando los niveles de expresión eran muy elevados (Figura 15B). En cambio, PSTPIP1 presenta una interacción clara con Lyp R por su extremo CTH tal y como habíamos descrito en estudios previos en nuestro laboratorio (Marcos *et al.* 2014). Asimismo la desfosforilación de esta proteína en nuestros ensayos *in vitro* no fue clara (Figura 22D). Con todo esto, nuestros datos indican que, a pesar de que PSTPIP1 interacciona con Lyp y se ha propuesto que es sustrato de las otras dos fosfatasa de la familia PEST (*PTPN12* y *PTPN18*) (Veillette *et al.* 2009; Spencer *et al.* 1997), no es sustrato de Lyp.

2. Diferencias entre Lyp R y W en la desfosforilación de sus sustratos.

Hasta el momento, las diferencias funcionales encontradas entre la fosfatasa y su variante polimórfica asociada a enfermedades autoinmunes son escasas y confusas. Se sabe que el dominio catalítico no está afectado por la sustitución de arginina por triptófano y es idéntico en ambas variantes (Bottini *et al.* 2006). La relevancia biológica de R620W se debe al cambio que sufre el motivo P1, que es la región de interacción de la fosfatasa con Csk (Cloutier y Veillette 1996; Gregorieff *et al.* 1998; Ghose *et al.* 2001). Esta sustitución hace que disminuya la afinidad de Csk por Lyp (de la Puerta *et al.* 2013), y esto podría repercutir en una reducción del efecto inhibitorio que Lyp ejerce en la señalización del TCR (Bottini *et al.* 2006 y Perricone *et al.* 2011).

Otros estudios sugieren que R620W produce una mayor inhibición de la señalización del TCR ya que se trata de una fosfatasa más activa (Vang *et al.* 2005 y Bottini *et al.* 2006). Esto tendría implicaciones en el ámbito de la tolerancia de timocitos y favorecería la selección positiva de células T autorreactivas (Sakaguchi *et al.* 2003). En cualquier caso se requieren más estudios para establecer el posible papel que tendría el aumento de actividad de la variante Lyp W en la patogénesis de la autoinmunidad humana.

En cuanto a nuestros resultados, los análisis comparativos de la actividad de Lyp R y Lyp W en ensayos de pNPP, no revelaron diferencias entre la actividad

intrínseca de ambas proteínas (datos no mostrados). Además, las cinéticas de desfosforilación para los sustratos *bona-fide* caracterizados en este trabajo, son prácticamente idénticas para ambas fosfatasa (Figura 22); si bien es cierto, creemos que dada la gran avidéz que tiene Lyp por estos sustratos, cabe la posibilidad de que hayamos empleado un exceso de fosfatasa, y quizá si hubiésemos utilizado cantidades más limitantes, se podrían haber puesto de manifiesto las diferencias que puedan existir en la eficiencia de desfosforilación de estas proteínas. Este efecto de la importancia de la dosis para ver posibles diferencias entre ambas fosfatasas se ve reflejado en el ensayo de luciferasa (Figura 38E), en el que Lyp R inhibe en mayor medida que Lyp W la activación del promotor de IL-2 tras la estimulación del TCR cuándo los niveles de fosfatasa expresados son bajos; mientras que cuando hay un exceso de proteína, ambas variantes inhiben por igual.

Asimismo, en el caso de Lck (Figura 21), parece que Lyp R la desfosforila más eficientemente a 5 y 15 min; esto implicaría que Lyp R es capaz de inhibir la señalización por el TCR más rápida y eficientemente que Lyp W. En contraposición a nuestras observaciones, en un estudio realizado en 2010 (Fiorillo *et al.* 2010) no se encontraron diferencias entre la actividad de Lyp R y Lyp W recombinante obtenida de células de insecto, empleando como sustrato un péptido derivado de Lck.

Las pequeñas diferencias observadas entre la variante R y W en proteínas cuyos niveles de desfosforilación son muy inferiores a los de las proteínas caracterizadas como sustratos *bona-fide* en este trabajo (Figura 22C y D); como HPK1, PSTPIP1 o Pirina, son difíciles de interpretar ya que, por ejemplo, en el caso de PSTPIP1, nuestros datos indican a que es una proteína que interacciona con Lyp, pero no es su sustrato. Este resultado sugiere que PSTPIP1 podría funcionar como un adaptador capaz de modular la actividad de Lyp.

En conjunto, estos datos apuntan a que Lyp W se comporta como una mutación de pérdida de función e inhibe en menor medida que Lyp R la señalización por el TCR; en cambio, estas diferencias podrían ser imperceptibles si la célula aumenta los niveles de expresión de la fosfatasa.

3. Lyp se localiza en *microclusters* con SLP76 y regula su formación.

En la señalización del TCR se originan complejos multiproteicos que han recibido el nombre de "*microclusters de SLP76*", los cuales transmiten la señal que se origina en la región próxima al TCR al interior celular. En los últimos años, son muchas las proteínas que se ha visto que forman parte de estos complejos como son HPK1, Vav1 o Fyb (Lasserre *et al.* 2011; Ksionda *et al.* 2012; Coussens *et al.* 2013); las cuales pueden regular la formación o la estabilidad de estos complejos.

En este trabajo, describimos por primera vez que Lyp también se localiza en estas estructuras e inhibe su formación (Figuras 35, 36 y 37), ya que a diferencia de las células Jurkat, en las cuales en reposo Lyp se encuentra homogéneamente distribuída en el citosol y pasa a formar parte de los *microclusters* tras la estimulación del TCR; la línea celular 49.4, KO para Lyp, presenta estos agregados en reposo y recupera el fenotipo observado en la línea Jurkat cuando se reestablece la expresión de la fosfatasa.

Cabe destacar que los *microclusters* formados tras la estimulación del TCR en las células 49.4 transfectadas con Lyp son de menor tamaño que en el caso de Jurkat. Este hecho creemos que se debe a que la transfección transitoria en la línea 49.4 hace que los niveles expresados de Lyp sean muy superiores a los niveles endógenos expresados en Jurkat, y esta fosfatasa inhibe la formación de estos complejos multiproteicos. Además, este aumento de la expresión de Lyp con respecto a los niveles endógenos presentados en este tipo celular explicaría también que los coeficientes de colocación de Pearson entre Lyp y SLP76 sean superiores a los obtenidos en los experimentos realizados anteriormente en células Jurkat; especialmente en las células que expresan niveles visiblemente mayores de Lyp (Figura 38B CONTROL).

En base a estos resultados, Lyp inhibiría la señalización por el TCR desfosforilando proteínas adaptadoras, cuya fosforilación es esencial en la formación de estos complejos señalizadores, impidiendo así la formación de *microclusters* y la transmisión de la señal iniciada en el TCR al interior celular. Además, hemos corroborado que la inhibición de la formación de estas microestructuras se debe únicamente a su acción catalítica (Figura 39) ya que la transfección del dominio

catalítico activo de Lyp (LP) es suficiente para devolver a las células 49.4 el fenotipo observado en Jurkat; mientras que por el contrario, al transfectar la línea celular 49.4 con el mutante inactivo de Lyp (R-DACS) las células en reposo siguen formando *microclusters*. Asimismo, los estudios realizados en linfocitos de sangre periférica (Figura 40) sugieren que las observaciones realizadas en células Jurkat son extrapolables a este tipo celular, pues los PBLs forman *microclusters* de SLP76 a los mismos tiempos de estimulación que las células Jurkat y los niveles de expresión de Lyp parecen regular la formación de estos complejos.

4. Interacción de Lyp con HS1.

Las proteínas identificadas en este trabajo como sustratos de Lyp interactúan mediante fosfotirosinas presentes en su secuencia con el dominio catalítico de Lyp; si bien es cierto que estos sustratos poseen además otros dominios mediante los cuales podrían interactuar con la fosfatasa. Para valorar esta posibilidad se llevaron a cabo los ensayos de coimmunoprecipitación con la secuencia completa activa de Lyp (Figura 17A). En el caso de HS1, se observó que interactuaba con mayor afinidad con la fosfatasa que con el dominio catalítico aislado, lo que nos llevó a caracterizar la interacción entre ambas proteínas. De acuerdo con los resultados obtenidos en esta parte del estudio, parece que además de interactuar las fosfotirosinas 378 y 397 de HS1 con el dominio catalítico de Lyp (Figura 30), la unión de ambas proteínas se ve reforzada por la interacción entre el dominio SH3 de HS1 y las regiones ricas en prolina de Lyp (Figura 44).

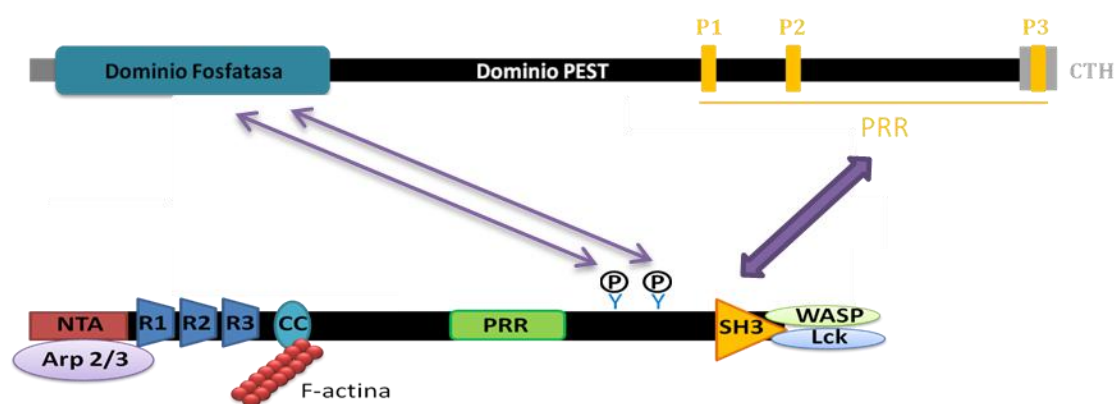


Figura 44. Estructuras primarias y regiones de interacción de Lyp y HS1. La interacción entre estas dos proteínas se establece tanto por el dominio catalítico de Lyp con dos fosfotirosinas

Discusión

presentes en la región central de HS1; como por los extremos carboxiterminales de ambas proteínas gracias a sus motivos ricos en prolina y dominio SH3 respectivamente.

Dado que el dominio SH3 de HS1 puede interactuar tanto con Lck (Takemoto *et al.* 1996) como con Lyp, es posible que esta fosfatasa sea esencial en la regulación de la actividad de HS1, ya que controlaría el estado de fosforilación de la proteína y, en consecuencia su actividad (Ruzzene *et al.* 1996). Teniendo en cuenta que la mutación R620W se localiza en el motivo P1 de Lyp, podría afectar a la interacción entre ambas proteínas, tal y como ocurre en el caso de Csk (Bottini *et al.* 2004). En cambio, en base a los datos obtenidos en este estudio, dicha mutación no parece afectar a su interacción con HS1 (Figura 24B).

Al igual que ocurre con HS1, SKAP55 y SKAP-HOM podrían estar interactuando con Lyp mediante otras regiones además de sus fosfotirosinas, ya que como se observa en la Figura 17A, ambas proteínas coprecipitan con Lyp R. Presumiblemente esta interacción adicional se establecería entre los dominios SH3 presentes en el extremo carboxilo de estas proteínas (Figura 3) y los motivos ricos en prolina de Lyp.

5. Efecto de Lyp en la señalización del TCR posterior a la formación de *microclusters*.

Dadas las notables diferencias encontradas en cuanto a la presencia de *microclusters*, entre la línea celular 49.4 y la línea Jurkat en reposo, quisimos estudiar los efectos que esto podría tener en eventos de la señalización más tardíos. Inicialmente, llamó nuestra atención el hecho de que **en reposo** no existen cambios en la activación de los promotores, NFAT, AP1 e IL-2 (Figura 42 barras azules), pese a que la línea celular 49.4 presenta unos claros *microclusters*. Esto podría deberse a que existiese redundancia entre los sustratos de Lyp y los de otras fosfatasas, teoría que descartamos al ver que el patrón de fosforilación basal de la línea 49.4 y JK son muy diferentes (Figura 41C), observándose una clara hiperfosforilación de muchas proteínas en la línea 49.4. Otra posible explicación sobre este hecho es que los *microclusters* observados en las células 49.4 en reposo no sean funcionales. Un estudio

realizado en 2014 (Crites *et al.* 2014) sugiere que los *microclusters* son el resultado de la asociación, tras la estimulación del TCR, de nanoclusters, que se encuentran preformados en reposo, con moléculas señalizadoras. De manera que existen diferencias notables en la composición y las propiedades físicas de los complejos que se forman tras la estimulación del TCR y los preexistentes en células sin estimular. Además, los *microclusters* observados en respuesta a la presentación antigénica son sensibles a la despolimerización de actina (Vardhana *et al.* 2010), mientras que esto no afecta a los nanoclusters de las células en reposo. En base a esto, hipotetizamos que en el caso de la línea KO de Lyp, los *microclusters* observados en células en reposo son el resultado de la asociación de estos nanoclusters afuncionales, ya que al no estar presente la fosfatasa, las moléculas adaptadoras están hiperfosforiladas en reposo y esto permite su asociación constitutiva. En cambio, es necesaria la presentación antigénica y la formación de la sinapsis inmunológica para que se produzca la polimerización de la actina y estos *microclusters* pasen a ser funcionales. Todo esto explicaría por qué las células 49.4, pese a formar *microclusters* en reposo, no presentan otras características de las células T activadas. No obstante, también sería posible que la célula activase otros mecanismos compensatorios, posteriores a la formación de estas microestructuras, para evitarse en ausencia de estímulo.

En cuanto a los resultados obtenidos de los ensayos de luciferasa en los que se utilizaron los promotores AP-1, NFAT e IL-2, se observó que, tras la estimulación del TCR, la activación de los tres promotores se ve significativamente incrementada en las células que no expresan Lyp, lo cual está en concordancia con el papel inhibitorio atribuido a esta fosfatasa. Cabe destacar que estos efectos están más acentuados en la línea sh240.2 que en la línea 49.4, para la cual no se observaron grandes cambios en la fosforilación de proteínas cruciales en las rutas de señalización que producen la activación de los factores de transcripción evaluados en los ensayos de luciferasa (Figura 41C). Esto podría indicar que en esta línea celular existen mecanismos compensatorios que contrarrestan la deficiencia de la fosfatasa.

Finalmente también nos propusimos valorar las diferencias en la proliferación y viabilidad que pudieran existir en la línea 49.4 y Jurkat, observando curvas de proliferación muy similares en ambos casos (datos no mostrados). Esto indicaría que la eliminación del gen *PTPN22* en células JK no produce cambios a este nivel. En cambio,

Discusión

debemos tener en cuenta que al tratarse de líneas celulares immortalizadas tienen la propiedad de dividirse indefinidamente, de modo que los cambios en la proliferación celular son más difíciles de valorar que en un cultivo primario.

El hecho de que veamos cómo la línea KO de Lyp presenta alteradas algunas de las respuestas de la señalización del TCR mientras otras se mantienen intactas es un reflejo del complejo entramado molecular que conduce a la activación del linfocito T y su regulación.

En su conjunto, los datos recopilados en este estudio indican que Lyp, además de desfosforilar proteínas que se activan inmediatamente después de la activación del TCR, como Lck, inhibe también la señalización del TCR desfosforilando proteínas adaptadoras e impidiendo la formación de complejos señalizadores que son imprescindibles para la correcta activación del linfocito T, incluyendo la producción de citoquinas y la regulación de la adhesión y migración celular (Figura 45).

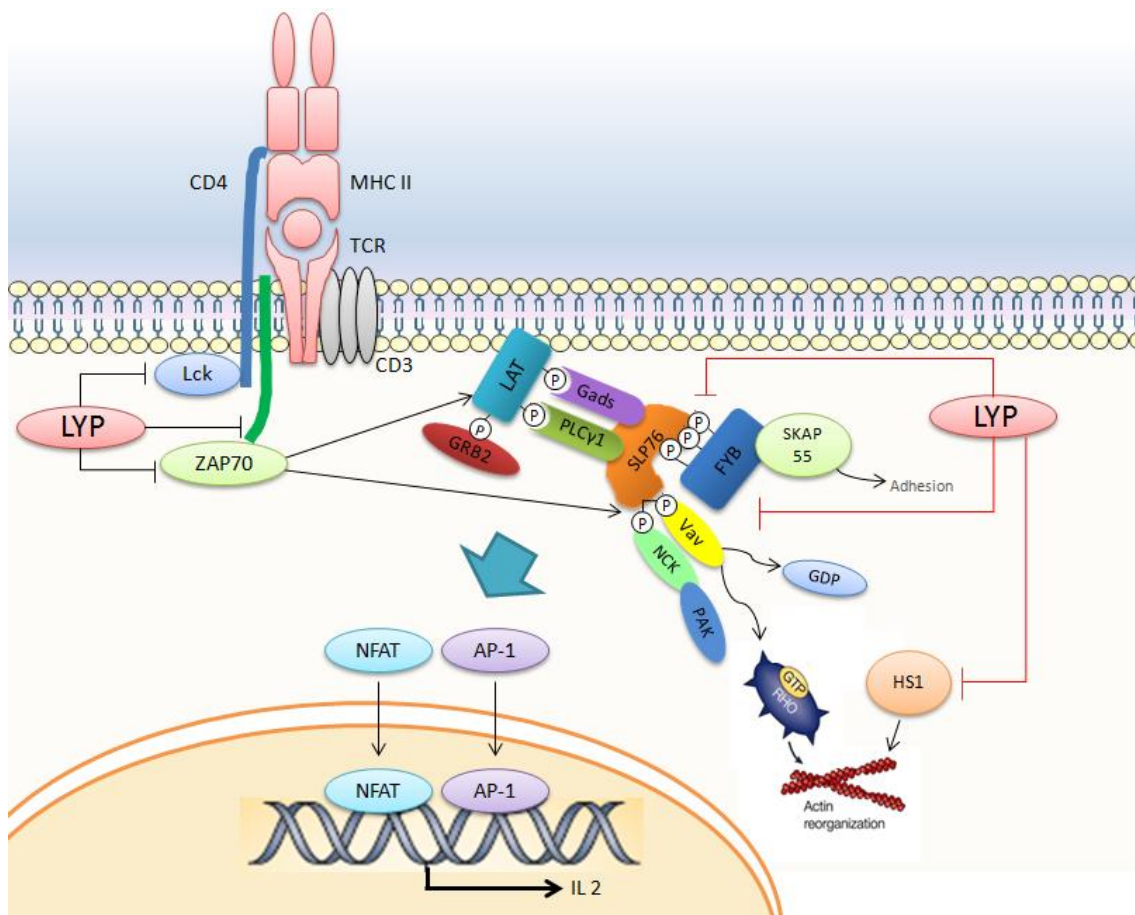


Figura 45: Modelo propuesto de la inhibición de la señalización del TCR por Lyp. En negro, las proteínas hasta el momento identificadas como sustratos de Lyp. En rojo, se incluyen las nuevas dianas caracterizadas en este estudio.

Conclusiones

1. SKAP55, SKAP-HOM, Fyb, SLP76, Vav1 y HS1 son sustratos *bona-fide* de Lyp.
2. El dominio catalítico de Lyp interacciona directamente con la Tyr237 de SKAP-HOM, las Tyr595, Tyr651 y Tyr771 de Fyb, las Tyr113, Tyr128 y Tyr145 de SLP76 y también con las Tyr378 y Tyr397 de HS1. Por tanto, todas estas tirosinas son susceptibles de ser desfosforiladas por Lyp.
3. Lyp presenta mayor afinidad por tirosinas cuyas secuencias flanqueantes se componen mayoritariamente de aminoácidos ácidos. En concreto, parece ser esencial que el aminoácido situado a continuación de la fosfotirosina sea un aspártico o un glutámico, mientras que también se requiere la presencia de un aminoácido apolar en la posición +3.
4. En células en reposo, Lyp se localiza en el citoplasma celular donde se distribuye homogéneamente.
5. Tras la estimulación del TCR, Lyp se localiza en los *microclusters* de SLP76, donde colocaliza con esta proteína.
6. Lyp regula la formación de *microclusters* de SLP76 inhibiendo su formación mediante la desfosforilación de las proteínas que los integran.
7. Lyp inhibe la activación de los promotores IL-2, NFAT y AP1 tras la estimulación del TCR.
8. Lyp modula la fosforilación de PLC γ 1 y Erk-2. La sobreexpresión de Lyp conduce a un incremento de P-PLC γ 1 y una disminución de P-Erk tras la estimulación del TCR, mientras que la depleción de la fosfatasa produce el efecto contrario.
9. La variante polimórfica R620W se comporta como mutación de pérdida de función en la señalización del TCR. En consecuencia, inhibe en menor medida que Lyp R tanto la formación de *microclusters*, como la activación de la expresión del promotor de IL-2.

Bibliografía

- Aarnisalo, J., Treszl, A., Svec, P., Marttila, J., Oling, V., Simell, O., Knip, M., Körner, A., Madacsy, L., Vasarhelyi, B., Ilonen, J. y Hermann, R. (2008). "Reduced CD4+T cell activation in children with type 1 diabetes carrying the PTPN22/Lyp 620Trp variant." *J. Autoimmun.* **31** (1): 13–21.
- Abraham, R.T. y Weiss, A.(2004). "Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signalling paradigm." *Nat Rev Immunol.* **4**(4):301-8.
- Alonso, A., Sasin, J., Bottini, N., Friedberg, I. y Osterman, A. (2004). "Protein tyrosine phosphatases in the human genome." *Cell* **117**(6): 699-711.
- Andersen, J. N., Jansen, P. G., Echwald, S., M.Mortensen, O. y H.Fukada, T. (2004). "A genomic perspective on protein tyrosine phosphatases: gene structure, pseudogenes, and genetic disease linkage." *FASEB J* **18**(1): 8-30.
- Angers-Loustau, A., Cote, J. F., Charest, A., Dowbenko, D. Y Spencer, S. (1999). "Protein tyrosine phosphatase-PEST regulates focal adhesion disassembly, migration, and cytokinesis in fibroblasts." *J Cell Biol* **144**(5): 1019-31.
- Aoki, N., Yamaguchi-Aoki, Y. y Ullrich, A. (1996). "The novel protein-tyrosine phosphatase PTP20 is a positive regulator of PC12 cell neuronal differentiation." *J Biol Chem* **271**(46): 29422-6.
- Aoki, N., Ueno, S., Mano, H., Yamasaki, S. y Shiota, M. (2004). "Mutual regulation of protein-tyrosine phosphatase 20 and protein-tyrosine kinase Tec activities by tyrosine phosphorylation and dephosphorylation." *J Biol Chem* **279**(11): 10765-75.
- Arechiga, A. F., Habib, T., He, Y., Zhang, X. y Zhang, Z. Y. (2009). "Cutting edge: the PTPN22 allelic variant associated with autoimmunity impairs B cell signaling." *J Immunol* **182**(6): 3343-7.
- Arimura, Y., Vang, T., Tautz, L., Williams, S. y Mustelin, T. (2008). "TCR-induced downregulation of protein tyrosine phosphatase PEST augments secondary T cell responses." *Mol Immunol* **45**(11):3074-84.
- Asada, H., Ishii, N., Sasaki, Y., Endo, K., Kasai, H., Tanaka, N., Takeshita, T., Tsuchiya, S., Konno, T. y Sugamura, K. (1999). "Grf40, A novel Grb2 family member, is involved in T cell signaling through interaction with SLP-76 and LAT." *J Exp Med.* **189**(9):1383-90.
- Ayoub, E., Hall, A., Scott, A.M., Chagnon, M.J., Miquel, G., Hallé, M., Noda, M., Bikfalvi, A. y Tremblay, M.L. (2013). "Regulation of the Src kinase-associated phosphoprotein 55 homologue by the protein tyrosine phosphatase PTP-PEST in the control of cell motility." *J Biol Chem.* **288**(36):25739-48.
- Badour, K., Zhang, J., Shi, F., Leng, Y. y Collins, M. (2004). "Fyn and PTP-PEST-mediated regulation of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) tyrosine phosphorylation is required for coupling T cell antigen receptor engagement to WASp effector function and T cell activation." *J Exp Med* **199**(1): 99-112.
- Baker, R.G., Hsu, C.J., Lee, D., Jordan, M.S., Maltzman, J.S., Hammer, D.A., Baumgart, T. y Koretzky, G.A. (2009). "The adapter protein SLP-76 mediates "outside-in" integrin signaling and function in T cells." *Mol Cell Biol* **9**:5578–89.
- Barr, A. J., Ugochukwu, E., Lee, W. H., King, O. N. y Filippakopoulos, P. (2009). "Large-scale structural analysis of the classical human protein tyrosine phosphatome." *Cell* **136**(2): 352-63.
- Begovich, A. B., Caillier, S. J., Alexander, H. C., Penko, J. M., Hauser, S. L. (2005). "The R620W polymorphism of the protein tyrosine phosphatase PTPN22 is not associated with multiple sclerosis." *Am J Hum Genet* **76**(1): 184-7.
- Begovich, A. B., Carlton, V. E., Honigberg, L. A., Schrod, S. J. y Chokkalingam, A. P. (2004). "A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis." *Am J Hum Genet* **75**(2): 330-7.
- Bergman, M., Mustelin, T., Oetken, C., Partanen, J., Flint, N.A., Amrein, K.E., Autero, M., Burn, P. y Alitalo, K. (1992). "The human p50csk tyrosine kinase phosphorylates p56lck at Tyr-505 and down regulates its catalytic activity." *EMBO J.* **11** (8):2919–2924.
- Bilal, M.Y, y Houtman, J.C. (2015). "GRB2 Nucleates T Cell Receptor-Mediated LAT Clusters That Control PLC-γ1 Activation and Cytokine Production." *Front Immunol.* **6**:141.

Bibliografía

- Bottini, N., Musumeci, L., Alonso, A., Rahmouni, S., Nika, K., Rostamkhani, M., MacMurray, J., Meloni, G.F., Lucarelli, P., Pellicchia, M., Eisenbarth, G.S., Comings, D. y Mustelin T. (2004). "A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes." Nat Genet **36**(4): 337-8.
- Bottini, N., Vang, T., Cucca, F. y Mustelin, T. (2006). "Role of PTPN22 in type 1 diabetes and other autoimmune diseases." Semin Immunol **18**(4): 207-13.
- Bravo, M.J., Colmenero, J.D., Queipo-Ortuño, M.I., Morata, P., Orozco, G., Martin, J., Alonso, A. y Caballero, A. (2009). "PTPN22 C1858T polymorphism and human Brucellosis." Scand. J. Infect. Dis. **41** (2): 109–112.
- Brownlie, R.J., Miosge, L.A., Vassilakos, D., Svensson, L.M., Cope, A. y Zamoyska, R. (2012). "Lack of the phosphatase PTPN22 increases adhesion of murine regulatory T cells to improve their immunosuppressive function." Sci Signal. **5**(252):ra87.
- Bubeck Wardenburg, J., Fu, C., Jackman, J.K., Flotow, H., Wilkinson, S.E., Williams, D.H., Johnson, R., Kong, G., Chan, A.C. y Findell, P.R. (1996). "Phosphorylation of SLP-76 by the ZAP-70 protein-tyrosine kinase is required for T-cell receptor function." J Biol Chem. **271**(33):19641-4.
- Bubeck-Wardenburg, J., Pappu, R., Bu, J.Y., Mayer, B., Chernoff, J., Straus, D. y Chan, A.C. (1998). "Regulation of PAK activation and the T cell cytoskeleton by the linker protein SLP-76." Immunity. **9**(5):607-16.
- Bunnell, S.C., Diehn, M., Yaffe, M.B., Findell, P.R., Cantley, L.C. y Berg, L.J. (2000). "Biochemical interactions integrating Itk with the T cell receptor-initiated signaling cascade." J Biol Chem. **275**(3):2219-30.
- Bunnell, S.C., Singer, A.L., Hong, D.I., Jacque, B.H., Jordan, M.S., Seminario, M.C., Barr, V.A., Koretzky, G.A. y Samelson, L.E. (2006). "Persistence of cooperatively stabilized signaling clusters drives T-cell activation." Mol Cell Biol. **26**(19):7155-66.
- Campi, G., Varma, R. y Dustin, M.L. (2005). "Actin and agonist MHC-peptide complex-dependent T cell receptor microclusters as scaffolds for signaling." J Exp Med. **202**(8):1031-6.
- Canton, I., Akhtar, S., Gavalas, N. G., Gawkrödger, D. J. y Blomhoff, A. (2005). "A single-nucleotide polymorphism in the gene encoding lymphoid protein tyrosine phosphatase (PTPN22) confers susceptibility to generalised vitiligo." Genes Immun **6**(7): 584-7.
- Carlton, V. E., Hu, X., Chokkalingam, A. P., Schrodli, S. J. y Brandon, R. (2005). "PTPN22 genetic variation: evidence for multiple variants associated with rheumatoid arthritis." Am J Hum Genet **77**(4): 567-81.
- Chapman, S.J., Khor, C.C., Vannberg, F.O., Maskell, N.A., Davies, C.W., Hedley, E.L., Segal, S., Moore, C.E., Knox, K., Day, N.P., Gillespie, S.H., Crook, D.W., Davies, R.J. y Hill, A.V. (2006). "PTPN22 and invasive bacterial disease." Nat. Genet. **38** (5): 499–500.
- Charest, A., Wagner, J., Shen, S. H. y Tremblay, M. L. (1995). "Murine protein tyrosine phosphatase-PEST, a stable cytosolic protein tyrosine phosphatase." Biochem J **308** (Pt 2): 425-32.
- Cheng, J., Daimaru, L., Fennie, C. y Lasky, L. A. (1996). "A novel protein tyrosine phosphatase expressed in lin(lo)CD34(hi)Sca(hi) hematopoietic progenitor cells." Blood **88**(4): 1156-67.
- Clements, J.L., Yang, B., Ross-Barta, S.E., Eliason, S.L., Hrstka, R.F., Williamson, R.A. y Koretzky, G.A. (1998). "Requirement for the leukocyte-specific adapter protein SLP-76 for normal T-cell development." Science **281**:416–9.
- Cloutier, J. F., Chow, L. M. y Veillette, A. (1995). "Requirement of the SH3 and SH2 domains for the inhibitory function of tyrosine protein kinase p50csk in T lymphocytes." Mol Cell Biol **15**(11): 5937-44.
- Cloutier, J.F. y Veillette, A. (1996). "Association of inhibitory tyrosine protein kinase p50csk with protein tyrosine phosphatase PEP in T cells and other hemopoietic cells." EMBO J. **15**:4909–4918
- Cloutier, J.F. y Veillette, A. (1999). "Cooperative inhibition of T-cell antigen receptor signaling by a complex between a kinase and a phosphatase." J. Exp.Med. **189** (1): 111–121.
- Cohen, S., Dadi, H., Shaoul, E., Sharfe, N. y Roifman, C. M. (1999). "Cloning and characterization of a lymphoid-specific, inducible human protein tyrosine phosphatase, Lyp." Blood **93**(6): 2013-24.

- Coussens, N.P., Hayashi, R., Brown, P.H., Balagopalan, L., Balbo, A., Akpan, I., Houtman, J.C., Barr, V.A., Schuck, P., Appella, E. y Samelson, L.E. (2013). "Multipoint binding of the SLP-76 SH2 domain to ADAP is critical for oligomerization of SLP-76 signaling complexes in stimulated T cells." *Mol Cell Biol*. **33**(21):4140-51.
- Cote, J. F., Chung, P. L., Theberge, J. F., Halle, M. y Spencer, S. (2002). "PSTPIP is a substrate of PTP-PEST and serves as a scaffold guiding PTP-PEST toward a specific dephosphorylation of WASP." *J Biol Chem* **277**(4): 2973-86.
- Criswell, L. A., Pfeiffer, K. A., Lum, R. F., Gonzales, B. y Novitzke, J. (2005). "Analysis of families in the multiple autoimmune disease genetics consortium (MADGC) collection: the PTPN22 620W allele associates with multiple autoimmune phenotypes." *Am J Hum Genet* **76**(4): 561-71.
- Crites, T.J., Padhan, K., Muller, J., Krogsgaard, M., Gudla, P.R., Lockett, S.J. y Varma, R. (2014). "TCR Microclusters pre-exist and contain molecules necessary for TCR signal transduction." *J Immunol*. **193**(1):56-67.
- daSilva, A.J., Li, Z.W., DeVera, C., Canto, E., Findell, P. y Rudd, C.E. (1997). "Cloning of a novel T-cell protein FYB that binds FYN and SH2-domain-containing leukocyte protein 76 and modulates interleukin 2 production." *Proc Natl Acad Sci USA* **94**:7493-8.
- Dang, C. V. y Lee, W. M. (1988). "Identification of the human c-myc protein nuclear translocation signal." *Mol Cell Biol* **8**(10): 4048-54.
- Davidson, D., Cloutier, J. F., Gregorieff, A. y Veillette, A. (1997). "Inhibitory tyrosine protein kinase p50csk is associated with protein-tyrosine phosphatase PTP-PEST in hemopoietic and non-hemopoietic cells." *J Biol Chem* **272**(37): 23455-62.
- Davidson, D. y Veillette, A. (2001). "PTP-PEST, a scaffold protein tyrosine phosphatase, negatively regulates lymphocyte activation by targeting a unique set of substrates." *EMBO J*. **20**(13): 3414-26.
- Davidson, D., Shi, X., Zhong, M.C., Rhee, I. y Veillette, A. (2010). "The phosphatase PTP-PEST promotes secondary T cell responses by dephosphorylating the protein tyrosine kinase Pyk2." *Immunity*. **33**(2):167-80.
- de la Puerta, M.L., Trinidad, A.G., Rodríguez, Mdel C., de Pereda, J.M., Sánchez Crespo, M., Bayón, Y. y Alonso, A. (2013). "The autoimmunity risk variant LYP-W620 cooperates with CSK in the regulation of TCR signaling." *PLoS One*. **8**(1):e54569.
- Delon, J., Bercovici, N., Liblau, R. y Trautmann, A. (1998). "Imaging antigen recognition by naive CD4+ T cells: compulsory cytoskeletal alterations for the triggering of an intracellular calcium response." *Eur J Immunol* **28**(2):716-29.
- Dosil, M., Leibman, N. y Lemischka, I. R. (1996). "Cloning and characterization of fetal liver phosphatase 1, a nuclear protein tyrosine phosphatase isolated from hematopoietic stem cells." *Blood* **88**(12): 4510-25.
- Duke-Cohan, J.S., Kang, H., Liu, H. y Rudd, C.E. (2006). "Regulation and function of SKAP-55 noncanonical motif binding to the SH3c domain of adhesion and degranulation-promoting adaptor protein." *J Biol Chem* **281**:13743-50.
- Egashira, M., Kitamura, D., Watanabe, T. y Niikawa, N. (1996). "The human HCLS1 gene maps to chromosome 3q13 by fluorescence in situ hybridization." *Cytogenet Cell Genet*. **72**(2):175-6.
- Fiorillo, E., Orrú, V., Stanford, S.M., Liu, Y., Salek, M., Rapini, N., Schenone, A.D., Saccucci, P., Delogu, L.G., Angelini, F., Manca Bitti, M.L., Schmedt, C., Chan, A.C., Acuto, O. y Bottini, N. (2010). "Autoimmune-associated PTPN22 R620W variation reduces phosphorylation of lymphoid phosphatase on an inhibitory tyrosine residue." *J Biol Chem*. **285**(34):26506-18.
- Fischer, U., Michel, A. y Meese, E.U. (2005). "Expression of the gene for hematopoietic cell specific protein is not restricted to cells of hematopoietic origin." *Int J Mol Med*. **15**(4):611-5.
- Flint, A. J., Tiganis, T., Barford, D. y Tonks, N. K. (1997). "Development of "substrate-trapping" mutants to identify physiological substrates of protein tyrosine phosphatases." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(5): 1680-5.
- Flores, E., Roy, G., Patel, D., Shaw, A. y Thomas, M. L. (1994). "Nuclear localization of the PEP protein tyrosine phosphatase." *Mol Cell Biol* **14**(7): 4938-46.

Bibliografía

- Gakidis, M.A., Cullere, X. y Olson, T. (2004). "Vav GEFs are required for $\beta 2$ integrin-dependent functions of neutrophils." J Cell Biol **166**:273–82.
- García-Bustos, J., Heitman, J. y Hall, M. N. (1991). "Nuclear protein localization." Biochim Biophys Acta **1071**(1): 83-101
- Garton, A. J. y Tonks, N. K. (1994). "PTP-PEST: a protein tyrosine phosphatase regulated by serine phosphorylation." EMBO J **13**(16): 3763-71.
- Garton, A. J. y Tonks, N. K. (1999). "Regulation of fibroblast motility by the protein tyrosine phosphatase PTP-PEST." J Biol Chem **274**(6): 3811-8.
- Gensler, M., Buschbeck, M. y Ullrich, A. (2004). "Negative regulation of HER2 signaling by the PEST-type protein-tyrosine phosphatase BDP1." J Biol Chem. **279**(13):12110-6.
- Ghose, R., Shekhtman, A., Goger, M.J., Ji, H. y Cowburn D. (2001). "A novel, specific interaction involving the Csk SH3 domain and its natural ligand." Nat Struct Biol. **8**:998–1004.
- Gjörloff-Wingren, A., Saxena, M., Han, S., Wang, X., Alonso, A., Renedo, M., Oh, P., Williams, S., Schnitzer, J. y Mustelin, T. (2000). "Subcellular localization of intracellular protein tyrosine phosphatases in T cells." Eur. J. Immunol. **30** (8): 2412–2421.
- Gomez, T.S., McCarney, S.D. y Carrizosa, E. (2006). "HS1 functions as an essential actin-regulatory adaptor protein at the immune synapse." Immunity. **24**(6):741–52.
- Gomez, T.S., Kumar, K., Medeiros, R.B., Shimizu, Y., Leibson, P.J. y Billadeau, D.D. (2007). "Formins regulate the actin-related protein 2/3 complex-independent polarization of the centrosome to the immunological synapse." Immunity. **26**(2):177-90.
- Graham, D.B., Robertson, C.M. y Bautista, J. (2007). "Neutrophil-mediated oxidative burst and host defense are controlled by a Vav-PLC $\beta 2$ signaling axis in mice." J Clin Invest **117**:3445–52.
- Gregorieff, A., Cloutier, J.F. y Veillette, A. (1998). "Sequence requirements for association of protein-tyrosine phosphatase PEP with the Src homology 3 domain of inhibitory tyrosine protein kinase p50(csk)." J. Biol. Chem. **273** (21):13217–13222.
- Griffiths, E.K., Krawczyk, C. y Kong, Y.Y. (2001). "Positive regulation of T cell activation and integrin adhesion by the adapter Fyb/Slap." Science **293**:2260–3.
- Gross, B.S., Lee, J.R., Clements, J.L., Turner, M., Tybulewicz, V.L.J., Findell, P.R., Koretzky, G.A. y Watson, S.P. (1999). "Tyrosine phosphorylation of SLP-76 is downstream of Syk following stimulation of the collagen receptor in platelets." J Biol Chem **274**:5963–71.
- Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." J Mol Biol. **166**(4):557-80.
- Hasegawa, K., Yajima, H., Katagiri, T., Ogimoto, M. y Arimura, Y. (1999). "Requirement of PEST domain tyrosine phosphatase PEP in B cell antigen receptor-induced growth arrest and apoptosis." Eur J Immunol **29**(3): 887-96.
- Hasegawa, K., Martin, F., Huang, G., Tumas, D., Diehl, L. y Chan, A.C. (2004). "PEST domain-enriched tyrosine phosphatase (PEP) regulation of effector/memory T cells." Science. **303**:685–689.
- Herndon, T.M., Shan, X.C., Tsokos, G.C. y Wange, R.L. (2001). "ZAP-70 and SLP-76 regulate protein kinase C- θ and NF- κ B activation in response to engagement of CD3 and CD28." J Immunol. **166**(9):5654-64.
- Hill, R.J., Zozulya, S., Lu, Y.L., Ward, K., Gishizky, M. y Jallal, B. (2002). "The lymphoid protein tyrosine phosphatase Lyp interacts with the adaptor molecule Grb2 and functions as a negative regulator of T-cell activation." Exp. Hematol. **30** (3): 237–244.
- Hinks, A., Barton, A., John, S., Bruce, I. y Hawkins, C. (2005). "Association between the PTPN22 gene and rheumatoid arthritis and juvenile idiopathic arthritis in a UK population: further support that PTPN22 is an autoimmunity gene." Arthritis Rheum **52**(6): 1694-9.

- Huang, K., Sommers, C. L., Grinberg, A., Kozak, C. A. y Love, P. E. (1996). "Cloning and characterization of PTP-K1, a novel nonreceptor protein tyrosine phosphatase highly expressed in bone marrow." Oncogene **13**(7): 1567-73
- Huang, Y., Comiskey, E.O., Dupree, R.S., Li, S., Koleske, A.J. y Burkhardt, J.K. (2008). "The c-Abl tyrosine kinase regulates actin remodeling at the immune synapse." Blood. **112**(1):111-9.
- Hutchcroft, J.E., Slavik, J.M., Lin, H., Watanabe, T. y Bierer, B.E. (1998). "Uncoupling activation-dependent HS1 phosphorylation from nuclear factor of activated T cells transcriptional activation in Jurkat T cells: differential signaling through CD3 and the costimulatory receptors CD2 and CD28." J Immunol. **161**(9):4506-12.
- Jackman, J.K., Motto, D.G., Sun, Q., Tanemoto, M., Turck, C.W., Peltz, G.A., Koretzky, G.A. y Findell, P.R. (1995). "Molecular cloning of SLP-76, a 76-kDa tyrosine phosphoprotein associated with Grb2 in T cells." J Biol Chem. **270**(13):7029-32.
- Jagiello, P., Aries, P., Arning, L., Wagenleiter, S. E. y Csernok, E. (2005). "The PTPN22 620W allele is a risk factor for Wegener's granulomatosis." Arthritis Rheum **52**(12): 4039-43.
- Jamieson, J. S., Tumbarello, D. A., Halle, M., Brown, M. C. y Tremblay, M. L. (2005). "Paxillin is essential for PTP-PEST-dependent regulation of cell spreading and motility: a role for paxillin kinase linker." J Cell Sci **118**(Pt 24): 5835-47.
- Jia, Z., Barford, D., Flint, A. J. y Tonks, N. K. (1995). "Structural basis for phosphotyrosine peptide recognition by protein tyrosine phosphatase 1B." Science **268**(5218): 1754-8.
- Jo, E.K., Wang, H. y Rudd, C.E. (2005). "An essential role for SKAP-55 in LFA-1 clustering on T cells that cannot be substituted by SKAP-55R." J Exp Med **201**:1733-9.
- Kang, H., Freund, C., Duke-Cohan, J.S., Musacchio, A., Wagner, G. y Rudd, C.E. (2000). "SH3 domain recognition of a proline-independent tyrosine-based RKxxYxxY motif in immune cell adaptor SKAP55." EMBO J **19**:2889-99.
- Kim, Y. W., Wang, H., Sures, I., Lammers, R. y Martell, K. J. (1996). "Characterization of the PEST family protein tyrosine phosphatase BDP1." Oncogene **13**(10): 2275-9.
- Kitamura, D., Kaneko, H., Miyagoe, Y., Ariyasu, T. y Watanabe, T. (1989). "Isolation and characterization of a novel human gene expressed specifically in the cells of hematopoietic lineage." Nucleic Acids Res. **17**(22):9367-79.
- Kliche, S., Breitling, D. y Togni, M. (2006). "The ADAP/SKAP55 signaling module regulates T-cell receptor-mediated integrin activation through plasma membrane targeting of Rap1." Mol Cell Biol **26**:7130-44.
- Kovacs, E.M. y Yap, A.S. (2002). "The web and the rock: cell adhesion and the ARP2/3 complex." Dev Cell **3**:760-1.
- Krawczyk, C., Oliveira-dos-Santos, A., Sasaki, T., Griffiths, E., Ohashi, P.S., Snapper, S., Alt, F. y Penninger, J.M. (2002). "Vav1 controls integrin clustering and MHC/peptide-specific cell adhesion to antigen-presenting cells." Immunity **16**:331-43.
- Ksionda, O., Saveliev, A., Köchl, R., Rapley, J., Faroudi, M., Smith-Garvin, J.E., Wülfing, C., Rittinger, K., Carter, T. y Tybulewicz, V.L. (2012). "Mechanism and function of Vav1 localisation in TCR signalling." J Cell Sci. **125**(Pt 22):5302-14.
- Kumar, L., Pivniouk, V., de la Fuente, M.A., Laouini, D. y Geha, R.S. (2002). "Differential role of SLP-76 domains in T cell development and function." Proc Natl Acad Sci U S A. **99**(2):884-9.
- Kyogoku, C., Langefeld, C. D., Ortmann, W. A., Lee, A. y Selby, S. (2004). "Genetic association of the R620W polymorphism of protein tyrosine phosphatase PTPN22 with human SLE." Am J Hum Genet **75**(3): 504-7.
- Lamsyah, H., Rueda, B., Baassi, L., Elaouad, R., Bottini, N., Sadki, K. y Martin, J. (2009). "Association of PTPN22 gene functional variants with development of pulmonary tuberculosis in Moroccan population." Tissue Antigens **74** (3): 228-232.

Bibliografía

- Lasserre, R., Charrin, S., Cuche, C., Danckaert, A., Thoulouze, M.I., de Chaumont, F., Duong, T., Perrault, N., Varin-Blank, N., Olivo-Marin, J.C., Etienne-Manneville, S., Arpin, M. y Di Bartolo, V. (2010). "Ezrin tunes T-cell activation by controlling Dlg1 and microtubule positioning at the immunological synapse." EMBO J. **29**:2301–2314.
- Lasserre, R., Cuche, C., Blecher-Gonen, R., Libman, E., Biquand, E., Danckaert, A., Yablonski, D., Alcover, A. y Di Bartolo, V. (2011). "Release of serine/threonine-phosphorylated adaptors from signaling microclusters down-regulates T cell activation." J Cell Biol. **195**(5):839-53.
- Lee, A. T., Li, W., Liew, A., Bombardier, C. y Weisman, M. (2005). "The PTPN22 R620W polymorphism associates with RF positive rheumatoid arthritis in a dose-dependent manner but not with HLA-SE status." Genes Immun **6**(2): 129-33.
- Lee, H., Yi, J.S., Lawan, A., Min, K. y Bennett, A.M. (2015). "Mining the function of protein tyrosine phosphatases in health and disease." Semin Cell Dev Biol. **37**:66-72.
- Levinson, N.M., Visperas, P.R. y Kuriyan, J. (2009). "The tyrosine kinase Csk dimerizes through Its SH3 domain." PLoS ONE. **4** (11): e7683.
- Li, X., Oghi, K. A., Zhang, J., Krones, A. y Bush, K. T. (2003). "Eya protein phosphatase activity regulates Six1-Dach-Eya transcriptional effects in mammalian organogenesis." Nature **426**(6964): 247-54.
- Liou, J., Kiefer, F., Dang, A., Hashimoto, A., Cobb, M.H., Kurosaki, T. y Weiss, A. (2000). "HPK1 is activated by lymphocyte antigen receptors and negatively regulates AP-1." Immunity. **12**(4):399-408.
- Liu, J., Kang, H., Raab, M., da Silva, A.J., Kraeft, S.K. y Rudd, C.E. (1998). "FYB (FYN binding protein) serves as a binding partner for lymphoid protein and FYN kinase substrate SKAP55 and a SKAP55-related protein in T cells." Proc Natl Acad Sci USA **95**:8779–84.
- Liu, S.K., Fang, N., Koretzky, G.A. y McGlade, C.J. (1999). "The hematopoietic-specific adaptor protein gads functions in T-cell signaling via interactions with the SLP-76 and LAT adaptors." Curr Biol. **9**(2):67-75.
- Lopez-Escamez, J.A. (2010). "A variant of PTPN22 gene conferring risk to autoimmune diseases may protect against tuberculosis." J. Postgrad. Med. **56** (3): 242–243.
- Lupher Jr., M.L., Songyang, Z., Shoelson, S.E., Cantley, L.C. y Band, H. (1997). "The Cbl phosphotyrosine-binding domain selects a D(N/D)XpY motif and binds to the Tyr292 negative regulatory phosphorylation site of ZAP-70." J. Biol. Chem. **272** (52): 33140–33144.
- Maine, C.J., Marquardt, K., Scatizzi, J.C., Pollard, K.M., Kono, D.H. y Sherman, L.A. (2015). "The effect of the autoimmunity-associated gene, PTPN22, on a BXS-derived model of lupus." Clin Immunol. **156**(1):65-73.
- Maksumova, L., Le, H.T., Muratkhodjaev, F., Davidson, D., Veillette, A. y Pallen, C.J. (2005). "Protein tyrosine phosphatase alpha regulates Fyn activity and Cbp/PAG phosphorylation in thymocyte lipid rafts." J. Immunol. **175** (12): 7947–7956.
- Maltzman, J.S., Kovoov, L., Clements, J.L. y Koretzky, G.A. (2005). "Conditional deletion reveals a cell-autonomous requirement of SLP-76 for thymocyte selection." J Exp Med. **202**(7):893-900.
- Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T. y Sudarsanam, S. (2002). "The protein kinase complement of the human genome." Science **298**(5600): 1912-34.
- Marcos, T., Ruiz-Martín, V., de la Puerta, M.L., Trinidad, A.G., Rodríguez, Mdel C., de la Fuente, M.A., Sánchez Crespo, M., Alonso, A. y Bayón Y. (2014). "Proline-serine-threonine phosphatase interacting protein 1 inhibition of T-cell receptor signaling depends on its SH3 domain." FEBS J. **281**(17):3844-54.
- Marie-Cardine, A., Verhagen, A.M., Eckerskorn, C. y Schraven, B. (1998). "SKAP-HOM, a novel adaptor protein homologous to the FYN-associated protein SKAP55." FEBS Lett **435**:55–60.
- Martin, M. C., Oliver, J., Urcelay, E., Orozco, G. y Gomez-Garcia, M. (2005). "The functional genetic variation in the PTPN22 gene has a negligible effect on the susceptibility to develop inflammatory bowel disease." Tissue Antigens **66**(4): 314-7.

- Martinez-Quiles, N. (2013). "Emerging roles of hematopoietic lineage cell-specific protein 1 in the immune system." OA Immunology **1**(1):2.
- Matthews, R. J., Bowne, D. B., Flores, E. y Thomas, M. L. (1992). "Characterization of hematopoietic intracellular protein tyrosine phosphatases: description of a phosphatase containing an SH2 domain and another enriched in proline-, glutamic acid-, serine-, and threonine-rich sequences." Mol Cell Biol **12**(5): 2396-405.
- Michelot, A., Grassart, A., Okreglak, V., Costanzo, M., Boone, C. y Drubin, D.G. (2013). "Actin filament elongation in arp2/3-derived networks is controlled by three distinct mechanisms." Dev Cell. **24**(2):182–95.
- Milkiewicz, P., Pache, I., Buwaneswaran, H., Liu, X., Coltescu, C., Heathcote, E.J. y Siminovitch, K.A. (2006). "The PTPN22 1858T variant is not associated with primary biliary cirrhosis." Tissue Antigens **67**(5): 434-7.
- Montes-Cano, M.A., García-Lozano, J.R., Aguilar-Reina, J., Romero-Gómez, M., Barroso, N., Nuñez-Roldán, A., Martín, J. y González-Escribano, M.F. (2008). "PTPN22 C1858T polymorphism and the outcome of hepatitis C virus infection." Viral Immunol. **21** (4): 491–494.
- Musci, M.A., Motto, D.G., Ross, S.E., Fang, N. y Koretzky, G.A. (1997). "Three domains of SLP-76 are required for its optimal function in a T cell line." J Immunol. **159**(4):1639-47.
- Mustelin, T., Alonso, A., Bottini, N., Huynh, H., Rahmouni, S., Nika, K., Louis-dit-Sully, C., Tautz, L., Togo, S.H., Bruckner, S., Mena-Duran, A.V. y al-Khoury, A.M. (2004). "Protein tyrosine phosphatases in T cell physiology." Mol. Immunol. **41** (6–7): 687–700.
- Myung, P.S., Derimanov, G.S., Jordan, M.S., Punt, J.A., Liu, Q.H., Judd, B.A., Meyers, E.E., Sigmund, C.D., Freedman, B.D. y Koretzky, G.A. (2001). "Differential requirement for SLP-76 domains in T cell development and function." Immunity. **15**(6):1011-26.
- Nika, K., Tautz, L., Arimura, Y., Vang, T., Williams, S. y Mustelin, T. (2007). "A weak Lck tail bite is necessary for Lck function in T cell antigen receptor signaling." J. Biol. Chem. **282** (49): 36000–36009.
- Nobes, C.D. y Hall, A. (1995). "Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia." Cell **81**:53–62.
- Nolz, J.C., Gomez, T.S., Zhu, P., Li, S., Medeiros, R.B., Shimizu, Y., Burkhardt, J.K., Freedman, B.D. y Billadeau, D.D. (2006). "The WAVE2 complex regulates actin cytoskeletal reorganization and CRAC-mediated calcium entry during T cell activation." Curr Biol.**16**(1):24-34.
- Ophir, M.J., Liu, B.C. y Bunnell, S.C. (2013). "The N terminus of SKAP55 enables T cell adhesion to TCR and integrin ligands via distinct mechanisms." J Cell Biol. **203**(6):1021-41.
- Orozco, G., Eerligh, P., Sanchez, E., Zhernakova, S. y Roep, B. O. (2005). "Analysis of a functional BTNL2 polymorphism in type 1 diabetes, rheumatoid arthritis, and systemic lupus erythematosus." Hum Immunol **66**(12): 1235-41.
- Orru, V., Tsai, S. J., Rueda, B., Fiorillo, E. y Stanford, S. M. (2009). "A loss-of-function variant of PTPN22 is associated with reduced risk of systemic lupus erythematosus." Hum Mol Genet. **18**(3): 569-79.
- Otsuka, J., Horiuchi, T., Yoshizawa, S., Tsukamoto, H., Sawabe, T. y Kikuchi, Y. (2004). "Association of a four-amino acid residue insertion polymorphism of the HS1 gene with systemic lupus erythematosus: molecular and functional analysis." Arthritis Rheum. **50**(3):871–81.
- Palacios, E. H. y Weiss, A. (2004). "Function of the Src-family kinases, Lck and Fyn, in T-cell development and activation." Oncogene **23**(48): 7990-8000.
- Pearce, A.C., McCarty, O.J., Calaminus, S.D., Vigorito, E., Turner, M. y Watson, S.P. (2007). "Vav family proteins are required for optimal regulation of PLCc2 by integrin α 11b β 3." Biochem J **401**:753–61.
- Pearson, R. B. y Kemp, B. E. (1991). "Protein kinase phosphorylation site sequences and consensus specificity motifs: tabulations." Methods Enzymol **200**: 62-81.
- Perricone, C., Ceccarelli, F. y Valesini, G. (2011). "An overview on the genetic of rheumatoid arthritis: a never-ending story." Autoimmun Rev. **10**:599–608.

Bibliografía

- Peterson, E.J., Woods, M.L. y Dmowski, S.A. (2001). "Coupling of the TCR to integrin activation by Slap-130/Fyb." Science **293**:2263–5.
- Pivniouk, V., Tsitsikov, E., Swinton, P., Rathbun, G., Alt, F.W. y Geha, R.S. (1998). "Impaired viability and profound block in thymocyte development in mice lacking the adaptor protein SLP-76." Cell **94**:229–38.
- Playford, M.P., Lyons, P.D., Sastry, S.K. y Schaller, M.D.(2006). "Identification of a filamin docking site on PTP-PEST." J Biol Chem. **281**(45):34104-12.
- Prescott, N. J., Fisher, S. A., Onnie, C., Pattni, R. y Steer, S. (2005). "A general autoimmunity gene (PTPN22) is not associated with inflammatory bowel disease in a British population." Tissue Antigens **66**(4): 318-20.
- Raab, M., da Silva, A.J., Findell, P.R. y Rudd, C.E. (1997). "Regulation of Vav-SLP-76 binding by ZAP-70 and its relevance to TCRn/CD3 induction of interleukin-2." Immunity **6**:155–64.
- Rayapureddi, J. P., Kattamuri, C., Steinmetz, B. D., Frankfort, B. J. y Ostrin, E. J. (2003). "Eyes absent represents a class of protein tyrosine phosphatases." Nature **426**(6964): 295-8.
- Rayapureddi, J. P., Kattamuri, C., Chan, F. H. y Hegde, R. S. (2005). "Characterization of a plant, tyrosine-specific phosphatase of the aspartyl class." Biochemistry **44**(2): 751-8.
- Rieck, M., Arechiga, A., Onengut-Gumuscu, S., Greenbaum, C., Concannon, P. y Buckner, J.H. (2007). "Genetic variation in PTPN22 corresponds to altered function of T and B lymphocytes." J. Immunol. **179** (7): 4704–4710.
- Robledo, G., González, C.I., Morillo, C., Martín, J. y González, A. (2007). "Association study of PTPN22 C1858T polymorphism in Trypanosoma cruzi infection." Tissue Antigens **69** (3): 261–264.
- Rogers, S., Wells, R. y Rechsteiner, M. (1986). "Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis." Science **234**(4774): 364-8.
- Rottner, K. y Stradal, T.E. (2001). "Actin dynamics and turnover in cell motility." Curr Opin Cell Biol. **23**(5):569–78.
- Rudd, C.E. (1999). "Adaptors and molecular scaffolds in immune cell signaling." Cell **96**:5–8.
- Rueda, B., Nunez, C., Orozco, G., Lopez-Nevot, M. A. y de la Concha, E. G. (2005). "C1858T functional variant of PTPN22 gene is not associated with celiac disease genetic predisposition." Hum Immunol **66**(7): 848-52.
- Ruzzene, M., Brunati, A.M., Marin, O., Donella-Deana, A. y Pinna, L.A. (1996). "SH2 domains mediate the sequential phosphorylation of HS1 protein by p72syk and Src-related protein tyrosine kinases." Biochemistry. **35**(16):5327-32.
- Sakaguchi, N., Takahashi, T., Hata, H., Nomura, T., Tagami, T., Yamazaki, S., Sakihama, T., Matsutani, T., Negishi, I., Nakatsuru, S. y Sakaguchi, S. (2003). "Altered thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice." Nature. **426**:454–460.
- Salmeen, A., Andersen, J. N., Myers, M. P., Tonks, N. K. y Barford, D. (2000). "Molecular basis for the dephosphorylation of the activation segment of the insulin receptor by protein tyrosine phosphatase 1B." Mol Cell **6**(6): 1401-12.
- Samelson, L. E. (2002). "Signal transduction mediated by the T cell antigen receptor: the role of adapter proteins." Annu Rev Immunol **20**: 371-94.
- Sarmiento, M., Puius, Y. A., Vetter, S. W., Keng, Y. F. y Wu, L. (2000). "Structural basis of plasticity in protein tyrosine phosphatase 1B substrate recognition." Biochemistry **39**(28): 8171-9.
- Sastry, S. K., Lyons, P. D., Schaller, M. D. y Burrige, K. (2002). "PTP-PEST controls motility through regulation of Rac1." J Cell Sci **115**(Pt 22): 4305-16.
- Sastry, S. K., Rajfur, Z., Liu, B. P., Cote, J. F. y Tremblay, M. L. (2006). "PTP-PEST couples membrane protrusion and tail retraction via VAV2 and p190RhoGAP." J Biol Chem **281**(17): 11627-36.

- Sauer, K., Liou, J., Singh, S.B., Yablonski, D., Weiss, A. y Perlmutter, R.M. (2001). "Hematopoietic progenitor kinase 1 associates physically and functionally with the adaptor proteins B cell linker protein and SLP-76 in lymphocytes." *J Biol Chem.* **276**(48):45207-16.
- Sawabe, T., Horiuchi, T., Koga, R., Tsukamoto, H., Kojima, T. y Harashima, S. (2003). "Aberrant HS1 molecule in a patient with systemic lupus erythematosus." *Genes Immun.* **4**(2):122-31.
- Shiota, M., Tanihiro, T., Nakagawa, Y., Aoki, N. y Ishida, N. (2003). "Protein tyrosine phosphatase PTP20 induces actin cytoskeleton reorganization by dephosphorylating p190 RhoGAP in rat ovarian granulosa cells stimulated with follicle-stimulating hormone." *Mol Endocrinol* **17**(4): 534-49.
- Sirois, J., Cote, J. F., Charest, A., Uetani, N. y Bourdeau, A. (2006). "Essential function of PTP-PEST during mouse embryonic vascularization, mesenchyme formation, neurogenesis and early liver development." *Mech Dev* **123**(12): 869-80.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. y Klenk, D.C. (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid." *Anal Biochem* **150**(1): 76-85.
- Smyth, D., Cooper, J. D., Collins, J. E., Heward, J. M. y Franklyn, J. A. (2004). "Replication of an association between the lymphoid tyrosine phosphatase locus (Lyp/PTPN22) with type 1 diabetes, and evidence for its role as a general autoimmunity locus." *Diabetes* **53**(11): 3020-3.
- Soulsby, M. y Bennett, A.M. (2009). "Physiological signaling specificity by protein tyrosine phosphatases." *Physiology (Bethesda)*. **24**:281-9.
- Spencer, S., Dowbenko, D., Cheng, J., Li, W., Brush, J., Utzig, S., Simanis, V. y Lasky, L.A. (1997). "PSTPIP: a tyrosine phosphorylated cleavage furrow-associated protein that is a substrate for a PEST tyrosine phosphatase." *J Cell Biol.* **138**(4):845-60.
- Stanford, S. M., Krishnamurthy, D., Falk, M.D., Messina, R., Debnath, B., Li, S., Liu, T., Kazemi, R., Dahl, R., He, Y., Yu, X., Chan, A.C., Zhang, Z.Y., Barrios, A.M., Woods, V.L. Jr., Neamati, N. y Bottini, N. (2011). "Discovery of a novel series of inhibitors of lymphoid tyrosine phosphatase with activity in human T cells." *J. Med Chem.* **54**:1640-1654.
- Stanford, S. M., Rapini, N. y Bottini, N. (2012). "Regulation of TCR signalling by tyrosine phosphatases: from immune homeostasis to autoimmunity." *Immunology.* **137**:1-19.
- Stanford, S.M. y Bottini, N. (2014). "PTPN22: the archetypal non-HLA autoimmunity gene." *Nat Rev Rheumatol.* **10**(10):602-11.
- Takemoto, Y., Furuta, M., Li, X.K., Strong- Sparks, W.J. y Hashimoto, Y. (1995). "LckBP1, a proline-rich protein expressed in haematopoietic lineage cells, directly associates with the SH3 domain of protein tyrosine kinase p56lck." *EMBO J.* **14**(4):3403-14.
- Takemoto, Y., Sato, M., Furuta, M. y Hashimoto, Y. (1996). "Distinct binding patterns of HS1 to the Src SH2 and SH3 domains reflect possible mechanisms of recruitment and activation of downstream molecules." *Int Immunol.* **8**(11):1699-705.
- Taniuchi, I., Kitamura, D., Maekawa, Y., Fukuda, T., Kishi, H. y Watanabe, T. (1995). "Antigen-receptor induced clonal expansion and deletion of lymphocytes are impaired in mice lacking HS1 protein, a substrate of the antigen-receptor-coupled tyrosine kinases." *EMBO J.* **14**(15): 3664-78.
- Tautz, L., Pellicchia, M. y Mustelin, T. (2006). "Targeting the PTPome in human disease." *Expert Opin Ther Targets* **10**(1): 157-77.
- Tiganis, T. y Bennett, A.M. (2007). "Protein tyrosine phosphatase function: the substrate perspective." *Biochem J.* **402**(1):1-15.
- Tootle, T.L., Silver, S.J., Davies, E.L., Newman, V., Latek, R.R., Mills, I.A., Selengut, J.D., Parlikar, B.E. y Rebay, I. (2003). "The transcription factor Eyes absent is a protein tyrosine phosphatase." *Nature.* **426**(6964):299-302.

Bibliografía

- Tskvitaria-Fuller, I., Rozelle, A.L., Yin, H.L. y Wülfing, C. (2003). "Regulation of sustained actin dynamics by the TCR and costimulation as a mechanism of receptor localization." J Immunol. **171**(5):2287-95.
- Valitutti, S., Dessing, M., Aktories, K., Gallati, H. y Lanzavecchia, A. (1995). "Sustained signaling leading to T cell activation results from prolonged T cell receptor occupancy. Role of T cell actin cytoskeleton." J Exp Med. **181**(2):577-84.
- van Oene, M., Wintle, R. F., Liu, X., Yazdanpanah, M. y Gu, X. (2005). "Association of the lymphoid tyrosine phosphatase R620W variant with rheumatoid arthritis, but not Crohn's disease, in Canadian populations." Arthritis Rheum **52**(7): 1993-8.
- Vandiedonck, C., Capdevielle, C., Giraud, M., Krumeich, S. Y Jais, J. P. (2006). "Association of the PTPN22*R620W polymorphism with autoimmune myasthenia gravis." Ann Neurol **59**(2): 404-7.
- Vang, T., Congia, M., Macis, M.D., Musumeci, L., Orrú, V., Zavattari, P., Nika, K., Tautz, L., Taskén, K., Cucca, F., Mustelin, T. y Bottini, N. (2005). "Autoimmune-associated lymphoid tyrosine phosphatase is a gain-of-function variant." Nat. Genet. **37** (12): 1317–1319.
- Vang, T., Liu, W.H., Delacroix, L., Wu, S., Vasile, S., Dahl, R., Yang, L., Musumeci, L., Francis, D., Landskron, J., Tasken, K., Tremblay, M.L., Lie, B.A., Page, R., Mustelin, T., Rahmouni, S., Rickert, R.C. y Tautz, L. (2012). "LYP inhibits T-cell activation when dissociated from CSK." Nat. Chem. Biol. **8**:437–446.
- Vang, T., Miletic, A. V., Arimura, Y., Tautz, L. y Rickert, R. C. (2008). "Protein tyrosine phosphatases in autoimmunity." Annu Rev Immunol **26**: 29-55.
- Vardhana, S., Choudhuri, K., Varma R. y Dustin, M.L. (2010). "Essential role of ubiquitin and TSG101 protein in formation and function of the central supra-molecular activation cluster." Immunity. **32**:531–540.
- Veillette, A., Rhee, I., Souza, C.M. y Davidson, D. (2009). "PEST family phosphatases in immunity, autoimmunity, and autoimmune inflammatory disorders." Immunol Rev. **228**(1):312-24.
- Velaga, M. R., Wilson, V., Jennings, C. E., Owen, C. J. y Herington, S. (2004). "The codon 620 tryptophan allele of the lymphoid tyrosine phosphatase (LYP) gene is a major determinant of Graves' disease." J Clin Endocrinol Metab **89**(11): 5862-5.
- Vicente-Manzanares, M. y Sánchez-Madrid, F. (2004). "Role of the cytoskeleton during leukocyte responses." Nat Rev Immunol. **4**(2):110-22.
- Viken, M. K., Amundsen, S. S., Kvien, T. K., Boberg, K. M. y Gilboe, I. M. (2005). "Association analysis of the 1858C>T polymorphism in the PTPN22 gene in juvenile idiopathic arthritis and other autoimmune diseases." Genes Immun **6**(3): 271-3.
- Wang, H., Moon, E.Y., Azouz, A., Wu, X., Smith, A., Schneider, H., Hogg, N. y Rudd, C.E. (2003). "SKAP-55 regulates integrin adhesion and formation of T cell-APC conjugates." Nat Immunol **4**:366–74.
- Wang, H., Liu, H., Lu, Y., Lovatt, M., Wei, B. y Rudd, C.E. (2007). "Functional defects of SKAP-55-deficient T cells identify a regulatory role for the adaptor in LFA-1 adhesion." Mol Cell Biol **27**:6863–75.
- Wang, H., Wei, B., Bismuth, G. y Rudd CE. (2009). "SLP-76-ADAP adaptor module regulates LFA-1 mediated costimulation and T cell motility." Proc Natl Acad Sci USA **106**:12436–41.
- Wang, H.M., Xu, Y.F., Ning, S.L., Yang, D.X., Li, Y., Du, Y.J., Yang, F., Zhang, Y., Liang, N., Yao, W., Zhang, L.L., Gu, L.C., Gao, C.J., Pang, Q., Chen, Y.X., Xiao, K.H., Ma, R., Yu, X. y Sun, J.P. (2014). "The catalytic region and PEST domain of PTPN18 distinctly regulate the HER2 phosphorylation and ubiquitination barcodes." Cell Res. **24**(9):1067-90.
- Wang, S., Dong, H., Han, H., Ho, W.T., Fu, X. y Zhao,Z.J. (2010). "Identification of a variant form of tyrosine phosphatase LYP." BMC Mol. Biol. **11**: 78.
- Wang, Y., Shaked, I., Stanford, S.M., Zhou, W., Curtsinger, J.M., Mikulski, Z., Shaheen, Z.R., Cheng, G., Sawatzke, K., Campbell, A.M., Auger, J.L., Bilgic, H., Shoyama, F.M., Schmeling, D.O., Balfour, H.H. Jr., Hasegawa, K., Chan, A.C., Corbett, J.A., Binstadt, B.A., Mescher, M.F., Ley, K., Bottini, N. y Peterson, E.J. (2013). "The autoimmunity-associated gene PTPN22 potentiates toll-like receptor-driven, type 1 interferon-dependent immunity." Immunity. **39**(1):111-22.

- Wange, R.L., Guitián, R., Isakov, N., Watts, J.D., Aebersold, R. y Samelson, L.E. (1995). "Activating and inhibitory mutations in adjacent tyrosines in the kinase domain of ZAP-70." *J. Biol. Chem.* **270** (32): 18730–18733.
- Woodman, P.G. (2003). "P97, a protein coping with multiple identities." *J. Cell. Sci.* **116** (Pt 21): 4283–4290.
- Wu, J., Motto, D.G., Koretzky, G.A. y Weiss, A. (1996). "Vav and SLP-76 interact and functionally cooperate in IL-2 gene activation." *Immunity* **4**:593–602.
- Wu J., Katrekar A., Honigberg L.A., Smith A.M., Conn M.T., Tang J., Jeffery D., Mortara K., Sampang J., Williams S.R., Buggy J. y Clark J.M. (2006). "Identification of substrates of human protein-tyrosine phosphatase PTPN22." *J. Biol. Chem.* **281** (16): 11002–11010.
- Xu, W., Harrison, S. C. y Eck, M. J. (1997). "Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src." *Nature* **385**(6617): 595-602.
- Yablonski, D., Kuhne, M.R., Kadlecsek, T. y Weiss, A. (1998). "Uncoupling of nonreceptor tyrosine kinases from PLC- γ 1 in an SLP-76-deficient T cell." *Science* **281**:413–6.
- Yaffe, M. B. y Elia, A. E. (2001). "Phosphoserine/threonine-binding domains." *Curr Opin Cell Biol* **13**(2): 131-8.
- Yaffe, M. B. (2002). "Phosphotyrosine-binding domains in signal transduction." *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(3): 177-86.
- Yan, J.X., Wait, R., Berkelman, T., Harry, R.A., Westbrook, J.A., Wheeler, C.H. y Dunn, M.J. (2000). "A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization-mass spectrometry." *Electrophoresis*. **21**: 3666-3672.
- Yang, J., Cheng, Z., Niu, T., Liang, X. y Zhao, Z. J. (2000). "Structural basis for substrate specificity of protein-tyrosine phosphatase SHP-1." *J Biol Chem* **275**(6): 4066-71.
- Yang, Q., Co, D., Sommercorn, J. y Tonks, N. K. (1993). "Cloning and expression of PTP-PEST. A novel, human, nontransmembrane protein tyrosine phosphatase." *J Biol Chem* **268**(23): 17650.
- Yokosuka, T., Sakata-Sogawa, K., Kobayashi, W., Hiroshima, M., Hashimoto-Tane, A., Tokunaga, M., Dustin, M.L. y Saito, T. (2005). "Newly generated T cell receptor microclusters initiate and sustain T cell activation by recruitment of Zap70 and SLP-76." *Nat Immunol.* **6**(12):1253-62.
- Yu, X., Sun, J. P., He, Y., Guo, X. y Liu, S. (2007). "Structure, inhibitor, and regulatory mechanism of Lyp, a lymphoid-specific tyrosine phosphatase implicated in autoimmune diseases." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(50): 19767-72.
- Yu, X., Chen, M., Zhang, S., Yu, Z.H., Sun, J.P., Wang, L., Liu, S., Imasaki, T., Takagi, Y. y Zhang, Z.Y. (2011). "Substrate specificity of lymphoid-specific tyrosine phosphatase (Lyp) and identification of Src kinase-associated protein of 55 kDa homolog (SKAP-HOM) as a Lyp substrate." *J Biol Chem.* **286**(35):30526-34.
- Zhang, W., Sloan-Lancaster, J., Kitchen, J., Tribble, R. P. y Samelson, L. E. (1998). "LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation." *Cell* **92**(1): 83-92.
- Zhang, Z. Y., Wang, Y. y Dixon, J. E. (1994). "Dissecting the catalytic mechanism of protein-tyrosine phosphatases." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(5): 1624-7.
- Zikherman, J., Hermiston, M., Steiner, D., Hasegawa, K., Chan, A. y Weiss, A. (2009). "PTPN22 deficiency cooperates with the CD45 E613R allele to break tolerance on a non-autoimmune background." *J. Immunol.* **182** (7): 4093–4106.
- Zoledziewska, M., Perra, C., Orru, V., Moi, L. y Frongia, P. (2008). "Further evidence of a primary, causal association of the PTPN22 620W variant with type 1 diabetes." *Diabetes* **57**(1): 229-34.