



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Sede Consorzata: Istituto Veneto di Medicina Molecolare

Dipartimento di Scienze Biomediche Sperimentali

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN: Bioscienze

INDIRIZZO: Biologia Cellulare

CICLO: XX

LA COSTIMOLAZIONE DEI LINFOCITI T ALLA SINAPSI IMMUNOLOGICA: CD28, RAFTS DI MEMBRANA E RECETTORI CHEMOCHINICI

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Tullio Pozzan

Supervisore: Ch.mo Prof. Antonella Viola

Dottorando: Rita Lucia Contento

31 gennaio 2008

Indice

Abbreviazioni	1
Riassunto	3
Summary	6
Introduzione	9
1 Il sistema immunitario	9
2 I linfociti T	10
2.1 La vita itinerante dei linfociti T	10
2.2 Sottopopolazioni linfocitarie	12
3 La sinapsi immunologica	14
4 Le dinamiche dell'interazione tra linfociti T e APC	19
5 Il <i>signaling</i> nell'attivazione dei linfociti T	21
6 La costimolazione	26
6.1 Meccanismi di costimolazione	28
7 Costimolazione da riarrangiamenti della membrana: <i>rafts</i> di membrana.	30
7.1 I <i>rafts</i> di membrana: dalle membrane artificiali alle membrane biologiche	30
7.2 Funzioni dei <i>rafts</i> e loro ruolo nell'attivazione linfocitaria	34
8 Costimolazione da molecole di membrana: CD28	36
8.1 Effetti del CD28	36
8.2 Il CD28 e l'assemblaggio della SI	37
8.3 <i>Signaling</i> del CD28	39
9 Costimolazione da molecole solubili: chemochine e recettori chemochinici	41
9.1 Le chemochine nella risposta immunitaria	41
9.2 I recettori chemochinici	45
9.3 Le chemochine e la SI	48
10 Rimodellamento citoscheletrico e attivazione linfocitaria	51
10.1 La filamina	55
Scopo dello studio	59

Risultati	63
CD28 interaction with filamin-A controls lipid raft accumulation at the T-cell immunological synapse. Tavano R, Contento RL, Baranda SJ, Soligo M, Tuosto L, Manes S, Viola A. Nat Cell Biol. 2006 Nov;8(11):1270-6. Epub 2006 Oct 22.	65
CXCR4-CCR5: a new couple modulating T-cell functions. Contento RL, Molon B, Pantano S, Boularan C, Pozzan T, Manes Broton S, Parmentier M, Marullo S, Viola A. <i>Under revision</i>	75
Discussione	103
Bibliografia	111
Pubblicazioni e Poster	135
Presentazioni orali, Premi ed Esperienze all'estero	136

Abbreviazioni

APC	cellula presentante l'antigene
Arp2/3	proteine 2/3 correlate all'actina
BRET	trasferimento di energia per risonanza dovuta a bioluminescenza
DAG	diacilglicerolo
DC	cellula dendritica
DRM	membrane resistenti ai detergenti
FLN	filamina
GAP	proteina attivante l'attività GTPasica
GDI	inibitore della dissociazione delle guanine
GDP	guanosin-difosfato
GEF	fattore di scambio dei nucleotidi guaninici
GPCR	recettore accoppiato a proteina G eterotromerica
GPI	glicosil-fosfatidil-inositolo
Grb-2	proteina-2 legante il recettore dei fattori di crescita
GRP	proteina di rilascio della guanosina
GTP	guanosin-trifosfato
HEV	venula a endotelio alto
HIV	virus dell'immunodeficienza umana
ICAM-1	molecola di adesione intracellulare 1
IFN- γ/α	interferone- γ/α
IL	interleuchina
IP ₃	inositolo-1,4,5trifosfato
IRR	indice di reclutamento relativo
ITAM	motivo di attivazione dell'immunorecettore basato su tirosina
Itk	chinasi della cellula T inducibile dall'IL-2
LAT	adattatore per l'attivazione della cellula T
LFA-1	antigene funzionale leucocitario 1
MFI	intensità media di fluorescenza
MHC	complesso maggiore di istocompatibilità
PBT	linfociti T umani del sangue periferico
PI3K	fosfatidil-inositide 3 chinasi

PIP ₂	fosfatidil-inositolo-4,5bifosfato
PKC/A	protein chinasi C/A
PLC γ/β	fosfolipasi C γ/β
SAG	superantigene
SEA/B/E	enterotossine stafilococciche A/B/E
SI	sinapsi immunologica
siRNA	small interference RNA
SLP-76	proteina leucocitaria di 76 kDa contenete il dominio SH2
SMAC	complesso sopramolecolare di attivazione (c, centrale; p, periferico; d, distale)
TCR	recettore della cellula T
TGF- β	fattore β di crescita tumorale
Th	linfocita T <i>helper</i>
TNF- α	fattore α di necrosi tumorale
Treg	cellule T regolatorie
ZAP-70	proteina di 70 kDa associata alla catena ζ

Riassunto

L'attivazione dei linfociti T è basata sull'interazione del recettore della cellula T (TCR) con l'antigene associato alle proteine del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) ed esposto sulla superficie di una cellula presentante l'antigene (APC). Il sito di contatto tra queste due cellule viene definito sinapsi immunologica (SI) e rappresenta una giunzione cellulare altamente specializzata dove il linfocita T riceve ed integra i segnali provenienti dalla cellula *partner* al fine di poter "scegliere" tra la tolleranza e l'attivazione. Tali segnali, accessori a quello del TCR, sono definiti in modo sostanziale dalle molecole di costimolazione, il cui *pattern* di espressione dipende dall'ambiente infiammatorio e che quindi codificano per la cellula T il contesto della presentazione antigenica. Conformemente con la diversità di strategie che si può supporre serva per uno scopo tanto complesso e sfaccettato, negli ultimi anni si sono andati definendo nuovi meccanismi di costimolazione, diversi da quelli classici basati sull'interazione tra recettori di membrana, come ad esempio l'amplificazione del segnale mediata dai *rafts* di membrana e la costimolazione attraverso mediatori solubili quali le chemochine. Durante il mio progetto di dottorato, mi sono quindi occupata di definire i meccanismi molecolari alla base di queste nuove strategie di costimolazione nella SI.

Nella membrana plasmatica delle cellule esistono dei piccoli microdomini lipidici, ricchi di colesterolo e sfingolipidi, estremamente eterogenei e dinamici, con un selettivo contenuto proteico, denominati *rafts* (zattere) di membrana. Questi microdomini nella membrana della cellula T vengono reclutati e stabilizzati alla SI, in modo da formare una piattaforma in cui il segnale del TCR sia protetto e amplificato e quindi costimolato. Nel nostro laboratorio è stato proposto che il CD28, la più importante molecola costimolatoria dei linfociti T *naive*, amplifichi il segnale del TCR mediante un riarrangiamento dei *rafts* ed un loro reclutamento alla SI.

Con lo scopo di identificare il meccanismo molecolare che permette al CD28 di assemblare i *rafts* alla SI e considerando l'importanza del citoscheletro actinico nella mobilitazione delle molecole verso la SI, ci siamo focalizzati sull'interazione CD28-citoscheletro-*rafts*. In questo lavoro di tesi è stato dimostrato che il CD28 lega la filamina-A (FLNa), una proteina legante l'actina in grado di indurre legami crociati e stabilizzare il citoscheletro corticale, e la recluta alla SI. L'interazione tra CD28 e FLNa e il reclutamento della FLNa alla SI richiedono lo stesso dominio ricco in proline presente nella coda citoplasmatica del CD28 che è richiesto

per la mobilitazione dei *rafts* di membrana alla SI. Inoltre l'inibizione dell'espressione della FLNa tramite small interference (si)RNA blocca il reclutamento dei *rafts* alla SI indotto dal CD28, l'attivazione di Cdc42, proteina che regola i riarrangiamenti citoscheletrici, e la costimolazione linfocitaria da CD28.

Questi risultati indicano che il CD28 utilizza la FLNa per indurre i riarrangiamenti citoscheletrici necessari affinché i microdomini lipido-proteici della membrana plasmatica si riorganizzino durante la formazione di una SI completa e matura, permettendo così l'attivazione linfocitaria in presenza di concentrazioni antigeniche limitanti.

Tra le molecole costimolatorie solo di recente sono state annoverate anche le chemochine. Nei linfociti T il recettore chemochinico CXCR4 è costitutivamente espresso e regola la migrazione linfocitaria verso gradienti della chemochina CXCL12. Il CCR5 invece è espresso solo nelle cellule T attivate e dirige la loro migrazione verso gradienti di CCL3, CCL4 e CCL5. Inoltre questi due recettori sono coinvolti in molti processi patologici, tra cui l'autoimmunità, il cancro e l'HIV (virus dell'immunodeficienza umana). Nel nostro laboratorio è stato dimostrato che durante la stimolazione delle cellule T entrambi i recettori CXCR4 e CCR5 vengono reclutati e si accumulano a livello di una SI matura, tramite un meccanismo, indipendente dal CD28, che richiede la secrezione delle chemochine da parte delle APC e l'accoppiamento del recettore con G_q invece che con G_i , proteina classicamente usata da tali recettori per indurre migrazione. Il reclutamento di CXCR4 e CCR5 alla SI risulta in una interazione più forte tra cellula T e APC, in una ridotta responsività a gradienti chemotattici e in livelli più alti di proliferazione e di produzione di IFN- γ (interferone- γ) da parte delle cellule T.

Lo scopo del mio lavoro è stato capire le basi di tale versatilità di funzione e di *signaling* del CXCR4 e del CCR5, e identificare i requisiti per la costimolazione indotta da chemochine.

Poiché i recettori chemochinici possono creare complessi recettoriali con specifiche caratteristiche farmacologiche e di *signaling* attraverso l'omo- o l'etero-dimerizzazione, il mio lavoro si è basato sull'ipotesi che la presenza di complessi molecolari tra CXCR4 e CCR5 sia il presupposto della loro funzione costimolatoria alla SI nei linfociti umani. È stato quindi dimostrato che, contrariamente alla funzione chemotattica in cui è noto che CXCR4 e CCR5 agiscono come omodimeri, la funzione costimolatoria richiede la collaborazione funzionale tra CXCR4 e CCR5: i due recettori devono essere co-reclutati alla SI e devono essere co-espressi dalla cellula T per costimolare la produzione di citochine. È stato inoltre dimostrato che questi recettori quando co-espressi formano costitutivamente dei complessi del

tipo etero-dimeri o etero-oligomeri, suggerendo che la cooperazione tra recettori rappresenti una strategia chiave per la plasticità funzionale delle chemochine.

Nel suo complesso, il mio studio dei meccanismi di costimolazione ha messo in evidenza come la trasmissione delle informazioni alla SI sia un processo estremamente complesso, integrato e dinamico, che coinvolge mediatori solubili, recettori di membrana e citoscheletro, e che crea dei microambienti dedicati all'amplificazione dei segnali modulando la natura stessa della membrana cellulare e la composizione dei complessi recettoriali e di *signaling*.

Summary

T lymphocytes are activated when their T-cell receptors (TCRs) recognize and interact with the specific antigenic complexes formed by antigen-derived peptides bound to proteins of the major histocompatibility complex (MHC) and exposed on the surface of an antigen-presenting cell (APC). The contact site between these two cells is referred as immunological synapse (IS) and represents a highly specialized cellular junction, where T lymphocyte receives and integrates several signals provided by cellular partner, in order to choose between tolerance and immunity. These signals, additional to TCR, are substantially provided by costimulatory molecules that are tuned by inflammatory environment, thus coding the context of antigenic presentation. The immune system has developed different strategies for such a complex function and recently new costimulatory mechanisms, different from the classical ones based on membrane receptors, have been identified, such as signal amplification by membrane rafts and costimulation through chemokines. In this thesis I have been interested in defining the molecular mechanisms underlying these new costimulatory strategies at the IS.

The cellular plasma membrane contains small, heterogeneous and highly dynamic, microdomains, enriched in sterol and sphingolipid and in selective proteins, defined as membrane rafts. In T-cell plasma membrane these microdomains are recruited into the IS, forming a platform where TCR signal is protected and amplified, and thus contribute to costimulation. In our group it has been proposed that CD28, the main costimulatory molecule for naïve T lymphocytes, amplifies TCR signal by inducing membrane rafts rearrangement and recruitment into the IS.

In order to identify the molecular mechanism allowing CD28-mediated rafts recruitment into the IS, and considering the essential role played by actin cytoskeleton in molecule mobilization toward IS, we focused on interaction among CD28, cytoskeleton and rafts. In this thesis it is demonstrated that CD28 binds to filamin-A (FLNa), an actin-binding protein able to induce actin crosslinking and to stabilize the cortical cytoskeleton, and recruits FLNa into the IS. The interaction between CD28 and FLNa, as well as the recruitment of FLNa into the IS, require the same CD28 prolin-rich motif needed for membrane rafts mobilization into the IS. Moreover FLNa silencing by small interference (si)RNA inhibits CD28-induced rafts recruitment into the IS, Cdc42 activation (that regulates cytoskeletal rearrangements) and CD28 costimulation.

These results indicate that CD28 uses FLNa to integrate signalling pathways, resulting in actin crosslinking and lipid raft recruitment into the IS, thus sustaining TCR signaling and lowering the T-cell activation threshold.

The costimulatory properties of chemokines have been recently demonstrated in human T lymphocytes. In these cells, the chemokine receptor CXCR4 is constitutively expressed and regulates lymphocyte migration towards gradients of CXCL12; in contrast, CCR5 is expressed only in activated T cells and leads their migration towards gradients of CCL3, CCL4 and CCL5. These two receptors are involved in several pathological conditions, such as autoimmunity, cancer and HIV (human immunodeficiency virus). Our group has demonstrated that during T-cell stimulation both CXCR4 and CCR5 are recruited and trapped into the IS, through a mechanism that requires chemokine secretion by APC. The CXCR4 and CCR5 recruitment into the IS results in stronger interactions between T cell and APC, in reduced responsiveness to chemotactic gradients and in higher levels of T-cell proliferation and IFN- γ (interferon- γ) production. Interestingly, we found that during T cell activation chemokine receptors are coupled with G_q instead of G_i, the classical G protein coupled to these receptors during cell migration.

The aim of my thesis was to study the mechanism for CXCR4 and CCR5 versatility in function and signaling, and to identify the requirements for chemokine-induced T-cell costimulation.

Since chemokine receptors can form receptor complexes with specific pharmacological and signaling properties through homo- and hetero-dimerization, we hypothesized that molecular complexes between CXCR4 and CCR5 in T lymphocytes are required for their costimulation at the IS. In this thesis it is demonstrated that, in contrast with CXCR4 and CCR5 chemotactic functions, which depends on receptor homodimers, the costimulatory function of these receptors requires their functional collaboration: CXCR4 and CCR5 must be co-recruited into the IS and must be co-expressed by T cell to costimulate cytokine production. Moreover it has been demonstrated that co-expressed CXCR4 and CCR5 form constitutive complexes (heterodimers or hetero-oligomers), suggesting that cooperation between receptors represents one key strategy for the functional plasticity of chemokines.

In conclusion, my study on novel T-cell costimulation mechanisms highlight the complexity of the process leading to transmission of signals at the IS. This integrated and dynamic process involves soluble mediators, membrane receptors and the cell cytoskeleton, and

generates micro-environments specific for signal amplification by locally modifying the cell membrane composition and its signaling complexes.

Introduzione

1 Il sistema immunitario

Il sistema immunitario si è sviluppato con il compito di mantenere, preservare e ripristinare l'integrità dell'organismo in seguito all'attacco di agenti esterni. Inoltre ha anche un ruolo nel mantenere sotto controllo componenti dell'organismo stesso alterate o anormali. Storicamente è stato diviso in due categorie principali: immunità innata e immunità acquisita o adattativa.

L'immunità acquisita ha per protagonisti i linfociti T e B ed è caratterizzata da una risposta antigene-specifica, che abitualmente impiega diversi giorni per organizzarsi, ma che alla successiva esposizione allo stesso antigene diventa più veloce e spesso più efficace, essendo dotata della cosiddetta "memoria per l'antigene stimolante"; contrariamente il sistema di difesa innato non è antigene-specifico, ed è pressoché immediato (risponde in pochi minuti), ma non ha alcuna memoria. Classicamente quindi lo studio della risposta adattativa riguarda i meccanismi della generazione della diversità recettoriale, della tolleranza al *self* e delle interazioni tra cellule, mentre lo studio della risposta innata è focalizzato sui meccanismi di pronto riconoscimento e uccisione dei patogeni e di diffusione del segnale d'allarme (Hoebe et al., 2004).

Il progredire delle conoscenze ha però messo in luce che queste due parti del sistema immunitario sono strettamente interconnesse e interdipendenti tra loro, dimostrando che le componenti del sistema immunitario appartengono ad un *continuum* organizzativo in cui una semplicistica classificazione dicotomica risulta riduttiva e fuorviante.

Infatti ci sono varie sottopopolazioni che non si adattano alla convenzionale distinzione innato/adattativo, perché posseggono alcune proprietà di entrambi i tipi di risposta, come le cellule T natural killer, i linfociti T $\gamma\delta$ e i linfociti B BI (Marshak-Rothstein & Ohashi, 2007). Inoltre entrambi gli attori di queste due braccia dell'immunità secernono molecole solubili come le citochine che modulano le funzioni degli appartenenti ad entrambe le categorie. Infine l'attivazione dei linfociti T, responsabili dell'immunità adattativa, necessita della presentazione dello specifico antigene da parte di cellule classificate all'interno dell'immunità innata; e il fenotipo di tali cellule, dipendente dalla loro storia pregressa e dal microambiente, influenza il processo dell'attivazione linfocitaria tanto da decretarne l'esito.

2 I linfociti T

I linfociti T maturi rappresentano il 70-80% della normale popolazione linfocitaria del sangue periferico (solo il 2% dei linfociti dell'organismo si trova nel sangue periferico, dove rappresenta nell'adulto il 16-45% della formula leucocitaria, con una conta normalmente compresa tra $4,3$ e $10,8 \times 10^9$ leucociti /L), il 90% di quella del dotto linfatico toracico, il 30-40% delle cellule dei linfonodi e il 20-30% dei linfociti della milza. Le cellule B mature rappresentano il 10-15% dei linfociti periferici umani, il 50% dei linfociti nella milza e circa il 10% dei linfociti nel midollo osseo.

Come tutte le cellule di origine ematopoietica, i linfociti T devono essere generati durante l'embriogenesi e poi continuamente rigenerati nel corso della vita per mantenere il repertorio a livello periferico. Sia i linfociti B che i T derivano da una cellula staminale comune. I precursori delle cellule T, che hanno origine nel sacco vitellino e nel fegato nella vita embrionale e nel midollo osseo dopo la nascita, lasciano gli organi di origine in uno stadio ancora immaturo, per portarsi nel timo, dove completano la loro maturazione, sia per quanto riguarda la differenziazione che la selezione. Infatti durante la maturazione timica i linfociti T acquisiscono due proprietà cruciali, la tolleranza al *self* e la restrizione al *self*: nel timo le cellule T auto-reattive vengono distrutte clonalmente (selezione negativa), mentre le cellule T competenti con moderata affinità vengono portate a maturazione (selezione positiva).

Inoltre nel timo i linfociti T vanno incontro ad una differenziazione in due distinte popolazioni, a seconda del corecettore espresso, CD4 o CD8. Le cellule CD8⁺ vengono definite linfociti T citotossici e sono in grado di causare la lisi di cellule estranee o infettate da patogeni intracellari (come virus e alcuni parassiti), tramite il rilascio di granuli ricchi di perforina (che forma dei pori nella membrana cellulare) e di granzimi (proteasi che attivano l'apoptosi nella cellula bersaglio). Le cellule CD4⁺ vengono invece definite linfociti T *helper* (Th) e sono i principali regolatori delle funzioni degli stessi linfociti T e dei linfociti B, attraverso la produzione di linfocine o per contatto diretto.

2.1 La vita itinerante dei linfociti T

Una caratteristica fondamentale del sistema immunitario è la motilità e il comportamento migratorio dei suoi componenti ematopoietici. Per tutta la loro vita i linfociti migrano e circolano attraverso il corpo, andando a localizzarsi nel microambiente adatto di volta in volta alla maturazione, alla differenziazione, alla sopravvivenza, all'attivazione, al pattugliamento

dei distretti corporei, con disseminazione del repertorio immunologico, o al raggiungimento dei siti bersaglio di insulto antigenico. Questo processo di circolazione e localizzazione mirate e intelligenti viene definito *homing* ed è cruciale per orchestrare le risposte immunitarie.

Le cellule T mature entrano nel circolo ematico per poi raggiungere gli organi linfoidi periferici (linfonodi e milza), il tessuto linfoide intestinale (tonsille, placche di Peyer e appendice), la cute e le mucose; nei linfonodi le cellule T occupano le zone paracorticali più interne, localizzate attorno ai centri germinativi delle cellule B e definite aree T parafollicolari, mentre nella milza esse occupano l'area periarteriolare della polpa bianca. Finché non vengono attivati da antigeni estranei, ricircolano continuamente tra il sangue e gli organi linfoidi secondari (nei quali entrano attraverso le venule a endotelio alto (HEV) e dai quali escono seguendo i vasi linfatici efferenti); tale processo è definito "traffico linfocitario". Queste cellule che non hanno ancora mai incontrato l'antigene per cui sono specifiche vengono definite vergini o *naive*; esse sono di piccole dimensioni con diametro di circa 6-9 μm , senza particolari caratteristiche morfologiche, con pochi organelli citoplasmatici, una relativa assenza di citoplasma e di reticolo endoplasmatico rugoso, un nucleo rotondeggiante e molta cromatina nucleare inattiva condensata nel nucleo, indicando una scarsa attività cellulare.

La ricircolazione termina quando negli organi linfoidi secondari avviene il primo incontro tra una cellula T e il suo antigene specifico, evento definito *priming*. Esso richiede l'interazione del linfocita T con una cellula che abbia internalizzato e processato l'antigene stesso e che ne esponga sulla propria superficie i peptidi, legati alle molecole glicoproteiche autologhe ed altamente polimorfiche del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC). I tipi cellulari in grado di svolgere questo compito, e che proprio per questa loro funzione vengono definiti APC, ossia Cellule Presentanti l'Antigene, sono i linfociti B, i fagociti mononucleati e, le più efficaci, le cellule dendritiche (DC). I linfociti T sono ristretti per le molecole MHC *self*: riconoscono un antigene presentato da una APC solo se quella APC esprime una molecola MHC riconosciuta come *self* dalla cellula T, cioè incontrata dai precursori T durante la loro maturazione timica. Inoltre le cellule citotossiche sono ristrette per la MHC di classe I portante antigeni di derivazione citosolica, mentre gli *helper* lo sono per la classe II portante antigeni extracellulari che sono stati processati dalla via endosomiale/lisosomiale. Tuttavia le cellule dendritiche possono endocitare antigeni esogeni e "cross-presentarli" su MHC I ai linfociti T citotossici CD8^+ ; questo processo è importante per sviluppare immunità contro tumori e patogeni che non infettano direttamente le APC, e per l'induzione della tolleranza

(Inaba & Inaba, 2005). L'interazione linfocita T-APC secondo la corretta restrizione è legata al legame diretto che si crea tra le molecole corecettoriali CD8 e CD4 con domini esterni non polimorfici della molecola MHC, rispettivamente di classe I o II.

Quando il recettore della cellula T (TCR) riconosce il suo specifico complesso MHC-peptide sulla superficie di una cellula APC, viene innescata una cascata di eventi molecolari intracitoplasmatici che trasducono il segnale fino al nucleo, permettendo così l'attivazione, la proliferazione, la differenziazione delle cellule vergini in cellule effettrici e in cellule T memoria, che risiedono essenzialmente negli organi linfoidi periferici.

Una volta attivati, i linfociti diventano estremamente eterogenei sotto il profilo funzionale e fenotipico e capaci di risposte biologiche e funzioni estremamente complesse. Il *priming* promuove l'attivazione dei linfociti T *naive* a linfoblasti, cellule di grandi dimensioni, con un nucleo allargato contenente cromatina diffusa e prominenti nucleoli e con abbondante citoplasma ricco di mitocondri e reticolo endoplasmatico rugoso, tutti marcatori di attività cellulare. Dopo l'attivazione nel giro di 1-2 giorni tali cellule entrano nella fase G1 del normale ciclo cellulare, subendo un'intensa proliferazione (espansione clonale). In circa 3-4 giorni esse completano la loro differenziazione in cellule T effettrici "armate" e lasciano gli organi linfoidi secondari attraverso i vasi linfatici efferenti, richiamate nei tessuti infettati.

Le cellule T effettrici rispetto alle cellule T *naive* esprimono molecole di adesione differenti che mediano non più la ricircolazione, ma la migrazione linfocitaria, tramite interazione con i relativi ligandi espressi sull'endotelio attivato, nei tessuti sede dei focolai di infezione, dove le cellule T prendono nuovamente contatto con l'antigene che ne ha determinato l'attivazione.

Una volta svolta la loro funzione, le cellule effettrici vanno in apoptosi, tranne un piccolo gruppo che differenzia in cellule della memoria, che rimangono quiescenti anche per lunghi periodi, finché non ricevono un nuovo stimolo antigenico specifico.

2.2 Sottopopolazioni linfocitarie

Poiché lo scopo del sistema immune è eliminare i patogeni invasori e considerando che ogni nemico ha le proprie debolezze, nei focolai di infiammazione la fase effettrice è orientata *ad hoc* per attuare la strategia più idonea all'eradicazione dell'evento patologico in corso. Quindi durante il *priming* le cellule T CD4⁺ possono essere polarizzate verso distinte sottopopolazioni di cellule effettrici: Th1, Th17 e Th2. Una polarizzazione corrispondente esiste anche per le cellule CD8⁺ citotossiche (Salgame *et al.*, 1991; Sad *et al.*, 1995).

permettendo di dividere schematicamente la risposta immunitaria in umorale e cellulo-mediata.

La polarizzazione a cellule Th1 è indotta da interferone- γ (IFN- γ) e interleuchina-12 (IL-12) e soppressa da IL-4; le cellule Th1 producono principalmente IL-2, IL-3, TNF- α (fattore α di necrosi tumorale) e IFN- γ e sono i principali regolatori della risposta cellulo-mediata per distruggere cellule tumorali o patogeni intracellulari (come virus e alcuni batteri). Infatti esse adiuvano le funzioni macrofagiche, sia producendo IFN- γ che attiva i macrofagi e ne potenzia le capacità antimicrobiche, sia stimolando i linfociti B a produrre anticorpi IgG1 e IgG3 opsonizzanti e fissanti il complemento, che facilitano la fagocitosi dei patogeni extracellulari. Le cellule Th1 sono coinvolte nello sviluppo di patologie autoimmuni e nelle reazioni di ipersensibilità ritardata (Abbas et al., 1996).

La polarizzazione a cellule Th2 è indotta da IL-4 e soppressa da IFN- γ e IL-12; le cellule Th1 producono principalmente IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 e sono i principali regolatori della risposte umorali per distruggere patogeni extracellulari (come gli elminti). Infatti esse stimolano i linfociti B a produrre anticorpi neutralizzanti o in grado di attivare il complemento o di indurre la degranolazione di mastociti ed eosinofili. Le cellule Th2 sono coinvolte nello sviluppo di patologie allergiche (Abbas et al., 1996).

Le cellule Th17 rappresentano una sottopopolazione identificata di recente (Harrington et al., 2005; Langrish et al., 2005; Park et al., 2005); il loro sviluppo è indotto da TGF- β (fattore β di crescita tumorale) e IL-6 (Bettelli et al., 2006), stabilizzato e amplificato da IL-23 e inibito da IL-4 e IFN- γ (Iwakura & Ishigame, 2006). Sono la principale fonte di produzione di IL-17, un potente mediatore infiammatorio, ma secernono anche IL-22 (Liang et al., 2006), IL-6 e TNF- α . I linfociti Th17 attivano le cellule coinvolte nella distruzione di batteri extracellulari e nell'infiammazione cronica (Ye et al., 2001); essi sono inoltre implicati nella patogenesi di malattie autoimmuni, come sclerosi multipla e psoriasi.

A prevenire o a spegnere la risposta immunitaria prima che l'eccesso di difesa esiti in un danno o si attivino cellule reattive contro antigeni *self*, interviene un'altra sottopopolazione di linfociti T, le cellule T regolatorie (Treg).

Questa sottopopolazione specializzata di linfociti T, identificata per l'espressione costitutiva della molecola CD25, dell'antigene citotossico dei linfociti T (CTLA-4) e del recettore per il fattore di necrosi tumorale indotto dai glucocorticoidi (GITR), controlla l'omeostasi dei linfociti T e mantiene la tolleranza verso il *self*. Possono essere divise in due sottopopolazioni: le Treg naturali (CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺) che maturano nel timo, e le Treg inducibili, derivate o

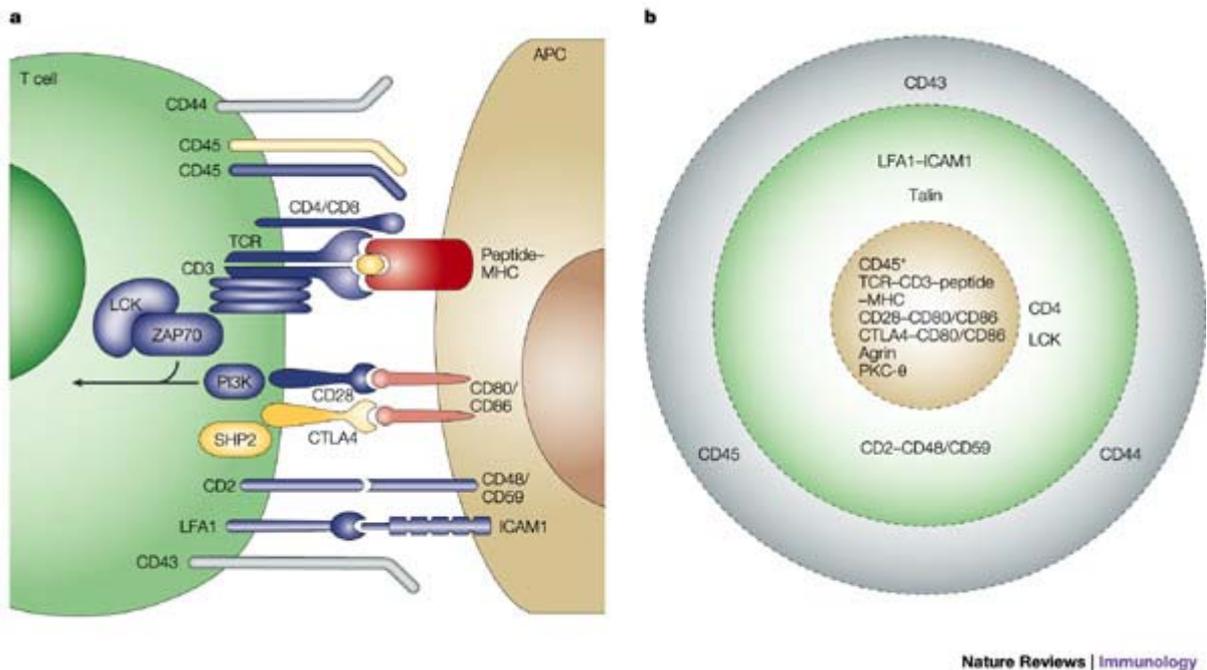
da cellule $CD8^+ CD25^-$ o da $CD4^+ CD25^-$ in periferia, sotto l'influenza di cellule dendritiche semi-mature, IL-10, TGF- β e possibilmente IFN- α (Mills, 2004). Queste cellule migrano selettivamente nelle sedi dove è richiesta un'azione immunosoppressiva, dove riconoscono e sono attivate dal loro antigene organo-specifico. Qui interagiscono con le cellule effettrici armate autoreattive sia di tipo $CD4^+$ che $CD8^+$ per sopprimerne reversibilmente la funzionalità grazie alla produzione di citochine immunosoppressive o all'interazione cellula-cellula. Non intaccano la differenziazione dei $CD4^+$ e $CD8^+$ in cellule effettrici armate e la loro capacità di riconoscere per la seconda volta l'antigene e formare coniugati con le cellule target che lo presentano; ne alterano, invece, una o più proprietà effettrici contemporaneamente, come la capacità di migrare e di secernere rispettivamente citochine o molecole citotossiche e granuli litici (Mempel et al., 2006).

3 La sinapsi immunologica

Il riconoscimento e l'interazione tra il TCR ed i complessi MHC-peptide porta ad una varietà di risposte cellulari e biochimiche che promuovono l'attivazione dei linfociti T e la loro proliferazione. Ma mentre il contatto tra il singolo TCR ed il suo ligando si risolve in genere nell'arco di pochi secondi, quello tra cellula T ed APC deve persistere parecchie ore, allo scopo di produrre un segnale sostenuto che consenta la piena attivazione cellulare. Ci sono però diversi ostacoli al prolungato mantenimento del segnale di attivazione. Per esempio, sulla superficie dell'APC ci sono solo 10-100 complessi MHC-peptide sul totale di 10^{4-5} molecole MHC espresse (Lanzavecchia et al., 1999). Nonostante questo limite venga risolto perché uno stesso complesso MHC-peptide può attivare di seguito diversi TCR mediante un processo chiamato "attivazione seriale" (*serial triggering*) (Valitutti et al., 1995; Viola & Lanzavecchia, 1996), ne sussistono altri: TCR e MHC sono piccoli e circondati da proteine più grosse e abbondanti (come il CD45) che costituiscono un impedimento sterico; il TCR ha una bassa affinità per il complesso MHC-peptide; APC e linfociti sono in movimento (Grakoui et al., 1999). Un meccanismo per facilitare e sostenere l'interazione tra linfocita T e APC è l'assemblaggio di una sinapsi immunologica (SI), una giunzione cellulare altamente

specializzata, del diametro di diversi micrometri, al sito di contatto tra la cellula T e l'APC, esattamente dove l'attivazione T ha luogo (Grakoui et al., 1999).

Una sinapsi matura e funzionale è organizzata nelle cellule T in tre anelli concentrici noti come complesso sopramolecolare di attivazione (SMAC), differenziati in base ad una precisa distribuzione delle molecole recettoriali e che interagiscono con la controparte espressa in modo speculare nelle APC (Figura 1).



Nature Reviews | Immunology

Figura 1. Rappresentazione della SI matura. **a)** La SI è vista di profilo; sono rappresentate alcune delle proteine coinvolte nel riconoscimento antigenico. Le molecole attivanti sono mostrate in blu, quelle inibitorie in giallo e quelle che non contribuiscono al signaling in grigio. La freccia indica il segnale che converge all'attivazione della cellula T. **b)** Rappresentazione delle regioni in cui è organizzata la SI: dal centro cSMAC, pSMAC e dSMAC (Huppa & Davis, 2003).

Nei linfociti T si identificano (Jacobelli et al., 2004):

- un anello più interno, noto come “complesso centrale di attivazione supramolecolare” (c-SMAC), in cui si concentrano TCR, CD3, CD4 o CD8, CD2, la molecola costimolatoria CD28, Lck e la protein chinasi C- θ (PKC- θ); sulla base dell'interazione di CD2 col suo ligando CD58 è stato calcolato che in questa zona la distanza tra le due membrane è inferiore ai 15 nm (Shaw & Dustin, 1997);
- un anello che circonda il c-SMAC, detto “complesso periferico di attivazione supramolecolare” (p-SMAC), dove si raggruppano molecole di adesione come l'integrina β 2 LFA-1 (antigene funzionale leucocitario 1) e la talina, proteine coinvolte nelle interazioni intercellulari iniziali e deputate a stabilizzare le zone di contatto;

- un anello più esterno, chiamato “complesso distale di attivazione supramolecolare”(d-SMAC), in cui sono presenti grosse molecole come CD43, CD44 e CD45.

Nelle APC si possono distinguere un *cluster* centrale, che comprende il complesso MHC-peptide e le molecole costimolatorie che interagiscono con quelle dello c-SMAC (come CD80, ligando di CD28), e un'area circostante, in cui sono raggruppate molecole di adesione come ICAM-1 (molecola di adesione intracellulare 1) che interagisce con LFA-1.

Lo sviluppo di una SI stabile può essere articolata in 5 fasi (Friedl et al., 2005):

1. il linfocita saggia i vari complessi MHC-peptide, entra in contatto con l'APC, riconoscendo ICAM-1, e si ferma aderendo ad essa, potendo così riconoscere l'antigene specifico. In questa fase la segregazione molecolare presenta una configurazione invertita rispetto quella della sinapsi matura, con le molecole di adesione al centro e il TCR in un anello periferico (Grakoui et al., 1999);
2. questa fase è cruciale per determinare l'esito dell'interazione: o il contatto viene meno o si assembla una SI precoce che dà il via al *signaling* intracellulare nel linfocita T. TCR, CD28, CD4 si muovono verso la piattaforma che si sta organizzando dinamicamente, attivando o regolando effettori a valle del TCR, in una complessa impalcatura molecolare associata alla membrana;
3. entro 5-30 minuti di continua interazione la SI diventa “matura”, così definita quando si forma il c-SMAC. In questa fase avviene la segregazione dei vari tipi di recettori nelle rispettive zone di appartenenza (c-SMAC, p-SMAC o d-SMAC);
4. raggiunta un'opportuna soglia di attivazione il linfocita T inizia a dissociarsi e il TCR viene internalizzato in vescicole intracitoplasmatiche;
5. la SI viene dissolta e la cellula continua il suo processo di migrazione.

Per la formazione della SI è importante una complessa serie di eventi coinvolgenti una profonda riorganizzazione del citoscheletro e un estensivo rimodellamento delle proteine e dei lipidi di membrana: la cellula T polarizza la sua rete di actina e microtubuli verso il sito di contatto e così dirige in tal direzione il trasporto di membrana (Anton van der Merwe et al., 2000), creando inoltre una rete altamente organizzata di recettori e di molecole di *signaling* intracellulare.

La SI è dunque una struttura altamente dinamica, caratterizzata da segregazione di proteine e lipidi, compartimentalizzazione del segnale e scambio bidirezionale di informazioni, tramite immuno-trasmettitori sia solubili che legati alla membrana.

Tramite l'organizzazione temporale e spaziale del TCR, delle molecole ad esso associate, delle altre proteine transmembrana e dei secondi messaggeri in *clusters* attivanti e in un complesso sopramolecolare che può essere dinamicamente montato e smontato, la SI gioca un ruolo chiave nell'iniziare, integrare, modulare, amplificare e sostenere gli importanti segnali forniti da diversi sistemi recettoriali (Dustin & Shaw, 1999). La natura compartimentalizzata e polarizzata della SI facilita un *signaling* locale, che porta a specifiche risposte cellulari in tempi e luoghi specifici. Per esempio la SI permette a recettori a bassa affinità per il ligando, come CD28 e CD40 (Bromley et al., 2001) di trovarsi in un ambiente protetto in cui l'associazione è più probabile e il legame può avvenire ripetutamente.

La SI permette inoltre la secrezione polarizzata di granuli litici (Stinchcombe et al., 2006) e citochine (Reichert et al., 2001) durante l'interazione con cellule bersaglio o con APC. Recenti studi hanno però messo in luce che la polarizzazione della secrezione non è una regola generale. Per esempio è stato dimostrato che i linfociti CD4⁺ secernono IL-4, TNF e chemochine in modo multidirezionale, anche se la secrezione di IL-2 e IFN- γ è polarizzata verso l'APC (Huse et al., 2006); inoltre la degranolazione da parte dei CD8⁺ non richiede la formazione di una SI matura (Purbhoo et al., 2004) e, *in vitro*, può essere disaccoppiata temporalmente e spazialmente dalla SI stimolatoria stabile (Wiedemann et al., 2006).

Contrariamente a quanto riportato inizialmente, la formazione del cSMAC non è necessaria per il *signaling* precoce del TCR, che può iniziare prima dell'organizzazione di un complesso di attivazione (Dustin et al., 2006), indicando che la SI non è un prerequisito alla stimolazione del TCR, ma rappresenta una struttura complessa che piuttosto consegue che ad essa, ed è anzi implicata nell'internalizzazione dei complessi molecolari e nell'esaurimento del *signaling* (Lee et al., 2003).

Infatti recenti evidenze indicano che l'inizio e il mantenimento dell'attivazione della cellula T dipendono da *microclusters* di molecole per la trasduzione del segnale, alla periferia della SI (Mossman et al., 2005; Yokosuka et al., 2005). Tali *microclusters* di TCR contengono molecole chiavi del *signaling* (come Lck, Zap70 -proteina di 70 kDa associata alla catena ζ -, LAT -adattatore per l'attivazione della cellula T- e SLP-76 -proteina leucocitaria di 76 kDa contenete il dominio SH2-), mostrano eventi di fosforilazione su tirosina e flussi di calcio, in modo dipendente dalla polimerizzazione actinica; essi si muovono indipendentemente verso il centro della SI e formano il TCR-cSMAC (Varma et al., 2006), dove si dissociano dalle molecole del *signaling* e perdono l'attività di fosforilazione su tirosine (Yokosuka et al., 2005). Nuovi *microclusters* di TCR continuano a formarsi nella zona di contatto tra le due

cellule anche dopo l'organizzazione del cSMAC e ad essere sede di *signaling* del TCR, fornendo il *signaling* duraturo richiesto per l'attivazione del linfocita T (Kropshofer *et al.*, 2002) (Figura 2).

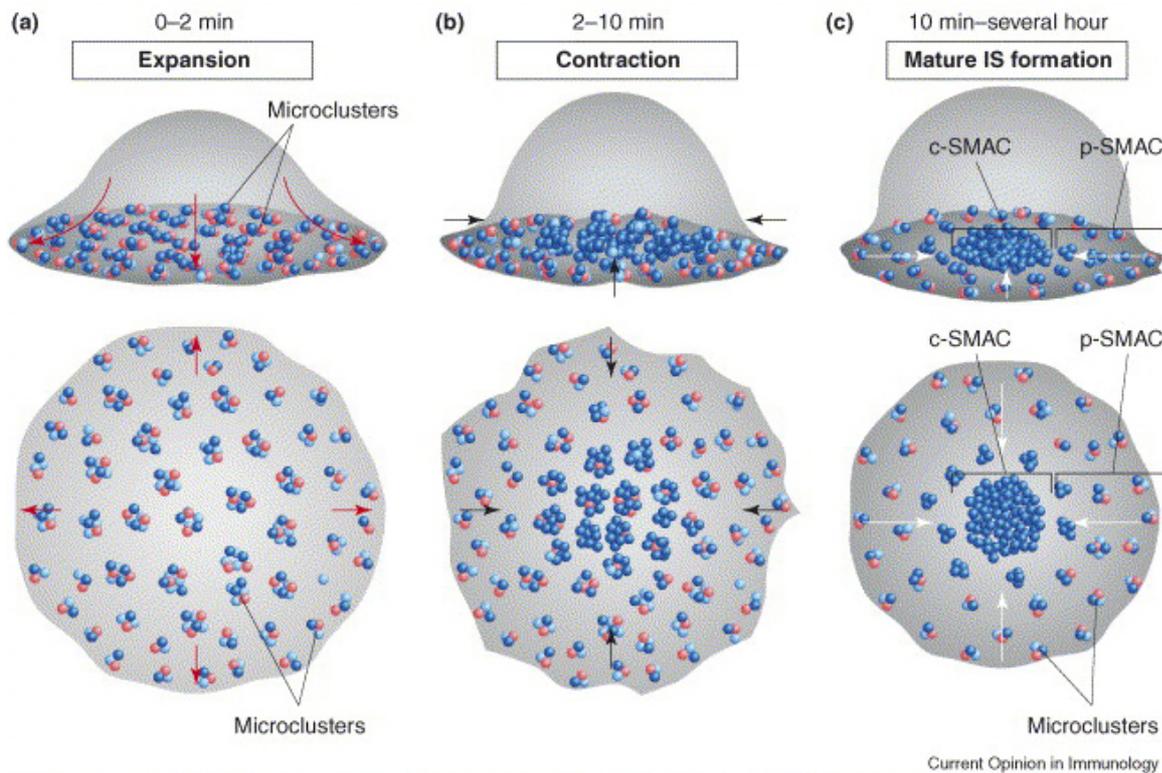


Figura 2. Il processo dinamico del riconoscimento antigenico e dell'attivazione linfocitaria in seguito alla formazione di *microclusters* e della SI, secondo il modello ottenuto da studi eseguiti con la microscopia TIRF (microscopia a fluorescenza in riflessione interna totale) su doppio strato lipidico. Nella figura i *microclusters* sono rappresentati da tre componenti: in rosso la chinasi, in blu il recettore e in azzurro l'adattatore. **a)** Dopo che la cellula T viene posta sul doppio strato lipidico contenente il complesso MHC-peptide e ICAM-1, all'interfaccia di contatto si generano dei *microclusters* del TCR, in cui si assemblano chinasi e adattatori che partecipano al *signaling* prossimale del TCR (come rivelato da fosforilazioni su tirosina e da flussi di calcio). In seguito al primo contatto, la cellula T continua ad estendersi sul supporto e nuovi *microclusters* si formano ai margini (freccette rosse). **b)** Dopo la completa espansione, la cellula T comincia a contrarsi (freccette nere) e i *microclusters* si accumulano al centro della zona di contatto. Durante questo processo, i *microclusters* si fondono tra loro formando *microclusters* più grandi, mentre le chinasi e gli adattatori si dissociano dal TCR. **c)** I *microclusters* del TCR alla fine si accumulano al centro della SI formando il cSMAC, che contiene livelli minimi delle chinasi e degli adattatori. Nuovi *microclusters* funzionali sono continuamente generati in periferia e poi traslocati al cSMAC per sostenere il segnale del TCR, che dura per ore (freccette bianche) (Saito & Yokosuka, 2006).

Questo modello concorda col fatto che non in tutte le condizioni sperimentali è distinguibile una SI matura secondo la classica schematizzazione in cSMAC e pSMAC. Infatti, la formazione di cSMAC e pSMAC è stata inizialmente dimostrata in seguito all'interazione di linfociti CD4⁺ con linfociti B (Monks *et al.*, 1998) o con modelli artificiali di APC costituiti da doppi strati lipidici (Groves & Dustin, 2003), mentre tra timociti e cellule epiteliali timiche (Hailman *et al.*, 2002; Richie *et al.*, 2002) e tra linfociti CD8⁺ e loro bersagli (Purbhoo *et al.*, 2004; O'Keefe & Gajewski, 2005), sono state descritte delle SI multifocali, costituite da

cSMAC multipli in un pSMAC. In presenza di DC come APC, invece, si sono osservate sia SI classiche che SI multifocali (Benvenuti *et al.*, 2004; Brossard *et al.*, 2005).

4 Le dinamiche dell'interazione tra linfociti T e APC

La natura dinamica delle interazioni tra cellule a livello linfonodale è stata recentemente elucidata dalle più sofisticate tecniche oggi usate per studiare le modalità con le quali cellule T e APC interagiscono tra loro fino alla formazione di una SI e all'attivazione della cellula T. Infatti se diversi studi *in vitro* avevano dimostrato che le cellule T immediatamente si fermano e organizzano una SI su un doppio strato lipidico contenente il complesso MHC-peptide e ICAM-1 (Grakoui *et al.*, 1999), più recentemente, osservando *in vivo* il comportamento di linfociti T e di DC all'interno dei linfonodi grazie alla microscopia a due fotoni, si è visto che le regole delle relazioni cellulari e dell'attivazione linfocitaria sono molto più complesse (Mempel *et al.*, 2004; Miller *et al.*, 2004b). La formazione *in vivo* di una coppia cellula T-APC avviene solo dopo che le cellule T in rapido movimento hanno avuto una lunga serie di incontri brevi e fugaci con diverse APC, diminuendo progressivamente la loro motilità. Nei linfonodi le cellule T, sia CD4⁺ che CD8⁺, possono sviluppare interazioni dinamiche e transienti con diverse DC prima di scegliere il proprio *partner* e formare coniugati stabili (Mempel *et al.*, 2004; Miller *et al.*, 2004b); in ogni caso è solo durante la fase di interazione prolungata che la cellula T è indotta a proliferare e a produrre citochine, confermando che l'attivazione linfocitaria produttiva corrisponde alla formazione della SI stabile (Mempel *et al.*, 2004). Dopo la dissoluzione della SI, la cellula T riprende un comportamento migratorio, instaura una serie di contatti brevi con le APC e inizia a proliferare.

L'esistenza di una prima fase estremamente dinamica dopo l'entrata della cellula T nel linfonodo, fenomeno non osservato *in vitro*, potrebbe rappresentare una strategia volta a trovare il *partner* ideale tra le numerose cellule presenti. Infatti i linfociti che entrano nella zona T linfonodale si muovono casualmente all'interno della rete strettamente impaccata costituita da DC e cellule reticolari (Miller *et al.*, 2003; Miller *et al.*, 2004a; Bajenoff *et al.*, 2006); il loro movimento è direttamente controllato da forze chemoattraenti presenti

nell'ambiente, in particolare le chemochine CCL21 e CCL19 (Forster *et al.*, 1999), ligandi del recettore CCR7 espresso dalle cellule T e prodotte rispettivamente da DC e HEV.

La presenza di forze chemoattraenti mentre le cellule T sono alla ricerca del *partner* ideale, se da un lato può aiutare la cellula T a saggiare diverse APC e quindi a trovare quella migliore, dall'altro può tentare e distrarre la cellula T, prevenendo la stabilizzazione della sua interazione con l'APC e inducendo una precoce separazione delle due cellule, determinando così il comportamento "esitante" delle cellule T. È stato quindi proposto che il messaggio mediato dalle chemochine che segnalano al linfocita di migrare e dirigersi verso altre destinazioni ("GO") compete con il messaggio del TCR che segnala al linfocita di fermarsi ad interagire con l'APC ("STOP") (Dustin, 2004).

Il fine bilancio tra questi due segnali determina la stabilità, la durata e l'esito dell'interazione tra cellula T e APC, modulando così la risposta immune. Infatti la cellula T si ferma, forma una SI stabile e si attiva solo se e quando il segnale di "STOP" fornito dal TCR raggiunge una determinata soglia e prevale su quello di "GO" fornito dalle chemochine, secondo un modello di attivazione multifasico e bilanciato. La forza del segnale di "STOP" varia con l'espressione e la regolazione del TCR e delle molecole di *signaling* ad esso associato, oltre che con la natura dell'antigene, ed è sostenuto e rafforzato da segnali di supporto forniti da molecole di costimolazione e di adesione attivate dall'interazione con i loro ligandi espressi dalle APC. Il raggiungimento di questa soglia può richiedere l'integrazione di più o meno segnali a seconda della loro forza, influenzando la durata del periodo che precede lo sviluppo di una SI matura. Si può speculare che la serie di incontri brevi e frequenti della prima fase del *priming* sia richiesta per modificare il comportamento della cellula T, indurre l'espressione di molecole che promuovono il segnale di "STOP" e avvicinare la cellula T sempre di più alla soglia di attivazione (Viola *et al.*, 2006). Infatti *in vitro* è stato dimostrato che la cellula T può essere attivata da segnali intermittenti (Rachmilewitz & Lanzavecchia, 2002; Faroudi *et al.*, 2003). Quando l'antigene non è limitante o le interazioni TCR-MHC-peptide sono ad alta avidità, presumibilmente l'incontro tra linfocita T e APC risulta rapidamente nella formazione di coniugati e nella loro maturazione a SI; quando invece i complessi MHC-peptide sono pochi e riconosciuti con bassa avidità dal TCR, la cellula T può richiedere diverse interazioni a breve termine con più APC, polarizzandosi gradualmente verso la migliore APC con cui formare finalmente una coppia stabile. Infatti il periodo di interazioni transienti si riduce fino a non essere osservato quando l'antigene è presentato da più DC (Miller *et al.*, 2004b; Shakhar *et*

al., 2005), suggerendo che la concentrazione antigenica e la frequenza di APC positive per l'antigene regolano le dinamiche tra cellule T e APC *in vivo*.

L'evento del *priming* si configura quindi non come una singola interazione cellulare stereotipata, ma come una complessa coreografia nella quale interazioni seriali alla ricerca dell'APC ideale permettono di graduare la risposta in base alla carica antigenica e di bilanciare gli elementi in gioco tra una risposta immune fedele ed adeguata e una risposta inappropriata e dannosa (Miller *et al.*, 2004b).

Non è ancora chiaro però se le dinamiche di interazione tra cellule T e APC varino quando l'esito dell'interazione è la tolleranza verso l'antigene piuttosto che l'attivazione contro di esso. Infatti è stato riportato che una caratteristica dell'induzione della tolleranza è la mancanza della fase di interazione stabile e duratura tra cellula T e APC, sostituita da una lunga serie di stimolazioni transienti e multiple (Hugues *et al.*, 2004). Studi successivi invece hanno riscontrato sottili differenze soltanto nella proporzione delle cellule T formanti *cluster* (Zinselmeyer *et al.*, 2005) o nella percentuale di cellule immobili in una determinata fascia temporale (Shakhar *et al.*, 2005), nonostante entrambi questi studi abbiano considerato parecchi parametri per valutare le dinamiche cellulari. Anche ritenendo il primo modello sperimentale proposto il più affidabile, resta da capire se questa differenza nella dinamica delle interazioni rappresenti una concausa nella determinazione dell'esito dell'interazione o una conseguenza del fatto che la cellula T riceve un *pattern* di stimoli insufficiente per l'attivazione e quindi per la maturazione di una SI stabile.

5 Il *signaling* nell'attivazione dei linfociti T

Il primo evento della cascata di eventi molecolari che portano all'attivazione linfocitaria è il riconoscimento da parte del TCR del suo specifico complesso MHC-peptide sulla superficie di una cellula APC.

Esistono due tipi di TCR: l'eterodimero $\alpha\beta$ (ontologicamente e filogeneticamente più recente, presente nel 90% circa delle cellule T, le cui pesano rispettivamente 42 e 45 kDa), e l'eterodimero $\gamma\delta$ (espresso su una piccola sottopopolazione di cellule T, al massimo 10%).

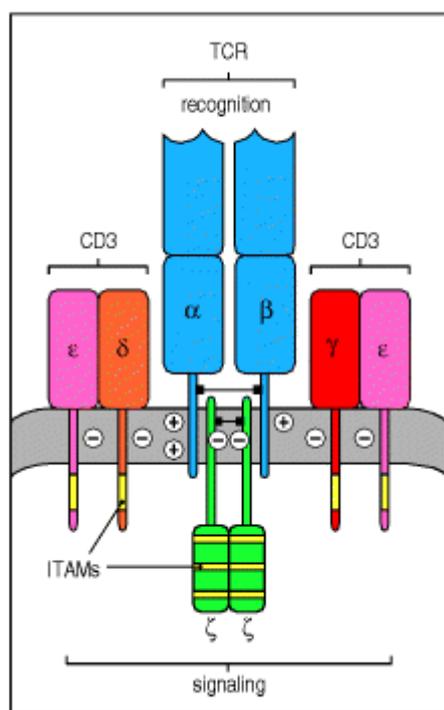


Figura 3. Struttura del complesso TCR/CD3 (Janeway, 2001).

In entrambe le forme, ciascuna catena della glicoproteina eterodimerica comprende (Figura 3):

- una porzione extracellulare formata da due domini N-terminali, uno variabile ed uno costante più prossimale, e dalla regione cerniera con residui cisteinici per il ponte disolfuro tra le due catene;
- un dominio transmembrana contenente amminoacidi carichi positivamente, utili per l'interazione con altre molecole di membrana;
- un dominio intracellulare formato da una corta coda di 9 amminoacidi nella catena α e di 12 nella β .

Le regioni variabili delle catene α e β hanno una sequenza altamente variabile da un clone di cellule T all'altro, essendo responsabili del riconoscimento dell'antigene (in particolare il legame avviene con 1-3 residui aminoacidici

di un epitopo immunodominante e residui polimorfici dell'MHC). Ogni linfocita T esprime sulla membrana plasmatica molti TCR (circa 30.000), ma tutti caratterizzati dalla stessa specificità antigenica che viene acquisita per diversificazione combinatoria e giunzionale tra i segmenti genici V (variabili), D (della diversità), J (di legame) e C (costanti) dei loci TCR α e TCR β durante lo sviluppo timico.

Il TCR è incapace di tradurre un segnale dopo aver legato l'antigene, a causa della corta coda intracitoplasmatica. Alla trasduzione del segnale è quindi deputato il complesso CD3/ ζ . Nel costituire il complesso TCR, infatti, l'eterodimero $\alpha\beta$ si associa non covalentemente con cinque proteine transmembrana: il complesso CD3, le cui catene γ , δ e ϵ si associano a formare eterodimeri (in particolare $\gamma:\epsilon$ e $\gamma:\delta$), e l'omodimero ζ . Queste catene non contribuiscono alla specificità del riconoscimento antigenico, ma hanno domini intracitoplasmatici dotati di sequenze importanti per la trasduzione del segnale, denominati ITAMs (motivi di attivazione dell'immunorecettore basati su tirosina) (Janeway, 2001). Gli ITAMs sono composti da due residui di tirosina, separati da circa 9-12 amminoacidi e caratterizzati dalla sequenza YXXL (dove Y indica la tirosina, X un qualsiasi amminoacido e L la leucina).

Il meccanismo di attivazione del TCR dopo legame con il complesso MHC-peptide prevede l'ingaggio multivalente del TCR, la formazione di un complesso di due o più TCR/CD3 a cui

conseguo un cambiamento conformazionale che coinvolge sia il TCR che il CD3 e che richiede la mobilità ristretta imposta da una membrana intatta (Minguet *et al.*, 2007). In questo processo il corecettore CD4 o CD8 non è coinvolto nell'induzione del cambiamento conformazionale, ma può aiutare nella sua stabilizzazione perché rafforza l'affinità dell'interazione tra il complesso MHC-peptide e il complesso TCR/CD3 (Minguet *et al.*, 2007).

L'evento più precoce nella trasduzione del segnale (Figura 4) dopo il legame dell'antigene al TCR è la fosforilazione dei residui tirosinici degli ITAMs delle catene ζ , γ , δ e ϵ da parte di tirosin-chinasi della famiglia Src, come Lck e Fyn; le Src-chinasi iniziano la trasduzione del segnale, pur non essendo molecole recettoriali, per la loro capacità di associarsi non covalentemente ma costitutivamente alla coda citoplasmatica di CD4 e CD8 (Veillette *et al.*, 1988), per cui il legame del TCR con il complesso MHC-peptide ridistribuisce Lck a contatto con le catene di CD3 (Pitcher & van Oers, 2003).

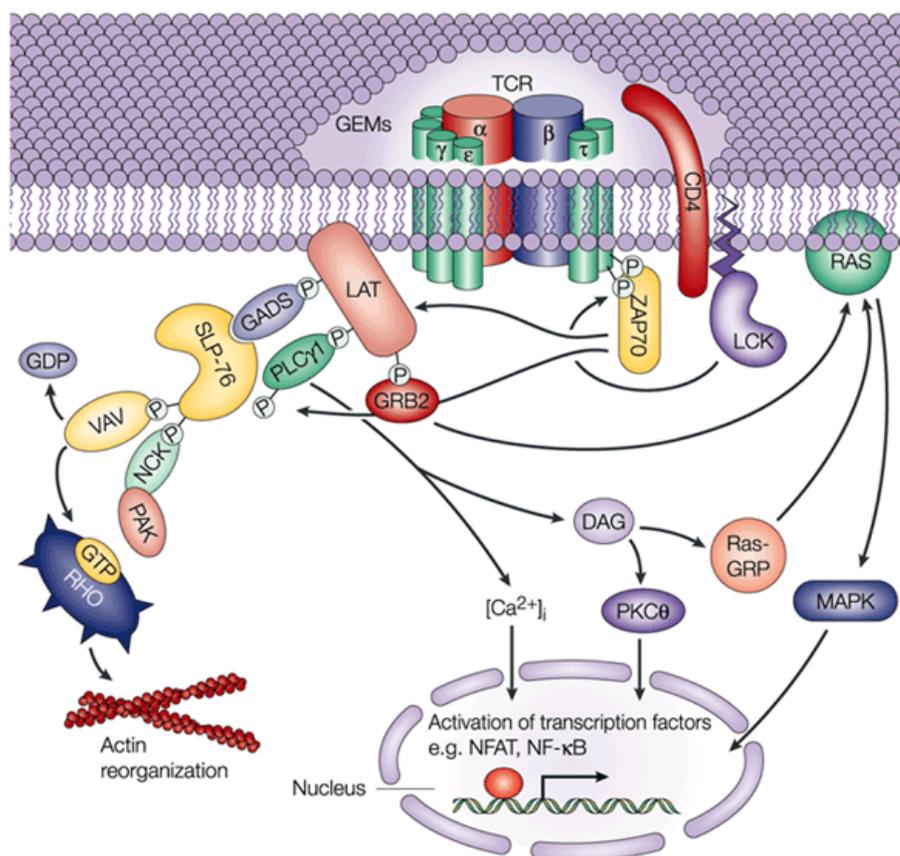


Figura 4. Eventi nella cascata di trasduzione del segnale in seguito a stimolazione del TCR: spiegazioni del testo (Koretzky & Myung, 2001).

In seguito alla fosforilazione gli ITAMs diventano ligandi ad alta affinità per proteine contenenti il dominio SH2 (Src Homology 2), come la tirosin-chinasi della famiglia Syk ZAP-

70 (Wange & Samelson, 1996); in seguito al suo reclutamento nel complesso recettoriale attivato, ZAP-70 è cataliticamente attivata, per effetto sia di trans-fosforilazione mediata dalle Src-chinasi sia di auto-fosforilazione (Iwashima *et al.*, 1994).

L'attivazione catalitica di ZAP-70 la rende in grado di fosforilare LAT, proteina transmembrana adattatrice che media interazioni tra proteine e il loro reclutamento alla membrana, e la proteina effettrice SLP-76 (Jordan *et al.*, 2003; Pitcher & van Oers, 2003).

Altri studi però considerano LAT l'unico substrato di ZAP-70, attribuendo la fosforilazione di SLP-76 e di altri substrati alle chinasi della famiglia Tec (Bunnell *et al.*, 2000), come Itk (chinasi della cellula T inducibile dall'IL-2), reclutate e attivate anch'esse dalle Src-chinasi, e direttamente coinvolte nella fosforilazione e attivazione della fosfolipasi $C\gamma 1$ (PLC γ) (Heyeck *et al.*, 1997; Perez-Villar & Kanner, 1999).

I substrati di ZAP-70 e delle Tec-chinasi accoppiano il TCR a diverse vie di trasduzione del segnale (Brdicka *et al.*, 1998):

1. mobilizzano il calcio, perché LAT lega la PLC γ ;
2. reclutano l'attivazione di Ras, perché LAT lega Grb-2/SOS/Ras;
3. inducono riarrangiamenti del citoscheletro, perché SLP-76 attiva Vav-1.

La PLC γ , attivata grazie LAT e Itk, idrolizza il fosfatidil-inositolo-4,5bifosfato (PIP $_2$) in:

1. inositolo-1,4,5trifosfato (IP $_3$), che diffonde nel citoplasma e, legando i recettori presenti sul reticolo endoplasmatico, mobilizza il calcio dai depositi intracellulari, favorendo l'attivazione della calcineurina, una serin-treonin fosfatasi che a sua volta attiva per defosforilazione il fattore di trascrizione NFAT, permettendogli di raggiungere il nucleo (Rao *et al.*, 1997);
2. diacilglicerolo (DAG), che media l'attivazione dei membri della famiglia delle PKC, fino all'attivazione del fattore trascrizionale NF-kB. NF-kB in condizioni di riposo è trattenuto nel citoplasma dall'associazione con la proteina inibitoria I κ B. La stimolazione della cellula determina la degradazione nei proteosomi di I κ B, previa fosforilazione da parte del complesso IKK attivato e successiva poliubiquitinilazione; così il dimero di NF-kB diventa libero di raggiungere il nucleo e legare il DNA (Karin & Ben-Neriah, 2000). È interessante notare che l'attivazione di NF-kB richiede Bcl10, una proteina contenente il dominio CARD (dominio di reclutamento delle caspasi), necessaria per l'oligomerizzazione di IKK nel sito di ingaggio del TCR, che agisce a valle della PKC dopo essersi arrangiata in filamenti citoplasmatici (Güet & Vito, 2000); per cui per l'attivazione di NF-kB è importante

la connessione tra il citoscheletro e strutture proteiche ordinatamente assemblate (Schmitz *et al.*, 2003).

Gli eventi prossimali della trasduzione del segnale comprendono anche l'attivazione di Ras, una proteina dotata di attività GTPasica intrinseca che viene attivata quando il GDP (guanosin-difosfato) che porta legato viene sostituito dal GTP (guanosin-trifosfato), e si inattiva dopo l'idrolisi del GTP a GDP. Il passaggio di Ras alla sua forma attiva legante il GTP avviene grazie un complesso costituito da SOS, uno scambiatore di nucleotidi guaninici, e da Grb-2 (proteina-2 legante il recettore dei fattori di crescita), una proteina adattatrice dotata di domini SH2 (per il legame con le fosfotirosine di proteine a monte come LAT) e di domini SH3 (Src Homology 3) (per il legame con SOS). Una volta attivata, Ras porta, tramite la via delle chinasi attivate dai mitogeni (MAPK), all'attivazione del fattore di trascrizione AP-1.

Ras viene attivata anche a partire dal DAG, grazie alla proteina Ras-GRP (proteina di rilascio della guanosina), un attivatore di Ras in collaborazione con Ras-GEF (fattori di scambio dei nucleotidi guaninici) dotato di un dominio legante il DAG (Dower *et al.*, 2000).

Infine, grazie a SLP-76 e Vav-1, un fattore di scambio dei nucleotidi guaninici GDP/GTP per le piccole GTPasi della famiglia Rac/Rho, si ha l'attivazione di Rac e Cdc42 che implicano il rimodellamento del citoscheletro actinico.

L'attivazione della cellula mediata da fosforilazione su tirosine è rapidamente reversibile e generalmente di bassissima stechiometria, per il fatto che le tirosin-fosfatasi che rimuovono i fosfati dalle tirosine fosforilate hanno una attività di diversi ordini di grandezza superiore rispetto le chinasi (Mustelin & Tasken, 2003). Le fosfatasi sono essenziali per tenere la cellula in condizioni di riposo in assenza di stimolazione antigenica (O'Shea *et al.*, 1992), così come per ricondurre la cellula al fenotipo basale dopo che lo stimolo di attivazione è stato rimosso (Iivanainen *et al.*, 1990).

È verosimile che le fosfatasi siano attivamente rimosse dalla zona vicina al sito di ingaggio del TCR e ai complessi per la trasduzione del segnale ricchi di chinasi, in modo da ridurre la forte opposizione alla fosforilazione creata dall'attività fosfataseica che risulta mille volte più potente della chinasica (Mustelin & Tasken, 2003).

Non bisogna però pensare che le chinasi medino soltanto l'attivazione e le fosfatasi soltanto l'inattivazione: infatti la chinasi Csk fosforila residui tirosinici delle Src-chinasi, determinando così l'assunzione da parte di Lck di una conformazione inattiva per l'interazione della tirosina fosforilata con il dominio SH2 della stessa Lck (Bergman *et al.*,

1992); inversamente la glicoproteina transmembrana CD45 è una fosfatasi che agisce come regolatore positivo delle Src-chinasi, ed è quindi richiesta per la fosforilazione di tirosine indotta dall'ingaggio del TCR (Koretzky *et al.*, 1990); il ruolo positivo di CD45 è controbilanciato da alcune sue simultanee funzioni inibitrici (Irie-Sasaki *et al.*, 2001), con un equilibrio che sembra dipendere dal tempo di localizzazione di CD45 nel sito di contatto tra la cellula T e l'APC: CD45 è presente al centro della SI per un periodo di tempo limitato, sufficiente per permettere l'attivazione di Lck ma non tanto lungo da comportare l'inibizione per defosforilazione della stessa Lck e dei suoi substrati (Freiberg *et al.*, 2002). D'altra parte nella SI matura CD45 si localizza fuori dal cSMAC, ossia nella zona dove continuano a nascere nuovi *microcluster* attivanti del TCR.

Il punto di arrivo della cascata di traduzione del segnale è rappresentato da fattori di trascrizione che, una volta attivati, legano il DNA a livello di bersagli genetici importanti per la maturazione e la sopravvivenza dei linfociti T (in quanto regolano la proliferazione e hanno effetti antiapoptotici) e per la risposta immunitaria (in quanto aumentano l'espressione delle molecole MHC e B7.1 e inducono la sintesi di citochine come IL-2, IL-12, INF- γ , chemochine, enzimi e peptidi antimicrobici) (Schmitz *et al.*, 2003).

Il sistema di attivazione della cellula T è un macchinario molecolare altamente organizzato, di cui è nota soltanto una piccola parte, dove la regolazione spazio-temporale delle interazioni tra proteine in reti dinamiche determina la risposta biologica.

6 La costimolazione

Il complesso TCR/CD3 fornisce un segnale, seppur necessario, insufficiente per un'ottimale attivazione cellulare; quindi è stato proposto nella cosiddetta "ipotesi dei due segnali" che un secondo tipo di segnale, noto come segnale di costimolazione, che agisce sinergicamente allo stimolo trasmesso dall'antigene, sia necessario per amplificare e regolare finemente la risposta immunitaria (Bretscher, 1999). In generale, le risposte primarie delle cellule *naive*, come l'espansione clonale e l'acquisizione delle funzioni effettrici, sono più dipendenti dalla costimolazione rispetto alle risposte secondarie. Il costimolo non coincide necessariamente nel tempo e nello spazio con lo stimolo dato dal complesso MHC-peptide, però garantisce e

rafforza il riconoscimento tra TCR e MHC-peptide e promuove i successivi eventi biochimici di trasduzione del segnale, collaterali a quelli promossi dal TCR, necessari per indurre la sintesi di macromolecole, aumentare il metabolismo energetico, promuovere la progressione del ciclo cellulare e regolare differenziazione, proliferazione e morte cellulari (Acuto & Michel, 2003).

La costimolazione è fornita da molecole, espresse sulla superficie della APC o solubili (come le chemochine), che interagiscono in qualità di ligandi con dei recettori posti sulla superficie della cellula T. La complessa natura del segnale costimolatorio che una APC fornisce al linfocita dipende dallo stadio maturativo in cui si trova l'APC stessa. Infatti parallelamente al percorso seguito dal linfocita nel corso della propria vita, anche le APC, e in particolare le migliori APC, ossia le DC, devono affrontare un viaggio "di formazione" attraverso il corpo, con il fine di arrivare al linfonodo in grado di veicolare al linfocita nel modo più veritiero e convincente possibile il messaggio di cui sono depositarie.

Così, in condizioni di infiammazione tessutale, DC di derivazione monocitaria e residenti nei tessuti catturano e processano l'antigene e, per incontrare i linfociti T e indurne il *priming*, lasciano la periferia e migrano nell'area T del linfonodo drenante. Durante questo percorso, sono indotte a maturare dalle stesse molecole che le attraggono, ossia le chemochine CCL19 e CCL21 (Marsland *et al.*, 2005): le DC perdono la capacità di catturare e processare antigeni, ma maturano la proprietà di presentarli, attraverso l'aumento dei livelli di MHC, l'espressione in superficie di molecole costimolatorie e la secrezione di citochine. Il *pattern* costimolatorio acquisito dalla DC dipende dalla natura degli stimoli presenti nel processo patologico in atto, che possono essere rappresentati da sostanze derivate dalle risposte innate, componenti della parete batterica o componenti delle cellule dell'ospite danneggiate.

Rappresentando un esempio emblematico della artificiosità della distinzione tra immunità innata e adattativa, lo stadio maturativo dell'APC influenza drammaticamente l'esito dell'interazione con la cellula T *naive*, potendo indurre tolleranza o immunità.

Le cellule T che riconoscono antigeni *self* e che non sono state distrutte clonalmente dal processo timico di selezione negativa vengono rese inoffensive a livello periferico tramite l'intervento delle Treg o tramite l'induzione dell'anergia. Questo secondo meccanismo sfrutta proprio una stimolazione parziale o squilibrata: il solo segnale antigenico oppure un forte segnale costimolatorio in presenza di un debole segnale antigenico; comunque l'effetto sulle cellule T è di indurre un'attivazione parziale e subottimale, che sfocia poi in un lungo stato di

non responsività per cui le cellule sono refrattarie ad un successiva stimolazione per quanto completa ed equilibrata (Sloan-Lancaster & Allen, 1996).

Modelli tradizionali hanno suggerito che cellule T che ingaggiano complessi MHC-peptide presentati da DC mature (attivate dalla presenza di stimoli infiammatori) vengono attivate pienamente, mentre cellule T che ingaggiano complessi MHC-peptide presentati da DC immature vanno incontro alla tolleranza (Steinman *et al.*, 2003). Benchè questa prospettiva fornisca un importante principio di base, studi recenti rivelano la maggiore complessità del quadro: infatti da un lato è stato visto che le DC possono esistere in vari stati, non solo mature o immature, e che anche le DC parzialmente mature possono indurre tolleranza (Reis e Sousa, 2006); dall'altro è stato osservato che anche le cellule stromali del linfonodo possono indurre tolleranza ad antigeni periferici (Lee *et al.*, 2007).

6.1 Meccanismi di costimolazione

I meccanismi di costimolazione finora noti sono:

1. riorganizzazione della membrana plasmatica della cellula T.

Nella membrana plasmatica delle cellule esistono dei piccoli (diametro tra 10 e 200 nm) microdomini lipidici, ricchi di colesterolo e sfingolipidi, estremamente eterogenei e dinamici, con un selettivo contenuto proteico, denominati *rafts* (zattere) di membrana. Questi microdomini nella membrana della cellula T vengono reclutati e stabilizzati alla SI, tramite interazioni proteina-proteina o proteina-lipide, in modo da formare una piattaforma in cui il segnale del TCR sia protetto e amplificato e quindi costimolato (Viola & Gupta, 2007).

2. molecole di membrana espresse sulla superficie dell'APC e riconosciute da recettori espressi sulla cellula T.

A questo gruppo appartiene la molecola costimolatoria per eccellenza dei linfociti T, il CD28. Un altro recettore della famiglia del CD28 è ICOS, che lega LICOS espressa dalle APC; esso promuove la secrezione di IL-10, IL-2, IFN- γ e TNF- α , ma non di IL-4. ICOS favorisce la differenziazione in cellule T effettrici quando coopera con uno stimolo di attivazione adeguato (come CD3+CD28 o CD3+IL-2), mentre sostiene la differenziazione in Treg quando il segnale costimolatorio è insufficiente (Mesturini *et al.*, 2006).

Ad avere un ruolo costimolatorio sono anche diversi recettori, espressi dalle cellule T, che fanno parte della superfamiglia dei TNF. Il principale è CD40L (CD154), che lega CD40. Gli effetti del legame sono bidirezionali, poiché viene potenziata la maturazione delle APC

(l'espressione di MHC II, dei ligandi del CD28, di ICAM-1, di LFA-3 e la secrezione dell'IL-12, tramite l'attivazione dei fattori di trascrizione NF- κ B, NFAT e AP-1), ma anche vengono trasmessi segnali di attivazione alle cellule T (Grewal & Flavell, 1996). Altre proteine della superfamiglia TNF che espresse dalle cellule T ne inducono la costimolazione sono 4-1BB (CD137) col suo ligando 4-1BBL, OX40 (CD134) col suo ligando OX40L, CD27 col suo ligando CD70, HVEM col suo ligando LIGHT, CD30 col suo ligando CD30L, e GITR col suo ligando GITRL (Watts, 2005).

Anche le molecole di adesione CD2 e LFA-1 hanno funzione costimolatoria. CD2 lega LFA-3, viene reclutato in SI dove sembra avere un ruolo nel *signaling* precoce e nell'endocitosi del TCR (Singleton *et al.*, 2006) e aumenta la produzione di IL-2, IFN- γ e IL-4 (Musgrave *et al.*, 2004).

LFA-1 (CD11a/CD18) aumenta l'accumulo di complessi TCR-MHC-peptide nel cSMAC ed è richiesto per la localizzazione della talina nel pSMAC e per l'esclusione di CD45 dalla SI; aumenta quindi il TCR ingaggiato e ne favorisce il *signaling* prossimale (Graf *et al.*, 2007); aumenta la produzione di IL-2 e la proliferazione. Inoltre la coppia LFA-1/ICAM-1 può favorire l'attivazione della cellula T anche se espressa in modo invertito (ICAM-1 sulla cellula T e LFA-1 sull'APC), addirittura con maggior effetto costimolatorio (Kohlmeier *et al.*, 2003).

Infine altre molecole di superficie note per aumentare l'attivazione linfocitaria sono CD5, CD9 e CD44 (Yashiro-Ohtani *et al.*, 2000).

3. molecole solubili secrete dall'APC e riconosciute da recettori presenti sulla cellula T. Recentemente è stata dimostrato che anche le chemochine, classicamente note perché inducono migrazione cellulare, se rilasciate dall'APC alla SI, hanno una funzione costimolatoria (Molon *et al.*, 2005). Quindi nella SI come nella sinapsi nervosa, l'informazione può essere mediata sia da molecole transmembrana che da molecole solubili e le chemochine possono rappresentare degli immuno-trasmittitori, l'equivalente funzionale dei neurotrasmettitori (Trautmann, 2005).

7 Costimolazione da riarrangiamenti della membrana: *rafts* di membrana.

7.1 I *rafts* di membrana: dalle membrane artificiali alle membrane biologiche

I *rafts* di membrana sono dei domini di membrana piccoli (10-200 nm di diametro), eterogenei, altamente dinamici, ricchi di steroli e sfingolipidi che compartimentalizzano i processi cellulari.

Le membrane cellulari sono costituite da una complessa miscela di colesterolo e vari glicerofosfolipidi e sfingolipidi, organizzati in un doppio strato per le forze idrofobiche che tendono a minimizzare il loro contatto con l'acqua. Gli sfingolipidi possiedono catene carboniose più lunghe e presentano una coesione laterale più forte rispetto ai glicerofosfolipidi. Proprio per le loro distinte proprietà biofisiche e per l'ampia differenza nel grado di saturazione delle loro catene aciliche, i lipidi delle membrane cellulari mostrano un comportamento differente durante la formazione di un monostrato lipidico: i glicerofosfolipidi hanno la tendenza ad adottare una fase fluida mobile, mentre gli sfingolipidi tendono ad una organizzazione più strettamente impaccata (Brown & London, 1998). Quindi in modelli di membrana artificiali, la segregazione dei lipidi in microdomini di varie dimensioni è stata facilmente dimostrata (Silvius, 2003).

La prima osservazione sperimentale a suggerire la presenza di due distinti compartimenti nelle membrane cellulari, che differiscono dalle membrane artificiali persino nella composizione lipidica, è arrivata dalle cellule epiteliali. La membrana plasmatica delle cellule epiteliali è polarizzata in domini, uno apicale e uno basolaterale (Rodriguez-Boulant & Nelson, 1989). Il foglietto esterno della membrana apicale è ricco di glicosfingolipidi e sfingomielinina, mentre quello della membrana basolaterale è ricco del glicerolipide fosfatidilcolina (Simons & van Meer, 1988). In queste cellule, glicosfingolipidi e proteine ancorate dal glicosil-fosfatidil-inositolo (GPI) sono specificatamente inviate alla membrana apicale, suggerendo che i microdomini lipidici sono formati nel Golgi, il sito di smistamento per la distribuzione apicale o basolaterale, da cui poi raggiungono la superficie apicale (Simons & van Meer, 1988; Brown & Rose, 1992). Questi studi hanno inoltre proposto un ruolo chiave per i *rafts* nel traffico di membrana e nello smistamento proteico.

Un'altra osservazione sperimentale cruciale è derivata dall'uso di detergenti (soprattutto il Triton X-100 a 4°C) per isolare i *clusters* di glicosfingolipidi, colesterolo e proteine-GPI, che formano le cosiddette membrane resistenti ai detergenti (DRM) (Brown & Rose, 1992). Lo scoprire che i DRM estratti dalle membrane cellulari trattengono uno specifico insieme di

proteine, comprese molecole chiave del *signaling*, ha suggerito che questi domini lipidici possano avere un ruolo cruciale non solo come piattaforma per il traffico di membrana e di proteine, ma anche per il *signaling* (Cinek & Horejsi, 1992; Casey, 1995).

Si è formulata quindi l'ipotesi dei *rafts* di membrana: nelle membrane cellulari forze attrattive tra sfingolipidi e colesterolo mediano la formazione di *clusters* laterali di lipidi in un ambiente di glicerofosfolipidi non saturi (Simons & Ikonen, 1997). È stato proposto quindi che i *rafts* controllino lo smistamento proteico e l'assemblaggio dei complessi di *signaling* in diversi contesti biologici.

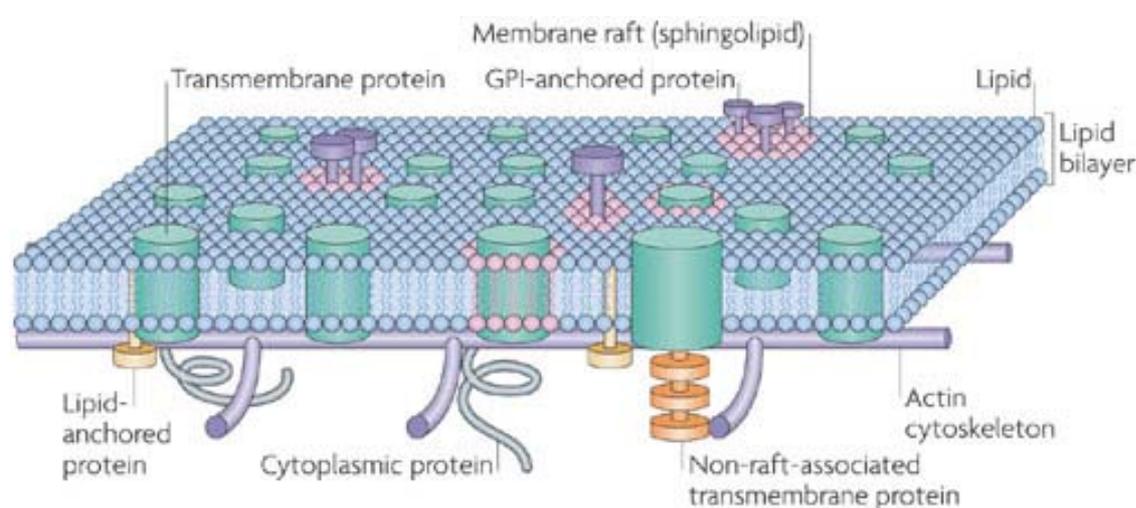
Il fatto però che i *rafts* venissero definiti operativamente in base a due tecniche che fanno affidamento sulle loro proprietà fisicochimiche, cioè l'insolubilità ai detergenti che permette il loro isolamento come DRM in un gradiente di densità di saccarosio e la necessità del colesterolo per la loro integrità e funzionalità, ha dato adito a speculazioni sull'esistenza stessa dei *rafts*. Da una parte infatti i DRM non rappresentano *rafts* di membrana in cellule vive e non forniscono informazioni sulla organizzazione dei microdomini preesistente al detergente; anzi il trattamento con il Triton X-100 può esso stesso creare o perturbare profondamente i domini lipidici (Heerklotz, 2002; Heerklotz *et al.*, 2003), tanto più per la mancanza di standardizzazione dei protocolli. D'altra parte la deplezione del colesterolo tramite sostanze farmacologiche come la metil- β -ciclodestrina, per studiare la dipendenza dai *rafts* delle funzioni cellulari (Edidin, 2003), altera il potenziale di membrana (Pizzo *et al.*, 2002), l'endocitosi (Lang *et al.*, 2001), il citoscheletro actinico e la mobilità laterale delle proteine di membrana (Kwik *et al.*, 2003), invalidando l'interpretazione di qualsiasi dato.

La microscopia standard, sia a fluorescenza che elettronica, non è riuscita a visualizzare i *rafts* in cellule non stimulate, portando a pensare che se non sono illusori, i *rafts* nelle membrane delle cellule vive devono essere sfuggenti (Munro, 2003), molto piccoli (dell'ordine dei nanometri) e/o estremamente dinamici (Subczynski & Kusumi, 2003; Jacobson *et al.*, 2007).

Le membrane biologiche sono infatti molto diverse dalle artificiali sia per composizione lipidica che per l'altissima concentrazione proteica (Quinn *et al.*, 1984): le membrane biologiche sono principalmente costituite da proteine, con i lipidi che formano un anello (Takamori *et al.*, 2006) o un guscio (Anderson & Jacobson, 2002) attorno a ciascuna proteina. Inoltre le membrane biologiche tramite proteine inserite nel loro foglietto interno interagiscono col citoscheletro actinico e le interazioni proteine-lipidi sono importanti nell'organizzazione della struttura compartimentalizzata della membrana: lo steccato dell'actina e i paletti delle proteine transmembrana generano dei confini tra compartimenti

che limitano la diffusione di lipidi e proteine, influenzando l'organizzazione dei microdomini di membrana (Kusumi *et al.*, 2005) (Figura 5).

Nel contesto di questo nuovo modello delle membrane plasmatiche, un approccio per uno studio rigoroso dei *rafts* è quello di analizzare i complessi riarrangiamenti di membrana che avvengono in un linfocita attivato. Per esempio nei leucociti in migrazione, marcatori endogeni ed esogeni dei *rafts* si concentrano ai poli opposti della cellula, mostrando una chiara segregazione della membrana plasmatica in compartimenti lipidici (Gomez-Mouton *et al.*, 2001; Seveau *et al.*, 2001; Millan *et al.*, 2002; Gri *et al.*, 2004; Kindzelskii *et al.*, 2004).



Nature Reviews | Immunology

Figura 5. La membrana plasmatica è composta da lipidi e proteine associate tramite interazioni non covalenti. Il doppio strato lipidico ha una composizione asimmetrica, con gli sfingolipidi, i glicosfingolipidi e la fosfatidilcolina arricchiti nel foglietto esterno e i glicerofosfolipidi in quello interno. In rosa è mostrata l'organizzazione dei *rafts* di membrana in nanodomini (meno di 5 nm), secondo il modello basato sulla distribuzione delle proteine-GPI nelle membrane delle cellule a riposo. In accordo con l'ipotesi del "guscio" le proteine transmembrana possono essere transientemente circondate da lipidi tipo *rafts*. Nel foglietto interno della membrana l'actina e proteine che legano l'actina interagiscono con lipidi e proteine, formando così compartimenti di membrana e regolando le dinamiche dei *rafts* di membrana (Viola & Gupta, 2007).

Inoltre il progredire delle tecniche microscopiche ha fornito dati convincenti sull'esistenza dei *rafts* di membrana senza ricorrere a strategie che possono portare ad artefatti (come i DRM o l'aggregazione dei componenti dei *rafts* indotta da anticorpi). Tramite trasferimento di energia per risonanza dovuta a fluorescenza (FRET) è stata dimostrata in cellule imperturbate l'organizzazione dei *rafts* in domini dell'ordine del nanometro (Varma & Mayor, 1998): nelle cellule vive le proteine-GPI sono presenti come monomeri e come *clusters* di meno di 5 nm di diametro e sensibili al colesterolo (Sharma *et al.*, 2004). Altri approcci che hanno dimostrato

l'esistenza dei *rafts* in cellule vive sono *single particle tracking* (Dietrich *et al.*, 2002), *laser trap* (Pralle *et al.*, 2000) e *single dye tracking* (Schutz *et al.*, 2000). Inoltre è stato dimostrato, in seguito ad interazione con ligandi, l'intrappolamento di *rafts* piccoli e dinamici in piattaforme più grandi per la trasduzione del segnale (Suzuki *et al.*, 2007a; Suzuki *et al.*, 2007b).

Appare quindi evidente che la composizione della membrana plasmatica delle cellule T non è omogenea e che i microdomini lipidici esistono e sono stabilizzati dopo stimolazione del linfocita.

In condizioni di riposo i *rafts* sono molto piccoli e dinamici, composti solo da poche molecole che interagiscono transientemente, si possono formare e disperdere continuamente e non possono essere isolati in stato nativo; inoltre i loro costituenti possono frequentemente entrare e uscire dai domini, restandovi associati per pochi millisecondi o meno (Subczynski & Kusumi, 2003). La breve durata dei *rafts* e le loro piccole dimensioni concordano con il delicato equilibrio di partizione delle molecole tra i domini *rafts* e le regioni non-*rafts* della membrana; d'altra parte anche gli stati di monomeri o di complessi delle proteine transmembrana dipendono da un equilibrio precario: piccoli cambiamenti nell'interazione con il colesterolo o nello stato di conformazione delle proteine di membrana possono spostare il punto di equilibrio dei due sistemi e indurre l'oligomerizzazione e l'aggregazione delle proteine, che poi attivano la via di trasduzione del segnale a valle, e la stabilizzazione temporanea e la fusione dei *rafts* in domini più grandi circostanti il complesso recettoriale, per effetto della riduzione dei movimenti termici casuali dei lipidi e stabilizzati ulteriormente da interazioni con il citoscheletro actinico (Subczynski & Kusumi, 2003; Pizzo & Viola, 2004).

Per quanto riguarda il contenuto proteico dei *rafts*, le proteine possono avere diversa propensione per l'ambiente *rafts* in funzione delle loro caratteristiche fisiche: i microdomini sono arricchiti delle proteine ancorate al foglietto esterno grazie al glicolipide GPI che portano covalentemente legato, e delle proteine localizzate nel foglietto interno grazie alla modificazione con residui di acidi grassi saturi, come la miristoilazione e la palmitoilazione (Harder *et al.*, 1998).

Tra le proteine GPI associate spiccano CD55 e CD59 (che regolano l'attività del complemento), CD14 (recettore per l'LPS –lipopolisaccaride-), CD24 (molecola costimolatoria) e CD73 (una nucleotidasi) (Horejsi, 2003). Tra le proteine citoplasmatiche associate ai *rafts* è fondamentale la presenza delle chinasi della famiglia Src (Stefanova *et al.*, 1991; Garnett *et al.*, 1993), come Lck (Rodgers *et al.*, 1994), delle proteine G (Oh &

Schnitzer, 2001), tra cui le piccole proteine G delle famiglie Ras e Rho (Niv *et al.*, 2002). Nonostante molte proteine transmembrana siano escluse dai *rafts*, importanti eccezioni sono rappresentate dai corecettori palmitoilati CD4 e CD8, dal pre-TCR nei timociti precoci CD4⁺ e CD8⁻ (Saint-Ruf *et al.*, 2000), dal recettore per l'adesione CD44, dalle proteine adattatrici LAT e PAG/Cbp, che lega e attiva Csk, e da diversi membri della famiglia del recettore per il fattore di necrosi tumorale (Horejsi, 2003).

In realtà soltanto pochissime molecole sono localizzate esclusivamente nei *rafts* o nelle membrane convenzionali, anche molecole che tipicamente preferiscono l'ambiente *rafts*, come le Src-chinasi, risiedono per metà circa nelle membrane non-*rafts*. La ripartizione dipende dal tipo cellulare, dall'ammontare totale dei domini *rafts* sulla superficie cellulare e dallo stato di aggregazione delle molecole, controllato a sua volta dai segnali intra ed extracellulari. Quindi la differenza tra molecole associate ai *rafts* e altre non associate è quantitativa e non qualitativa. Tale compartimentalizzazione dipende dal citoscheletro actinico sottostante la membrana, che interagisce con proteine legate al foglietto interno dei *rafts*, e non dalla matrice extracellulare, né dai domini extracellulari delle proteine di membrana (Subczynski & Kusumi, 2003).

7.2 Funzioni dei *rafts* e loro ruolo nell'attivazione linfocitaria

La natura polarizzata e compartimentalizzata dell'attivazione linfocitaria gioca un ruolo chiave nell'attivare specifiche vie di *signaling* e quindi specifiche risposte biologiche con precise determinazioni spazio-temporali. Questa polarizzazione richiede rapidi riarrangiamenti citoscheletrici e l'assemblaggio di specializzati domini lipidici di membrana. I piccoli *rafts* possono talora essere stabilizzati a formare piattaforme più grandi tramite interazioni proteina-proteina o proteina-lipide (Pike, 2006).

È stato suggerito un ruolo dei *rafts* in numerosi processi biologici: la trasduzione del segnale (per esempio attraverso il TCR, ma anche attraverso il BCR, il pre-BCR, il recettore per il frammento Fc delle immunoglobuline, i recettori per citochine e chemochine e il recettore per l'LPS); l'apoptosi; l'adesione e la migrazione cellulari (Horejsi, 2003); la trasmissione sinaptica; l'organizzazione del citoscheletro; lo smistamento proteico durante esocitosi ed endocitosi. Inoltre sembra rappresentino il punto di entrata cellulare di un ampio spettro di virus, batteri e tossine, nonché il sito di assemblaggio virale e di formazione dei prioni e dell'amiloide dell'Alzheimer (Munro, 2003).

La fusione dei *rafts* è un aspetto essenziale nella formazione della SI e nell'attivazione linfocitaria (Janes *et al.*, 2000).

Sul versante della APC nei *rafts* si concentrano gli specifici complessi MHC-peptide, e ciò assume particolare importanza considerando che i complessi specifici rappresentano solo una minuscola frazione di tutti i complessi MHC-peptidi di quella APC (Hiltbold *et al.*, 2003).

Nei linfociti T è stato dimostrato con tecniche biochimiche, proteomiche e di microscopia che il legame del TCR da parte dell'antigene ne induce la localizzazione nelle regioni di membrana ricche di colesterolo e glicosfingolipidi (Dykstra *et al.*, 2003). Inoltre anche il CD28 dopo interazione col suo ligando si localizza nei DRM (Sadra *et al.*, 2004). L'associazione del TCR con i DRM è rapidamente seguita dal reclutamento nei DRM delle proteine del complesso di *signaling* (tra cui CD3 ζ , ZAP-70, SLP76, PKC- θ , PLC γ , PI3K - fosfatidil-inositide 3 chinasi- e I κ k), indicando un ruolo chiave dei *rafts* nell'iniziare, regolare spazialmente e sostenere il segnale di attivazione (Viola & Gupta, 2007).

Il raggruppamento dei *rafts* in microdomini più grandi e la redistribuzione dei *rafts* e delle proteine *rafts*-associate alla SI (Lanzavecchia *et al.*, 1999; Gaus *et al.*, 2005) è importante per la organizzazione spaziale della SI stessa, associando tra loro componenti prima separati e portando così alla fosforilazione crociata e all'attivazione delle chinasi, cui segue l'inizio del processo di trasduzione del segnale (Horejsi, 2003). La stimolazione di TCR e CD28 nei linfociti T determina un riarrangiamento su larga scala dei domini di membrana, con i piccoli *rafts* individuali che si fondono in un dominio dell'ordine di dimensioni del micron, per cui le proteine dei domini *rafts* sono reclutate alla SI con movimenti laterali mediati dal citoscheletro e dal traffico di membrana. Il reclutamento dei *rafts* alla SI dipende quindi dalla sinergia tra *rafts*, citoscheletro e *signaling*. Inoltre i *rafts* interagiscono con il sistema endocitico per mediare l'internalizzazione dei recettori (Harder & Engelhardt, 2004).

Un vantaggio dei *rafts* è la loro versatilità: essendo strutture parzialmente basate sulle interazioni lipidiche, possono accogliere molecole diverse e, assemblando specifiche molecole e amplificando il dialogo tra sistemi altrimenti separati, possono trasdurre, attraverso diverse vie, vari tipi di segnale, a seconda del tipo e della storia del segnale extracellulare (Subczynski & Kusumi, 2003).

Il fatto che i due foglietti della membrana, con le rispettive proteine associate, siano tra loro accoppiati (forse grazie alla lunghezza delle catene aciliche degli sfingolipidi che ne comporta l'interdigitazione tra i lipidi del foglietto interno o forse per l'affinità tra le proteine e i *rafts* stessi) permette ai *rafts* di agire da piattaforma che concentra le molecole di trasduzione per

un segnale più efficiente e specifico e di accoppiare eventi esterni alla cellula con le vie di trasduzione del segnale interne alla cellula stessa (Munro, 2003).

I *rafts* hanno quindi un ruolo chiave nell'iniziare (Pizzo *et al.*, 2004), regolare spazialmente e sostenere il *signaling* antigene dipendente, rappresentando un meccanismo chiave di costimolazione: generando un ambiente favorevole alla trasduzione del segnale, il reclutamento dei *rafts* alla SI abbassa la soglia di attivazione dei linfociti e contribuisce all'amplificazione del *signaling* indotto dalla costimolazione (Viola & Gupta, 2007).

8 Costimolazione da molecole di membrana: CD28

8.1 Effetti del CD28

Il CD28 è una glicoproteina integrale di membrana omodimerica, del peso di 44 kDa, contenente nella regione extracellulare un dominio di tipo immunoglobulinico; è espressa nel 90% dei linfociti T umani CD4⁺ e nel 50% dei CD8⁺, a circa 6×10^4 molecole per cellula (mentre il TCR è espresso a circa 3×10^4 molecole per cellula). La sua espressione aumenta dopo stimolazione con l'antigene o agenti farmacologici che mimano il legame con l'antigene. Dopo stimolazione del CD28, la cellula è a lungo non responsiva ad una successiva stimolazione, in quanto l'espressione in membrana del CD28 è repressa per più di 48 ore, mentre la quantità di mRNA è ridotta per 4-24 ore. I ligandi di CD28 sono il dimero B7.1 (CD80) e il monomero B7.2 (CD86), appartenenti anch'essi alla superfamiglia delle immunoglobuline, espressi ad alti livelli dalle APC attivate. Il segnale indotto dal CD28 dopo interazione con B7.1 o B7.2 non presenta marcate differenze biochimiche (Sharpe & Freeman, 2002).

La mancanza del segnale costimolatorio del CD28 riduce le risposte immunitarie ai patogeni e agli antigeni dell'allograft, riduce la proliferazione cellulare, inibisce la formazione del centro germinativo, le ipermutazioni somatiche e lo *switch* isotipico delle classi immunoglobuliniche, riduce la differenziazione in cellule T *helper* e l'espressione di citochine del tipo Th2 (Acuto & Michel, 2003). Questi effetti dipendono dal fatto che il CD28 è fondamentale nelle cellule *naive* per fornire un potente segnale sinergico a quello del TCR, in modo da attivare fattori di trascrizione come NF- κ B, NFAT e AP1, regolatori a valle nella

cascata della risposta immune, che iniziano o controllano la proliferazione, la morte, la differenziazione cellulari e le interazioni funzionali con altre cellule. Il legame del TCR in assenza di quello del CD28 porta le cellule all'apoptosi o all'anergia (Viola, 2001). La stimolazione del CD28 infatti potenzia quegli aspetti del *signaling* del TCR che non coinvolgono il flusso di calcio: in assenza del CD28, il flusso di calcio del TCR predomina, con piccoli ma sostenuti aumenti di calcio che portano all'attivazione soltanto di NFAT, il quale senza la cooperazione di AP1 controlla geni di regolatori negativi dell'attivazione linfocitaria (Macian *et al.*, 2004).

Il CD28 determina un'aumentata espressione del recettore per l'IL-2, di recettore per le chemochine, come CXCR5, e di altri immunorecettori come CD49L, CTLA4, ICOS, OX40 e 4-1BB, delle citochine IL-2, IFN- γ e IL-4 e della ciclina D che permette la progressione del ciclo cellulare verso G1 e S; inoltre fa aumentare la massa cellulare stimolando la biosintesi di molecole e il metabolismo energetico, promuove l'espressione di geni antiapoptotici come BCL-XL, favorisce la differenziazione verso il sottotipo Th2 e contribuisce a modificare la struttura cromatinica e a demetilare il DNA per rendere accessibili i geni che regolano i processi biologici della cellula.

Questi eventi assicurano lo sviluppo di una seconda onda di segnale (ore o giorni dopo l'iniziale incontro tra APC e cellula T) negli organi linfoidi secondari e/o dopo migrazione ai tessuti e sono cruciali per le funzioni effettrici T e per stabilire la memoria a lungo termine (Acuto & Michel, 2003).

8.2 Il CD28 e l'assemblaggio della SI

L'interazione tra il TCR e il complesso MHC-peptide, del tipo chiave-lucchetto, è molto più lenta di quella del CD28 col suo ligando (van der Merwe & Davis, 2003), quindi il numero di molecole del CD28 impegnate risulta più grande e il legame più dinamico rispetto al TCR. Tutto ciò può influenzare l'ampiezza e la persistenza dei due segnali (Acuto & Michel, 2003). Il legame tra CD28 e il suo ligando, vincolando tra loro le membrane della cellula T e della APC, facilita l'interazione del TCR col complesso MHC-peptide e aiuta a sostenere la fosforilazione tirosinica (ad esempio su ZAP-70 (Tuosto & Acuto, 1998), su Lck (Holdorf *et al.*, 2002) e su Vav-1 (Klasen *et al.*, 1998)) sfruttando l'aggregazione dei *rafts* di membrana alla SI (Lanzavecchia *et al.*, 1999; Martin *et al.*, 2001; Tuosto *et al.*, 2001).

Il CD28 dopo interazione col suo ligando viene reclutato alla SI (Grakoui *et al.*, 1999), nonostante il *signaling* del CD28 inizi prima della formazione della SI (Andres *et al.*, 2004).

L'effetto del CD28 si verifica diversi minuti dopo l'iniziale stimolazione del TCR e sembra essere dovuto al fatto che il CD28 facilita il trasposto laterale di componenti di membrana sfruttando il citoscheletro actinico (Wulfing & Davis, 1998). Il CD28, che dopo stimolazione si localizza nei *rafts* (Sadra *et al.*, 2004), favorisce il reclutamento alla SI dei *rafts* e di molecole del *signaling* (come Lck e PKC- θ) (Lanzavecchia *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2002; Tavano *et al.*, 2004) e l'esclusione di CD45 dalla SI, stabilizzando così la trasduzione del segnale per 5-15 minuti, tempo richiesto per la piena attivazione linfocitaria (Acuto & Michel, 2003). Mentre l'ingaggio del TCR è seguito dall'organizzazione del complesso di trasduzione del segnale, ma non dall'aggregazione dei *rafts* di membrana (Bunnell *et al.*, 2000), la costimolazione del CD28 recluta i *rafts* alla SI, principalmente da riserve intracellulari (Pizzo & Viola, 2003), dato che le cellule T *naive* hanno pochi *rafts* sulla membrana plasmatica e li espongono solo dopo attivazione (Tuosto *et al.*, 2001). Alcune molecole, tra cui Lck, sono trasportate alla SI da depositi intracellulari per mezzo del trasporto di membrana (Lanzavecchia *et al.*, 1999; Martin *et al.*, 2001; Tuosto *et al.*, 2001). Quindi nella trasduzione del segnale del TCR sono implicati sia i *rafts* presenti sulla superficie cellulare e preassociati con il TCR, che forniscono le chinasi che iniziano la cascata, sia dei *rafts* intracellulari che traslocano alla SI e amplificano il segnale e sono coinvolti nella costimolazione (Horejsi, 2003). Nelle cellule T effettrici lo stimolo del CD28 non è necessario perché un largo numero di *rafts* è già presente sulla membrana, permettendo l'amplificazione del segnale del TCR indipendentemente dallo stimolo del CD28 (Viola, 2001). Questo meccanismo potrebbe spiegare perché le cellule memoria ed effettrici siano notoriamente più responsive (la risposta è più rapida, a dosi più basse di antigene e le condizioni di costimolazione richieste sono meno stringenti) delle cellule *naive* (Croft, 1994).

Quindi il CD28 fornisce alla SI degli elementi selezionati necessari alla trasduzione del segnale che non sono efficientemente reclutati dal TCR; in questo modo permette il raggiungimento della soglia di attivazione o, in altri termini, abbassa la soglia stessa, cioè il numero minimo richiesto di TCR stimolati e converte un peptide agonista debole o parziale in agonista completo, ossia permette la risposta a peptidi a bassa affinità (Viola & Lanzavecchia, 1996; Manickasingham *et al.*, 1998; Acuto & Michel, 2003). Le cellule T si attivano una volta stimolato un numero soglia di recettori, in genere circa 8.000 dei 30.000 presenti sulla superficie di un linfocita T umano. La costimolazione da CD28 abbassa il numero di recettori richiesti per l'attivazione a circa 1.000, rendendo la cellula T più sensibile alla stimolazione da parte del complesso MHC-peptide. Il secondo segnale non agisce aumentando il numero di

TCR stimolati, ma amplifica il segnale trasmesso, incrementando i precoci eventi di fosforilazione. Questo assicura una risposta cellulare ad uno stimolo antigenico fisiologico con l'ingaggio di un numero relativamente basso di recettori (Viola & Lanzavecchia, 1996).

In realtà non è ancora chiaro quale sia la causa e quale la conseguenza: se la stabilizzazione dei *rafts* alla SI rifletta l'assemblamento di un macchinario per la trasduzione del segnale completo e pienamente efficiente, o se piuttosto il reclutamento dei *rafts* medi questo stesso risultato; comunque i due aspetti si potenziano l'un l'altro generando un circolo virtuoso che stabilizza la piattaforma per il segnale (Harder & Engelhardt, 2004).

Mentre il segnale del TCR se abbastanza forte attiva molti programmi di espressione genica, il CD28 da solo porta alla espressione transiente di solo pochi geni e non presenta chiare conseguenze biologiche, indicando che il suo è un ruolo subordinato (Acuto & Michel, 2003). Inoltre la mancanza del segnale trasmesso dal CD28 può essere compensato da più alte concentrazioni dell'antigene stimolante (Viola, 2001). Però in condizioni normali, solo pochi TCR sono attivati, determinando soltanto eventi incompleti e di breve durata che non inducono la proliferazione né la differenziazione cellulari; in questo caso il CD28 è in grado di amplificare fortemente il segnale (Acuto & Michel, 2003).

8.3 Signaling del CD28

Il CD28 è connesso al macchinario di segnalazione intracellulare attraverso la sua corta (41 amminoacidi) coda intracitoplasmatica e attiva alcuni degli effettori della cascata di trasduzione del segnale condividendoli con il TCR. I segnali mediati dal C28 sono infatti integrati con quelli indotti dal TCR ad un livello della cascata prossimale alla membrana, prima che gli eventi avvengano a livello nucleare.

La connessione del CD28 al macchinario di trasduzione del segnale non è mediata dagli ITAMs come avviene per il CD3, ma dal motivo Tyr-Met-Asn-Met e da due motivi ricchi di proline localizzati nella sua coda citoplasmatica (Figura 6) (Acuto & Michel, 2003).

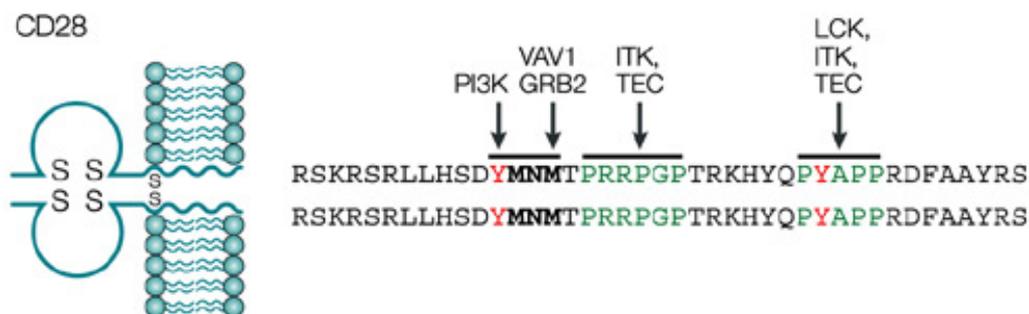


Figura 6. Sequenza amminoacidica della coda citoplasmatica del CD28 umano. Sono evidenziati i motivi rilevanti per la trasduzione del segnale e le molecole che con essi interagiscono (Acuto & Michel, 2003).

Immediatamente dopo il legame (nell'arco di secondi), il CD28 attivato viene ridistribuito nei *rafts*, venendo così a colocalizzare con la forma attiva di Lck (Montixi *et al.*, 1998; Irls *et al.*, 2003) che ne fosforila la tirosina del motivo Tyr-Met-Asn-Met (Raab *et al.*, 1995). Tale tirosina è importante per l'interazione con le proteine del *signaling* con domini SH2, tra cui la stessa Lck (Holdorf *et al.*, 1999). Per la funzione costimolatoria sono necessari sia Lck sia il dominio ricco di proline della coda citoplasmatica del CD28, che gli permette di interagire con il dominio SH3 della Src-chinasi e, attivandola, iniziare la cascata di trasduzione del segnale (Holdorf *et al.*, 1999).

Molte delle proteine che appartengono alla via di trasduzione del CD28 costituiscono un sottogruppo di quelle implicate nella trasmissione del segnale del TCR. Tra le più importanti ci sono PI3K, le Tec-chinasi e Itk, Vav-1 e la serin-treonin chinasi AKT (anche nota come PKB) (Acuto & Michel, 2003).

PI3K attraverso la sua subunità regolatoria p85 lega la tirosina fosforilata del motivo Tyr-Met-Asn-Met presente nella coda citoplasmatica del CD28 (Figura 6) e attraverso la subunità p110 genera fosfatidil-inositolo-3,4,5trifosfato (PIP₃) e fosfatidil-inositolo-3,4bifosfato (PIP₂) a partire dal fosfatidil-inositolo-4,5bifosfato, inducendo così dei cambiamenti allosterici e la localizzazione alla membrana plasmatica delle proteine della via di trasduzione del segnale che contengono il dominio omologo alla plecstrina, per le quali gli inositoli fungono da ancora, tra cui Vav-1 e Akt. Il risultato finale è l'induzione di BCL-XL, la progressione nel ciclo cellulare e la risposta antigenica (Acuto & Michel, 2003).

Lo stesso sito di legame di PI3K lega anche Grb-2, ma a livelli più bassi (Rudd & Schneider, 2003).

Le Tec-chinasi, regolate da Lck, Vav-1 e PI3K, amplificano l'espressione dell'IL-2: attraverso la PLC γ 1 contribuiscono all'aumento del calcio intracellulare, all'attivazione di PKC dipendente da DAG e all'attivazione di Ras, Raf ed Erk attraverso Ras/GTP. La loro attivazione dipende dai due motivi ricchi in proline presenti nella coda del CD28 (Figura 6) (Acuto & Michel, 2003). Sembra che Tec e Itk regolino anche la proteina della sindrome di Wiskott-Aldrich (WASp), che lega il complesso Arp2/3 (proteine 2/3 correlate all'actina), responsabile della enucleazione dei filamenti di actina. In realtà CD28 da solo non induce fosforilazione di PLC γ 1 e aumento di calcio (Michel 2001), indicando che gli effetti su Tec e Itk mediati dal CD28 dipendono dal TCR.

L'asparagina del motivo Tyr-Met-Asn-Met è importante per la fosforilazione di Vav-1, anche se il meccanismo di ancoraggio di Vav-1 al CD28 non è chiaro, per quanto sia indipendente

da PI3K. Vav-1, attivando Rac-Rho, controlla i riarrangiamenti citoscheletrici, l'aggregazione del TCR e dei *rafts* e amplifica l'attivazione di NFAT, NF- κ B e AP1 (Marinari *et al.*, 2002; Acuto & Michel, 2003).

AKT, la cui attivazione dipende da PI3K, lega il CD28 sia a NFAT, di cui inibisce l'esportazione dal nucleo, che a NF- κ B e promuove la sopravvivenza cellulare controllando c-myc e la ciclica D (Acuto & Michel, 2003).

Il segnale indotto dal CD28, per quanto amplifichi le risposte cellulari al TCR, può essere superfluo, in quanto agisce secondo un modello quantitativo e non qualitativo: è richiesto per superare la soglia di segnalazione quando questa non sia conseguibile dall'attivazione del solo TCR. Variando la composizione dei complessi proteici di segnalazione altamente ordinati e/o la durata del loro assemblaggio, la qualità del segnale può variare senza bisogno di un componente esclusivo nella via controllata dal CD28 (come invece sarebbe necessario in un modello qualitativo). Benché il TCR possa provvedere al minimo necessario per propagare il segnale nella cellula, il CD28 agisce come un amplificatore, importante soprattutto per le cellule *naive* (Acuto & Michel, 2003).

9 Costimolazione da molecole solubili: chemochine e recettori chemochinici.

9.1 Le chemochine nella risposta immunitaria

I leucociti hanno la capacità di muoversi in modo orientato verso la sorgente di uno stimolo, che le guida nel sito in cui devono svolgere la loro funzione e di cui riconoscono direzione ed intensità; tale movimento direzionato, definito chemotassi, avviene lungo un gradiente chimico extracellulare creato da sostanze dette chemotattiche, quali le chemochine. Le chemochine sono piccole proteine (67-127 residui aminoacidici di circa 8-12 kDa) idrosolubili e costituenti una delle superfamiglie appartenenti alla classe delle citochine. Il loro nome, che significa "citochina chemotattica", riflette la loro principale azione di fattori migratori solubili (del Pozzo *et al.*, 1998). Grazie alle loro selettive proprietà di chemoattrazione, le chemochine coordinano l'omeostasi tessutale e l'infiammazione, orchestrando la circolazione leucocitaria in condizioni sia fisiologiche che patologiche. Nella complessa rete di interazioni in gioco per regolare il sistema immunitario, caratterizzato da

responsività, efficienza, rapidità, sicurezza e dispersione su un vasto territorio, serve un codice di comunicazione comune a tutti i tipi cellulari implicati, ricco, versatile e finemente modulabile. Il sistema delle chemochine, caratterizzato da ridondanza e pleiotropia, condiviso da tutte le cellule del sistema immunitario, con più di 50 chemochine e 20 recettori finora conosciuti (Figura 7), corrisponde a questa necessità e regola e modula la migrazione cellulare definendo il chi, il dove e il quando.

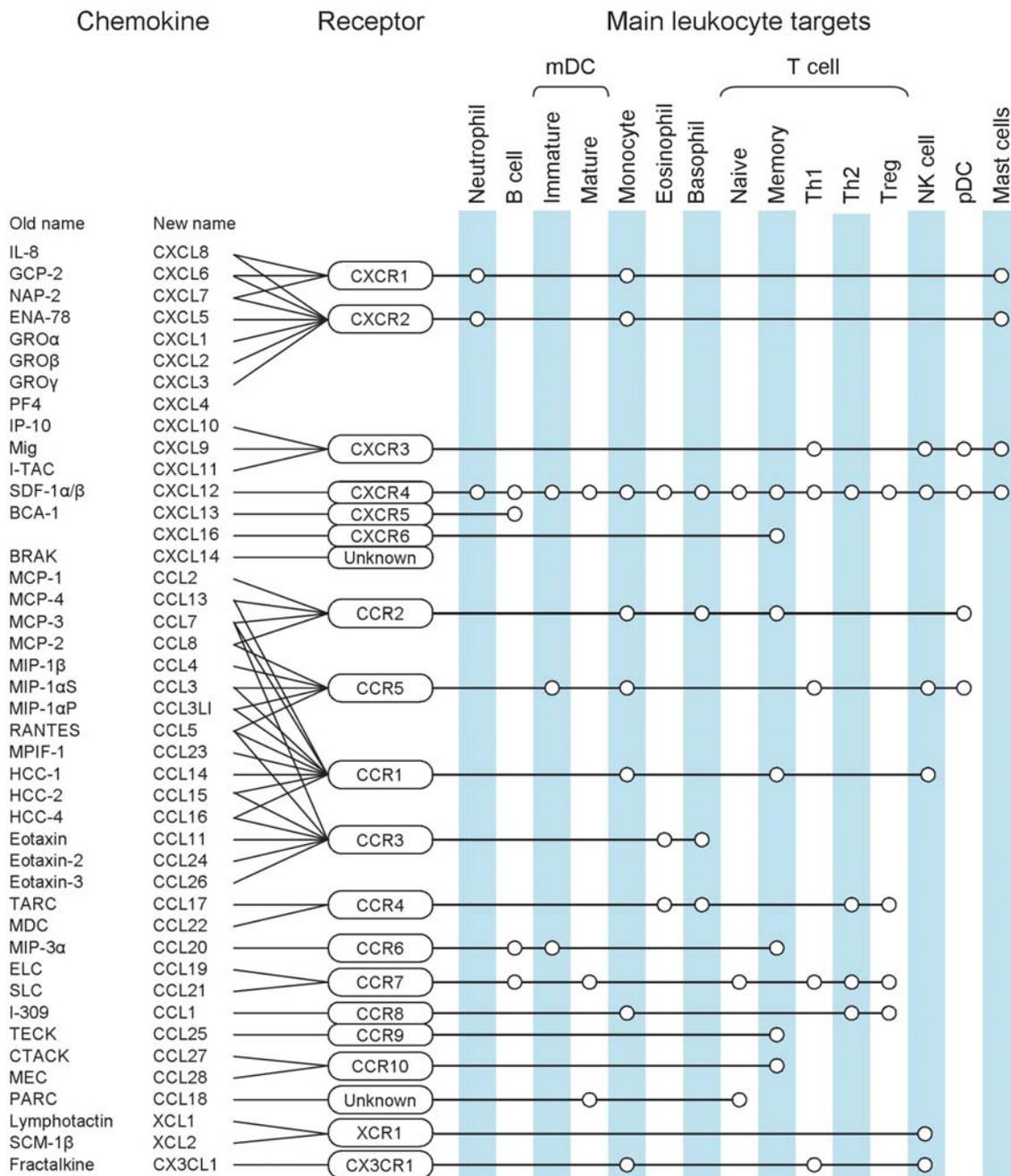


Figura 7. Chemochine umane e loro recettori. Per ogni chemochina sono riportati il vecchio e il nuovo nome, i(l) recettori(e) specifici(o), e i bersagli leucocitari (Viola & Luster, 2008).

Benché il controllo della migrazione rappresenti la loro prima funzione, le chemochine svolgono molti altri ruoli, a seconda del tipo di recettore, di cellula e dello stadio di sviluppo e attivazione cellulari: coordinano la scelta di una cellula tra proliferazione o apoptosi, l'angiogenesi, l'ematopoesi, l'organogenesi, e l'adesione cellulare (indirettamente, attivando le integrine).

Le chemochine giocano un ruolo chiave in tutti i passaggi della vita delle cellule T (Figura 8). Il CXCL12 secreto ad alte dosi dalle cellule reticolari mantiene le cellule staminali nelle nicchie del midollo osseo (Broxmeyer *et al.*, 2005); i progenitori linfoidi comuni esprimono il CCR7 e il CCR9 e i loro ligandi CCL21 e CCL25 determinano il reclutamento dei timociti nel timo (Liu *et al.*, 1996; Wurbel *et al.*, 2001). All'interno del timo sono CCR4, CCR7, CCR9 e CXCR4 a promuovere e guidare la maturazione timica nelle sue varie fasi attraverso zona corticale e zona midollare (Bleul & Boehm, 2000). Giunte alla maturazione, le cellule T escono grazie all'espressione del recettore S1P₁ e a CXCR4, potendo raggiungere la circolazione linfatica ed ematica (Poznansky *et al.*, 2002; Matloubian *et al.*, 2004). Le cellule *naive* che ricircolano nel sangue esprimono il CCR7 e sono attratte nei linfonodi dai ligandi CCL19 e CCL21 (Forster *et al.*, 1999). Queste stesse chemochine attirano nei linfonodi le DC, inducendone al contempo la maturazione, incrementano i movimenti linfocitari e coordinano le interazioni cellulari, facilitando la ricerca da parte del linfocita del *partner* giusto (Bajenoff *et al.*, 2006). Durante il *priming* e l'attivazione delle cellule T nei tessuti periferici, le chemochine come molecole solubili rilasciate alla SI possono favorire l'adesione e costimolare la cellula T, promuovendone attivazione e polarizzazione (Molon *et al.*, 2005). Le cellule T attivate a cellule effettrici lasciano il linfonodo grazie ad un segnale mediato da S1P (Matloubian *et al.*, 2004) e sono divise in sottopopolazioni linfocitarie caratterizzate in modo fisiologicamente rilevante da un diverso *pattern* di recettori chemochinici (Kim *et al.*, 2001).

Nelle cellule Th1 sono espressi CXCR3, CXCR4, CCR5, CCR7 e CX3CR1 (Bonecchi *et al.*, 1998; Sallusto *et al.*, 1998); nelle Th17 CXCR4, CXCR6, CCR2, CCR5, CCR6 e CCR4 (Annunziato *et al.*, 2007; Sato *et al.*, 2007); nelle Th2 CCR4, CCR7, CCR8 e CXCR4 (Bonecchi *et al.*, 1998; D'Ambrosio *et al.*, 1998; Sallusto *et al.*, 1998). Nelle cellule CD8⁺ sono espressi CXCR3, CCR5 e CX3CR1 (Fukada *et al.*, 2002; Nishimura *et al.*, 2002; Iijima *et al.*, 2003).

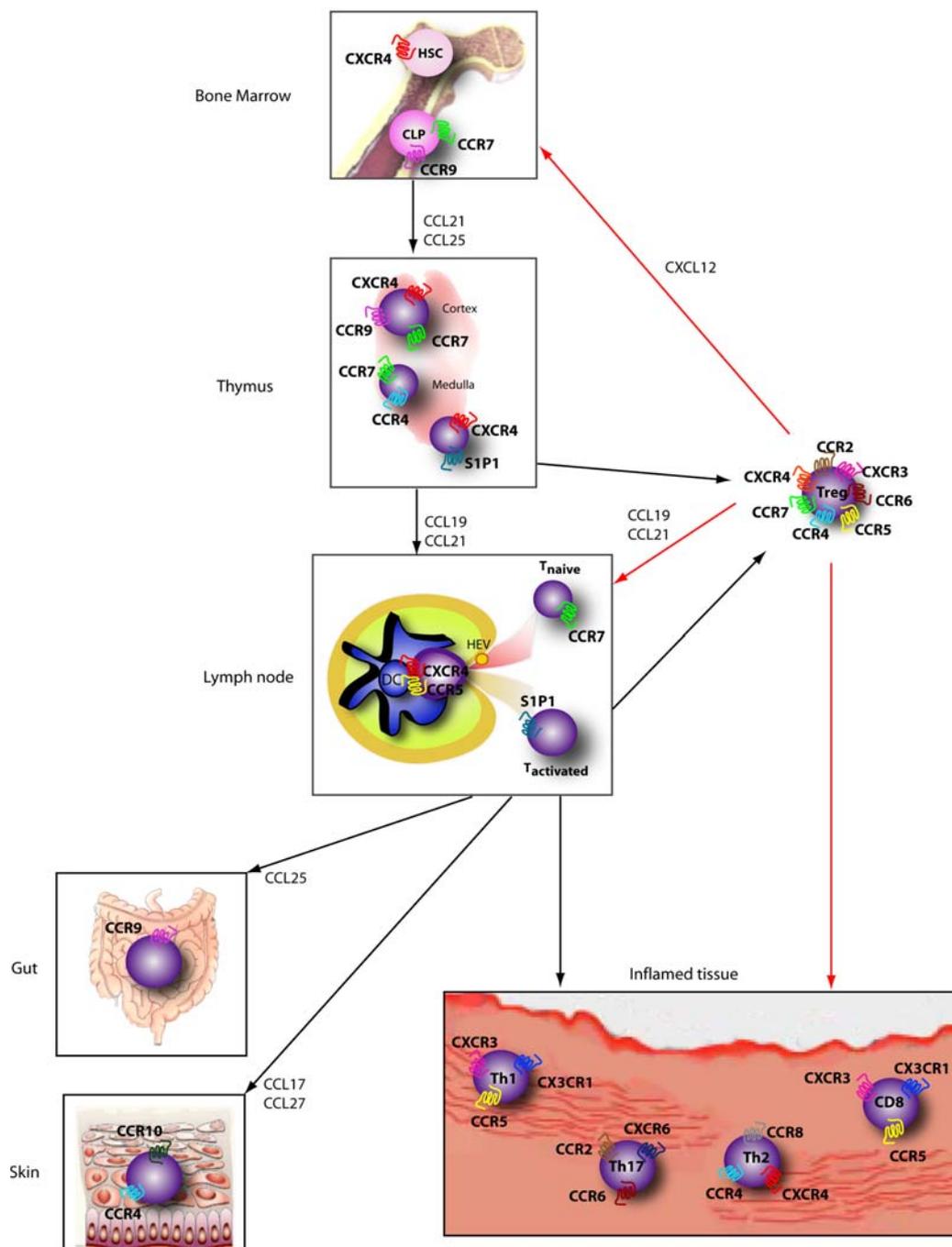


Figura 8. Una visione semplificata dei ruoli principali delle chemochine e dei loro recettori nella vita dei linfociti T. CLP, progenitori linfoidi comuni; HSC, cellule staminali umane. Spiegazioni nel testo.

Le chemochine modulano l'espressione delle citochine che polarizzano le cellule T (Boring *et al.*, 1997; Braun *et al.*, 2000; Gu *et al.*, 2000; Zou *et al.*, 2000); inoltre le chemochine che attraggono le cellule Th1 sono indotte dall'IFN- γ e soppresse dell'IL-4, che invece induce le chemochine che attraggono preferenzialmente le cellule Th2. Infine le chemochine stimolano l'espressione selettiva di altri recettori chemochinici e dei loro ligandi nei monociti, modulando e amplificando così il reclutamento leucocitario (Locati *et al.*, 2002).

Le cellule T migrano nei tessuti periferici con una ricircolazione tessuto-specifica (cutanea tramite CCR4 e CCR10, o intestinale tramite CCR9) o arrivano nelle sedi di processi patologici attratte dalle chemochine prodotte dalle cellule dell'infiammazione o dalle cellule danneggiate (Bono *et al.*, 2007).

Le cellule Treg possono esprimere una varietà di recettori chemochinici, per cui possono essere co-reclutate con le cellule effettrici nei tessuti infiammati per regolare *in situ* la risposta immune (Siegmund *et al.*, 2005; Wei *et al.*, 2006). Esse possono anche ricircolare ai linfonodi o al midollo osseo grazie a CCR7 (Lim *et al.*, 2004) o a CXCR4 (Zou *et al.*, 2004) rispettivamente.

9.2 I recettori chemochinici

La versatilità funzionale che caratterizza il sistema delle chemochine è conseguenza della molteplicità di vie di trasduzione del segnale indotte dai recettori chemochinici.

I recettori chemochinici sono recettori accoppiati a proteine G eterotromeriche (GPCR), costituiti da una singola catena polipeptidica di circa 40 kDa e lunga 340-370 aminoacidi, che forma sette eliche transmembrana, con un domino N-terminale extracellulare che lega la chemochina e uno C-terminale citoplasmatico coinvolto nella trasduzione del segnale e nell'internalizzazione del recettore (Murphy, 1994); in seguito all'interazione col ligando possono attivare cascate di *signaling* che controllano la polarizzazione cellulare, la migrazione e l'espressione genica (Viola *et al.*, 2006).

Le proteine G sono eterotrimeri α , β , γ (di rispettivamente 36-52, 35-36 e 8-10 kDa) in cui le subunità $\beta\gamma$ costituiscono unità funzionali e la subunità α lega nucleotidi guaninici, essendo attiva quando lega GTP. Le subunità α , di cui sono noti 23 sottotipi, sono classificate in quattro gruppi (α_s , α_i , α_q and $\alpha_{12/13}$) e su tale base sono classificate le proteine G.

Nello stato inattivo la proteina G non è associata con il recettore e ha una molecola di GDP legata a livello della subunità α . Il legame della chemochina induce un cambiamento conformazionale della struttura terziaria del recettore che gli permette di legare a livello intracellulare e attivare la proteina G, promuovendo la sostituzione del GDP con il GTP nella subunità α . La presenza del GTP regola la modificazione della conformazione della subunità α e la sua dissociazione dal dimero $\beta\gamma$, che agisce come un'unità funzionale e non presenta differenze strutturali con il dimero all'interno della proteina G intatta. Sono state descritte fino ad ora 5 sottotipi di subunità β e 12 di γ , ubiquitariamente espressi, ma non tutti i potenziali dimeri possono appaiarsi. Questa organizzazione delle subunità le rende capaci di attivare vie

differenti di *signaling*. Il legame della subunità α al suo ligando innesca la sua lenta attività GTPasica che idrolizza il GTP a GDP, permettendo alle tre subunità di riassociarsi. Il *signaling* è pertanto controllato da tre interdipendenti cicli di associazione-dissociazione: recettore- proteina G, nucleotidi guaninici-G α e G α -G $\beta\gamma$.

Sebbene globalmente simili ad altri GPCR, i recettori chemochinici sono caratterizzati da un motivo unico nel *loop* del secondo dominio intracellulare, ovvero la sequenza aminoacidica DRYLAIV. La fosforilazione di alcuni residui altamente conservati di Tyr, tra cui quella presente in questo motivo, rappresenta l'evento di inizio della cascata di trasduzione del segnale (Rodriguez-Frade *et al.*, 2001).

I recettori chemochinici possono interagire con diverse proteine G, appartenenti a differenti famiglie α , e trasmettere il segnale a distinte vie intracellulari, determinando distinti effetti biologici (Figura 9). Classicamente, nella funzione chemotattica, il recettore segnala tramite G α_i : in seguito alla percezione del gradiente chemotattico, ossia all'interazione della chemochine col suo recettore, la proteina G $_i$ si associa fisicamente al recettore, portando all'inibizione dell'adenilato ciclasi, alla mobilitazione del calcio intracellulare e alla polimerizzazione actinica nel polo anteriore della cellula (Goldman *et al.*, 1985; Shefcyk *et al.*, 1985), mentre a livello del polo posteriore della cellula si ha l'attivazione di G α_{12-13} con contrazione del sistema actina-miosina (Xu *et al.*, 2003). La conferma del *signaling* tramite G α_i è data dal fatto che le risposte chemotattiche alle chemochine sono inibite dalla tossina della pertosse, che introduce una modificazione covalente (ADP-ribosilazione) a livello delle subunità α_i e ne inibisce l'accoppiamento al recettore. Nonostante ciò, in alcune circostanze la tossina della pertosse non blocca le risposte indotte dalle chemochine, per il fatto che il recettore si associa a proteine G diverse dalla G $_i$, come G $_{q/11}$ o G $_{16}$ (Mellado *et al.*, 2001a). Alcuni studi infatti hanno dimostrato che l'accoppiamento del recettore con G $\alpha_{q/11}$ porta ad un'aumentata adesione cellulare e all'attivazione (Mellado *et al.*, 2001b; Molon *et al.*, 2005). Finora non è chiaro se i recettori chemochinici possano associarsi e segnalare tramite G α_s .

Un punto chiave è capire cosa specifichi l'accoppiamento con una specifica proteina G da parte di un recettore. Una possibilità è che i GPCR possano adottare varie conformazioni, esponendo quindi diversi residui responsabili per l'interazione con il ligando e per l'accoppiamento con la proteina G (Kenakin, 2003). Secondo questo modello, legando differenti sotto-stati del recettore, differenti agonisti possono dirigere il *signaling* del recettore a differenti proteine G.

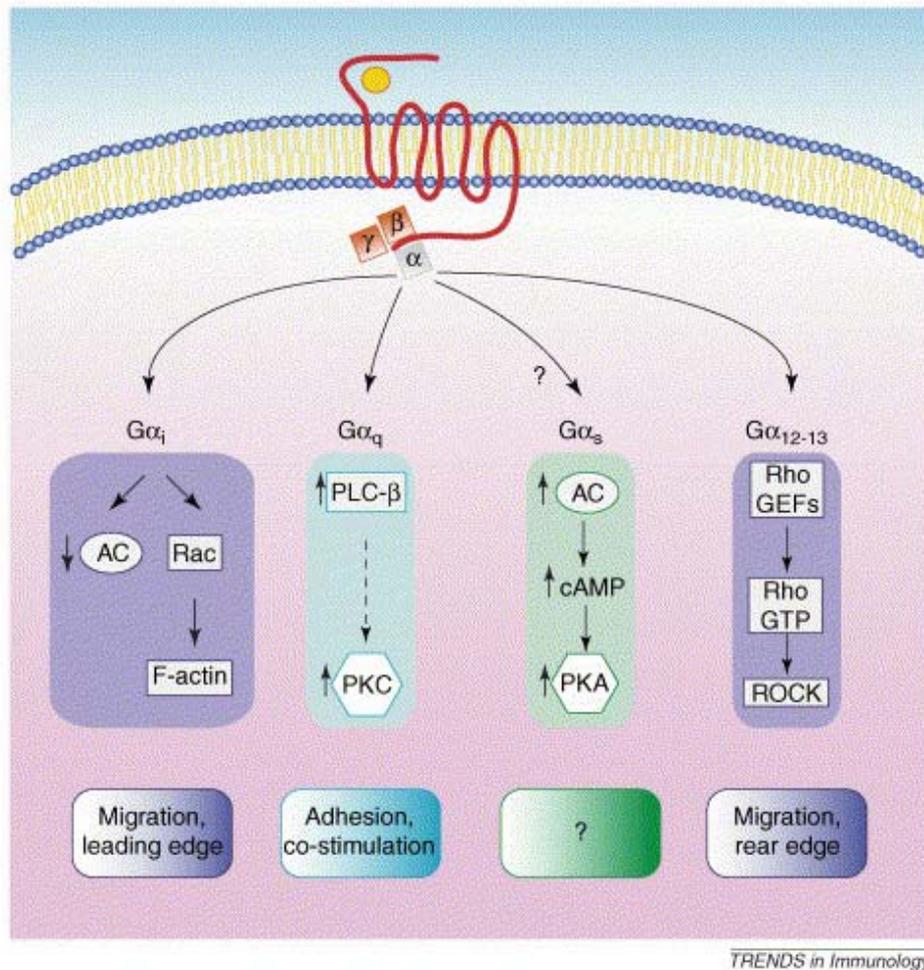


Figura 9. Vie di segnale multiple indotte dai GPCR. Il recettore chemochinico (rosso) può segnalare attraverso diverse famiglie di proteine $G\alpha$, risultando in distinte vie di *signaling* e distinti effetti biologici. L'accoppiamento con $G\alpha_i$, attraverso Rac, regola la percezione del gradiente e la polimerizzazione actinica al polo anteriore di una cellula in migrazione (Goldman *et al.*, 1985; Shefcyk *et al.*, 1985). Inoltre, il *signaling* di $G\alpha_i$ risulta nell'inibizione dell'adenilato ciclasi (AC), ma non è noto se questo *signaling* sia rilevante per la migrazione. Dall'altro lato della cellula, il *signaling* del polo posteriore dipende dall'attivazione indotta dalle chemochine di $G\alpha_{12-13}$, che segnala tramite la via che comprende i GEFs per Rho e la Rho chinasi ROCK, fino alla contrazione actina-miosina (Xu *et al.*, 2003). Alcuni studi hanno indicato che l'accoppiamento del recettore a $G\alpha_{q11}$, tramite l'attivazione della PLC β e della PKC, risulta in un'aumentata adesione cellulare e nella costimolazione linfocitaria (Mellado *et al.*, 2001b; Molon *et al.*, 2005). Non è chiaro se il recettore chemochinico possa associarsi e segnalare attraverso $G\alpha_s$, stimolando l'attività della AC, con aumento dell'AMP ciclico (cAMP) e attivazione della PKA (Viola *et al.*, 2006).

Un altro fattore che può influenzare la conformazione dei recettori chemotattici e il loro *signaling* è la dimerizzazione. I GPCR esistono e funzionano come omo- o etero-dimeri (Bulenger *et al.*, 2005; Prinster *et al.*, 2005). Mentre l'eterodimerizzazione è necessaria per la funzione di alcuni GPCR, diversi studi hanno dimostrato che recettori che funzionano perfettamente come omodimeri, possono anche formare eterodimeri con altri GPCR. In questi casi è stato visto che questa eterodimerizzazione non obbligatoria causa importanti cambiamenti fenotipici del recettore, compresi marcate alterazioni nella farmacologia del

recettore, cambiamenti nell'accoppiamento con le proteine G e nel *signaling*, nonché modificazioni nella regolazione e nel traffico cellulare del recettore (Kroeger et al., 2003).

È noto anche che l'accoppiamento con le proteine G può essere determinato dall'ambiente lipidico attorno al recettore. Diverse proteine G possono essere destinate a diversi microdomini di membrana tramite acilazione della subunità α (Oh & Schnitzer, 2001), e la localizzazione nei *rafts* di membrana può quindi modulare la specificità dei GPCR e l'accoppiamento con $G\alpha$ (Rimoldi et al., 2003).

9.3 Le chemochine e la SI

Benché il contributo di molecole costimolatorie alla formazione della SI sia ben noto da tempo, solo di recente i recettori chemochinici sono stati descritti come nuove molecole costimolatorie delle cellule T (Molon et al., 2005).

Durante il processo chemotattico, nelle cellule T l'attivazione dei recettori chemochinici promuove la riorganizzazione dei componenti intracellulari e associati alla membrane, determinando così un polo anteriore (*leading edge*) e un polo posteriore (uropodo o *rear edge* o *trailing edge*) (Ward, 2004); questo processo di stabile asimmetria morfologico-funzionale è definito polarizzazione e aumenta la sensibilità alla chemochine a livello del polo anteriore della cellula T dato che in tale sede si accumula il recettore chemochinico (Gomez-Mouton et al., 2004), mentre all'uropodo si accumulano molecole di adesione cellulare come LFA-1, CD43 e CD44 (del Pozo et al., 1998). Tale polarizzazione aumenta la sensibilità anche alla stimolazione del TCR al polo anteriore (Negulescu et al., 1996), suggerendo che la compartimentalizzazione di membrana indotta dalla chemochine possa aiutare la ricognizione antigenica. Inoltre, il *signaling* del recettore chemochinico regola l'adesività locale della cellula T attraverso l'attivazione di LFA-1 (Constantin et al., 2000; Shamri et al., 2005). Quindi i recettori chemochinici potrebbero favorire l'organizzazione della SI, piuttosto che avere solo l'effetto di distrarre la cellula T attirandola verso altre sorgenti di chemochina.

Inoltre le chemochine possono costimolare l'attivazione delle cellule T, incrementando la proliferazione e la produzione di citochine (Taub et al., 1996; Karpus et al., 1997; Molon et al., 2005). In prossimità dell'APC, la cellula T emette protrusioni ricche dei recettori chemotattici CCR5 e CXCR4 che si interdigitano con la superficie dell'APC (Molon et al., 2005), ricordando la concentrazione di recettori chemochinici al polo anteriore di una cellula in migrazione (Gomez-Mouton et al., 2004). Questa interazione culmina nella formazione di una SI stabile, dove la maggior parte del recettore chemochinico è reclutata stabilmente,

tramite un meccanismo che richiede la secrezione della chemochina da parte dell'APC. La produzione di chemochine da parte dell'APC, l'accumulo e l'intrappolamento del recettore alla SI favoriscono l'attivazione linfocitaria perché rinforzano l'attrazione tra la cellula T e il suo *partner* (evitando la distrazione della cellula T da parte di altre fonti di chemochine, a cui la responsività della cellula T è ridotta), risultano in una prolungata interazione cellulare e trasmettono un segnale costimolatorio per la proliferazione e la produzione di citochine (Molon *et al.*, 2005).

Infatti l'attivazione del TCR porta a un importante cambiamento nel *signaling* dei recettori chemochinici che alla SI sono accoppiati preferenzialmente a $G_{q/11}$ invece che a G_i (Molon *et al.*, 2005), inducendo quindi adesione cellulare piuttosto che chemotassi (Mellado *et al.*, 2001a; Rodriguez-Frade *et al.*, 2001), o aumentando l'affinità di LFA-1 (Tybulewicz, 2002; Shamri *et al.*, 2005) o prevalendo sul segnale chemotattico mediato da G_i . Inoltre, il *signaling* attraverso G_q induce la traslocazione di NFAT al nucleo (Boss *et al.*, 1996), fornendo un altro meccanismo per cui l'ingaggio del recettore chemochinico alla SI possa aumentare l'attivazione linfocitaria.

Un aspetto non ancora chiarito è se altre chemochine possano costimolare l'attivazione delle cellule T quando secrete dalle APC.

Benchè il meccanismo molecolare alla base della competizione o della cooperazione tra TCR e chemochine sia ancora ignoto e non sia chiaro quanto la costimolazione da chemochine sia un meccanismo generale, si può attribuire un duplice ruolo alle chemochine e ai loro recettori nell'attivazione delle cellule T (Viola *et al.*, 2006) (Figura 10). Da un lato, la presenza di chemochine nel linfonodo in cui il linfocita sta cercando il suo *partner* ideale può agire come una forza attrattiva e distraente, prevenire la formazione di una coppia stabile e determinare il comportamento esitante tra più *partner* da parte della cellula T, perché il recettore chemochinico accoppiato, secondo la funzione classica, a G_i può competere col TCR (Peacock & Jirik, 1999). Dall'altro lato, la secrezione di CXCL12 e/o CCL5 da parte dell'APC può prima attrarre la cellula T e poi favorire e stabilizzare la SI, in quanto i recettori chemochinici, intrappolati alla SI, diventano insensibili a ogni altra possibile chemodistrazione, e, accoppiati a G_q , collaborano col TCR e facilitano l'attivazione linfocitaria rafforzando l'adesione T-APC e trasmettendo segnali costimolatori.

Se l'ingaggio del CXCR4 e del CCR5 ha un effetto a favore della stabilizzazione della SI e dell'attivazione linfocitaria, l'ingaggio del CXCR3 e del CCR7 può bloccare entrambi i processi (Bromley *et al.*, 2000). Quindi alcune chemochine, tra cui i ligandi di CXCR4 e

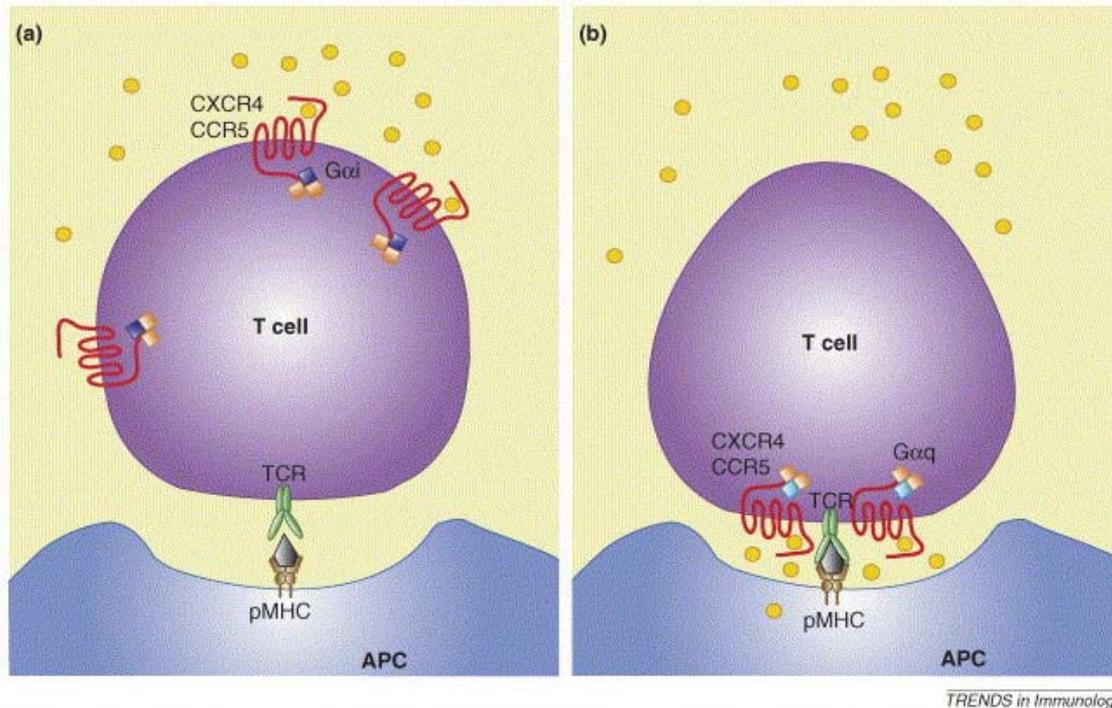


Figura 10. Il duplice ruolo delle chemochine nell'attivazione dei linfociti T. **a)** secondo la visione classica dei recettori chemochinici, le chemochine nel linfonodo attraggono le cellule T distraendole dall'APC con cui stanno interagendo e causandone un comportamento esitante tra varie APC. **b)** La distrazione indotta dalle chemochine viene evitata se l'APC secerne le chemochine verso la cellula T, intrappolando il recettore chemochinico alla SI. In queste condizioni il recettore si associa a G_q e non solo non risponde più ad altre sorgenti chemotattiche, ma anche costimola l'attivazione linfocitaria (Viola *et al.*, 2006).

CCR5 possono essere definite subordinate al *signaling* del TCR, in quando incapaci di invertirne il segnale di *STOP* e anzi collaborano con esso, mentre altre chemochine, come i ligandi di CXCR3 e CCR7, annullano il segnale del TCR e hanno un potenziale immunosoppressivo, per cui sono considerate dominanti (Bromley *et al.*, 2000). Inoltre DC immature secernono e rispondono a un profilo di chemochine che promuove la migrazione cellulare e impedisce l'assemblaggio della SI, mentre DC mature secernono e rispondono a un profilo di chemochine che riduce la migrazione cellulare e promuove contatti cellulari duraturi portando all'assemblaggio della SI e all'attivazione (Sozzani *et al.*, 1998; Benvenuti *et al.*, 2004; Kaiser *et al.*, 2005).

Esiste quindi un ambiente chemochinico ottimale per le dinamiche e le interazioni cellulari, ed è verosimile che l'effetto complessivo delle chemochine sulla formazione della SI sia il risultato del bilancio della quantità e della qualità delle chemochine secrete dalle APC e presenti nel microambiente.

10 Rimodellamento citoscheletrico e attivazione linfocitaria

Il processo di redistribuzione e segregazione di molecole che si verifica nella formazione della SI può avvenire per meccanismo passivo, cioè per le interazioni determinate dalle proprietà intrinseche delle molecole stesse (come il legame col loro ligando, le dimensioni fisiche e la ripartizione nei *rafts* di membrana), e per meccanismo attivo, cioè per azione del citoscheletro actinico (Anton van der Merwe *et al.*, 2000).

Il citoscheletro actinico svolge infatti due ruoli critici nell'attivazione delle cellule T: da una parte permette alle molecole e ai *rafts* movimenti sulla superficie cellulare dell'ordine di micrometri, dall'altra costituisce un'impalcatura per i componenti della trasduzione del segnale alla SI, dove stabilizza le interazioni molecolari (Dustin & Cooper, 2000).

L'attivazione del TCR porta al rimodellamento citoscheletrico come indicato dall'accumulo di filamenti actinici e dalla formazione di lamellipodi e arricciamenti di membrana a livello della SI; inoltre l'ingaggio del TCR causa il riorientamento dei centri che organizzano i microtubuli, necessario per la secrezione di citochine (Sechi & Wehland, 2004). Anche la costimolazione comporta riarrangiamenti del citoscheletro actinico che accumulano *rafts* e recettori alla SI (Wulfing & Davis, 1998; Viola *et al.*, 1999; Rozelle *et al.*, 2000; Villalba *et al.*, 2001; Dupre *et al.*, 2002). L'inibizione della polimerizzazione actinica abolisce il *signaling* delle cellule T, il *clustering* del TCR e i flussi di calcio.

Che il reclutamento dei *rafts* dipenda dalla riorganizzazione dell'actina è dimostrato sia da studi su Vav-1 (Wulfing & Davis, 1998; Villalba *et al.*, 2001), che dalla sindrome di Wiskott-Aldrich, nella quale la mancanza di WASp inficia l'attivazione delle cellule T per il mancato reclutamento dei *rafts* alla SI (Dupre *et al.*, 2002).

I filamenti actinici sono costituiti da monomeri di actina, la proteina più presente nella cellula, che è in grado di legare e idrolizzare l'ATP e ha struttura polare: un'estremità a punta a crescita meno veloce e un'estremità a spina a crescita più rapida; essi sono estremamente flessibili, possono essere allungati o accorciati da entrambe le estremità, in un sistema in equilibrio con i monomeri di actina e regolato da un'ampia serie di proteine. Le estremità a spina sono orientate nella cellula verso la membrana plasmatica, per cui la loro rapida crescita porta a protrusioni della membrana e quindi alla motilità della cellula (Millard *et al.*, 2004).

La polimerizzazione con allungamento avviene principalmente a partire da estremità a spina libere, che vengono create tramite:

1. rimozione, mediata dai polifosfoinositidi, del cappuccio proteico (ad esempio gelsolina) che stabilizza l'estremità del filamento preservandola sia dall'allungamento che dall'accorciamento;
2. taglio del filamento per opera di proteine come la gelsolina e la cofilina;
3. nucleazione *de novo*, grazie a proteine che accelerino e stabilizzino la polimerizzazione dei monomeri di actina.

La depolimerizzazione, altrettanto importante della polimerizzazione per orientare il citoscheletro, dipende in primo luogo dalla cofilina, la cui attivazione, indotta dal CD28 tramite PI3K, avviene per defosforilazione. La dissociazione del fosfato dal complesso ATP-actina marca i filamenti vecchi e favorisce il legame della cofilina e quindi la depolarizzazione o il taglio del filamento. Il monomero ADP-actina rilasciato viene legato dalla profilina che favorisce lo scambio nucleotidico ripristinando l'ATP-actina, rendendola di nuovo disponibile per la nucleazione, che però avviene solo in presenza di adeguati stimoli e proteine, e non spontaneamente. Con la profilina, per il legame con l'ATP-actina, compete la timosina, una proteina che sequestra l'actina in stato inattivo, mantenendo così un *pool* di actina globulare disponibile.

Per iniziare la polimerizzazione actinica un ruolo importante è svolto da WASp (la proteina della Sindrome di Wiskott-Aldrich) e dal complesso Arp2/3 (proteine correlate all'actina 2/3). L'associazione del complesso Arp2/3 con l'actina, legata alla profilina e ad ATP, porta alla nucleazione, cioè alla creazione di nuovi filamenti, a partire dell'estremità a spina, superando quello che è il passaggio limitante della polimerizzazione. Il processo continua fino alla sua terminazione ad opera di proteine-cappuccio (Samstag *et al.*, 2003).

Nel processo di nucleazione, in seguito al contatto di alcune delle sette subunità del complesso Arp2/3 con il lato di un filamento preesistente, le proteine Arp2 e Arp3 (che sono ripiegate in modo simile all'actina) diventano la prima subunità del filamento nascente, che quindi cresce come un ramo angolato di 70°. Anche Arp2/3 lega l'ATP, come l'actina, ma con minore affinità: la forma senza ATP è inattiva, poiché l'idrolisi dell'ATP è essenziale per la nucleazione di nuovi filamenti. L'ATP, la presenza di un filamento actinico preesistente e WASp determinano un cambiamento conformazionale di Arp2/3 che gli permette di formare un'elica actinica e quindi partecipare alla polimerizzazione (Millard *et al.*, 2004).

Le proteine coinvolte nella dinamica citoscheletrica variano a seconda che la cellula riceva 1 o 2 stimoli (Figura 11): l'attivazione del complesso TCR/CD3 coinvolge WASp, Arp2/3 e la profilina (per la polimerizzazione) e ingaggia anche proteine leganti l'actina che ancorano tra

loro il citoscheletro, la membrana e le proteine dello SMAC; quando si aggiunge il secondo stimolo (CD28) viene reclutata anche la cofilina (Samstag *et al.*, 2003).

Gli elementi della cascata di trasduzione del segnale che collegano i recettori di membrana con molecole effettrici come Arp2/3 sono molteplici e condivisi dalle vie a valle del TCR e del CD28, integrando così i due segnali.

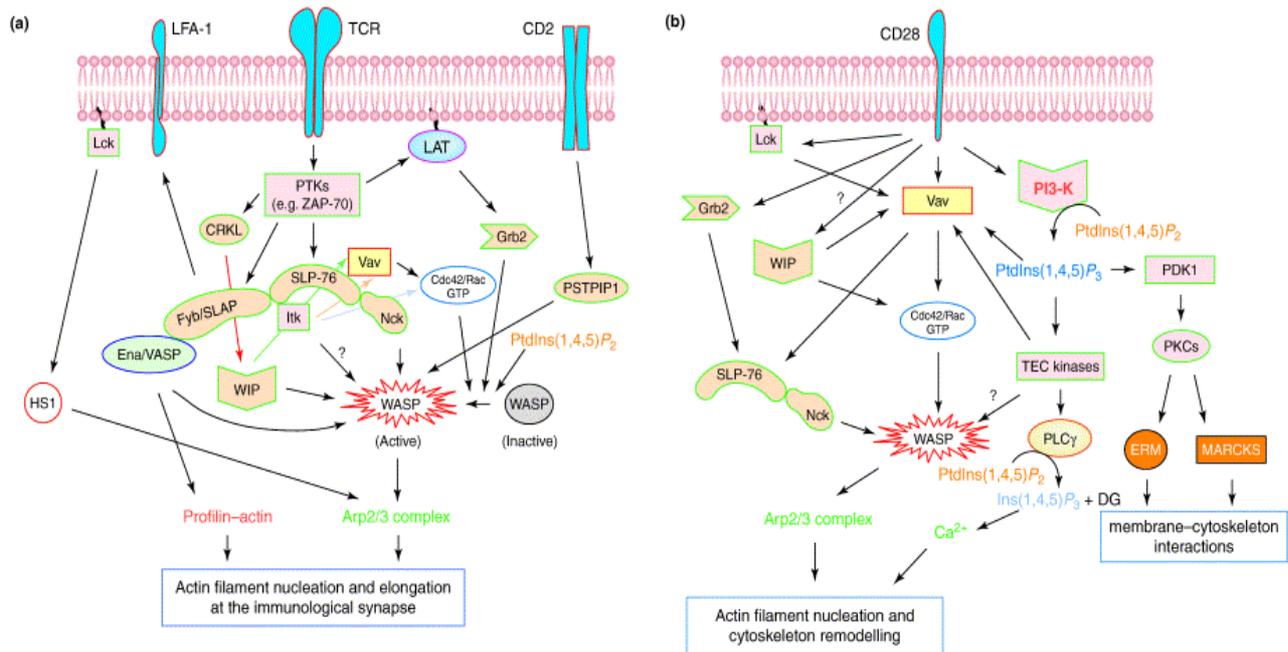


Figura 11. Regolazione delle dinamiche citoscheletriche da parte del signaling del TCR e del CD28. **a)** Il TCR può guidare la nucleazione actinica reclutando e attivando diverse proteine chinasiche e adattatrici. Tra esse WASp può essere reclutato da Nck, da Vav, dal complesso WIP (proteina che interagisce con WASp)/ZAP-70/CRKL, o dal CD2 tramite PSTPIP1 (proteina 1 che interagisce con la prolin-serin-treonin fosfatasi); WASp è inoltre regolata da PIP2, Grb2 e Itk (dettagli nel testo). La nucleazione actinica può essere mediata anche da HS1 (proteina specifica ematopoietica 1) e dal complesso Fyb/SLAP-130-Ena/VASP (fosfoproteina stimolata dal vasodilatatore), tramite reclutamento della profilina. Fyb/SLAP-130 è anche coinvolto nella regolazione della funzione di LFA-1. **b)** Il CD28 regola il rimodellamento citoscheletrico tramite Vav, Cdc42, Rac e WASp, oltre che tramite PI3K e Grb-2 (dettagli nel testo). La funzione di Vav e l'attività di Rac e Cdc42 sono influenzate anche da WIP e Lck. Inoltre il CD28 regola l'associazione tra citoscheletro e membrana tramite la via di signaling che coinvolge PDK1, PKC, le proteine ERM (ezrina, radixina e moesina) e MARCKS (substrato della chinasi C ricco di alanine miristoilato) (Sechi & Wehland, 2004).

Diversi intermedi della trasduzione del segnale concorrono ad attivare WASp:

1. PIP2, presente in membrana nei *rafts* di membrana in concentrazione dipendente dallo stato di attivazione della cellula;
2. Grb-2, ligando di CD28, SLP-76 e LAT;
3. le piccole GTPasi della famiglia Rho/Rac, come Cdc42 e Rac;
4. infine la chinasi Itk può contribuire a regolare l'attività di Wasp tramite fosforilazione (Sechi & Wehland, 2004).

È probabile che i regolatori di WASp agiscano additivamente o sinergicamente: per esempio Cdc42 da sola non è in grado di attivare WASp, ma aumenta l'attivazione mediata dal PIP2 (Thrasher, 2002).

Per la propria azione WASp viene reclutata alla SI grazie ad un sistema di interazioni proteiche: tramite SLP-76, WASp viene complessata con LAT, adattatore transmembrana reclutato nella fase precoce della trasduzione del segnale; al reclutamento di WASp partecipa anche Nck che interagisce sia con WASp (Rivero-Lezcano *et al.*, 1995) che con CD3ε (Gil *et al.*, 2002), permettendo un collegamento tra queste due proteine a livello della membrana in prossimità di PIP2.

La piattaforma per la polimerizzazione actinica legata alla membrana è rappresentata dai *rafts*, attraverso la sintesi *in situ* di PIP₂ e la regolazione dell'attività tirosin-chinasica, entrambe in grado di attivare WASp e quindi Arp2/3 (Rozelle *et al.*, 2000).

La famiglia delle Rho GTPasi (membri della famiglia Ras), di cui fanno parte Cdc42, Rac1, Rac2, RhoA e RhoB, comprende più di 20 membri che regolano molti aspetti delle funzioni cellulari, come la progressione del ciclo cellulare, il trasporto tramite vescicole e i riarrangiamenti citoscheletrici (Bar-Sagi & Hall, 2000; Ridley, 2001). In particolare, Cdc42 induce la formazione di protrusioni costituite da filamenti di actina chiamati filopodi in linee cellulari di fibroblasti e monociti; inoltre è necessario per la polarizzazione della cellula T verso l'APC (Stowers *et al.*, 1995). Cdc42 fornisce un segnale polarizzato che può inoltre localizzare l'attività di altre GTPasi correlate, come Rac (Nobes & Hall, 1995).

Le piccole proteine G possono legare alternativamente una molecola di GDP (conformazione inattiva) oppure di GTP (conformazione attiva); l'attivazione è favorita dai GEF, mentre è spenta tramite idrolisi del GTP, sia da un'attività GTPasica intrinseca che da una estrinseca da parte di proteine attivanti l'attività GTPasica (GAP). Gli inibitori della dissociazione delle guanine (GDI) legano preferenzialmente la proteina associata a GDP e prevengono il rilascio del nucleotide, mantenendo le piccole proteine G in uno stato inattivo (Thrasher, 2002). Molte proteine Rho sono prenilate su cisterne nel dominio carbossi-terminale, modificazione necessaria per l'interazione con la membrana plasmatica.

L'attivazione di Rac e Cdc42 a GTP-Rac e GTP-Cdc42 è mediata da Vav-1, un GEF per la famiglia delle piccole proteine G Rho/Rac (Khosravi-Far *et al.*, 1994). Vav-1 a sua volta è attivata da Fyn (Michel *et al.*, 1998) per fosforilazione in seguito al segnale del TCR (Gulbins *et al.*, 1993) e soprattutto del CD28 (Tuosto *et al.*, 1996; Michel *et al.*, 1998), con il quale inoltre interagisce direttamente. Vav-1 è necessaria per l'organizzazione del citoscheletro nei

linfociti T dopo ingaggio del TCR, infatti in cellule Vav-1 negative mancano il *capping* dell'actina e il *clustering* del TCR (Holsinger *et al.*, 1998) e Cdc42-GTP non viene reclutato alla SI, difetto revertito dalla reintroduzione di Vav-1 (Zeng *et al.*, 2003). In particolare Vav-1 regola i riarrangiamenti citoscheletrici che sono necessari all'accumulo di molecole del segnale all'interfaccia tra cellula T e APC (Wulfig *et al.*, 2000).

10.1 La filamina

La filamina (FLN) è stata la prima proteina non muscolare studiata capace di legare l'actina. È un dimero le cui due catene polipeptidiche pesano 280 kDa ciascuna; consiste in un dominio N-terminale che lega l'actina (ABD), di 24 domini ripetuti *rod-like*, interrotti da due anelli di 30 amminoacidi ciascuno che le conferiscono flessibilità (H1 e H2), e un dominio C-terminale responsabile della dimerizzazione (Stossel *et al.*, 2001) (Figura 12).

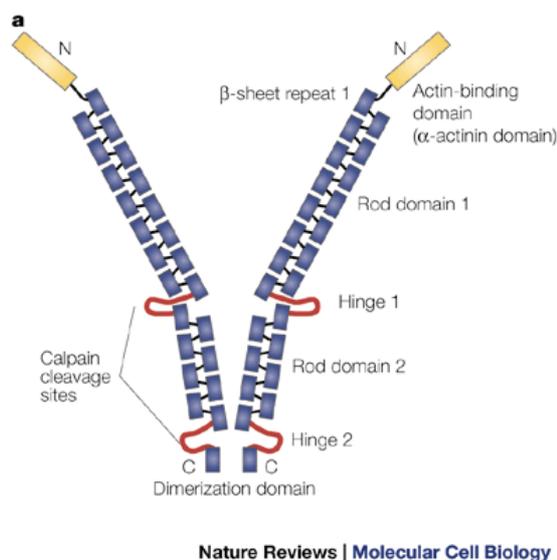


Figura 12. Struttura della FLN umana (Stossel *et al.*, 2001).

Il dominio ABD è composto da due domini omologhi alla calponina (CHD1 e CHD2) e assomiglia ai domini di altre proteine che legano l'actina, come la β -spectrina, l' α -actinina, la calponina e la distrofina, e permette alla FLN di legarsi ai filamenti di actina; i domini *rod-like* sono costituiti da foglietti β anti-paralleli che assomigliano ai domini delle immunoglobuline, e sembrano funzionare da interfaccia per le interazioni proteina-proteina; infatti la FLN, oltre l'actina, lega più di 30 diverse proteine (Feng & Walsh, 2004). Poiché molte delle proteine a cui si associa la FLN sono recettori di membrana, è stato proposto che la FLN funzioni come una sorta di impalcatura che connette e coordina vari processi cellulari alle dinamiche dell'actina citoscheletrica.

Nei mammiferi sono presenti tre isoforme di FLN: a, b e c (van der Flier & Sonnenberg, 2001), con omologia di sequenza del 70%, ad eccezione dei due anelli flessibili H1 e H2 che hanno solo il 45% di omologia. Inoltre la FLNc contiene 81 amminoacidi nella ripetizione 20 che non sono presenti nelle isoforme a e b. FLNa e FLNb sono espresse in modo ubiquitario, anche se i livelli di espressione dell'isoforma B sono diversi in ogni tessuto e pressoché nulli nei linfociti T (Calderwood *et al.*, 2001). La FLNc invece si trova solo nei muscoli scheletrico e cardiaco.

La FLN influenza le proprietà reologiche del citoscheletro, promuovendo la formazione di reti actiniche, in particolare nelle regioni corticali delle cellule, che conferiscono al citosol una consistenza simile a gel. I dimeri di FLN possono organizzare l'actina in reti ortogonali (cross-linkando i filamenti) oppure in fasci paralleli: questi due diversi tipi di organizzazione sono dovuti al rapporto tra le molecole di actina e quelle di FLN e alla flessibilità molecolare dell'isoforma di FLN; un alto rapporto FLN/actina promuove la formazione di fasci paralleli, mentre il contrario promuove la formazione di reti ortogonali (van der Flier & Sonnenberg, 2001); la FLNc che manca delle regioni ad anello H1 e H2 risulta meno flessibile e forma fibre actiniche più rigide.

Tra le molecole che legano la FLN ci sono anche recettori di membrana. La connessione che si stabilisce tra questi e l'actina, attraverso molecole adattatrici come la FLN, ancorando i recettori all'actina corticale o alle fibre da stress, conferisce stabilità meccanica alla membrana cellulare, oltre a mantenere le connessioni tra cellule e tra cellula e matrice. Le FLN, collegando tra loro recettori di superficie, tipo le β -integrine (Loo *et al.*, 1998; Nurmi *et al.*, 2006), la rete di actina e le componenti del segnale intracellulare, potrebbero costituire l'impalcatura di complessi di *signaling* e facilitare l'attivazione dei processi cellulari locali, in particolare quelli che coinvolgono la polimerizzazione dell'actina (Stossel *et al.*, 2001). La regolazione delle interazioni tra FLN, actina e proteine transmembrana non è conosciuta. È stato però riportato che l'occupazione di un recettore da parte del suo ligando influenza l'associazione della FLN con i recettori transmembrana: ad esempio, quando il recettore Fc γ RI lega una immunoglobulina, diminuisce la sua interazione con la FLNa (Ohta *et al.*, 1991). Questo può far ipotizzare che il recettore non occupato sia connesso al citoscheletro corticale actinico tramite la FLN, quindi l'interazione col suo ligando lo libererebbe dall'ancora e questo determinerebbe la riorganizzazione del citoscheletro.

È stato dimostrato che la FLNa lega alcuni membri della famiglia delle GTPasi Rho, oltre che qualcuno dei cofattori che sono implicati nella regolazione dell'assemblaggio dell'actina

(Ohta *et al.*, 1999; Bishop & Hall, 2000). Ral lega la FLNa in modo GTP-dipendente, mentre Cdc42, RhoA e Rac1 costitutivamente (Ohta *et al.*, 1999). È probabile che interagendo direttamente con il *signaling* delle proteine Rho, le FLN possano organizzare i filamenti di actina in configurazioni tridimensionali utili alla cellula (Stossel *et al.*, 2001).

Nonostante le molte evidenze sperimentali che legano la FLN al *signaling* cellulare, non è stato ancora chiarito come il segnale abbia effetto sulla FLN. Parecchie serin-treonin chinasi fosforilano la FLN, come ad esempio la PKA e la PKC. Anche Lck fosforila la FLN (Pal Sharma & Goldmann, 2004), forse per regolare la sua associazione con i recettori di superficie oppure con i lipidi di membrana o per regolare il legame crociato dei filamenti di actina in reti (Goldmann, 2001); il legame con Lck potrebbe quindi avere effetti sul posizionamento della chinasi in specifiche aree del foglietto intracitoplasmatico della membrana.

Scopo dello studio

La SI rappresenta un ambiente selettivo e protetto generatosi dal contatto tra un linfocita T ed una cellula che presenta sulla sua membrana complessi MHC-peptidi in grado di legare il TCR. Uno dei ruoli più importanti di questa prolungata interazione tra linfociti T e APC è di permettere al linfocita di riconoscere non solo l'antigene, ma anche il contesto in cui esso viene presentato. Le infezioni e i processi infiammatori ad esse associati inducono infatti un cambiamento nelle cellule che si manifesta con un *pattern* di recettori di membrana diverso. Spesso il compito di queste molecole indotte dall'ambiente infiammatorio è quello di co-stimolare i linfociti T, di inviare cioè dei segnali accessori a quelli inviati al TCR tramite i complessi peptide-MHC, che sono inoltre sempre poco espressi. La SI rappresenta quindi il luogo dove il linfocita T riceve ed integra i segnali provenienti dalla cellula *partner* al fine di poter "scegliere" tra la tolleranza e l'attivazione. Poiché questo è un evento fondamentale per il corretto funzionamento del sistema immunitario, è ovvio pensare che ci siano diverse strategie (forse ridondanti) per costimolare i linfociti T. Negli ultimi anni, anche grazie al lavoro svolto nel nostro laboratorio, si sono andati definendo nuovi meccanismi di costimolazione, diversi da quelli classici basati sull'interazione tra recettori di membrana, come ad esempio l'amplificazione del segnale mediata dai *rafts* di membrana e la costimolazione attraverso mediatori solubili quali le chemochine. Durante il mio progetto di dottorato, mi sono quindi occupata di definire i meccanismi molecolari alla base di queste nuove strategie di costimolazione nella SI.

Alcuni anni fa è stato proposto che i *rafts* di membrana possano confluire nella sinapsi immunologica e qui amplificare il segnale del TCR (Viola *et al.*, 1999; Viola, 2001). E' stato inoltre dimostrato che i due meccanismi di costimolazione basati sul CD28 e sui riarrangiamenti delle membrana plasmatica confluiscono in un unico processo: il CD28 è in grado di costimolare attraverso il reclutamento dei *rafts* alla SI, permettendo così l'assemblaggio del complesso di *signaling* in modo più completo e in un ambiente protetto (Viola *et al.*, 1999; Viola, 2001). Sebbene questi dati siano stati inizialmente ottenuti stimolando i linfociti T con anticorpi anti-CD3 e anti-CD28, quindi con una stimolazione non fisiologica, e evidenziando i *rafts* tramite l'interazione del GM1 con la tossina colerica, con il rischio di artefatti da legame crociato, essi sono stati successivamente verificati anche utilizzando marcatori fluorescenti dei *rafts* (Tavano *et al.*, 2004) e avvalendosi di un metodo

di stimolazione fisiologico, che quindi induce la formazione di una normale SI (Tavano *et al.*, 2004; Round *et al.*, 2005).

La verifica che il reclutamento dei *rafts* alla SI dipende dal CD28, confermando l'ipotesi che sia questo il fenomeno chiave attraverso cui il CD28 esplica la sua funzione, è stata accompagnata dalla definizione, per lo meno iniziale, della precisa via di trasduzione del segnale attivata dalla stimolazione del CD28: il dominio PxxPP del CD28, necessario per la costimolazione e la generazione di cellule T regolatrici (Holdorf *et al.*, 1999; Tai *et al.*, 2005), è necessario anche per il reclutamento dei *rafts* e di Lck alla SI (Tavano *et al.*, 2004).

Nonostante queste evidenze però, il ruolo del CD28 e dei riarrangiamenti di membrana da esso indotti è ancora oggetto di dibattito (Burack *et al.*, 2002; Glebov & Nichols, 2004; Douglass & Vale, 2005), rendendo necessari ulteriori studi e approfondimenti, in particolare sui meccanismi che collegano l'ingaggio del recettore con il rimodellamento massivo della membrana plasmatica e il reclutamento dei *rafts* alla SI.

Nella prima parte del mio dottorato di ricerca, mi sono quindi occupata di identificare il meccanismo molecolare che permette al CD28 di assemblare i *rafts* nella sinapsi immunologica, focalizzandomi sull'interazione CD28-citoscheletro-*rafts*. Questa scelta è stata effettuata considerando 1) l'importanza del citoscheletro actinico nell'attivazione linfocitaria e nella costimolazione, dimostrata anche dal mancato reclutamento dei *rafts* alla SI dopo stimolazione del TCR e del CD28 nei linfociti T privi di WASp (Dupre *et al.*, 2002) o privi di Vav-1 (Tavano *et al.*, 2004); 2) l'esistenza di molecole, come le proteine leganti l'actina ERM, talina e vinculina, coinvolte nell'associazione tra *rafts* e citoscheletro (Rodgers *et al.*, 2005); 3) il ruolo chiave del CD28 nel controllare la riorganizzazione citoscheletrica durante l'attivazione linfocitaria, tramite Vav-1, Cdc42, Rac, WASp e Arp2/3 (Stowers *et al.*, 1995; Fischer *et al.*, 1998; Kaga *et al.*, 1998; Wulfig & Davis, 1998; Zhang *et al.*, 1999; Villalba *et al.*, 2001; Dupre *et al.*, 2002; Salazar-Fontana *et al.*, 2003; Millard *et al.*, 2004).

Il meccanismo di costimolazione basato sulla secrezione di chemochine da parte dell'APC è stato solo recentemente dimostrato (Molon *et al.*, 2005).

Nei linfociti T il recettore chemochinici CXCR4 è costitutivamente espresso e regola la migrazione linfocitaria verso gradienti della chemochine CXCL12. Il CCR5 invece è espresso solo nelle cellule T attivate e dirige la loro migrazione verso gradienti di CCL3, CCL4 e CCL5. Inoltre questi due recettori sono coinvolti in molti processi patologici, tra cui l'autoimmunità, il cancro e l'HIV (virus dell'immunodeficienza umana).

È stato dimostrato che durante la stimolazione delle cellule T entrambi i recettori CXCR4 e CCR5 vengono reclutati e si accumulano a livello di una SI matura, tramite un meccanismo, indipendente dal CD28, che richiede la secrezione delle chemochine da parte delle APC e l'accoppiamento del recettore con G_q invece che con G_i , proteina classicamente usata da tali recettori per indurre migrazione (Rodriguez-Frade *et al.*, 1999; Vila-Coro *et al.*, 1999). Il reclutamento di CXCR4 e CCR5 alla SI risulta in una interazione più forte tra cellula T e APC, in una ridotta responsività a gradienti chemotattici e in livelli più alti di proliferazione e di produzione di IFN- γ da parte delle cellule T (Molon *et al.*, 2005).

Lo scopo del mio lavoro è stato capire le basi di tale versatilità funzionale e di *signaling* del CXCR4 e del CCR5, e identificare i requisiti per la costimolazione indotta da chemochine.

È noto che i GPCR, tra cui i recettori chemochinici, formano dimeri (omo- o etero-) o oligomeri, come requisito essenziale per l'espressione e il *signaling* (Terrillon & Bouvier, 2004; Prinster *et al.*, 2005); talora alcuni GPCR che non richiedono l'eterodimerizzazione e funzionano come omodimeri possono comunque associarsi con altri recettori in una eterodimerizzazione definita non-obbligatoria, creando un complesso recettoriale con specifiche caratteristiche farmacologiche e di *signaling* (Bulenger *et al.*, 2005).

In particolare è stata dimostrata l'esistenza di omodimeri di CXCR4 (Vila-Coro *et al.*, 1999; Issafras *et al.*, 2002; Babcock *et al.*, 2003; Toth *et al.*, 2004; Percherancier *et al.*, 2005) e di CCR5 (Benkirane *et al.*, 1997; Rodriguez-Frade *et al.*, 1999; Mellado *et al.*, 2001b; Issafras *et al.*, 2002; Hernanz-Falcon *et al.*, 2004; El-Asmar *et al.*, 2005), di eterodimeri CXCR4-CCR2 (Percherancier *et al.*, 2005; Sohy *et al.*, 2007) e CCR5-CCR2 (Mellado *et al.*, 1999; Mellado *et al.*, 2001b; Hernanz-Falcon *et al.*, 2004; El-Asmar *et al.*, 2005; Springael *et al.*, 2006), la cui formazione induce l'accoppiamento con G_q piuttosto che con G_i e media adesione cellulare piuttosto che chemotassi (Mellado *et al.*, 2001b).

Considerate l'eterodimerizzazione tra CXCR4 e CCR2 e l'alta similarità tra il CCR5 e il CCR2 (Springael *et al.*, 2005), è sorprendente che fino ad oggi eterodimeri CXCR4-CCR5 non siano mai stati riscontrati (Rodriguez-Frade *et al.*, 1999; Issafras *et al.*, 2002; Babcock *et al.*, 2003); l'unica isolata dimostrazione della associazione tra CXCR4 e CCR5 è stata condotta su una linea di fibroblasti embrionali murini e non esplora la rilevanza biologica del fenomeno osservato (Wang *et al.*, 2004).

Il mio lavoro si è basato quindi sull'ipotesi che la presenza di complessi molecolari tra CXCR4 e CCR5 sia alla base della loro funzione costimolatoria alla SI nei linfociti umani.

Risultati

CD28 interaction with filamin-A controls lipid raft accumulation at the T-cell immunological synapse

Regina Tavano^{1,5}, Rita Lucia Contento^{1,5}, Sonia Jimenez Baranda², Marzia Soligo³, Loretta Tuosto³, Santos Manes² and Antonella Viola^{1,4,6}

During physiological T-cell stimulation by antigen presenting cells (APCs), a major T-cell membrane rearrangement is known to occur leading to the organization of 'supramolecular activation clusters' at the immunological synapse^{1,2}. A possible role for the synapse is the generation of membrane compartments where signalling may be organized and propagated². Thus, engagement of the costimulatory molecule CD28 at the immunological synapse promotes the organization of a signalling compartment by inducing cytoskeletal changes and lipid raft accumulation³⁻⁵. We identified the actin-binding protein Filamin-A (FLNa) as a novel molecular partner of CD28. We found that, after physiological stimulation, CD28 associated with and recruited FLNa into the immunological synapse, where FLNa organized CD28 signalling. FLNa knockdown by short interfering RNA (siRNA) inhibited CD28-mediated raft accumulation at the immunological synapse and T-cell costimulation. Together, our data indicate that CD28 binding to FLNa is required to induce the T-cell cytoskeletal rearrangements leading to recruitment of lipid microdomains and signalling mediators into the immunological synapse.

During lymphocyte activation, lipid rafts may function as platforms for the formation of multicomponent transduction complexes. These microdomains are constitutively enriched in proteins involved in the early phases of T-cell receptor (TCR) signalling, such as the Src-family kinases Lck and Fyn, the adapter protein LAT (linker of activation in T cells), phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched domains (PAG) or Csk-activating protein (Cbp) and Lck-interacting molecule (LIME). The composition of raft-associated proteins changes after T-cell stimulation, suggesting that rafts are dynamic platforms for T-cell signalling (reviewed in ref. 6). Based on these data, and on the use of cholesterol-depleting reagents, a direct role for lipid rafts in controlling TCR triggering was initially proposed^{7,8}. However, the recent literature indicates that TCR triggering, at least in its initial phases, is independent of cholesterol-based microdomains⁹⁻¹¹. On the other hand, during physiological T-cell

stimulation, rafts may be required to organize a complete immunological synapse or for signal transduction associated with T-cell costimulatory molecules^{5,10}. Furthermore, raft mobilization towards the immunological synapse requires the simultaneous engagement and signalling of TCR and CD28 (refs 4, 5, 12). It was proposed that, by reorganizing lipid rafts, CD28 recruits signalling molecules into the immunological synapse, thus explaining how CD28 triggering leads to higher and more stable tyrosine phosphorylation of several substrates^{4,5}. Moreover, recruitment and clustering of rafts within the immunological synapse may segregate negative and positive players of T-cell activation and protect TCR signalling¹³⁻¹⁵.

Lipid raft dynamics, in addition to T-cell activation, depend largely on F-actin rearrangements¹⁶. Different reports have identified molecules that participate in tethering lipid rafts to the actin cytoskeleton. These include actin binding proteins (such as ERM (ezrin, radixin, moesin) proteins, talin and vinculin, among others) that have been found associated with lipid microdomains, and the lipid PtdIns(4,5)P₂, which is also enriched in rafts (reviewed in ref. 17).

The signalling pathway that connects TCR-CD28 triggering to actin reorganization depends on Vav-1 (a guanine nucleotide exchange factor (GEF) for Rho GTPases), the small Rho GTPase Cdc42 and the Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP)¹⁸⁻²⁰. It is likely that TCR-CD28 triggering induces lipid-raft mobilization through a signalling pathway involving Vav-1, Cdc42 and WASP^{5,21,22}. However, TCR triggering alone, which also induces WASP activation, does not result in lipid-raft accumulation at the immunological synapse⁵.

WASP induces actin polymerization through the Arp2/3 complex, which is one of the most important actin filament-crosslinking factors in cortical cytoplasm. It has been suggested that the Arp2/3 complex cooperates with filamins to establish cortical actin architecture²³. Filamins are large cytoplasmic proteins that crosslink cortical actin into a dynamic three-dimensional structure and, by interacting with proteins of great functional diversity, may represent versatile signalling scaffolds²³. FLNa is expressed in T lymphocytes and participates in T-cell activation²⁴. We speculated that this molecule may function in CD28-induced raft dynamics.

¹Venetian Institute of Molecular Medicine, Department of Biomedical Science, University of Padua, 35100 Padua, Italy. ²Department of Immunology and Oncology, Centro Nacional de Biotecnología, 28049 Madrid, Spain. ³Department of Cellular and Developmental Biology, University of Rome 'La Sapienza', 00185 Rome, Italy. ⁴Istituto Clinico Humanitas, 20089 Rozzano (MI), Italy. ⁵These authors contributed equally to this work. ⁶Correspondence should be addressed to A.V. (e-mail: antonella.viola@unipd.it)

Received 20 April 2006; accepted 22 September 2006; published online 22 October 2006; DOI: 10.1038/ncb1492

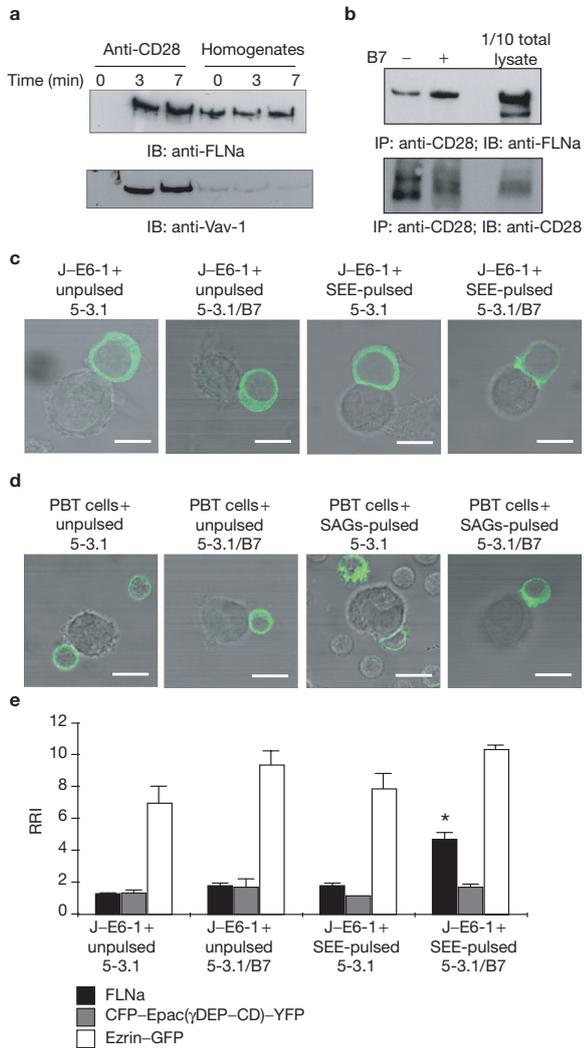


Figure 1 CD28 associates with FLNa and induces its recruitment into the immunological synapse. **(a)** Coimmunoprecipitation of CD28 and FLNa. Peripheral blood CD4⁺ T cells were incubated with anti-CD28-coated magnetic beads. After nitrogen cavitation, affinity-isolated membranes and 1/10 of the respective pelleted homogenates were blotted with anti-Vav-1 and anti-FLNa antibodies. An uncropped image of the blot is shown in the Supplementary Information, Fig. S2. **(b)** Peripheral blood CD4⁺ T cells were incubated or not with unpulsed 5-3.1/B7 cells for 5 min and CD28 was immunoprecipitated with anti-CD28 antibody. Anti-human c-Rel was used as isotype control for immunoprecipitation (data not shown). Immunoprecipitated proteins were sequentially analysed by western blotting with anti-FLNa and anti-CD28 antibodies. Results are representative of three independent experiments. An uncropped image of the blot is shown in the Supplementary Information, Fig. S2. **(c, d)** Jurkat **(c)** or peripheral blood CD4⁺ T cells (PBT; **d**) were stimulated as indicated and FLNa localization was analysed by confocal microscopy. The scale bars represent 10 μ m. **(e)** The relative recruitment index (RRI), calculated as described in the Methods, of FLNa, CFP-Epac(δ DEP-CD)-YFP (irrelevant cytoplasmic marker) and ezrin-GFP (actin cytoskeleton marker) are compared. Data represent mean \pm s.e.m. of thirty cells from three independent experiments. Asterisk indicates $P < 0.001$ compared with controls. In **c** and **d**, more than 70% of T cell-superantigens (SAGs)-pulsed 5-3.1/B7 conjugates showed FLNa RRI > 2 .

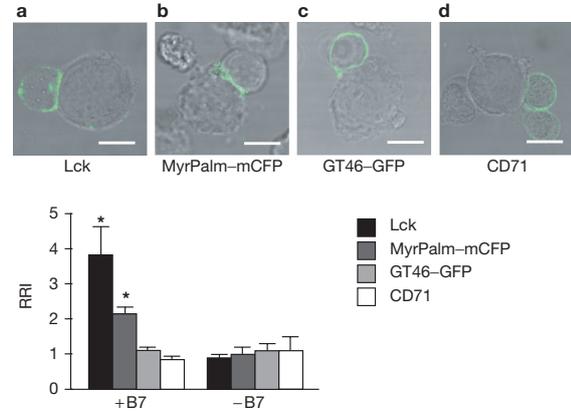


Figure 2 CD28 costimulation induces specific accumulation of lipid rafts at the immunological synapse. **(a-d)** Jurkat T cells expressing MyrPalm-mCFP **(b)**, GT46-GFP **(c)** or not transfected **(a, d)** were conjugated with SEE-pulsed 5-3.1 (data not shown) or 5-3.1/B7 cells for 15 min. Fixed conjugates were either stained for Lck **(a)** or CD71 **(d)** or directly analysed by confocal microscopy **(b, c)**. The scale bars represent 10 μ m. FITC, mCFP and GFP were colour-coded green. The RRI was calculated as described in the Methods and represent mean \pm s.e.m. of thirty cells from three independent experiments. Asterisk indicates $P < 0.001$ compared with both GT46-GFP and CD71 RRI.

FLNa-CD28 interaction was analysed by affinity immunoprecipitation of CD28-containing membranes using anti-CD28 antibody-coated magnetic beads after nitrogen cavitation of human peripheral blood CD4⁺ T lymphocytes. In the resting state, neither Vav-1 nor FLNa were coisolated with CD28 beads; CD28 ligation notably induced FLNa and Vav-1 copurification with CD28 (Fig. 1a). To verify that CD28 triggering by the physiological ligand B7.1 induces association of the T-cell costimulatory receptor with the actin-binding protein FLNa, human peripheral blood CD4⁺ T lymphocytes were incubated with L-cell transfectants expressing the human B7.1 molecule (5-3.1/B7). CD28 triggering resulted in enhanced association of CD28 with FLNa, as demonstrated by coimmunoprecipitation experiments (Fig. 1b).

To characterize the FLNa domains responsible for interaction with CD28, we examined the ability of the CD28 intracellular domain (CD28-ICD) to interact with FLNa deletion mutants by one-on-one transformation in a two-hybrid screening. In transformed colonies, interaction between CD28-ICD and FLNa fragments conferred the ability to grow in medium lacking adenosine, histidine, tryptophan and leucine, and blue colonies in a β -galactosidase assay. Using this approach, we identified repeat 10 (FLNa^{D10}, residues 1158-1246) as the minimum domain that retained interaction with CD28-ICD (see Supplementary Information, Table S1).

T-cell stimulation by APCs induces cytoskeletal rearrangements and accumulation of F-actin and FLNa at the immunological synapse²⁴. We have previously shown that the Jurkat T-cell line is a valuable model for investigating CD28 costimulation under physiological activation conditions (for example, staphylococcus enterotoxin E (SEE)-pulsed APCs, bearing or lacking B7.1)⁵. We found that FLNa was recruited into the immunological synapse only when T cells were stimulated through TCR-CD3 and CD28 (Fig. 1c). Similar results were obtained with peripheral blood CD4⁺ resting T cells (Fig. 1d). To exclude the possibility that the observed CD28-induced FLNa recruitment into the immunological synapse was due to accumulation of cytoplasm or increased actin

LETTERS

polymerization, we analysed the distribution of an irrelevant cytosolic marker (CFP-Epac(δ DEP-CD)–YFP) and of ezrin–GFP in Jurkat T cells stimulated by SEE-pulsed APCs (Fig. 1e). CD28 costimulation did not significantly enhance accumulation of cytoplasmic or cytoskeletal markers at the immunological synapse, indicating that FLNa is specifically recruited by CD28 into the immunological synapse.

In resting T lymphocytes, stimulation of T cells with anti-CD3 plus anti-CD28 antibody-coated beads induces recruitment of the ganglioside GM1 to the TCR triggering site⁴. Several studies confirmed and expanded this initial observation, and suggested that raft recruitment to the immunological synapse occurs only in a subset of T cells that are characterized by high activation stringency, and also requires CD28 signalling (reviewed in ref. 6). In contrast, another study suggested that lipid rafts are randomly distributed during cell stimulation by antibody-coated beads and that the apparent enrichment in GM1 observed at the TCR contact site is the sole consequence of nonspecific membrane ruffling²⁵. Antibody-induced T-cell activation is a highly useful experimental tool, but bears little resemblance to physiological situations. To understand whether and how lipid-based compartmentalization of plasma membrane occurs during T-cell stimulation by APCs, the distribution of endogenous or transfected proteins showing affinity for either rafts or conventional membranes was analysed. Lipid rafts were visualized using either a cyan fluorescent protein carrying consensus sequences for myristoylation plus palmitoylation (MyrPalm–mCFP) or by staining of the Src kinase Lck. Non-raft membranes were visualized through expression of the transmembrane protein LGFPGT46 or CD71 staining. Accumulation of MyrPalm–mCFP and Lck was observed at the immunological synapse of T cells stimulated by B7⁺ APCs, indicating that rafts are mobilized in response to physiological CD28 costimulation and participate in T-cell synapse organization (Fig. 2). Raft recruitment can not be the sole consequence of membrane ruffling as it is highly specific – fluorescent markers of non-raft membranes did not accumulate at the immunological synapse (Fig. 2). These data, together with many previous results, demonstrate that lipid-based membrane asymmetries are generated during physiological processes in lymphocytes, suggesting a pivotal role for lipid membrane microdomains in controlling the immunological synapse formation.

Clearly, CD28 signalling is required to mobilize lipid rafts towards the immunological synapse during T-cell stimulation, even if the mechanism responsible for costimulation-induced membrane rearrangement is not known. We asked whether the capacity of CD28 to concentrate rafts at the T-cell immunological synapse might depend on its capacity to recruit FLNa. We investigated this hypothesis by decreasing *FLNa* expression in T cells using siRNA. In Jurkat T cells in which 50% knockdown of *FLNa* was achieved (Fig. 3a), accumulation at the immunological synapse of lipid raft markers (such as the endogenous Src-kinase Lck or MyrPalm–mCFP) was impaired (Fig. 3b, c), indicating that FLNa is required for raft recruitment into the T-cell immunological synapse. TCR recruitment into the immunological synapse was not affected by *FLNa* knockdown (data not shown).

To specifically block the interaction between CD28 and FLNa, the FLNa fragment containing repeats 10–12 (FLNa^{D10–12}) was overexpressed. This fragment interacted with CD28 in a two-hybrid screen (see Supplementary Information, Table S1) and thus can function as a dominant-negative mutant by preventing CD28 interaction with endogenous FLNa. Overexpression of FLNa^{D10–12} in T cells inhibited CD28-mediated

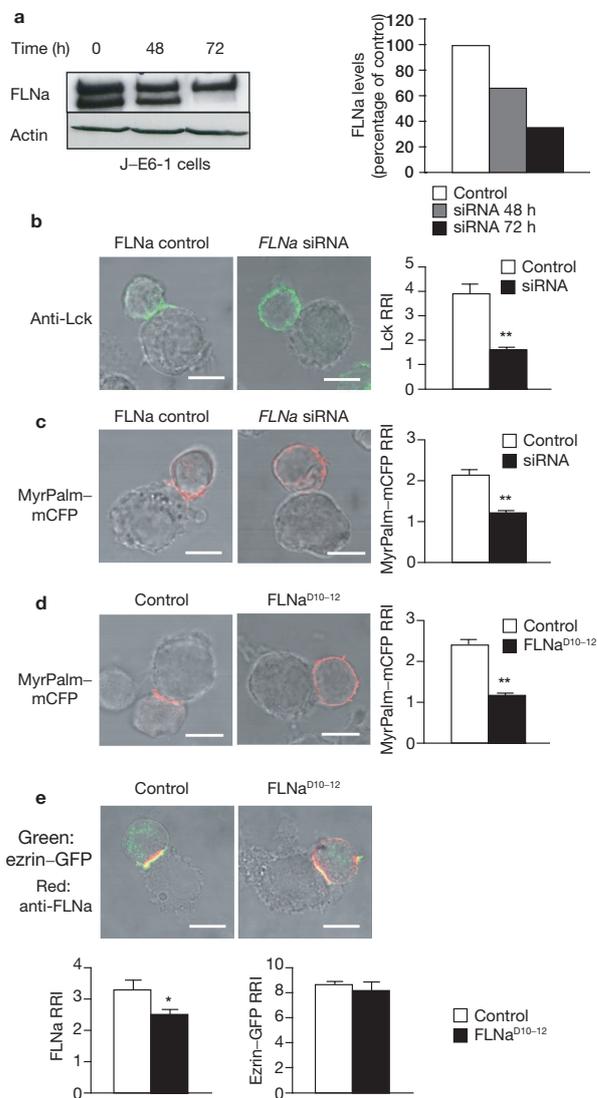


Figure 3 FLNa is required for CD28-induced raft recruitment into the immunological synapse. (a) Jurkat T cells were transfected with *FLNa*-specific or control siRNAs. After 48 or 72 h, cells were harvested and samples blotted with anti-FLNa antibody. Blotting with the anti-actin antibody resolved in the same gel is shown as control. Densitometric analysis is shown in the graph. Results are representative of at least three independent experiments. An uncropped image of the blot is shown in the Supplementary Information, Fig. S2. (b, c) Jurkat T cells expressing (c) or not (b) the raft marker MyrPalm–mCFP were transfected with *FLNa*-specific or control siRNAs. After 72 h, cells were conjugated with SEE-pulsed 5-3.1/B7 cells for 15 min. Fixed conjugates were either stained for Lck (b) or directly analysed by confocal microscopy (c). (d) Jurkat T cells expressing the raft marker MyrPalm–mCFP were transfected with Myc-tagged FLNa^{D10–12}. After 12 h, cells were conjugated with SEE-pulsed 5-3.1/B7 cells for 15 min. Fixed conjugates were directly analysed by confocal microscopy. In this figure, FITC was colour-coded green and mCFP red. (e) Localization of endogenous FLNa or ezrin–GFP in Jurkat T cells expressing Myc-tagged FLNa^{D10–12}. The scale bars represent 10 μ m. The RRI was calculated as described in the Methods and represent mean \pm s.e.m. of thirty cells from three independent experiments. The double asterisk indicates $P < 0.001$ and the single asterisk indicates $P < 0.05$ compared with controls.

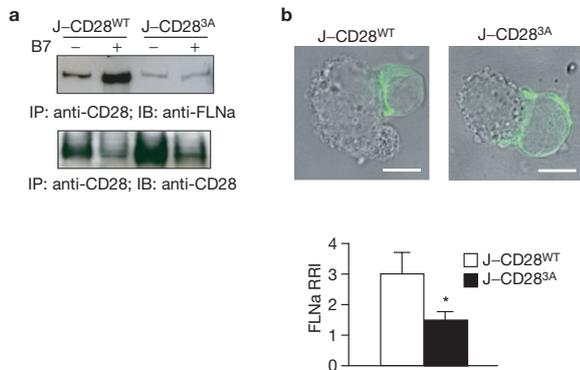


Figure 4 FLNa recruitment into the immunological synapse requires the CD28 C-terminal PxxPP motif. **(a)** The C-terminal proline motif of CD28 is required for CD28–FLNa interaction. Jurkat cells lacking CD28 and reconstituted with either wild-type CD28 (J–CD28) or with the mutant CD28^{3A} (J–CD28^{3A}) were stimulated or not with unpulsed 5-3.1/B7 cells for 5 min. CD28 was immunoprecipitated with an anti-CD28 antibody and immunoprecipitated proteins were sequentially blotted with anti-FLNa and anti-CD28 antibodies. Results are representative of three independent experiments. An uncropped image of the blot is shown in the Supplementary Information, Fig. S2. **(b)** J–CD28 or J–CD28^{3A} were conjugated with SEE-pulsed 5-3.1/B7 cells for 15 min. Fixed conjugates were stained for FLNa and analysed by confocal microscopy. The scale bars represent 10 μ m. The RRI was calculated as described in Methods and represent mean \pm s.e.m. of thirty cells out of three independent experiments. Asterisk indicates $P < 0.001$ compared with controls.

raft recruitment into the immunological synapse (Fig. 3d), indicating that CD28-mediated raft accumulation at the immunological synapse depends on the ability of CD28 to interact with FLNa. Overexpression of FLNa^{D10-12} in T cells inhibited endogenous FLNa recruitment into the immunological synapse, whereas ezrin localization remained unaffected (Fig. 3e).

We have previously shown that mutations in the carboxy-terminal proline motif of CD28 impair raft mobilization during physiological activation of T cells⁵. Therefore, we asked whether the same CD28 motif is required for CD28–FLNa association. To test this hypothesis, we used a Jurkat cell line (CH7C17) deficient for CD28 expression reconstituted with human wild-type CD28 or with a CD28 mutant in the C-terminal PxxPP (CD28^{3A}), generated by substituting the prolines at positions 208, 211 and 212 with alanine⁵. We found that after stimulation with 5-3.1/B7 cells, CD28^{3A} impairs the association with FLNa, indicating that the C-terminal proline motif of CD28 required to mobilize rafts is the same used by CD28 to interact with FLNa (Fig. 4a). Moreover, Jurkat cells expressing the CD28^{3A} mutant (J–CD28^{3A}) were unable to recruit FLNa into the immunological synapse during stimulation with SEE-pulsed 5-3.1/B7 cells (Fig. 4b). TCR and ezrin recruitment was not impaired in J–CD28^{3A} T cells (data not shown).

In addition to filamentous actin, filamins bind a variety of signalling molecules. It has been proposed that, by bringing together membrane receptors, the actin cytoskeleton and intracellular signalling molecules, filamins facilitate the activation of local cellular processes²³. In particular, FLNa binds to Rho family GTPases and to some of their regulatory cofactors, indicating that FLNa may be crucial in regulating local processes involving actin polymerization²⁶.

In T cells, CD28 activation promotes actin polymerization through the activation of the small Rho GTPase Cdc42 (ref. 27). CD28 triggering induces tyrosine phosphorylation of Vav-1, which, in turn, activates Cdc42 and Rac-1 (ref. 28). To investigate the role of CD28–FLNa association in CD28 signalling, Vav-1 phosphorylation and Cdc42 activation was analysed in J–CD28^{3A} cells that were stimulated by 5-3.1/B7 cells. In T cells expressing the CD28^{3A} mutant, Vav-1 was phosphorylated in response to B7.1 stimulation at levels comparable to those observed in T cells expressing wild-type CD28 (see Supplementary Information, Fig. S1a) whereas Cdc42 activation was inhibited (see Supplementary Information, Fig. S1b). Activation of Cdc42 in J–CD28^{3A} cells stimulated through TCR using SEE-pulsed 5-3.1 cells was unaffected and similar to that observed in wild-type J–CD28 cells (see Supplementary Information, Fig. S1b). Cdc42 activation was unaffected in J–CD28^{3A} cells receiving both TCR and CD28 stimulation (data not shown).

Taken together, these data indicate that the C-terminal PxxPP motif of CD28 is dispensable for Vav-1 phosphorylation, but it is required for optimal Cdc42 activation. The observation that the same motif of CD28 is required for CD28–FLNa association, and that FLNa binds Cdc42 and Rac-1, suggests that CD28 uses FLNa to recruit Rho GTPases at the site of Vav-1 activation, thus organizing a complete signalling compartment for actin remodelling. Cdc42 activation by CD28 was analysed in peripheral blood T lymphocytes in which 80% knockdown of FLNa was achieved by siRNA (Fig. 5a). In T cells, FLNa knockdown did not affect CD28, CD4 or TCR–CD3 expression (data not shown). Activation of Cdc42 in FLNa-knockdown T cells stimulated through CD28 was inhibited (Fig. 5b), thus confirming that CD28 uses FLNa to activate Cdc42 in response to physiological stimulation.

It has been proposed that CD28 amplifies TCR signalling by recruiting lipid rafts into the immunological synapse²⁹. If FLNa is required for CD28-induced cytoskeletal rearrangements leading to raft mobilization, we reasoned that expression of FLNa^{D10-12}, which prevents CD28 interaction with endogenous FLNa, or FLNa knockdown, would result in defective CD28 costimulation. Expression of FLNa^{D10-12} in Jurkat cells strongly inhibited NF-AT (nuclear factor of activated T cells) activity induced by TCR plus CD28 signalling, thus indicating that CD28-induced FLNa recruitment into the immunological synapse regulates T-cell costimulation (Fig. 5c). In addition, peripheral blood CD4⁺ T cells, showing 80% knockdown of FLNa achieved by siRNA (Fig. 5a), were stimulated by beads coated with anti-CD3 antibodies alone or together with anti-CD28 antibody and interferon- γ production was analysed. As expected, stimulation of resting T cells with anti-CD3 plus anti-CD28 antibodies induced stronger T-cell stimulation as compared to anti-CD3 stimulation alone (Fig. 5d). Interestingly, FLNa knockdown resulted in loss of costimulation and left anti-CD3 response unperturbed (Fig. 5d). These data indicate that when FLNa expression levels are reduced in T cells, CD28-induced costimulation is selectively inhibited, whereas TCR–CD3 signalling remains unaffected.

This study shows that CD28 binds to FLNa and recruits this actin-binding protein into the immunological synapse. The molecular details of the interaction between CD28 and FLNa are still unclear. Our data indicate that FLNa can directly bind CD28, but this association is stabilized on CD28 triggering. We also found that FLNa has a direct role in CD28 signalling by recruiting Cdc42 at the site of Vav-1 activation.

Interestingly, mutations in the CD28 cytoplasmic proline motif resulting in impaired recruitment of lipid rafts into the immunological synapse⁵, also resulted in loss of CD28–FLNa interaction. FLNa knockdown

LETTERS

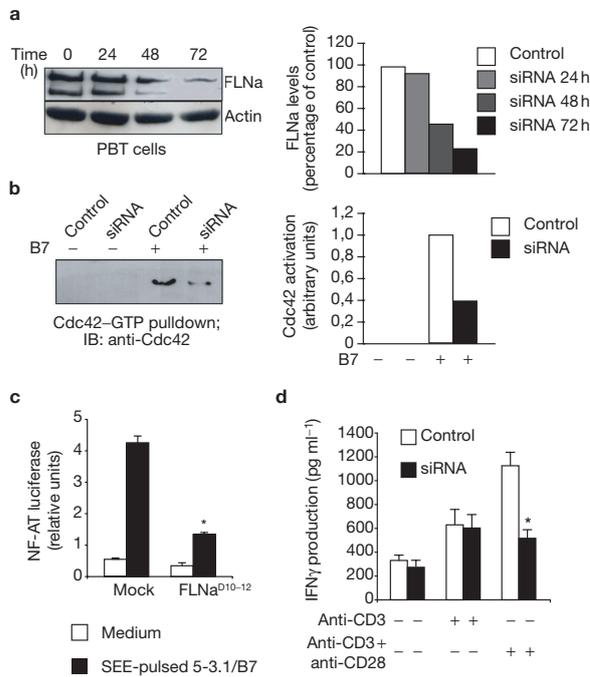


Figure 5 FLNa is required for CD28-induced T-cell costimulation. (a) Peripheral blood CD4⁺ T cells were transfected with *FLNa*-specific or control siRNAs. After 24, 48 or 72 h, cells were harvested and samples blotted with anti-*FLNa* antibody. Blotting with the anti-actin antibody resolved in the same gel is shown as control. Densitometric analysis is shown in the graph. An uncropped image of the blot is shown in the Supplementary Information, Fig. S2. (b) Peripheral blood CD4⁺ T cells were transfected with *FLNa*-specific or control siRNAs. After 72 h, cells were stimulated or not with unpulsed 5-3.1/B7 cells (CD28 triggering) for 5 min. GTP-Cdc42 was detected as described in Methods. Densitometric analysis is shown in the graph. (c) Jurkat T cells were transfected with NF-AT luciferase reporter construct together with empty vector (pcDNA) or *FLNa*^{D10-12} and then stimulated for 8 h with medium alone (control) or 5-3.1/B7 cells pulsed with SEE. The results are expressed as the mean of relative luciferase units \pm s.d. from triplicate samples. Asterisk indicates $P < 0.001$ compared with cells expressing *FLNa*^{D10-12}. (d) Peripheral blood CD4⁺ T cells were transfected with *FLNa*-specific or control siRNAs. After 72 h, T cells were mixed with beads coated with anti-CD3 or anti-CD3 plus anti-CD28 antibodies. After 12 h, supernatants were collected and IFN γ production measured by ELISA. Results are representative of four experiments. Asterisk indicates $P < 0.001$ compared with controls.

by siRNA induces defects in CD28-dependent raft mobilization, indicating that CD28 uses *FLNa* to integrate signalling pathways, resulting in actin crosslinking and lipid raft mobilization. Considering these data, we speculate that *FLNa* stabilizes and crosslinks actin filaments at the immunological synapse, resulting in accumulation of lipid membrane microdomains. It has been suggested that the links between actin filaments that are formed by the Arp2/3 complex are metastable and dissociate, whereas interactions between *FLNa* and actin filaments are robust on a longer timescale²³.

In the absence of tools to manipulate rafts without altering T-cell physiology, the hypothesis that costimulatory molecules use rafts to amplify TCR signalling and to facilitate T-cell activation, could not be definitively exploited. However, the finding that CD28 requires *FLNa* to

recruit lipid rafts into the immunological synapse allowed us to investigate the role of membrane microdomains during T-cell activation. We found that in T cells in which *FLNa* expression is reduced, lipid raft mobilization and CD28 costimulation are lost. Importantly, TCR-CD3 responses are not altered in these cells, indicating that *FLNa* knockdown specifically affects T-cell costimulation.

Our data suggest that during T cell activation by APCs, CD28 coligation with the TCR alters the local environment around the TCR, thereby providing a spatially distinct domain for signal amplification. □

METHODS

Cell culture. The Jurkat T cell line J.E6-1 (Jurkat cell clone purchased by the American Type Culture Collection, Manassa, VA) and EBV-B cells were maintained in RPMI 1640 supplemented with 10% FCS, L-glutamine, penicillin and streptomycin (Gibco, Grand Island, NY). The wild-type CD28 and CD28^{3A} Jurkat T cell line were obtained as previously described² and maintained as above, with the addition of 400 μ g ml⁻¹ hygromycin B, 4 μ g ml⁻¹ puromycin and 2 mg ml⁻¹ G418 (Sigma, St Louis, MO). The L-cell transfectants expressing HLA-DR (α , β 1*0101; 5-3.1) or cotransfected with HLA-DR (α , β 1*0101) and human B7.1 (5-3.1/B7) were previously described³⁰. Human peripheral blood CD4⁺ T cells were purified by negative selection by using a RosetteSep kit (StemCell Technologies, Vancouver, Canada).

Antibodies and reagents. Mouse anti-Lck (3A5), goat anti-CD28 (N20), mouse anti-CD3- ζ (6B10.2) and mouse anti-human c-Rel (B-6) antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Anti-human CD28 (CD28.2) and anti-human CD71 antibodies were purchased from BD Pharmingen (San Diego, CA). Anti-human filamin-A (FLMN01) was purchased from NeoMarkers (Fremont, CA). Anti-human Cdc42 and anti-human Vav-1 were purchased from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY). Anti-mouse HRP-conjugated secondary antibody was purchased from Biorad (Hercules, CA), anti-goat HRP-conjugated secondary antibody was purchased from Santa Cruz. Anti-mouse fluorescein-conjugated secondary antibody was purchased from Calbiochem (San Diego, CA), and anti-mouse rhodamine-conjugated secondary antibody was purchased from Chemicon (Temecula, CA). The immunoblots were analysed by enhanced chemiluminescence (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden). *Staphylococcus enterotoxin A* (SEA), B (SEB) and E (SEE) were purchased from Toxin Technology (Sarasota, FL).

Yeast two hybrids. CD28 bait was constructed by amplifying the CD28-ICD (amino acids 180–221) by PCR with specific primers (5'-GCGAATTCAGGA GTAAGAGGAGCAGG-3' and 5'-GCGGATCCTCAGGAGCGATAGGCTGC-3'), and the product subcloned into Gal4-binding domain vector (pGBKT7; Clontech, Mountain View, CA). *FLNa* D8–9, D10–12, D13–16, D16–20 and D20–24 fragments were amplified by PCR with specific primers (*FLNa* repeat 10: 5'-GCGAATTCCTTGACG CATCCAAA-3' and 5'-GCGGATCCGCTTG CTGGGGAAGTT-3'; *FLNa* D8–9: 5'-GCGAATTCCTGGACCTCAGCAAG-3' and 5'-GCGGATCCGCGGGAACCACGTTGGG-3'; *FLNa* D10–12: 5'-GCGAATTCCTTGACGATCCAAA-3' and 5'-GCGGATCCCTTGAAAG GACTGCGCTGG-3'; *FLNa* D13–16: 5'-CGGAATTCACAGATGCGTCCAAG-3' and 5'-GCCTCGAGCTGCAAGGGGCTTCC-3'; *FLNa* D16–20: 5'-CGGAATTCGCCCCGGAGAGGCC-3' and 5'-GCGGATCCCTAGGGGCCAC-3'; *FLNa* D20–24: 5'-CGGGATCCCG AAAGAGAGCATCACC-3' and 5'-GCCTCGAGTCAGGGCACCACAAC-3') and cloned in the pGADT7 vector in *EcoRI*-*BamHI* (D8–9, D10–12, D16–20), *EcoRI*-*XhoI* (D13–16), and *BamHI*-*XhoI* (D20–24), respectively. Yeasts were cotransformed with pGBKT7-CD28-ICD and each of the pGADT7-*FLNa* fragments by one-on-one transformation. Positive interactions were verified by colony growth on agar plates lacking adenine, histidine, tryptophan and leucine, and using a β -galactosidase assay with X- α -Gal as a substrate (Clontech).

Plasmids and transfections. MyrPalm-mCFP in pcDNA3 plasmid, coding for lipid-modified fluorescent proteins, was the kind gift from R. Tsien (Howard Hughes Medical Institute, San Diego, CA). pGFP-GT46 was a gift from K. Simons (Max Planck Institute, Dresden, Germany). *FLNa* D10–12 was amplified with the primers 5'-GCGAATTCCTTGACGATCCAAA-3' and 5'-GCGGATCCCTTGAAAGG

ACTGCCTGG-3', and subcloned in pcDNA3. Ezrin-GFP, in EGFP-C2 plasmid, was a kind gift from S. Mayor (National Centre for Biological Science, Bangalore, India). CFP-Epac(δ DEP-CD)-YFP, in pcDNA3 plasmid, was a kind gift from K. Jalink (The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, The Netherlands)³¹. cDNA constructs were transfected by electroporation as previously described³.

RNA interference. Jurkat or peripheral blood CD4⁺ T cells were transfected with 5 μ g of the pooled SMART selection-designed siRNAs (CCAACAAGGUCAAAGUUAUUU; GCAGGAGGCGGCGAGUUAUUU; GUAUGGAGAUGAAGAGGUUAUU; UCACAGAAAUGACCAAGAUU; Dharmacon, Lafayette, CO) for *FLNa* or with 1.5 μ g of control siRNAs, using electroporation or Amaxa Nucleofector kit, respectively. Cells were then incubated in complete medium for 24, 48 or 72 h before harvesting, depending on the type of experiment. Both *FLNa* bands with relative molecular masses of 280,000 and 250,000 (*M*_r, 280K and 250K) were reduced, but the 280K band was more stable. Recently, p56lck has been described to bind to and phosphorylate *FLNa*, thus altering its susceptibility to calpain³². Thus, the 280K form of *FLNa* may be more stable than the 250K, especially in Jurkat cell lines expressing high levels of p56lck.

Immunoisolation of plasma membrane fragments. M-450 goat anti-mouse magnetic beads (Dynal A.S., Oslo, Norway) were coated with anti-CD28 monoclonal antibody (BD Pharmingen) following manufacturer's instructions. Peripheral blood CD4⁺ T cells (1.2×10^7) were incubated (4 °C, 2 min) with anti-CD28 beads (bead:cell ratio, 1:2) in RPMI with 1% FCS. Bead-cell conjugates were incubated (37 °C) for 0, 3 and 7 min, washed once with ice-cold H buffer (10 mM sodium Hepes at pH 7.2, 250 mM sucrose, 2 mM MgCl₂, 10 mM NaF and 1 mM vanadate) and resuspended in 1 ml H buffer containing 1 μ g BIS(sulfosuccinimidyl) suberate (BS³; Pierce, Rockford, IL), 0.2 mM pervanadate and CLAP protease inhibitor (chymostatin, leupeptin, antipain and pepstatin; 100 μ M each, Sigma). Cells were nitrogen-cavitated (4 °C, 50 bar, 7 min) using a nitrogen cavitation bomb (Parr Instrument Company, Moline, IL). Beads were retrieved with a magnet (Dynal) and washed three times with 10 ml H buffer (1 min each at 4 °C); homogenates were pelleted by ultracentrifugation (100,000g, 4 °C, 20 min), in an Optima XL-100K ultracentrifuge (Beckman Coulter, Fullerton, CA). Beads and cell pellets were analysed by immunoblotting.

Confocal microscopy. 5-3.1 and 5-3.1/B7 cells were suspended at 10^7 cells ml⁻¹ and incubated (or not) with 1 μ g ml⁻¹ of the bacterial superantigen SEE or with a cocktail of superantigens (SEA, SEB, SEE, 1 μ g ml⁻¹ each) for 2 h at 37 °C, with mixing every 20 min. Pulsed cells were washed and incubated for 15 min at 37 °C with equal amount of T cells. Cells were then adhered to microscope slides coated with 50 μ g ml⁻¹ poly-L-lysine, fixed with 4% paraformaldehyde and either permeabilized with 0.1% Triton in PBS and stained for filamin-A (scarcely expressed in 5-3.1 cells) or for Lck, CD71 and CD3- ζ (not expressed in 5-3.1 cells) or directly mounted in 2.5% 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO, Fluka, St Louis, MO), 90% glycerol, 10% PBS.

Confocal microscopy was performed with a Biorad confocal microscope (BioRad, Hercules, CA) with 60 \times objective lenses (Nikon, Tokyo, Japan), using laser excitation at 488 nm, 550 nm or 430 nm. Images were analysed with the Adobe Photoshop 7.0 programme. Surface plot analysis was performed with the Image J programme.

Fluorescence quantitation. To quantitate the recruitment of *FLNa*, TCR, Ezrin-GFP, CFP-Epac(δ DEP-CD)-YFP and MyrPalm-mCFP to the immunological synapse, boxes were drawn around the immunological synapse, the regions of the T cell not in contact with APCs, and a background area. The relative recruitment index (RRI) was calculated as indicated: (mean fluorescence intensity (MFI) at synapse - background) / (MFI at all the cell membrane not in contact with APCs - background). Quantitative analysis of MFI was performed with the Image J programme. At least thirty conjugates were examined quantitatively for each experiment. Statistical significance was calculated using a Student's *t*-test.

Densitometry. Densitometric analyses were performed on a Image Master VDS-CL densitometer using volume analysis of Image Master Total Lab software (Amersham Biosciences, Amersham, UK). All densitometric values obtained were calculated from nonsaturated signals. For siRNA experiments, *FLNa* expression values were normalized for actin; for *cdc42* assay, values were normalized for the controls.

Cdc42-activation assay. Wild-type J-CD28 or J-CD28^{3A} cells (1×10^7) were stimulated or not with 1×10^7 SEE-pulsed 5.3-1 or unpulsed 5.3-1/B7 cells, for 5 min at 37 °C. In some experiments, human peripheral blood CD4⁺ T lymphocytes, transfected with *FLNa*-specific or control siRNAs, were used. Cells were then lysed in 500 μ l of MLB buffer (125 mM HEPES at pH 7.5, 750 mM NaCl, 5% Igepal CA-630, 50 mM MgCl₂, 5 mM EDTA and 10% glycerol) containing protease and phosphatase inhibitors, and the activation of Cdc42 was determined by affinity precipitation using a GST-fusion-protein based kit, according to the manufacturer's protocol (Rac/cdc42 assay reagent, Upstate Biotechnology). Proteins then were separated by 12% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membrane, and probed with anti-Cdc42.

Immunoprecipitation. Wild-type J-CD28 or J-CD28^{3A} cells (1×10^7), or peripheral blood CD4⁺ T cells (2×10^7) were stimulated or not with 1×10^7 5.3-1/B7 cells, for 5 min at 37 °C; cells were then lysed in 1% Nonidet P-40 buffer (20 mM Tris-HCl at pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA), containing 10 μ g ml⁻¹ aprotinin, 10 μ g ml⁻¹ leupeptin, 20 mM NaF, 1 mM Pefabloc-SC, 1 mM Na₂VO₄ and 10 mM Na₂P₂O₇. Postnuclear lysates were precleared for 1 h at 4 °C with protein G-Sepharose (Amersham Biosciences) and then incubated for 2-3 h with anti-CD28 antibodies pre-adsorbed to protein G. Immunoprecipitates were washed twice in 1% Nonidet P-40, twice in 0.05% Nonidet P-40 lysis buffer, and boiled in SDS buffer before electrophoresis on 8% SDS-polyacrylamide gels. After protein transfer, nitrocellulose membranes were blotted with anti-filamin A and anti-CD28 antibodies. Anti-human c-Rel was used as isotype control for immunoprecipitation.

NF-AT luciferase assay. J-E6-1 cells (1×10^7) were transfected with 10 μ g NF-AT luciferase reporter construct, together with 30 μ g of empty vector (pcDNA) or *FLNa*^{D10-12}. After 24 h, 1×10^5 T cells were stimulated for 8 hours with medium alone (control) or with 5-3.1/B7 cells pulsed with SEE; the cells were then washed in PBS and lysed in 1 \times lysis buffer (Reporter lysis Buffer 5 \times ; Promega, Madison, WI). After 30 min, 20 μ l of each sample were subjected to the luciferase assay, according to the manufacturer's instructions (Luciferase Assay System, Promega).

ELISA. After siRNA transfection (72 h), peripheral blood CD4⁺ T cells were plated at a 1:1 ratio with beads coated with 10 μ g ml⁻¹ anti-CD3 (OKT3), or with 10 μ g ml⁻¹ anti-CD3 plus 10 μ g ml⁻¹ anti-CD28 antibodies (CD28.2). After 24 h, supernatants were collected and IFN γ production was measured using standard commercially available ELISA kits (Pierce Endogen, Rockford, IL), according to the manufacturer's instructions.

Statistical analysis. All the data are representative of at least three different experiments. Values are expressed as mean \pm s.e.m. Statistical analysis was performed using the Student's *t*-test.

Note: Supplementary Information is available on the Nature Cell Biology website.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank T. P. Stossel and F. Nakamura for providing *FLNa* constructs and advice, and T. Harder for scientific discussion. We also thank M. Bettella and A. Cabrelle for technical support. This work has been supported by grants from the Italian Association for Cancer Research (AIRC) and University of Padua (Progetto d'Ateneo) to A.V. and from AIRC, the Italian Space Agency (ASI, MoMa "From Molecule to Man" Project) to L.T. L.T. is also supported by "Fondazione Andrea Cesalpino" Policlinico Umberto I (University of Rome "La Sapienza", Rome Italy). S.M. is supported by the Spanish Ministry of Education and Science (SAF2005-00241).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

A.V. designed the study and wrote the manuscript. S.M. provided reagents and designed the yeast two-hybrids experiment. L.T. provided reagents and suggestions. M.S. performed the NF-AT luciferase assay and control experiments not shown in the manuscript. S.J.B. performed the yeast two-hybrid assay. R.T. and R.L.C. performed all the other experiments, prepared the figures and performed statistical tests.

COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare that they have no competing financial interests.

Published online at <http://www.nature.com/naturecellbiology/>
Reprints and permissions information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions>

LETTERS

1. Monks, C. R., Freiberg, B. A., Kupfer H., Sciaky, N. & Kupfer, A. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* **395**, 82–86 (1998).
2. Dustin, M. L. & Shaw, A. S. Costimulation: building an immunological synapse. *Science* **283**, 649–650 (1999).
3. Wulfig, C. & Davis, M. M. A receptor/cytoskeletal movement triggered by costimulation during T cell activation. *Science* **282**, 2266–2269 (1998).
4. Viola, A., Schroeder, S., Sakakibara, Y. & Lanzavecchia, A. T lymphocyte costimulation mediated by reorganization of membrane microdomains. *Science* **283**, 680–682 (1999).
5. Tavano, R. *et al.* CD28 and lipid rafts coordinate recruitment of Lck to the immunological synapse of human T lymphocytes. *J. Immunol.* **173**, 5392–5397 (2004).
6. Manes, S. & Viola, A. Lipid rafts in lymphocyte activation and migration. *Mol. Membr. Biol.* **23**, 59–69 (2006).
7. Montixi, C. *et al.* Engagement of T cell receptor triggers its recruitment to low-density detergent-insoluble membrane domains. *EMBO J.* **17**, 5334–5348 (1998).
8. Xavier, R., Brennan, T., Li, Q., McCormack, C. & Seed, B. Membrane compartmentation is required for efficient T cell activation. *Immunity* **8**, 723–732 (1998).
9. Pizzo, P. *et al.* Lipid rafts and TCR signalling: a critical reevaluation. *Eur. J. Immunol.* **32**, 3082–3091 (2002).
10. Pizzo, P. *et al.* Physiological T cell activation starts and propagates in lipid rafts. *Immunol. Lett.* **91**, 3–9 (2004).
11. Rouquette-Jazdani, A. K., Pelassy, C., Breittmayer, J. P. & Aussen, C. Reevaluation of the role of cholesterol in stabilizing rafts implicated in T cell receptor signaling. *Cell. Signal.* **18**, 105–122 (2005).
12. Gaus, K., Chklovskaya, E., Fazekas de St Groth, B., Jessup, W. & Harder, T. Condensation of the plasma membrane at the site of T lymphocyte activation. *J. Cell Biol.* **171**, 121–131 (2005).
13. Rodgers, W. & Rose, J. K. Exclusion of CD45 inhibits activity of p56lck associated with glycolipid-enriched membrane domains. *J. Cell Biol.* **135**, 1515–1523 (1996).
14. Janes, P. W., Ley, S. C. & Magee, A. I. Aggregation of lipid rafts accompanies signaling via the T cell antigen receptor. *J. Cell Biol.* **147**, 447–461 (1999).
15. Zhang, M. *et al.* CD45 signals outside of lipid rafts to promote ERK activation, synaptic raft clustering, and IL-2 production. *J. Immunol.* **174**, 1479–1490 (2005).
16. Sechi, A. S. & Wehland, J. Interplay between TCR signalling and actin cytoskeleton dynamics. *Trends Immunol.* **25**, 257–265 (2004).
17. Rodgers, W., Farris, D. & Mishra, S. Merging complexes: properties of membrane raft assembly during lymphocyte signaling. *Trends Immunol.* **26**, 97–103 (2005).
18. Stowers, L., Yelon, D., Berg, L. J. & Chant, J. Regulation of the polarization of T cells toward antigen-presenting cells by Ras-related GTPase CDC42. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **92**, 5027–5031 (1995).
19. Fischer, K. D. *et al.* Vav is a regulator of cytoskeletal reorganization mediated by the T-cell receptor. *Curr. Biol.* **8**, 554–562 (1998).
20. Zhang, J. *et al.* Antigen receptor-induced activation and cytoskeletal rearrangement are impaired in Wiskott-Aldrich syndrome protein-deficient lymphocytes. *J. Exp. Med.* **190**, 1329–1342 (1999).
21. Villalba, M. *et al.* Vav1/Rac-dependent actin cytoskeleton reorganization is required for lipid raft clustering in T cells. *J. Cell Biol.* **155**, 331–338 (2001).
22. Dupre, L. A. *et al.* Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates lipid raft dynamics during immunological synapse formation. *Immunity* **17**, 157–166 (2002).
23. Stossel, T. P. *et al.* Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 138–145 (2001).
24. Hayashi, K. & Altman, A. Filamin A is required for T cell activation mediated by protein kinase C- θ . *J. Immunol.* **177**, 1721–1728 (2006).
25. Glebov, O. O. & Nichols, B. J. Lipid raft proteins have a random distribution during localized activation of the T-cell receptor. *Nature Cell Biol.* **6**, 238–243 (2004).
26. Ohta, Y., Suzuki, N., Nakamura, S., Hartwig, J. H. & Stossel, T. P. The small GTPase RalA targets filamin to induce filopodia. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **96**, 2122–2128 (1999).
27. Salazar-Fontana, L. I., Barr, V., Samelson, L. E. & Bierer, B. E. CD28 engagement promotes actin polymerization through the activation of the small Rho GTPase Cdc42 in human T cells. *J. Immunol.* **171**, 2225–2232 (2003).
28. Han, J. *et al.* Lck regulates Vav activation of members of the Rho family of GTPases. *Mol. Cell Biol.* **17**, 1346–1353 (1997).
29. Viola, A. Amplification of TCR signaling by membrane dynamic microdomains. *Trends Immunol.* **22**, 322–327 (2001).
30. Karr, R. W., Panina-Bordignon, P., Yu, W. Y. & Lanzavecchia, A. Antigen-specific T cells with monogamous or promiscuous restriction patterns are sensitive to different HLA-DR β chain substitutions. *J. Immunol.* **146**, 4242–4247 (1991).
31. Ponsioen, B. *et al.* Detecting cAMP-induced Epac activation by fluorescence resonance energy transfer: Epac as novel cAMP indicator. *EMBO Rep.* **5**, 1176–1180 (2004).
32. Sharma, C. P. & Goldmann, W. H. Phosphorylation of actin-binding protein (ABP-280; filamin) by tyrosine kinase p56lck modulates actin filament cross-linking. *Cell Biol. Intl* **28**, 935–941 (2004).

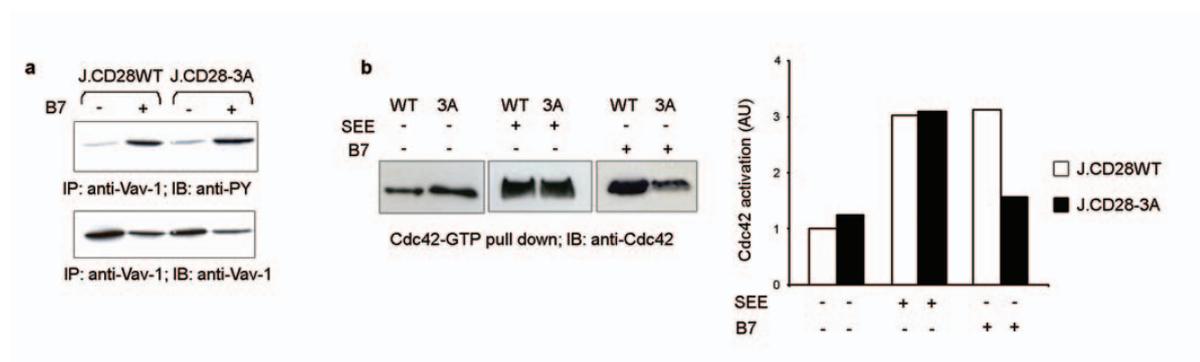


Figure S1 CD28-FLNa association is required for proper CD28 signaling. (a) J.CD28WT or J.CD28-3A were stimulated or not with unpulsed 5-3.1/B7 cells for 5 min. Vav-1 was immunoprecipitated with an anti-Vav-1 antibody and immunoprecipitated proteins were sequentially blotted with anti-phosphotyrosine and anti-Vav-1 antibodies. (b) J.CD28WT or J.CD28-3A were either

left unstimulated (control) or stimulated with SEE-pulsed 5-3.1 (TCR triggering) or unpulsed 5-3.1/B7 (CD28 triggering) cells for 5 min. GTP-Cdc42 was detected as described in *Methods*. Densitometric analysis is shown in the graph. Results are representative of three independent experiments.

Table S1. Interaction of FLNa fragments with the CD28ICD in the two-hybrid system.

FLNa fragment	Amino acids	CD28ICD		
		-LHAW	- LW	X-αGal
FLNa repeats 8-9	969-1156	—	+	—
FLNa repeats 10-12	1158-1439	+	+	+
FLNa repeat 10	1158-1246	+	+	+
FLNa repeats 13-16	1446-1857	—	+	—
FLNa repeats 16-20	1772-2234	—	+	—
FLNa repeats 20-24	2141-2648	—	+	—

Yeast cells cotransformed with GBD-CD28ICD and the FLNa fragments indicated subcloned in GAD vector were plated on selection plates lacking leucine and tryptophan (-LW; cotransformation control) or adenine, histidine, leucine and tryptophan (-LHAW); growth (+) was recorded after 72 h. The X-αGal column indicates the presence (+) or absence (-) of β-galactosidase activity in the grown colonies.

SUPPLEMENTARY INFORMATION

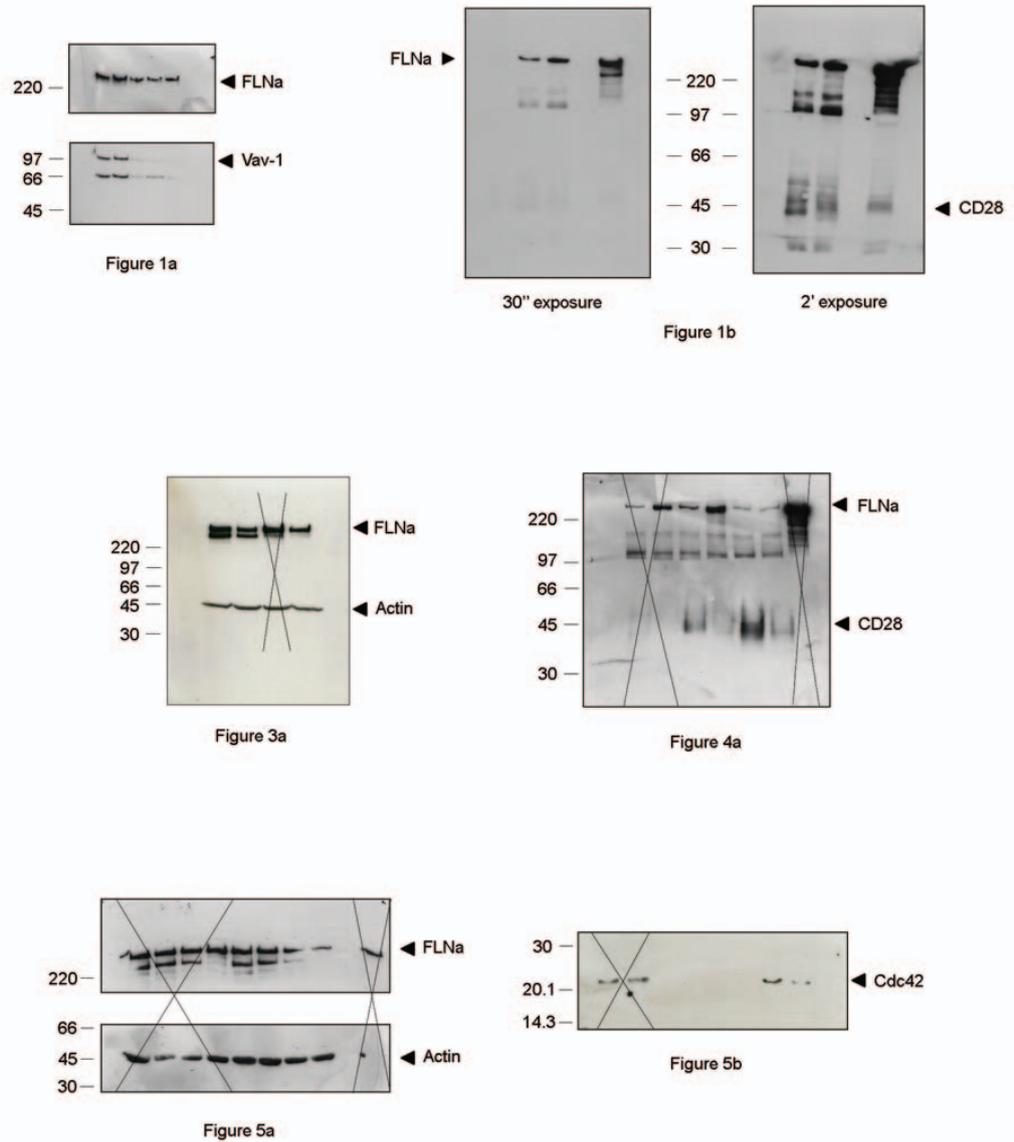


Figure S2 Composite figure showing full blots of figures in the manuscript.

CXCR4-CCR5: a new couple modulating T-cell functions

Rita Lucia Contento^{*†}, Barbara Molon[‡], Sergio Pantano^{*}, Cedric Boullaran^{§¶}, Tullio Pozzan^{*†}, Santos Manes Broton^{||}, Marc Parmentier^{**}, Stefano Marullo^{§¶} and Antonella Viola^{*.††}.

^{*}Venetian Institute of Molecular Medicine, via Orus 2, 35134 Padua, Italy

[†]Department of Biomedical Sciences, University of Padua, Viale G. Colombo 3, 35121 Padua, Italy

[‡]Istituto Oncologico Veneto I.R.C.C.S., Via Gattamelata 64, 35128 Padua, Italy

[§]Institut Cochin, Université Paris Descartes, Centre National de la Recherche Scientifique (Unité Mixte de Recherche 8104), 75014 Paris, France

[¶]Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U567, Paris, France

^{||}Department of Immunology and Oncology, Centro Nacional de Biotecnología, 28049 Madrid, Spain

^{**}Institut de Recherche Interdisciplinaire en Biologie Humaine et Moléculaire (IRIBHM), Université Libre de Bruxelles, 1070 Brussels, Belgium

^{††}Istituto Clinico Humanitas I.R.C.C.S., Via Manzoni 56, 20089 Rozzano, Milan, Italy

Correspondence should be addressed to Antonella Viola (Istituto Clinico Humanitas IRCCS, Via Manzoni 56, 20089 Rozzano, Milan, Italy; phone: +39.02.82245118; fax: +39.02.82245101; antonella.viola@humanitas.it).

Classification: biological sciences: Immunology

Manuscript information: 21 text pages, 6 figures.

Abbreviations: IS, immunological synapse; APC, antigen-presenting cell; PB, peripheral blood; mAb, monoclonal antibody; GPCR, G protein coupled receptor; BRET, bioluminescence resonance energy transfer; SEE, *Staphylococcal* Enterotoxin E; RRI, relative recruitment index; MFI, mean fluorescence intensity.

Abstract

Chemokines and their receptors direct leukocyte migration among blood, lymph and tissues. Evidence has recently accumulated indicating that, besides their chemotactic functions, chemokine receptors are highly versatile players fine-tuning immune responses. During human T-cell activation by antigen-presenting cells (APCs), the chemokine receptors CCR5 and CXCR4 are recruited into the immunological synapse (IS), where they deliver costimulatory signals. However, the molecular mechanisms allowing signaling versatility of chemokine receptors are unknown. Here we describe the functional interaction between CXCR4 and CCR5 to exert specific biological functions and modulate T lymphocyte responses. We demonstrate that simultaneous expression and cooperation between CCR5 and CXCR4 are required for chemokine-induced T-cell costimulation at the IS. In addition, we provide evidence for a physical association of the two receptors in a signaling complex that activates distinct T-cell functions. We suggest that cooperation between receptors represents one key strategy for the functional plasticity of chemokines.

Introduction

Chemokines are small cytokines with selective chemoattractant properties coordinating tissue homeostasis and inflammation. Besides their chemotactic functions, chemokines are involved in several biological and physiopathological processes. Thus, deregulated expression of chemokines and their receptors is involved in the development of autoimmunity, chronic inflammation, immunodeficiency and cancer (1, 2). The broad range of activities displayed by chemokines is the consequence of multiple signaling pathways induced by chemokine receptors, seven-transmembrane molecules coupled to heterotrimeric G proteins (3).

In T lymphocytes, the chemokine receptor CXCR4 is constitutively expressed and regulates T-cell migration toward gradients of the chemokine CXCL12. In contrast, CCR5 is expressed in activated T cells only and direct their migration toward CCL3, CCL4 and CCL5 gradients. CXCR4 and CCR5 receptors are involved in several pathological processes, including autoimmunity, cancer, and HIV (2). We have recently demonstrated that during T-cell stimulation CCR5 and CXCR4 are recruited to and accumulate at the immunological synapse (IS), by a mechanism requiring chemokine secretion by antigen-presenting cells (APCs) and chemokine-receptor signaling through a $G_{\alpha i}$ -independent pathway (4). Recruitment of chemokine receptors into the IS results in stronger T-cell–APC attraction, reduction of T-cell responsiveness to chemotactic gradients, and in higher levels of T-cell proliferation and IFN- γ production (4).

To understand the basis of the signaling and functional versatility of CXCR4 and CCR5, we performed a study aimed at identifying the requirements for chemokine-induced costimulation. Here we show that CXCR4 and CCR5 are co-recruited into the T-cell IS and that cooperation between the two receptors is required for chemokine-mediated T-cell costimulation. Our data suggest that CXCR4 and CCR5 may hetero-oligomerize to allow signaling versatility in T lymphocytes.

Results

CXCR4 and CCR5 are co-recruited into the IS.

We had previously shown that CCR5 and CXCR4 specific antagonists inhibited recruitment of the specific receptor into the T-cell IS (4). To understand if the two receptors are co-recruited into the IS, we used Jurkat T cells, which endogenously express both CXCR4 and CCR5 (Fig. 1A), in which either CCR5-GFP or CXCR4-GFP were transfected. Interestingly, we found that T cell pre-treatment with the specific CXCR4 antagonist AMD3100 resulted not only in inhibition of CXCR4 accumulation at the T-cell IS, but it also blocked CCR5-GFP recruitment (Fig. 1B). Likewise, the CCR5 antagonist TAK-779 inhibited CXCR4-GFP accumulation at the IS, indicating that the two receptors are co-recruited into the T-cell–APC contact region (Fig. 1C). In contrast, T-cell migration toward CXCL12 was not affected by pre-treatment of T cells with met-RANTES (unpublished data), confirming that CXCR4 and CCR5 do not necessarily cooperate for their chemotactic functions (5-7).

To understand if there is a physical interaction between CXCR4 and CCR5 at the IS, we performed immunoprecipitation experiments in Jurkat T cells stably expressing GFP-CCR5 (4). In these experimental conditions, the endogenous expression of CXCR4 and the low expression of CCR5 (Fig. 2A) limit possible artifacts due to receptor over-expression. Association of the two chemokine receptors was evident in T cells stimulated with APCs, whereas CCR5 was unable to co-precipitate with CXCR4 in both unstimulated T cells and in response to soluble chemokines, either used alone (not shown) or in combination (Fig. 2B).

CXCR4 and CCR5 cooperate for T-cell costimulation.

We have previously shown that recruitment of CCR5 and CXCR4 into the T-cell IS results in enhanced T-cell activation as measured as proliferation and IFN- γ -production (4). We asked whether chemokine-induced costimulation enhances production of other cytokines by activated

peripheral blood (PB) T cells (Fig. 3). When presented to T cells together with anti-CD3 monoclonal antibody (mAb) on beads, both CCL5 and CXCL12 reproducibly enhanced production of IFN- γ , TNF- α and IL-13. In contrast, IL-2 expression was not modified by the chemokines. In our experiments, we did not observe enhanced T-cell costimulation when beads were coated with both CCL5 and CXCL12, as compared with beads coated with CXCL12 alone (unpublished data), suggesting that, in our specific experimental conditions, no significant synergistic signaling is occurring.

CXCR4 is constitutively expressed in both resting and activated T cells, whereas CCR5 is expressed in activated T cells only. To evaluate the functional significance of CXCR4-CCR5 co-recruitment into the T-cell IS, we asked whether CXCR4 requires CCR5 expression to enhance T-cell responses. Thus, we analyzed the capacity of CXCL12 to induce costimulation in resting (CXCR4⁺ CCR5⁻) versus activated (CXCR4⁺ CCR5⁺) human T lymphocytes. Costimulation by CXCL12 was observed only when both CXCR4 and CCR5 were expressed, indicating that CXCR4 requires CCR5 to amplify T-cell signaling (Fig. 4 *A* and *B*). Interestingly, exogenous expression of CCR5 in resting T cells allowed CXCR4 to induce costimulatory signals, indicating that the difference observed between resting and activated T cells was not related to the different activation status of lymphocytes (Fig. 4*C*). Finally, we analyzed the capacity of CXCR4 to deliver costimulatory signals in T cells in which the plasma membrane expression of CCR5 is genetically impeded by a naturally occurring loss-of-function mutation (8-10). In activated T cells from a homozygous CCR5 Δ 32 healthy donor, both CCL5 and CXCL12 did not enhance T-cell activation, thus demonstrating that CXCR4 needs CCR5 expression to induce costimulation (Fig. 4*D*).

CXCR4 and CCR5 are expressed as a multimeric complex at the plasma membrane.

G-protein coupled receptors (GPCRs) have traditionally been thought to act as monomers, but the emerging view in the field is that the signaling unit is composed of dimers or even oligomers (11). Homo- or heterodimerization is an essential requirement for expression and signaling of

several GPCRs. In addition, some GPCRs that do not require heterodimerization for their expression, traffic and signaling may specifically associate with other GPCR subtypes. This “non-obligatory” heterodimerization has important effects on signaling, trafficking and pharmacology of the receptors (12).

We investigated the structural determinants of the possible association modes between CCR5 and CXCR4 receptors by applying protein-protein docking techniques to the models obtained from the GPCRs Data Base (<http://www.gpcr.org>). This allowed us to obtain low-resolution models of homo- and heterodimers for these receptors (Fig. 5 *A, B* and *C*). The gross structural determinants obtained for hetero- and homodimers resulted comparable to those already reported (13). Comparative analysis indicated that the heterodimer interface area is comparable to that of both CCR5 and CXCR4 homodimers, suggesting that, within the coarseness of the theoretical approach, the energy gain upon heterodimerization is similar to that of homodimerization for both receptor complexes (Fig. 5*D*). Since the stability of protein-protein complexes is normally evaluated in terms of their solvent accessible area buried upon complexation and reciprocal surface complementarity, this indicated that heterodimerization may at least compete with homodimerization, and that there are no structural impediments for the formation of the CXCR4-CCR5 heterodimer in their inactive state.

The association of CCR5 with CXCR4 was thus investigated in intact Jurkat cells by bioluminescence resonance energy transfer (BRET) (14) expressing receptors fused to either Renilla luciferase (Rluc), the BRET donor, or the yellow variant of EGFP (YFP), the BRET acceptor (Fig. 6*A*). In saturation experiments, conducted with CCR5-Rluc as BRET donor, increasing concentration of both CCR5-YFP and CXCR4-YFP resulted in hyperbolic curves, characterized by similar BRET₅₀ values (0.71 ± 0.18 and 0.39 ± 0.11). These data are consistent with a similar propensity of CCR5 to constitutively self-aggregate or interact with CXCR4 in Jurkat cells. Controls experiments were conducted using the angiotensin AT1AR fused to YFP, as BRET acceptor. Weaker BRET signals were observed with a much higher BRET₅₀ value (6.45 ± 1.04),

indicative of a significantly lower propensity of CCR5 to associate with this receptor. BRET experiments between CCR5-Rluc and CCR5-YFP or CCR5-Rluc and CXCR4-YFP, conducted in parallel in Jurkat cells pre-incubated with SEE-pulsed or control APCs, showed similar BRET values (data not shown), indicating that the constitutive proximity of BRET partners is not enhanced further during their translocation to the immunological synapse.

Seminal studies performed by Marsh and coworkers have demonstrated that CXCR4 is internalized from the cell surface and down-modulated when cells are treated with phorbol esters (15, 16). This internalization requires a C-terminal Ser/IleLeu motif (16), which is not present in the CCR5 receptor (16). Thus, CCR5 is not internalized in response to PMA (16). We speculated that if CXCR4 and CCR5 formed a signaling complex in T cells, CCR5 expression would be down-regulated in T cells stimulated with CXCL12 and phorbol esters. CXCR4⁺ Jurkat T cells stably expressing CCR5 were stimulated with CCL5, CXCL12 or PMA for 90 min and expression of CCR5 was analyzed at the plasma membrane level at different time points (Fig. 6B). All the stimuli induced down-modulation of CCR5 expression at the plasma membrane with a similar kinetic. Interestingly, PMA-induced CXCR4 down-modulation, which was induced as a positive control, paralleled PMA-induced CCR5 internalization during the first 30 min, suggesting that at the plasma membrane most of the CCR5 is associated with CXCR4. The parallel down-modulation of CCR5 and CXCR4 during the first 30 min was followed by a faster recovery of CCR5 expression, indicating that the oligomeric complex formed between the two receptors may be sensitive to endosomal pH. Down-modulation of CCR5 expression by PMA cannot be explained by any type of cross-phosphorylation between receptors, because protein kinase C (PKC) activation by phorbol esters has no effect on membrane expression and trafficking of CCR5 if expressed alone (16).

Discussion

Our results are compatible with a heterodimerization or hetero-oligomerization model for CXCR4 and CCR5. A formal distinction between the two hypotheses goes beyond the aim of our study and is very complicated because of several technical issues. For example, although computational models have identified residues involved in receptor heterodimerization, the same residues seem to be required for homodimerization of the receptors, thus excluding the possibility of using specific mutants to address this question. The biological significance of the CXCR4-CCR5 interaction is anyway provided by the functional data showing that CXCR4 requires CCR5 for its recruitment into the immunological synapse and costimulatory functions. These data plainly indicate that a putative multimeric complex formed by the two receptors has distinctive signaling and biological properties and cannot be explained by the mere aggregation of CXCR4 and CCR5 homodimers in the same membrane domains. The observation that BRET signals remained unchanged upon receptor translocation to the immunological synapse, whereas the association of CCR5 with CXCR4 appeared markedly enhanced in CO-IP experiments conducted in Jurkat cells incubated with SEE-pulsed APCs, suggests that the 2 chemokine receptors are in close proximity in resting cells and stabilized within a complex once in the immunological synapse.

Recently, it has been suggested that soluble CXCL12 induces CXCR4 association with the TCR and that it enhances expression of IL-2 and IL-10 in T cell stimulated with plate-bound anti-CD3 mAb (17). In our experiments, CXCR4 was not recruited into the IS of CCR5⁻ resting T cells with CXCL12 secreting APCs (unpublished data), suggesting that, in a physiological context of antigen and chemokine presentation, CXCR4 does not substantially associate with the TCR. Moreover, we could not detect costimulation induced by CXCL12 in resting CCR5⁻ T cells. In addition, we found that, when compared to anti-CD3 stimulation, CXCL12 plus anti-CD3 mAb induced higher T-cell responses in terms of IFN- γ , TNF- α and IL-13 production, whereas IL-2 production was not affected. These different results may be explained by the different stimulation

protocol used. Indeed, plate-bound anti-CD3 mAb deliver a very strong signal to T cells and soluble chemokines are probably working differently than membrane-bound ones. Interestingly, it has been recently demonstrated that DCs bind chemokines at their plasma membrane (18). The CXCR4-CCR5 *in cis* costimulation here reported may be therefore different from chemokine receptor *in trans* costimulations, as described for CCR7 (18). In agreement with these data, we have demonstrated that CCR7 is not recruited into the IS formed between T cells and APCs producing CCR7 ligands (4).

Clearly, the critical questions are when CXCR4-CCR5 cooperation occurs and how CXCR4-CCR5 signaling influences T-cell responses *in vivo*. While CXCR4 is constitutively expressed in T cells, CCR5 expression is restricted to activated T cells. It would be therefore possible to conclude that chemokine-mediated costimulation occurs in the periphery, likely in inflamed tissues, and does not influence T-cell priming in lymph nodes. Recently, however, it has been demonstrated that inflammation leads to CCR5 expression by naïve CD8⁺ T cells, permitting their recruitment to sites of CD4⁺ T-cell interaction with DCs, where CCL3 and CCL4 are produced (19). This chemokine-driven cell clustering appears to be fundamental for development of proper long-term CD8⁺ T-cell memory and it is tempting to speculate that the expression of CCR5 is not only important for CD8 cell recruitment, but also for costimulatory signals required for efficient T-cell priming. As an example, the expression of CCR5 is crucial for control of infection by West Nile virus (WNV), a re-emerging pathogen capable of causing human fatal encephalitis (20), and, again, we speculate that both CCR5-mediated recruitment and the key role of CCR5 in T-cell costimulation (4) might explain the higher incidence of this disease in CCR5 Δ 32 individuals.

If, on the one hand, the CXCR4-CCR5 signaling may be beneficial to fight pathogens, on the other hand, it may amplify T-cell responses in chronic inflammation. The CCR5 Δ 32 polymorphism was found to be a genetic marker inversely related to the severity of rheumatoid arthritis (21), and several evidence indicates that both receptors play key roles in autoimmunity (2). Although chemokines and their receptors represent ideal therapeutical targets in autoimmunity, they are also

implicated in homeostatic cell trafficking (2). Our data suggest the possibility of uncoupling migration and *in situ* activation by designing specific antagonists, which will not impair the homeostasis of the immune system but inhibit activation of auto-reactive T cells.

CXCR4 and CCR5 are coreceptors for HIV entry in human cells. Almost all cases of HIV-1 transmission involve strains that use CCR5 for entry (R5 viruses); however, in up to 50% of infected people after five years, on average, viruses that are able to use CXCR4 become predominant (R5X4 or X4 viruses). Our data may explain recent “paradoxical findings”, as defined by the authors of this study, showing that CCR5 ligands protect neurons from HIV/gp120 and CXCL12 toxicity (22), because CCR5 ligands would indeed cross-compete with CXCR4 ligands and prevent their neurotoxic effects. Thus, by clarifying the complex interactions between CXCR4 and CCR5 chemokine receptors, we will improve our understanding of HIV pathogenesis.

In conclusion, we have demonstrated a novel and functional cooperation between CXCR4 and CCR5 to modulate T-lymphocyte responses. These results identify a new molecular mechanism pivotal to chemokine-receptor signaling versatility, and a new chemokine-receptor couple that may represent a good target for the pharmacological research.

Materials and Methods

Cell culture, constructs and transfections

The Jurkat T-cell line J.E6-1, Jurkat E6-1 cells expressing GFP-CCR5 (4) and EBV-B 221 cell lines were cultured in RPMI 1640 medium (Gibco) supplemented with 10% FCS, 2 mM L-glutamine, 100 U ml⁻¹ penicillin, and 100 µg ml⁻¹ streptomycin. Human PB CD4⁺ T cells were sorted by negative selection using RosetteSep kit (StemCell Technologies). Blood from CCR5Δ32 donor was kindly provided by Christophe Combadiere (Universite Pierre et Marie Curie Paris 6, Hopital Pitie-Salpetriere, Paris, France).

The GFP-CCR5 and the CXCR4-GFP constructs have been already described (4).

The CCR5-Rluc, CCR5-YFP, CXCR4-YFP and AT1AR-YFP constructs have been already described (23).

Human PB T cells were transiently transfected with GFP-CCR5 using an eletroporation system (Amaxa Biosystems) according to manufacturer's guidelines and were used for experiments 24 h later.

Flow cytometry

The expression of CCR5 and CXCR4 on Jurkat and PB T cells was assessed by flow cytometry analysis (FACS-Calibur or FACS Canto; Becton Dickinson) using the commercial anti-human CCR5 mAb (R&D, clone: 45531; or R&D, clone: CTC5; or BD Pharmingen™, clone: 2D7) and the commercial anti-CXCR4 mAb (BD Pharmingen™, clone: 12G5; or R&D, clone: 44717). Data were processed using CELLQUEST (Becton Dickinson).

Immunofluorescence confocal microscopy

Recruitment of CXCR4 and CCR5 into the T-cell IS was analyzed as previously described (4). In some experiments, Jurkat cells expressing GPF-CCR5 were treated with 10 µg ml⁻¹

AMD3100 (Sigma) at room temperature for 15 minutes. In parallel experiments Jurkat cells expressing CXCR4-GFP were treated with 5 μ M TAK-779 (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program) at 37°C for 15 minutes.

A minimum of 20 cells (or 20 conjugates) was examined quantitatively for each experiment. The fluorescence patterns reported in all the figures are representative of at least 90% of the cells.

Immunoprecipitation and western blot

Jurkat cells (10^7 cells) expressing GFP-CCR5 were stimulated or not for 15 min at 37°C with *Staphylococcal* Enterotoxin E (SEE)-pulsed B cells (10^7 cells) or with anti-CD3 mAb (clone: OKT3; 10 μ g ml⁻¹). Cells were then lysed in 1% Brij 96 V (Fluka) buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA), containing 10 μ g ml⁻¹ aprotinin, 10 μ g ml⁻¹ leupeptin, 20 mM NaF, 1 mM Pefabloc-SC, 1 mM Na₃VO₄ and 10 mM Na₄P₂O₇. Postnuclear lysates were precleared for 30 min at 4°C with protein G-Sepharose (Pharmacia Biotech Inc.) and then incubated for 2 h with anti-GFP rabbit polyclonal antibodies (Clontech), pre-adsorbed to protein G. Immunoprecipitates were washed twice in 1% Brij 96 V, twice in 0.05% Brij 96 V lysis buffer, and boiled in SDS-buffer before electrophoresis on 10% SDS-polyacrylamide gels. After protein transfer, nitrocellulose membranes were blotted with anti-CXCR4 antibody (24) and anti-GFP polyclonal antibodies (Clontech).

In some experiments GFP-CCR5-expressing Jurkat cells were serum-starved for 4h and then stimulated for 15 min with soluble chemokines, and GFP-CCR5 was immunoprecipitated as above. For control experiments, GFP was immunoprecipitated as above in Jurkat cells (10^7 cells) not expressing GFP-CCR5.

Densitometric analyses were performed on a Image Master VDS-CL densitometer using volume analysis of Image MasterTM Total Lab software (Amersham Biosciences). All densitometric values obtained were calculated from nonsaturated signals.

T-cell activation and ELISA

IFN- γ production was measured as described (4). Supernatants from three different experiments were also analyzed by SearchLight™ human TH1/TH2 cytokine array 1 (Pierce Biotechnology). For the multiplex arrays, in each separate experiment, duplicates of three dilutions of each sample were used. We did not obtain any relevant information about IL-8 and IL-12, because their concentrations were out of the standard ranges.

Receptors Models

The starting 3D models of chemokinic receptors, based on the structure of Rhodopsin, were obtained from the G-Proteins Coupled Receptors Data Base (<http://www.gpcr.org>).

Protein-protein docking

The structural models for the homo- and heterodimers were obtained using the program HEX 4.0(25) using full rotation search mode, shape correlation mode and a grid size of 0.4 Å. Full molecular mechanics minimization refining was used after initial scanning. Bioinformatic analysis, validated by site-specific mutagenesis experiments, have demonstrated that residues Ile52 and Val150 within TM1 and TM4, respectively, belong to the protein-protein interface (13, 26). This information was used as a filter to select among all the models generated. For the CCR5 (CXCR4) dimer, we selected the lowest energy-scoring complex bearing the minimum average distance between Ile52 (Ile60) on one monomer and Val150 (Val158) on the other and an angle between the principal axes of each molecule below 20 degrees. This criterion ensures that both residues belong simultaneously to the protein-protein interface with the correct orientation. The same rule was applied to the heterodimer. Structural superposition of the model obtained using this procedure with that published by Mellado and coworkers (13) using the program Swiss-PDBviewer (<http://www.expasy.org/spdbv/>) gave an root mean square deviation (RMSD) of 0.8 Å for the

backbone atoms indicating that both solutions are virtually identical. Similar docking trials using the program 3D-Dock (27) provided essentially the same solution.

The surface accessible area data were calculated at the protein-protein interaction server (<http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/PP/server/index.html>).

BRET Saturation Assays

5×10^6 Jurkat cells, expressing the SV40 T-antigen (JTAG cells), were electroporated with 0,5 μg of the DNA construct coding for BRET donor (CCR5-Rluc) and increasing (0,5–10 μg) amounts of the BRET acceptor plasmid (CCR5-YFP, CXCR4-YFP or AT1AR-YFP). Electroporation was performed in a Gene Pulser II electroporator at 950 μF and 250 V in a Gene-Pulse cuvette (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Total transfected DNA was maintained constant using appropriate amounts of pcDNA3 (Invitrogen). 24h after transfection, the luciferase substrate, coelenterazine h (Molecular Probes), was added at a final concentration of 5 μM to 1×10^5 cells. Luminescence and fluorescence were measured simultaneously using the MithrasTM fluorescence-luminescence detector (Berthold). Cells expressing BRET donors alone were used to determine background. Filter sets were 485 ± 10 nm for luciferase emission and 530 ± 12.5 nm for YFP emission. BRET ratios were calculated as described (28).

CXCR4-CCR5 co-modulation

Experiments were performed as described (16). In brief, Jurkat cells (2×10^7) stably expressing GFP-CCR5 by retroviral expression were incubated in basal medium containing 100 ng ml^{-1} PMA (Sigma) or 25 nM CXCL12 (Peprotech) or 50 nM CCL5 (Peprotech) at 37 °C. Cells were analyzed by flow cytometry after staining with anti-CXCR4 (BD PharmingenTM, clone: 12G5) or anti-CCR5 (R&D, clone: CTC5) mAb.

Statistical analysis

All the data are representative of at least three different experiments. Values are expressed as mean \pm SE or SD. Statistical analysis was performed using Student's *t* test (Microsoft Office).

Acknowledgments

We thank Anna Cabrelle, Denis Bison and Achille Anselmo for technical help. We are grateful to Christophe Combadiere for providing CCR5 Δ 32 peripheral blood cells and to Frances Lund, Mario Mellado and Giorgio Trinchieri for critical discussions. This work has been supported by grants from Italian Association for Cancer Research (AIRC) and the MIUR-PRIN to A.V. and Sidaction and Fondation de France to S.M. and the Belgian Actions de Recherche Concertées, Interuniversity Poles of Attraction and Fonds de la Recherche Scientifique Médicale to M.P. and the European Community (Innochem program). The following reagent was obtained through the NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH: TAK-779, (cat. No. 4983).

Competing interests statement

The authors declare that they have no competing financial interests.

Author contributions: R.L.C. and B.M. contributed equally to this work; T.P., S.M. and A.V. designed research; R.L.C., B.M., S.P., C.B. and M.P. performed research; S.M.B. contributed reagents; R.L.C., B.M., S.P. and C.B. analyzed data; S.M. and A.V. wrote the paper.

References

1. Gerard, C. & Rollins, B. J. (2001) *Nat Immunol* **2**, 108-15.
2. Viola, A., and Luster, A.D. (2008) *Annu rev pharmacol toxicol* **48**, in press.
3. Viola, A., Contento, R. L. & Molon, B. (2006) *Trends Immunol* **27**, 421-7.
4. Molon, B., Gri, G., Bettella, M., Gomez-Mouton, C., Lanzavecchia, A., Martinez, A. C., Manes, S. & Viola, A. (2005) *Nat Immunol* **6**, 465-71.
5. Babcock, G. J., Farzan, M. & Sodroski, J. (2003) *J Biol Chem* **278**, 3378-85.
6. Donzella, G. A., Schols, D., Lin, S. W., Este, J. A., Nagashima, K. A., Maddon, P. J., Allaway, G. P., Sakmar, T. P., Henson, G., De Clercq, E. & Moore, J. P. (1998) *Nat Med* **4**, 72-7.
7. Proudfoot, A. E., Power, C. A., Hoogewerf, A. J., Montjovent, M. O., Borlat, F., Offord, R. E. & Wells, T. N. (1996) *J Biol Chem* **271**, 2599-603.
8. Benkirane, M., Jin, D. Y., Chun, R. F., Koup, R. A. & Jeang, K. T. (1997) *J Biol Chem* **272**, 30603-6.
9. Mellado, M., Rodriguez-Frade, J. M., Vila-Coro, A. J., Fernandez, S., Martin de Ana, A., Jones, D. R., Toran, J. L. & Martinez, A. C. (2001) *Embo J* **20**, 2497-507.
10. Liu, R., Paxton, W. A., Choe, S., Ceradini, D., Martin, S. R., Horuk, R., MacDonald, M. E., Stuhlmann, H., Koup, R. A. & Landau, N. R. (1996) *Cell* **86**, 367-77.
11. Prinster, S. C., Hague, C. & Hall, R. A. (2005) *Pharmacol Rev* **57**, 289-98.
12. Bulenger, S., Marullo, S. & Bouvier, M. (2005) *Trends Pharmacol Sci* **26**, 131-7.
13. Hernanz-Falcon, P., Rodriguez-Frade, J. M., Serrano, A., Juan, D., del Sol, A., Soriano, S. F., Roncal, F., Gomez, L., Valencia, A., Martinez, A. C. & Mellado, M. (2004) *Nat Immunol* **5**, 216-23.
14. Boute, N., Jockers, R. & Issad, T. (2002) *Trends Pharmacol Sci* **23**, 351-4.
15. Signoret, N., Oldridge, J., Pelchen-Matthews, A., Klasse, P. J., Tran, T., Brass, L. F., Rosenkilde, M. M., Schwartz, T. W., Holmes, W., Dallas, W., Luther, M. A., Wells, T. N., Hoxie, J. A. & Marsh, M. (1997) *J Cell Biol* **139**, 651-64.
16. Signoret, N., Rosenkilde, M. M., Klasse, P. J., Schwartz, T. W., Malim, M. H., Hoxie, J. A. & Marsh, M. (1998) *J Cell Sci* **111 (Pt 18)**, 2819-30.
17. Kumar, A., Humphreys, T. D., Kremer, K. N., Bramati, P. S., Bradfield, L., Edgar, C. E. & Hedin, K. E. (2006) *Immunity* **25**, 213-24.
18. Friedman, R. S., Jacobelli, J. & Krummel, M. F. (2006) *Nat Immunol* **7**, 1101-8.
19. Castellino, F., Huang, A. Y., Altan-Bonnet, G., Stoll, S., Scheinecker, C. & Germain, R. N. (2006) *Nature* **440**, 890-5.
20. Glass, W. G., Lim, J. K., Cholera, R., Pletnev, A. G., Gao, J. L. & Murphy, P. M. (2005) *J Exp Med* **202**, 1087-98.
21. Zapico, I., Coto, E., Rodriguez, A., Alvarez, C., Torre, J. C. & Alvarez, V. (2000) *Genes Immun* **1**, 288-9.
22. Kaul, M., Ma, Q., Medders, K. E., Desai, M. K. & Lipton, S. A. (2007) *Cell Death Differ* **14**, 296-305.
23. Issafras, H., Angers, S., Bulenger, S., Blanpain, C., Parmentier, M., Labbe-Jullie, C., Bouvier, M. & Marullo, S. (2002) *J Biol Chem* **277**, 34666-73.
24. Vila-Coro, A. J., Rodriguez-Frade, J. M., Martin De Ana, A., Moreno-Ortiz, M. C., Martinez, A. C. & Mellado, M. (1999) *Faseb J* **13**, 1699-710.
25. Mustard, D. & Ritchie, D. W. (2005) *Proteins* **60**, 269-74.
26. de Juan, D., Mellado, M., Rodriguez-Frade, J. M., Hernanz-Falcon, P., Serrano, A., Del Sol, A., Valencia, A., Martinez, A. C. & Rojas, A. M. (2005) *Bioinformatics* **21 Suppl 2**, ii13-ii18.

27. Jackson, R. M., Gabb, H. A. & Sternberg, M. J. (1998) *J Mol Biol* **276**, 265-85.
28. Storez, H., Scott, M. G., Issafras, H., Burtey, A., Benmerah, A., Muntaner, O., Piolot, T., Tramier, M., Coppey-Moisan, M., Bouvier, M., Labbe-Jullie, C. & Marullo, S. (2005) *J Biol Chem* **280**, 40210-5.

Figure Legends

Fig. 1. CXCR4 and CCR5 are co-recruited into the IS. (A) Expression of endogenous CXCR4 and CCR5 in Jurkat T cells. Jurkat cells expressing GFP-tagged CCR5 (B) or CXCR4 (C) were incubated with *Staphylococcal* Enterotoxin E (SEE)-loaded B cells for 10 minutes, in the presence of AMD3100 or TAK779. Cells were then fixed and analyzed by confocal microscopy. Bar, 10 μ m. Quantitative analyses of CCR5 and CXCR4 accumulation at the IS are shown. The relative recruitment index (RRI) (4) represent mean (\pm SE) of thirty cells out of four independent experiments. * $p < 0.001$ compared with control T cells.

Fig. 2. Physical association between CXCR4 and CCR5 upon T-cell activation. (A) CCR5 and CXCR4 expression in activated PB T cells and Jurkat cell stably expressing GFP-CCR5 by retroviral infection. (B) GFP-CCR5 Jurkat T cells were stimulated as indicated and CCR5 was immunoprecipitated with an anti-GFP antibody. Immunoprecipitated proteins were blotted with anti-CXCR4 antibody. Blotting with the anti-GFP antibody resolved in the same gel is shown and Jurkat cells lacking GFP-CCR5 were included as control. Densitometric analyses indicated that $50\% \pm 13\%$ (SD) of CXCR4 was coimmunoprecipitated with CCR5 in activated T cells. Results are representative of three experiments.

Fig. 3. T-cell costimulation by CXCL12 and CCL5. PB T cells were stimulated with PHA and IL-2 for 7 days to allow CCR5 expression. T cells were then incubated with beads coated with anti-CD3 mAb in the presence or in the absence of anti-CD28 mAb, CXCL12 or CCL5. After 48 h, supernatants were collected and cytokine production measured by cytokine array (Pierce SearchLight Multiplex). Values represent mean (\pm SD) of duplicates. CD28 enhanced production of all the cytokines tested (not shown). Results are representative of three experiments performed with PB T-cells from three different donors.

Fig. 4. CXCL12-induced costimulation requires CCR5 expression. IFN- γ production in resting (*A*), activated (*B*), CCR5-transfected resting (*C*) or CCR5 Δ 32 activated (*D*) human PB T cells stimulated with beads coated with anti-CD3 mAb in the presence or in the absence of anti-CD28 mAb, CXCL12 or CCL5. For each cell type, the expression of CCR5, as analyzed by flow cytometry, is indicated. Results are representative of at least three experiments. * $p < 0.001$ compared with anti-CD3 stimulation.

Fig. 5. Structural model of CXCR4-CCR5 heterodimer. (*A-C*) Cartoon representation of the CXCR4-CCR5 heterodimer. (*A*) Side view of the complex. CCR5 and CXCR4 are light blue and yellow respectively. Ile52 and Val150 in CCR5, whose mutations impair dimerization, and their counterpart in CXCR4 (Ile60 and Val160) are represented in sticks. (*B*, *C*) Open book representation of the CCR5 (*B*) and CXCR4 (*C*) heterodimer interface. The protein cartoons are colored by sequence going from red (N-terminal) to blue (C-terminal). The solvent accessible surface of the molecules is shown and the same residues presented in (*A*) are shown in space-filling representation. (*D*) Protein-protein interface data.

Fig. 6. Constitutive association between CXCR4 and CCR5 at the plasma membrane. (*A*) BRET saturation curves obtained by measuring BRET in Jurkat T cells expressing fixed quantities of BRET donor (CCR5-Rluc) and increasing amounts of BRET acceptors (indicated C-terminally YFP-tagged GPCR constructs). Relative amounts of BRET acceptor are expressed as the ratio between the fluorescence of the acceptor over the luciferase activity of the donor. YFP $^{\circ}$ corresponds to background fluorescence in cells expressing the BRET donor alone. BRET-ratio values were from 18 individual transfections grouped as a function of the amount of BRET acceptor. (*B*) Co-modulation of CXCR4 and CCR5. CCR5 $^{+}$ CXCR4 $^{+}$ Jurkat cells were incubated with 100 ng ml $^{-1}$ PMA, 25 nM CXCL12 or 50 nM CCL5 for 90 min at 37°C. The graph shows the mean

fluorescence intensity (MFI) for treated cells as a proportion of the MFI for untreated cells at the indicated times. In each panel, data points represent mean (\pm SE) of triplicates.

Fig. 1

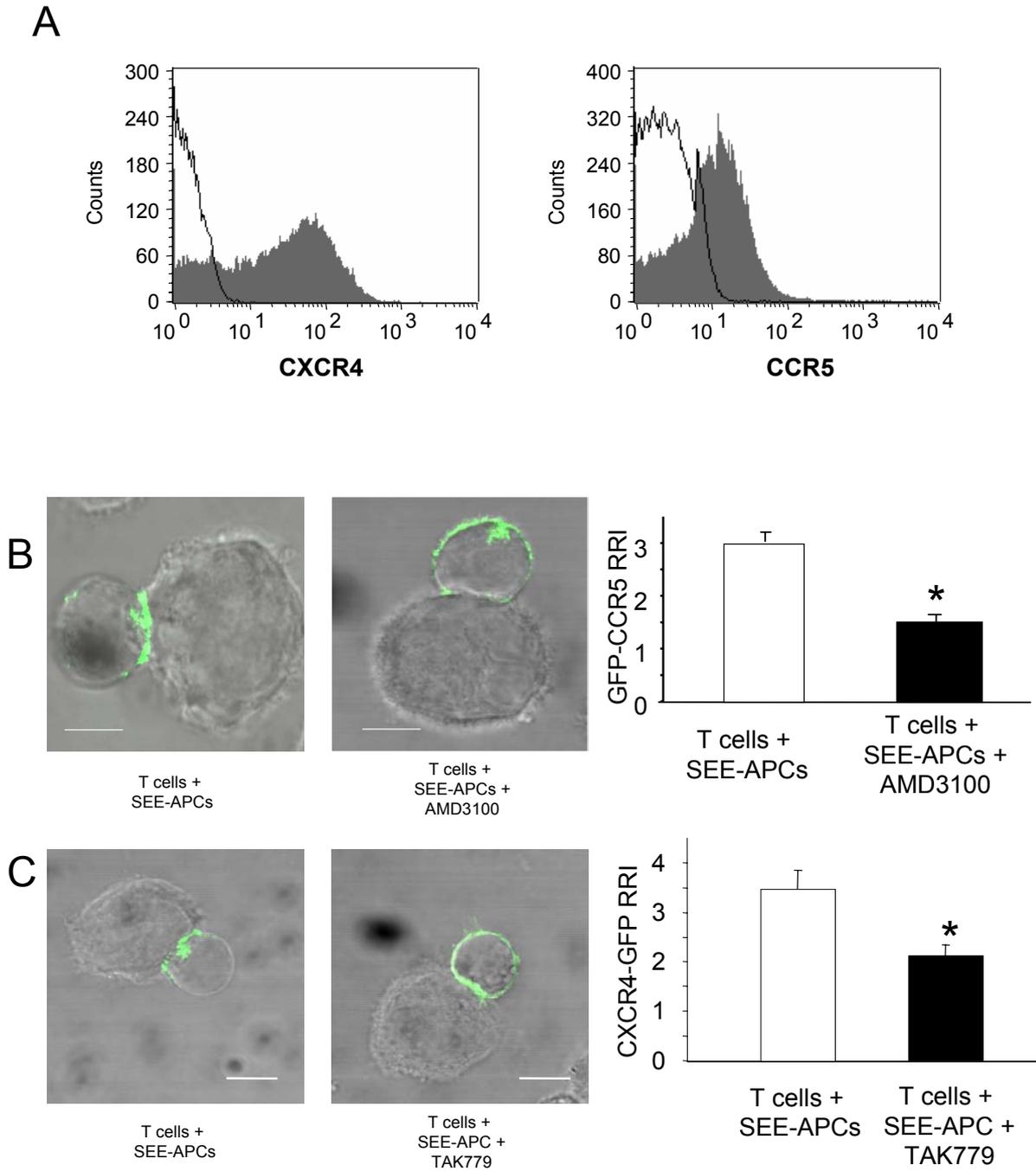


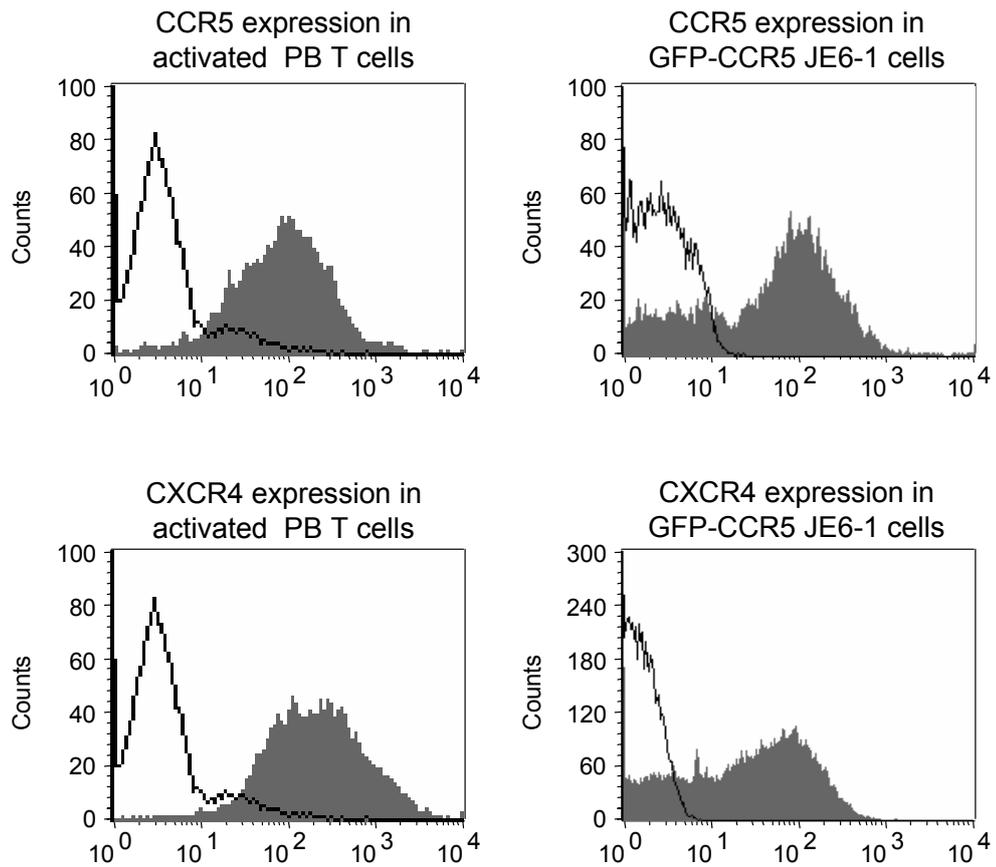
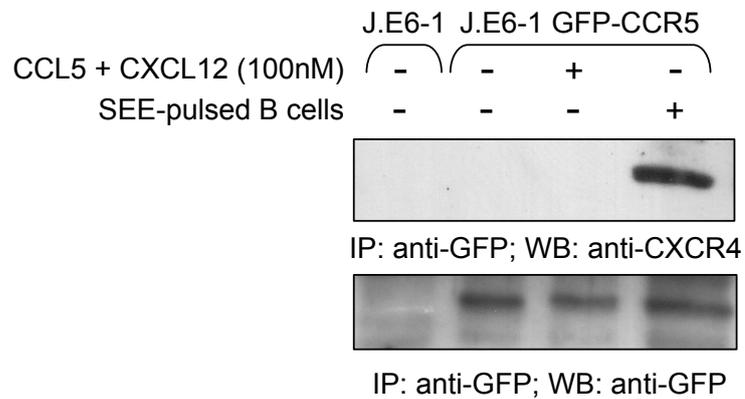
Fig.2**A****B**

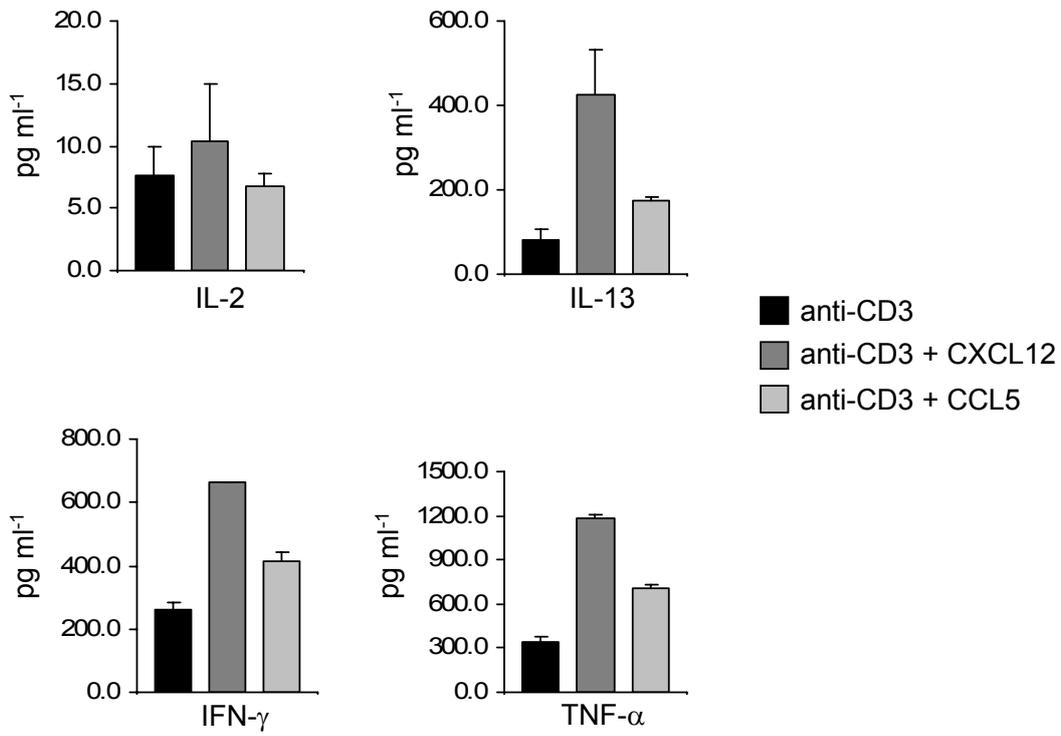
Fig. 3

Fig. 4

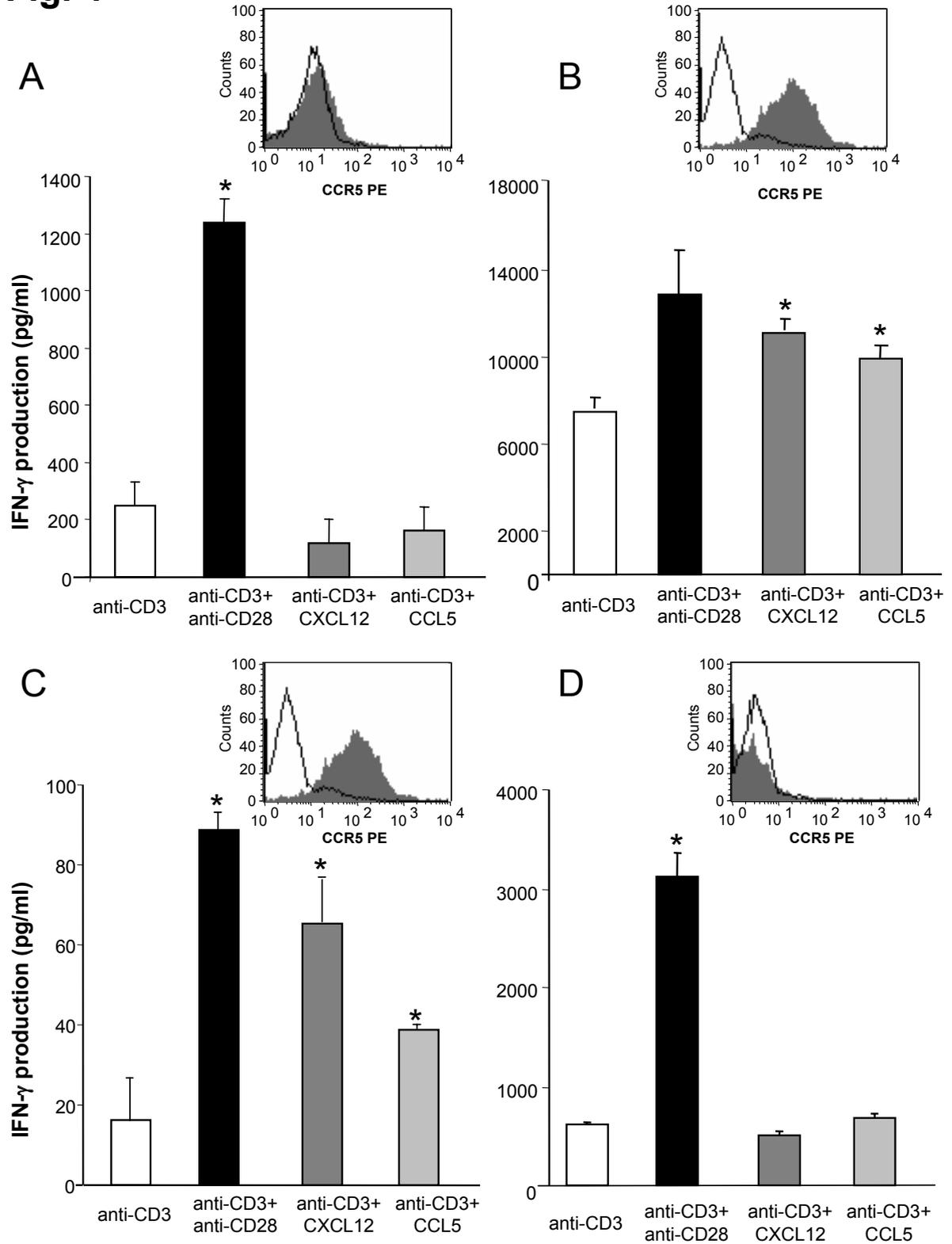
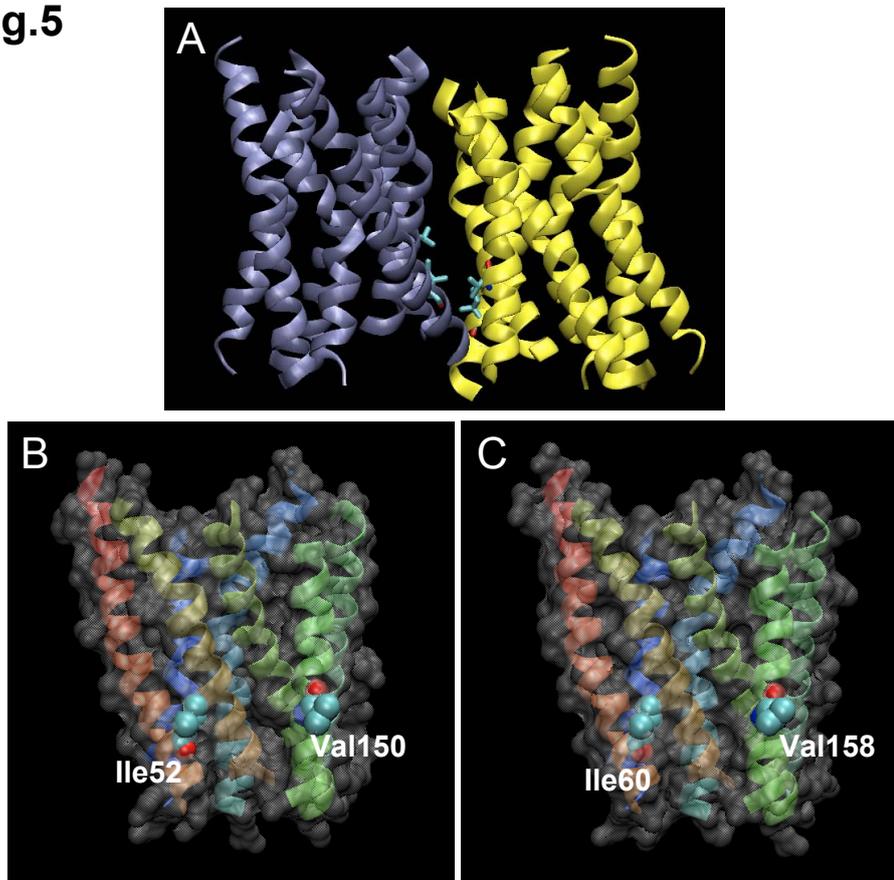


Fig.5



D

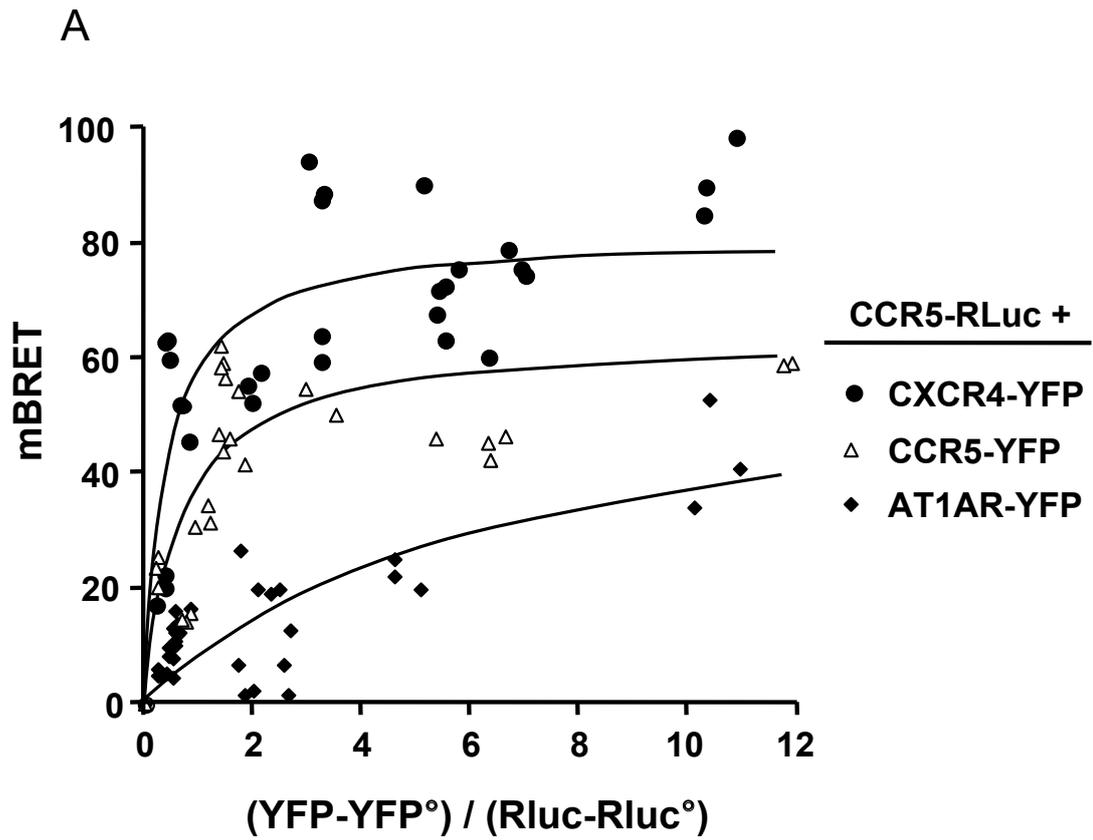
	CCR5 Homodimer	CXCR4 Homodimer	CXCR4-CCR5 Heterodimer
ASA [\AA^2] ^a	1472-1432	1488-1488	1377-1438
% ASA ^b	12-12	12-12	11-12
% Polar Atoms at the interface ^c	16-17	14-16	16-16

^a Accessible Surface Area (ASA) at the protein-protein interfaces.

^b Percent of the ASA at the interface respect to the total protein surfaces.

^c Percent of the polar atoms calculated over the total number of atoms within the interface.

Fig.6

B

cell surface expression(%)

time (min)

- ◆- CCR5/CXCL12
- CCR5/PMA
- ▲- CCR5/CCL5
- CXCR4/PMA

Discussione

I cambiamenti molecolari che la cellula T richiede per scegliere una singola APC, fermarsi e organizzare una SI matura sono ancora in gran parte oscuri, ma la loro decifrazione permetterebbe di capire come segnali analogici raccolti alla SI siano convertiti in un segnale simil-digitale che determina la scelta tra tolleranza e attivazione.

In questo processo un ruolo fondamentale è svolto dalle molecole di costimolazione.

Il CD28, tramite un processo specifico, selettivo e attivo, mediato cioè da una precisa via di trasduzione del segnale, recluta alla SI i *rafts* e le molecole del *signaling* associate ad essi. In questo modo il CD28 esplica la propria azione costimolatoria: concorre a creare un ambiente protetto e selettivo a livello della SI, regione di membrana dinamica e specializzata, concentrando nel sito appropriato elementi importanti per amplificare il segnale del TCR e determinare l'attivazione linfocitaria, permettendo una risposta efficace anche a concentrazioni antigeniche limitanti (Tavano *et al.*, 2004).

In questo studio è stato dimostrato che il CD28 lega la FLNa e la recluta alla SI; i dettagli molecolari dell'interazione tra CD28 e FLNa sono ancora da chiarire, ma i dati indicano che la FLNa può legarsi direttamente al CD28 e che tale associazione è stabilizzata dall'ingaggio del CD28. Quindi la stimolazione del CD28 induce attivazione di Vav-1 e associazione del corecettore con la FLNa; a sua volta la FLNa ha inoltre un ruolo diretto nel *signaling* del CD28 perché associa Cdc42 reclutandolo al sito di attivazione del suo scambiatore nucleotidico, Vav-1. Una volta attivato, Cdc42 lega WASp e ne determina un cambiamento conformazionale necessario per avviare tramite Arp2/3 la polimerizzazione actinica, in una rete la cui architettura risente dell'interazione con la FLNa. La FLNa infatti può cooperare con il complesso Arp2/3 nel definire e stabilizzare la struttura actinica. È stato proposto che i collegamenti tra i filamenti actinici che sono formati grazie il complesso Arp2/3 sono metastabili e dissociano, mentre le interazioni tra FLNa e filamenti actinici sono robuste e durano più a lungo (Stossel *et al.*, 2001).

È interessante che le mutazioni nel dominio prolinico della coda citoplasmatica del CD28 che inficiano il reclutamento dei *rafts* alla SI (Tavano *et al.*, 2004) inficiano anche l'interazione tra CD28 e FLNa e il reclutamento in SI della FLNa stessa e quindi l'attivazione di Cdc42 e la stabilizzazione dell'actina polimerizzata. Il silenziamento della FLNa tramite siRNA induce difetti nella mobilizzazione dei *rafts* e di Lck indotta dal CD28, indicando che il CD28 usa la

FLNa per integrare vie di trasduzione del segnale che portano al legame crociato dell'actina e alla mobilitazione dei *rafts*.

Questi dati indicano che la FLNa stabilizza e forma legami crociati con i filamenti di actina a livello della SI, portando così al reclutamento dei *rafts*. Quindi la doppia stimolazione TCR/CD28 induce polimerizzazione actinica attraverso WASp e il complesso Arp2/3 e allo stesso tempo stabilizza i filamenti actinici attraverso la FLNa. Solo l'ingaggio del CD28 recluta la FLNa, apportando alla SI l'elemento in più necessario per una differenza qualitativa nella rete actinica. I riarrangiamenti citoscheletrici mediati dal CD28 e dalla FLNa favoriscono la compartimentalizzazione dei *rafts* sulla membrana cellulare, accumulando così i mediatori del *signaling* alla SI.

In futuro bisognerà caratterizzare meglio l'associazione tra CD28 e FLNa, chiarendo il meccanismo tramite il quale il CD28 si associa alla FLNa, e studiare le altre proteine coinvolte nel *signaling* del CD28 a valle della FLNa. Inoltre sarebbe anche interessante capire quale sia il ruolo del ligando del CD28 nelle funzioni del CD28 alla SI, confrontando la molecola B7.2 al B7.1 finora utilizzato.

In ogni caso, il fatto che il reclutamento dei *rafts* indotto da CD28 dipenda dall'interazione tra CD28 e FLNa, proteina che lega l'actina e può supportare a livello del sito di attivazione linfocitaria l'ancoraggio all'actina di proteine transmembrana come il CD28, fornisce una connessione molecolare tra il citoscheletro actinico e le proteine transmembrana nei domini *rafts* delle membrane cellulari (Harder *et al.*, 2007).

Si rafforza quindi l'idea di un circolo virtuoso tra *rafts* di membrana e citoscheletro actinico durante l'attivazione linfocitaria. Da una parte, i *rafts* contengono elementi che regolano i riarrangiamenti actinici, come proteine leganti l'actina e il PIP(4,5)₂ (che regola l'attività di Rac e Cdc42 ed è generato in dipendenza della quantità di colesterolo nella membrana (Golub & Pico, 2005)); dall'altra il citoscheletro actinico partecipa nell'indurre e sostenere la polarizzazione dei *rafts* nelle cellule attivate (Viola & Gupta, 2007). La distruzione dei filamenti di actina fa completamente regredire la condensazione di membrana indotta dall'attivazione linfocitaria al sito stesso di attivazione; il fatto che la condensazione della membrana nei siti di attivazione linfocitaria dipenda dai filamenti di actina può derivare dalla immobilizzazione e dal *clustering* delle proteine di membrana per effetto dell'actina (Gaus *et al.*, 2005). Inoltre c'è frequente colocalizzazione dei microdomini lipidici con le protrusioni ricche di actina (Gaus *et al.*, 2003) e con le adesioni focali (Gaus *et al.*, 2006; Proszynski *et al.*, 2006); ed è stato suggerito che il legame crociato di proteine-GPI possa indurre

microdomini lipidici per il transiente ancoraggio dei *clusters* al citoscheletro tramite selettive proteine transmembrana e adattatori citoscheletrici (Chen *et al.*, 2006).

Una interazione diretta dei domini di membrana con i filamenti di actina è stata osservata con la microscopia elettronica nei foglietti di membrana delle cellule T (Lillemeier *et al.*, 2006); queste immagini mostrano un forte accumulo di filamenti actinici nei domini di membrana ricchi di proteine. La depolimerizzazione farmacologica dell'actina riduce il numero di domini ricchi di proteine ma non abolisce il *clustering* di sonde di membrana dotate di ancore lipidiche in domini *rafts* o non-*rafts*, suggerendo una complessa rete di interazioni tra domini di membrana e citoscheletro actinico (Harder *et al.*, 2007).

In assenza di mezzi per manipolare i *rafts* senza alterare la fisiologia della cellula T, l'ipotesi che le molecole costimolatorie usino i *rafts* per amplificare il segnale del TCR e facilitare l'attivazione linfocitaria non può essere definitivamente esplorata. In ogni caso, la dimostrazione che il CD28 richiede la FLNa per reclutare i *rafts* alla SI offre la possibilità di studiare il ruolo dei microdomini di membrana durante l'attivazione linfocitaria. Nelle cellule T in cui l'espressione della FLNa è ridotta, la mobilitazione dei *rafts* e la costimolazione da CD28 vengono meno. È importante notare che in queste cellule le risposte indotte dal complesso TCR-CD3 non sono alterate, confermando che il silenziamento della FLNa intacca specificatamente la costimolazione.

Il nostro studio, assieme alle evidenze ottenute con i più evoluti approcci tecnologici e con lo studio dei leucociti durante il processo di migrazione, permette di proporre il seguente modello: i *rafts* nelle cellule a riposo sono domini di membrana molto piccoli e dinamici, ma in seguito ad uno stimolo che induca la polarizzazione linfocitaria (come l'APC o le chemochine), essi vengono condensati al sito di attivazione della cellula e, grazie all'ancoraggio al citoscheletro actinico, formano domini altamente ordinati e stabilizzati, costituendo quindi una piattaforma per il completo assemblaggio del complesso di *signaling* (Harder *et al.*, 2007; Viola & Gupta, 2007).

Tra le molecole costimolatorie solo di recente sono state annoverate anche le chemochine: in seguito alla produzione da parte dell'APC dei rispettivi ligandi, i recettori chemochinici CXCR4 e CCR5 espressi dalla cellula T vengono reclutati alla SI, si associano a G_q, rafforzano l'interazione tra cellula T e APC e favoriscono l'attivazione linfocitaria, mentre classicamente si associano a G_i e inducono migrazione cellulare (Molon *et al.*, 2005).

In questo studio è stato dimostrato che, contrariamente alla funzione chemotattica, la funzione costimolatoria richiede la collaborazione funzionale tra CXCR4 e CCR5, infatti i due recettori devono essere co-reclutati alla SI e devono essere co-espressi dalla cellula T per costimolare la produzione di citochine. È stato inoltre dimostrato che questi recettori quando co-espressi formano costitutivamente dei complessi del tipo etero-dimeri o etero-oligomeri. Quindi gli eterodimeri di CXCR4 e CCR5 sono costitutivamente espressi dalle cellule T e partecipano alla attivazione linfocitaria trasducendo segnali costimolatori alla SI.

Considerando che sia per CCR5 che per CXCR4 è stata dimostrata la formazione di omodimeri che si associano a G_i a mediare la funzione chemotattica (Rodriguez-Frade *et al.*, 1999; Vila-Coro *et al.*, 1999) e che la formazione di omodimeri e eterodimeri è un meccanismo noto per la modulazione del *signaling* dei GPCR (Rodriguez-Frade *et al.*, 2001; Bulenger *et al.*, 2005; Prinster *et al.*, 2005; Springael *et al.*, 2006), si può formulare un modello secondo cui CXCR4 e CCR5, quando co-espressi, si trovano in un situazione di equilibrio dinamico tra omodimeri associati a G_i con funzione chemotattica e eterodimeri associati a G_q con funzione costimolatoria. L'eterodimerizzazione rappresenta dunque la strategia usata da questi recettori per avere la versatilità funzionale e di *signaling* necessaria a mediare effetti biologici tra loro opposti come la migrazione e la costimolazione.

In realtà i nostri dati sono compatibili sia con un modello di eterodimerizzazione con rapporto 1:1 tra CXCR4 e CCR5, sia di etero-oligomerizzazione con rapporto per esempio 2:2, cioè con l'ipotesi che omodimeri di recettori diversi si associno tra loro in un complesso con caratteristiche di *signaling* peculiari. La distinzione formale tra queste due ipotesi può rappresentare uno dei passi successivi di questo progetto, anche se è resa estremamente difficile dal punto di vista tecnico per il fatto che probabilmente, come evidenziato dal modello molecolare, i residui coinvolti nella eterodimerizzazione sono gli stessi richiesti per l'omodimerizzazione, per cui è impossibile usare specifici mutanti per dirimere il problema.

Qualunque delle due ipotesi risultasse vera, sussiste la dimostrazione della rilevanza biologica dell'interazione tra CXCR4 e CCR5, in quanto la co-espressione di CXCR4 e CCR5 è condizione necessaria e sufficiente per il reclutamento dei recettori alla SI e la costimolazione mediata dalle chemochine loro ligandi. Il complesso multimerico formato dai due recettori ha peculiari proprietà di *signaling* e di effetto biologico, che non possono essere spiegati dalla mera aggregazione di omodimeri di CXCR4 e di CCR5 negli stessi domini di membrana.

L'osservazione che il segnale di BRET (trasferimento di energia per risonanza dovuta a bioluminescenza) non viene modificato dalla stimolazione con le APC, situazione che invece

aumenta marcatamente l'interazione tra CXCR4 e CCR5 nell'esperimento di co-immunoprecipitazione, suggerisce che i due recettori siano già in stretta prossimità nelle cellule a riposo e vengano stabilizzati in un complesso a livello della SI, che diventa così rilevabile anche dalla tecnica biochimica meno sensibile (Hernanz-Falcon *et al.*, 2004).

D'altra parte la scarsa sensibilità dell'approccio biochimico nello studio dell'interazione tra CXCR4-CCR5 è confermata dai due lavori che in precedenza hanno negato l'esistenza dell'eterodimero CXCR4-CCR5 utilizzando tale approccio (Rodriguez-Frade *et al.*, 1999; Babcock *et al.*, 2003); bisogna però considerare che in questi lavori sono state impiegate cellule HEK invece che linfociti e quindi non è stato possibile stimolare le cellule con APC, condizione che secondo i nostri dati stabilizza il complesso rendendolo apprezzabile anche biochimicamente.

Sodroski e colleghi hanno utilizzato anche la tecnica del BRET per studiare la formazione di eterodimeri CXCR4-CCR5, così come hanno fatto Marullo e colleghi. I due gruppi hanno ottenuto risultati sovrapponibili: la coppia CXCR4-CCR5 dà valori di BRET superiori al controllo costituito dal solo donatore, ma inferiori alle coppie di interesse degli studi (nello specifico CXCR4-CXCR4 e CCR5-CCR5). Gli autori argomentano che il valore di BRET tra CXCR4 e CCR5 non è indice di vera interazione perché troppo basso (Issafras *et al.*, 2002) o perché simile a quello ottenuto tra due recettori troppo lontanamente correlati per poter formare dimeri (CXCR4 e CCR5 con il recettore per il frammento del complemento C5a) (Babcock *et al.*, 2003). Entrambi gli studi però seguono criteri di BRET allora consolidati ma oggi considerati insufficienti (Marullo & Bouvier, 2007); in particolare non è stata analizzata la cinetica del BRET in esperimenti di titolazione a concentrazione costante del donatore e crescente dell'accettore: un BRET specifico si caratterizza per una curva di crescita con saturazione iperbolica. Negli studi in questione questo tipo di analisi avrebbe permesso di apprezzare se valori non molto alti di BRET rappresentano comunque un BRET specifico e avrebbe potuto rendere consistente qualsiasi confronto tra le coppie CXCR4-CCR5 e CXCR4-C5aR e CCR5-C5aR.

Recentemente è stato suggerito che CXCL12 in soluzione induce l'associazione di CXCR4 con il TCR e aumenta l'espressione di IL-2 e IL-10 in cellule T stimulate con anticorpi anti-CD3 adesi ad una piastra (Kumar *et al.*, 2006). Nei nostri esperimenti, il CXCR4 non viene reclutato e non costimola in assenza del CCR5, anche se le APC secernono CXCL12, suggerendo che in un contesto fisiologico di presentazione dell'antigene e della chemochina, il CXCR4 non si associa al TCR. Inoltre le differenze riscontrate nel *pattern* di citochine

prodotte possono essere spiegate dal diverso protocollo usato: infatti l'anticorpo anti-CD3 immobilizzato su piastra fornisce un segnale molto forte alle cellule T e in queste condizioni probabilmente le chemochine in soluzione agiscono sulle cellule in modo molto diverso dalle chemochine legate alle membrane cellulari (Friedman *et al.*, 2006) o immobilizzate sulla stessa biglia con l'anticorpo anti-CD3 come nel nostro protocollo.

Chiaramente la domanda cruciale è quando la cooperazione tra CXCR4 e CCR5 avvenga e come influenzi le risposte linfocitarie *in vivo*.

Mentre il CXCR4 è costitutivamente espresso nelle cellule T, l'espressione del CCR5 è ristretta alle cellule T attivate. Si potrebbe quindi pensare che la costimolazione mediata da chemochine avvenga solo in periferia, plausibilmente nei tessuti infiammati, e non influenzi il *priming* nei linfonodi. È stato però dimostrato che l'infiammazione induce l'espressione del CCR5 nelle cellule T CD8⁺ *naive*, permettendone il reclutamento nei siti di interazione tra DC e linfociti T CD4⁺ dove vengono prodotti i ligandi del CCR5 (Castellino *et al.*, 2006). Questa riunione orchestrata dalle chemochine sembra fondamentale per lo sviluppo delle cellule T CD8⁺ della memoria a lungo termine, e si può speculare che l'espressione del CCR5 abbia un ruolo non solo nel reclutare le cellule, ma anche nel costimolarle per un *priming* efficiente.

Anche se le persone portatrici della mutazione CCR5Δ32 sono apparentemente sane, d'altra parte è noto che il CCR5 è importante per il controllo di alcune infezioni, come ad esempio quella da West Nile virus, un patogeno riemergente per può causare encefaliti fatali (Glass *et al.*, 2005). Anche in questo caso si può pensare che la più alta incidenza di tale patologia negli individui con la mutazione CCR5Δ32 sia dovuta al ruolo del CCR5 non solo nel reclutare i linfociti, ma anche nel costimolarli (Molon *et al.*, 2005).

Se da un lato la costimolazione mediata dal complesso CXCR4-CCR5 può essere utile nella lotta ai patogeni, dall'altro può amplificare le risposte linfocitarie nell'infiammazione cronica. Il polimorfismo CCR5Δ32 è infatti stato identificato come un marcatore inversamente correlato con la severità dell'artrite reumatoide (Zapico *et al.*, 2000), e diverse evidenze indicano che entrambi i recettori hanno un ruolo nell'autoimmunità (Viola & Luster, 2008).

La differenziazione della funzione chemotattica da quella costimolatoria delle chemochine e dei loro meccanismi di *signaling* potrebbe rappresentare un punto di partenza ideale per lo sviluppo di nuovi farmaci contro le malattie autoimmuni, rispettando però la ricircolazione omeostatica dei linfociti.

Il CXCR4 e il CCR5 inoltre sono i corecettori per l'entrata del virus dell'HIV nelle cellule umane. Quasi tutti i casi di trasmissione dell'HIV-1 coinvolgono ceppi che sfruttano il CCR5

per l'infezione (virus R5), ma dopo mediamente cinque anni, in fino al 50% degli infetti diventano predominanti virus che usano il CXCR4 (virus R5X4 o X4). Questi diversi ceppi virali hanno diverse caratteristiche: attivano diverse vie di *signaling* e diversi profili di espressione genica nelle cellule infettate e hanno diverse proprietà biologiche, quali la capacità di indurre sincizi e il tasso di replicazione; inoltre i virus X4 sono associati ad una malattia a decorso più rapido con un tasso accelerato di riduzione dei linfociti CD4⁺ (de Roda Husman & Schuitemaker, 1998; Locher *et al.*, 2005; Cicala *et al.*, 2006). Capire il diverso comportamento dei due ceppi virali, a partire dalle modalità e dalle conseguenze della loro interazione con i corecettori CXCR4 e CCR5, aiuterebbe molto nella lotta contro l'HIV. La dimostrazione dell'esistenza di eterodimeri tra CXCR4 e CCR5 apre nuove ipotesi nello studio della patogenesi dell'HIV. Per prima cosa bisognerà capire se l'eterodimero permette l'entrata del virus ed eventualmente con che effetti biologici, dato che il *signaling* a valle dell'eterodimero è marcatamente diverso da quello a valle dell'omodimero.

In conclusione, questo studio ha dimostrato la cooperazione funzionale tra CXCR4 e CCR5 nella modulazione delle risposte linfocitarie, identificando un nuovo meccanismo molecolare cruciale per la versatilità dei recettori chemochinici, e una nuova coppia di recettori chemochinici che può rappresentare un buon bersaglio per la ricerca farmacologica.

Tramite l'identificazione di una connessione molecolare tra recettore, domini di membrana e citoscheletro e l'identificazione di un esempio di versatilità recettoriale su base molecolare, questo studio dei meccanismi di costimolazione ha messo in evidenza come la trasmissione delle informazioni alla SI sia un processo estremamente complesso, integrato e dinamico. Infatti, da una parte il *pattern* di molecole costimolatorie espresse dall'APC, essendo dipendente dall'ambiente in cui l'APC matura, rappresenta il risultato delle molteplici strategie che l'APC mette in atto per codificare un'informazione completa del quadro fisiopatologico in corso; dall'altra il linfocita T decodifica e integra molti segnali provenienti da diverse APC e dal microambiente circostante, prima per trovare il *partner* cellulare migliore, poi per capire quale sia il suo ruolo nel delicato equilibrio tra immunità e tolleranza.

Bibliografia

- Abbas AK, Murphy KM & Sher A. (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* **383**, 787-793.
- Acuto O & Michel F. (2003). CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. *Nat Rev Immunol* **3**, 939-951.
- Anderson RG & Jacobson K. (2002). A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains. *Science* **296**, 1821-1825.
- Andres PG, Howland KC, Dresnek D, Edmondson S, Abbas AK & Krummel MF. (2004). CD28 signals in the immature immunological synapse. *J Immunol* **172**, 5880-5886.
- Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, Maggi L, Liotta F, Mazzinghi B, Parente E, Fili L, Ferri S, Frosali F, Giudici F, Romagnani P, Parronchi P, Tonelli F, Maggi E & Romagnani S. (2007). Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med* **204**, 1849-1861.
- Anton van der Merwe P, Davis SJ, Shaw AS & Dustin ML. (2000). Cytoskeletal polarization and redistribution of cell-surface molecules during T cell antigen recognition. *Semin Immunol* **12**, 5-21.
- Babcock GJ, Farzan M & Sodroski J. (2003). Ligand-independent dimerization of CXCR4, a principal HIV-1 coreceptor. *J Biol Chem* **278**, 3378-3385.
- Bajenoff M, Egen JG, Koo LY, Laugier JP, Brau F, Glaichenhaus N & Germain RN. (2006). Stromal cell networks regulate lymphocyte entry, migration, and territoriality in lymph nodes. *Immunity* **25**, 989-1001.
- Bar-Sagi D & Hall A. (2000). Ras and Rho GTPases: a family reunion. *Cell* **103**, 227-238.
- Benkirane M, Jin DY, Chun RF, Koup RA & Jeang KT. (1997). Mechanism of transdominant inhibition of CCR5-mediated HIV-1 infection by ccr5delta32. *J Biol Chem* **272**, 30603-30606.
- Benvenuti F, Lagaudriere-Gesbert C, Grandjean I, Jancic C, Hivroz C, Trautmann A, Lantz O & Amigorena S. (2004). Dendritic cell maturation controls adhesion, synapse formation, and the duration of the interactions with naive T lymphocytes. *J Immunol* **172**, 292-301.
- Bergman M, Mustelin T, Oetken C, Partanen J, Flint NA, Amrein KE, Autero M, Burn P & Alitalo K. (1992). The human p50csk tyrosine kinase phosphorylates p56lck at Tyr-505 and down regulates its catalytic activity. *Embo J* **11**, 2919-2924.
- Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL & Kuchroo VK. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* **441**, 235-238.

- Bishop AL & Hall A. (2000). Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* **348 Pt 2**, 241-255.
- Bleul CC & Boehm T. (2000). Chemokines define distinct microenvironments in the developing thymus. *Eur J Immunol* **30**, 3371-3379.
- Bonecchi R, Bianchi G, Bordignon PP, D'Ambrosio D, Lang R, Borsatti A, Sozzani S, Allavena P, Gray PA, Mantovani A & Sinigaglia F. (1998). Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J Exp Med* **187**, 129-134.
- Bono MR, Elgueta R, Sauma D, Pino K, Osorio F, Michea P, Fierro A & Roseblatt M. (2007). The essential role of chemokines in the selective regulation of lymphocyte homing. *Cytokine Growth Factor Rev* **18**, 33-43.
- Boring L, Gosling J, Chensue SW, Kunkel SL, Farese RV, Jr., Broxmeyer HE & Charo IF. (1997). Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in C-C chemokine receptor 2 knockout mice. *J Clin Invest* **100**, 2552-2561.
- Boss V, Talpade DJ & Murphy TJ. (1996). Induction of NFAT-mediated transcription by Gq-coupled receptors in lymphoid and non-lymphoid cells. *J Biol Chem* **271**, 10429-10432.
- Braun MC, Lahey E & Kelsall BL. (2000). Selective suppression of IL-12 production by chemoattractants. *J Immunol* **164**, 3009-3017.
- Brdicka T, Cerny J & Horejsi V. (1998). T cell receptor signalling results in rapid tyrosine phosphorylation of the linker protein LAT present in detergent-resistant membrane microdomains. *Biochem Biophys Res Commun* **248**, 356-360.
- Bretscher PA. (1999). A two-step, two-signal model for the primary activation of precursor helper T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 185-190.
- Bromley SK, Iaboni A, Davis SJ, Whitty A, Green JM, Shaw AS, Weiss A & Dustin ML. (2001). The immunological synapse and CD28-CD80 interactions. *Nat Immunol* **2**, 1159-1166.
- Bromley SK, Peterson DA, Gunn MD & Dustin ML. (2000). Cutting edge: hierarchy of chemokine receptor and TCR signals regulating T cell migration and proliferation. *J Immunol* **165**, 15-19.
- Brossard C, Feuillet V, Schmitt A, Randriamampita C, Romao M, Raposo G & Trautmann A. (2005). Multifocal structure of the T cell - dendritic cell synapse. *Eur J Immunol* **35**, 1741-1753.
- Brown DA & London E. (1998). Structure and origin of ordered lipid domains in biological membranes. *J Membr Biol* **164**, 103-114.

- Brown DA & Rose JK. (1992). Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* **68**, 533-544.
- Broxmeyer HE, Orschell CM, Clapp DW, Hangoc G, Cooper S, Plett PA, Liles WC, Li X, Graham-Evans B, Campbell TB, Calandra G, Bridger G, Dale DC & Srouf EF. (2005). Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist. *J Exp Med* **201**, 1307-1318.
- Bulenger S, Marullo S & Bouvier M. (2005). Emerging role of homo- and heterodimerization in G-protein-coupled receptor biosynthesis and maturation. *Trends Pharmacol Sci* **26**, 131-137.
- Bunnell SC, Diehn M, Yaffe MB, Findell PR, Cantley LC & Berg LJ. (2000). Biochemical interactions integrating Itk with the T cell receptor-initiated signaling cascade. *J Biol Chem* **275**, 2219-2230.
- Burack WR, Lee KH, Holdorf AD, Dustin ML & Shaw AS. (2002). Cutting edge: quantitative imaging of raft accumulation in the immunological synapse. *J Immunol* **169**, 2837-2841.
- Calderwood DA, Huttenlocher A, Kiosses WB, Rose DM, Woodside DG, Schwartz MA & Ginsberg MH. (2001). Increased filamin binding to beta-integrin cytoplasmic domains inhibits cell migration. *Nat Cell Biol* **3**, 1060-1068.
- Casey PJ. (1995). Protein lipidation in cell signaling. *Science* **268**, 221-225.
- Castellino F, Huang AY, Altan-Bonnet G, Stoll S, Scheinecker C & Germain RN. (2006). Chemokines enhance immunity by guiding naive CD8+ T cells to sites of CD4+ T cell-dendritic cell interaction. *Nature* **440**, 890-895.
- Chen Y, Thelin WR, Yang B, Milgram SL & Jacobson K. (2006). Transient anchorage of cross-linked glycosyl-phosphatidylinositol-anchored proteins depends on cholesterol, Src family kinases, caveolin, and phosphoinositides. *J Cell Biol* **175**, 169-178.
- Cicala C, Arthos J, Martinelli E, Censoplano N, Cruz CC, Chung E, Selig SM, Van Ryk D, Yang J, Jagannatha S, Chun TW, Ren P, Lempicki RA & Fauci AS. (2006). R5 and X4 HIV envelopes induce distinct gene expression profiles in primary peripheral blood mononuclear cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 3746-3751.
- Cinek T & Horejsi V. (1992). The nature of large noncovalent complexes containing glycosyl-phosphatidylinositol-anchored membrane glycoproteins and protein tyrosine kinases. *J Immunol* **149**, 2262-2270.
- Constantin G, Majeed M, Giagulli C, Piccio L, Kim JY, Butcher EC & Laudanna C. (2000). Chemokines trigger immediate beta2 integrin affinity and mobility changes: differential regulation and roles in lymphocyte arrest under flow. *Immunity* **13**, 759-769.

- Croft M. (1994). Activation of naive, memory and effector T cells. *Curr Opin Immunol* **6**, 431-437.
- D'Ambrosio D, Iellem A, Bonocchi R, Mazzeo D, Sozzani S, Mantovani A & Sinigaglia F. (1998). Selective up-regulation of chemokine receptors CCR4 and CCR8 upon activation of polarized human type 2 Th cells. *J Immunol* **161**, 5111-5115.
- de Roda Husman AM & Schuitemaker H. (1998). Chemokine receptors and the clinical course of HIV-1 infection. *Trends Microbiol* **6**, 244-249.
- del Pozo MA, Nieto M, Serrador JM, Sancho D, Vicente-Manzanares M, Martinez C & Sanchez-Madrid F. (1998). The two poles of the lymphocyte: specialized cell compartments for migration and recruitment. *Cell Adhes Commun* **6**, 125-133.
- Dietrich C, Yang B, Fujiwara T, Kusumi A & Jacobson K. (2002). Relationship of lipid rafts to transient confinement zones detected by single particle tracking. *Biophys J* **82**, 274-284.
- Douglass AD & Vale RD. (2005). Single-molecule microscopy reveals plasma membrane microdomains created by protein-protein networks that exclude or trap signaling molecules in T cells. *Cell* **121**, 937-950.
- Dower NA, Stang SL, Bottorff DA, Ebinu JO, Dickie P, Ostergaard HL & Stone JC. (2000). RasGRP is essential for mouse thymocyte differentiation and TCR signaling. *Nat Immunol* **1**, 317-321.
- Dupre L, Aiuti A, Trifari S, Martino S, Saracco P, Bordignon C & Roncarolo MG. (2002). Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates lipid raft dynamics during immunological synapse formation. *Immunity* **17**, 157-166.
- Dustin ML. (2004). Stop and go traffic to tune T cell responses. *Immunity* **21**, 305-314.
- Dustin ML & Cooper JA. (2000). The immunological synapse and the actin cytoskeleton: molecular hardware for T cell signaling. *Nat Immunol* **1**, 23-29.
- Dustin ML & Shaw AS. (1999). Costimulation: building an immunological synapse. *Science* **283**, 649-650.
- Dustin ML, Tseng SY, Varma R & Campi G. (2006). T cell-dendritic cell immunological synapses. *Curr Opin Immunol* **18**, 512-516.
- Dykstra M, Cherukuri A, Sohn HW, Tzeng SJ & Pierce SK. (2003). Location is everything: lipid rafts and immune cell signaling. *Annu Rev Immunol* **21**, 457-481.
- Edidin M. (2003). The state of lipid rafts: from model membranes to cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **32**, 257-283.

- El-Asmar L, Springael JY, Ballet S, Andrieu EU, Vassart G & Parmentier M. (2005). Evidence for negative binding cooperativity within CCR5-CCR2b heterodimers. *Mol Pharmacol* **67**, 460-469.
- Faroudi M, Zaru R, Paulet P, Muller S & Valitutti S. (2003). Cutting edge: T lymphocyte activation by repeated immunological synapse formation and intermittent signaling. *J Immunol* **171**, 1128-1132.
- Feng Y & Walsh CA. (2004). The many faces of filamin: a versatile molecular scaffold for cell motility and signalling. *Nat Cell Biol* **6**, 1034-1038.
- Fischer KD, Kong YY, Nishina H, Tedford K, Marengere LE, Kozieradzki I, Sasaki T, Starr M, Chan G, Gardener S, Nghiem MP, Bouchard D, Barbacid M, Bernstein A & Penninger JM. (1998). Vav is a regulator of cytoskeletal reorganization mediated by the T-cell receptor. *Curr Biol* **8**, 554-562.
- Forster R, Schubel A, Breitfeld D, Kremmer E, Renner-Muller I, Wolf E & Lipp M. (1999). CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* **99**, 23-33.
- Freiberg BA, Kupfer H, Maslanik W, Delli J, Kappler J, Zaller DM & Kupfer A. (2002). Staging and resetting T cell activation in SMACs. *Nat Immunol* **3**, 911-917.
- Friedl P, den Boer AT & Gunzer M. (2005). Tuning immune responses: diversity and adaptation of the immunological synapse. *Nat Rev Immunol* **5**, 532-545.
- Friedman RS, Jacobelli J & Krummel MF. (2006). Surface-bound chemokines capture and prime T cells for synapse formation. *Nat Immunol* **7**, 1101-1108.
- Fukada K, Sobao Y, Tomiyama H, Oka S & Takiguchi M. (2002). Functional expression of the chemokine receptor CCR5 on virus epitope-specific memory and effector CD8+ T cells. *J Immunol* **168**, 2225-2232.
- Garnett D, Barclay AN, Carmo AM & Beyers AD. (1993). The association of the protein tyrosine kinases p56lck and p60fyn with the glycosyl phosphatidylinositol-anchored proteins Thy-1 and CD48 in rat thymocytes is dependent on the state of cellular activation. *Eur J Immunol* **23**, 2540-2544.
- Gaus K, Chklovskaja E, Fazekas de St Groth B, Jessup W & Harder T. (2005). Condensation of the plasma membrane at the site of T lymphocyte activation. *J Cell Biol* **171**, 121-131.
- Gaus K, Gratton E, Kable EP, Jones AS, Gelissen I, Kritharides L & Jessup W. (2003). Visualizing lipid structure and raft domains in living cells with two-photon microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 15554-15559.
- Gaus K, Le Lay S, Balasubramanian N & Schwartz MA. (2006). Integrin-mediated adhesion regulates membrane order. *J Cell Biol* **174**, 725-734.

- Gil D, Schamel WW, Montoya M, Sanchez-Madrid F & Alarcon B. (2002). Recruitment of Nck by CD3 epsilon reveals a ligand-induced conformational change essential for T cell receptor signaling and synapse formation. *Cell* **109**, 901-912.
- Glass WG, Lim JK, Cholera R, Pletnev AG, Gao JL & Murphy PM. (2005). Chemokine receptor CCR5 promotes leukocyte trafficking to the brain and survival in West Nile virus infection. *J Exp Med* **202**, 1087-1098.
- Glebov OO & Nichols BJ. (2004). Lipid raft proteins have a random distribution during localized activation of the T-cell receptor. *Nat Cell Biol* **6**, 238-243.
- Goldman DW, Chang FH, Gifford LA, Goetzl EJ & Bourne HR. (1985). Pertussis toxin inhibition of chemotactic factor-induced calcium mobilization and function in human polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med* **162**, 145-156.
- Goldmann WH. (2001). Phosphorylation of filamin (ABP-280) regulates the binding to the lipid membrane, integrin, and actin. *Cell Biol Int* **25**, 805-808.
- Golub T & Pico C. (2005). Spatial control of actin-based motility through plasmalemmal PtdIns(4,5)P2-rich raft assemblies. *Biochem Soc Symp*, 119-127.
- Gomez-Mouton C, Abad JL, Mira E, Lacalle RA, Gallardo E, Jimenez-Baranda S, Illa I, Bernad A, Manes S & Martinez AC. (2001). Segregation of leading-edge and uropod components into specific lipid rafts during T cell polarization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 9642-9647.
- Gomez-Mouton C, Lacalle RA, Mira E, Jimenez-Baranda S, Barber DF, Carrera AC, Martinez AC & Manes S. (2004). Dynamic redistribution of raft domains as an organizing platform for signaling during cell chemotaxis. *J Cell Biol* **164**, 759-768.
- Graf B, Bushnell T & Miller J. (2007). LFA-1-mediated T cell costimulation through increased localization of TCR/class II complexes to the central supramolecular activation cluster and exclusion of CD45 from the immunological synapse. *J Immunol* **179**, 1616-1624.
- Grakoui A, Bromley SK, Sumen C, Davis MM, Shaw AS, Allen PM & Dustin ML. (1999). The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* **285**, 221-227.
- Grewal IS & Flavell RA. (1996). The role of CD40 ligand in costimulation and T-cell activation. *Immunol Rev* **153**, 85-106.
- Gri G, Molon B, Manes S, Pozzan T & Viola A. (2004). The inner side of T cell lipid rafts. *Immunol Lett* **94**, 247-252.
- Groves JT & Dustin ML. (2003). Supported planar bilayers in studies on immune cell adhesion and communication. *J Immunol Methods* **278**, 19-32.

- Gu L, Tseng S, Horner RM, Tam C, Loda M & Rollins BJ. (2000). Control of TH2 polarization by the chemokine monocyte chemoattractant protein-1. *Nature* **404**, 407-411.
- Guiet C & Vito P. (2000). Caspase recruitment domain (CARD)-dependent cytoplasmic filaments mediate bcl10-induced NF-kappaB activation. *J Cell Biol* **148**, 1131-1140.
- Gulbins E, Coggeshall KM, Baier G, Katzav S, Burn P & Altman A. (1993). Tyrosine kinase-stimulated guanine nucleotide exchange activity of Vav in T cell activation. *Science* **260**, 822-825.
- Hailman E, Burack WR, Shaw AS, Dustin ML & Allen PM. (2002). Immature CD4(+)CD8(+) thymocytes form a multifocal immunological synapse with sustained tyrosine phosphorylation. *Immunity* **16**, 839-848.
- Harder T & Engelhardt KR. (2004). Membrane domains in lymphocytes - from lipid rafts to protein scaffolds. *Traffic* **5**, 265-275.
- Harder T, Rentero C, Zech T & Gaus K. (2007). Plasma membrane segregation during T cell activation: probing the order of domains. *Curr Opin Immunol* **19**, 470-475.
- Harder T, Scheiffele P, Verkade P & Simons K. (1998). Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *J Cell Biol* **141**, 929-942.
- Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM & Weaver CT. (2005). Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* **6**, 1123-1132.
- Heerklotz H. (2002). Triton promotes domain formation in lipid raft mixtures. *Biophys J* **83**, 2693-2701.
- Heerklotz H, Szadkowska H, Anderson T & Seelig J. (2003). The sensitivity of lipid domains to small perturbations demonstrated by the effect of Triton. *J Mol Biol* **329**, 793-799.
- Hernanz-Falcon P, Rodriguez-Frade JM, Serrano A, Juan D, del Sol A, Soriano SF, Roncal F, Gomez L, Valencia A, Martinez AC & Mellado M. (2004). Identification of amino acid residues crucial for chemokine receptor dimerization. *Nat Immunol* **5**, 216-223.
- Heyeck SD, Wilcox HM, Bunnell SC & Berg LJ. (1997). Lck phosphorylates the activation loop tyrosine of the Itk kinase domain and activates Itk kinase activity. *J Biol Chem* **272**, 25401-25408.
- Hiltbold EM, Poloso NJ & Roche PA. (2003). MHC class II-peptide complexes and APC lipid rafts accumulate at the immunological synapse. *J Immunol* **170**, 1329-1338.
- Hoebe K, Janssen E & Beutler B. (2004). The interface between innate and adaptive immunity. *Nat Immunol* **5**, 971-974.

- Holdorf AD, Green JM, Levin SD, Denny MF, Straus DB, Link V, Changelian PS, Allen PM & Shaw AS. (1999). Proline residues in CD28 and the Src homology (SH)3 domain of Lck are required for T cell costimulation. *J Exp Med* **190**, 375-384.
- Holdorf AD, Lee KH, Burack WR, Allen PM & Shaw AS. (2002). Regulation of Lck activity by CD4 and CD28 in the immunological synapse. *Nat Immunol* **3**, 259-264.
- Holsinger LJ, Graef IA, Swat W, Chi T, Bautista DM, Davidson L, Lewis RS, Alt FW & Crabtree GR. (1998). Defects in actin-cap formation in Vav-deficient mice implicate an actin requirement for lymphocyte signal transduction. *Curr Biol* **8**, 563-572.
- Horejsi V. (2003). The roles of membrane microdomains (rafts) in T cell activation. *Immunol Rev* **191**, 148-164.
- Huang J, Lo PF, Zal T, Gascoigne NR, Smith BA, Levin SD & Grey HM. (2002). CD28 plays a critical role in the segregation of PKC theta within the immunologic synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 9369-9373.
- Hugues S, Fetler L, Bonifaz L, Helft J, Amblard F & Amigorena S. (2004). Distinct T cell dynamics in lymph nodes during the induction of tolerance and immunity. *Nat Immunol* **5**, 1235-1242.
- Huppa JB & Davis MM. (2003). T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nat Rev Immunol* **3**, 973-983.
- Huse M, Lillemeier BF, Kuhns MS, Chen DS & Davis MM. (2006). T cells use two directionally distinct pathways for cytokine secretion. *Nat Immunol* **7**, 247-255.
- Iijima W, Ohtani H, Nakayama T, Sugawara Y, Sato E, Nagura H, Yoshie O & Sasano T. (2003). Infiltrating CD8+ T cells in oral lichen planus predominantly express CCR5 and CXCR3 and carry respective chemokine ligands RANTES/CCL5 and IP-10/CXCL10 in their cytolytic granules: a potential self-recruiting mechanism. *Am J Pathol* **163**, 261-268.
- Iivanainen AV, Lindqvist C, Mustelin T & Andersson LC. (1990). Phosphotyrosine phosphatases are involved in reversion of T lymphoblastic proliferation. *Eur J Immunol* **20**, 2509-2512.
- Inaba K & Inaba M. (2005). Antigen recognition and presentation by dendritic cells. *Int J Hematol* **81**, 181-187.
- Irie-Sasaki J, Sasaki T, Matsumoto W, Opavsky A, Cheng M, Welstead G, Griffiths E, Krawczyk C, Richardson CD, Aitken K, Iscove N, Koretzky G, Johnson P, Liu P, Rothstein DM & Penninger JM. (2001). CD45 is a JAK phosphatase and negatively regulates cytokine receptor signalling. *Nature* **409**, 349-354.
- Irles C, Symons A, Michel F, Bakker TR, van der Merwe PA & Acuto O. (2003). CD45 ectodomain controls interaction with GEMs and Lck activity for optimal TCR signaling. *Nat Immunol* **4**, 189-197.

- Issafras H, Angers S, Bulenger S, Blanpain C, Parmentier M, Labbe-Jullie C, Bouvier M & Marullo S. (2002). Constitutive agonist-independent CCR5 oligomerization and antibody-mediated clustering occurring at physiological levels of receptors. *J Biol Chem* **277**, 34666-34673.
- Iwakura Y & Ishigame H. (2006). The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J Clin Invest* **116**, 1218-1222.
- Iwashima M, Irving BA, van Oers NS, Chan AC & Weiss A. (1994). Sequential interactions of the TCR with two distinct cytoplasmic tyrosine kinases. *Science* **263**, 1136-1139.
- Jacobelli J, Andres PG, Boisvert J & Krummel MF. (2004). New views of the immunological synapse: variations in assembly and function. *Curr Opin Immunol* **16**, 345-352.
- Jacobson K, Mouritsen OG & Anderson RG. (2007). Lipid rafts: at a crossroad between cell biology and physics. *Nat Cell Biol* **9**, 7-14.
- Janes PW, Ley SC, Magee AI & Kabouridis PS. (2000). The role of lipid rafts in T cell antigen receptor (TCR) signalling. *Semin Immunol* **12**, 23-34.
- Janeway C. (2001). *Immunobiology 5 : the immune system in health and disease*. Garland Pub., New York.
- Jordan MS, Singer AL & Koretzky GA. (2003). Adaptors as central mediators of signal transduction in immune cells. *Nat Immunol* **4**, 110-116.
- Kaga S, Ragg S, Rogers KA & Ochi A. (1998). Stimulation of CD28 with B7-2 promotes focal adhesion-like cell contacts where Rho family small G proteins accumulate in T cells. *J Immunol* **160**, 24-27.
- Kaiser A, Donnadieu E, Abastado JP, Trautmann A & Nardin A. (2005). CC chemokine ligand 19 secreted by mature dendritic cells increases naive T cell scanning behavior and their response to rare cognate antigen. *J Immunol* **175**, 2349-2356.
- Karin M & Ben-Neriah Y. (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu Rev Immunol* **18**, 621-663.
- Karpus WJ, Lukacs NW, Kennedy KJ, Smith WS, Hurst SD & Barrett TA. (1997). Differential CC chemokine-induced enhancement of T helper cell cytokine production. *J Immunol* **158**, 4129-4136.
- Kenakin T. (2003). Ligand-selective receptor conformations revisited: the promise and the problem. *Trends Pharmacol Sci* **24**, 346-354.
- Khosravi-Far R, Chrzanowska-Wodnicka M, Solski PA, Eva A, Burridge K & Der CJ. (1994). Dbl and Vav mediate transformation via mitogen-activated protein kinase pathways that are distinct from those activated by oncogenic Ras. *Mol Cell Biol* **14**, 6848-6857.

- Kim CH, Rott L, Kunkel EJ, Genovese MC, Andrew DP, Wu L & Butcher EC. (2001). Rules of chemokine receptor association with T cell polarization in vivo. *J Clin Invest* **108**, 1331-1339.
- Kindzelskii AL, Sitrin RG & Petty HR. (2004). Cutting edge: optical microspectrophotometry supports the existence of gel phase lipid rafts at the lamellipodium of neutrophils: apparent role in calcium signaling. *J Immunol* **172**, 4681-4685.
- Klasen S, Pages F, Peyron JF, Cantrell DA & Olive D. (1998). Two distinct regions of the CD28 intracytoplasmic domain are involved in the tyrosine phosphorylation of Vav and GTPase activating protein-associated p62 protein. *Int Immunol* **10**, 481-489.
- Kohlmeier JE, Rumsey LM, Chan MA & Benedict SH. (2003). The outcome of T-cell costimulation through intercellular adhesion molecule-1 differs from costimulation through leucocyte function-associated antigen-1. *Immunology* **108**, 152-157.
- Koretzky GA & Myung PS. (2001). Positive and negative regulation of T-cell activation by adaptor proteins. *Nat Rev Immunol* **1**, 95-107.
- Koretzky GA, Picus J, Thomas ML & Weiss A. (1990). Tyrosine phosphatase CD45 is essential for coupling T-cell antigen receptor to the phosphatidyl inositol pathway. *Nature* **346**, 66-68.
- Kroeger KM, Pflieger KD & Eidne KA. (2003). G-protein coupled receptor oligomerization in neuroendocrine pathways. *Front Neuroendocrinol* **24**, 254-278.
- Kropshofer H, Spindeldreher S, Rohn TA, Platania N, Grygar C, Daniel N, Wolpl A, Langen H, Horejsi V & Vogt AB. (2002). Tetraspan microdomains distinct from lipid rafts enrich select peptide-MHC class II complexes. *Nat Immunol* **3**, 61-68.
- Kumar A, Humphreys TD, Kremer KN, Bramati PS, Bradfield L, Edgar CE & Hedin KE. (2006). CXCR4 physically associates with the T cell receptor to signal in T cells. *Immunity* **25**, 213-224.
- Kusumi A, Nakada C, Ritchie K, Murase K, Suzuki K, Murakoshi H, Kasai RS, Kondo J & Fujiwara T. (2005). Paradigm shift of the plasma membrane concept from the two-dimensional continuum fluid to the partitioned fluid: high-speed single-molecule tracking of membrane molecules. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **34**, 351-378.
- Kwik J, Boyle S, Fooksman D, Margolis L, Sheetz MP & Edidin M. (2003). Membrane cholesterol, lateral mobility, and the phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-dependent organization of cell actin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 13964-13969.
- Lang T, Bruns D, Wenzel D, Riedel D, Holroyd P, Thiele C & Jahn R. (2001). SNAREs are concentrated in cholesterol-dependent clusters that define docking and fusion sites for exocytosis. *Embo J* **20**, 2202-2213.

- Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA & Cua DJ. (2005). IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* **201**, 233-240.
- Lanzavecchia A, Lezzi G & Viola A. (1999). From TCR engagement to T cell activation: a kinetic view of T cell behavior. *Cell* **96**, 1-4.
- Lee JW, Epardaud M, Sun J, Becker JE, Cheng AC, Yonekura AR, Heath JK & Turley SJ. (2007). Peripheral antigen display by lymph node stroma promotes T cell tolerance to intestinal self. *Nat Immunol* **8**, 181-190.
- Lee KH, Dinner AR, Tu C, Campi G, Raychaudhuri S, Varma R, Sims TN, Burack WR, Wu H, Wang J, Kanagawa O, Markiewicz M, Allen PM, Dustin ML, Chakraborty AK & Shaw AS. (2003). The immunological synapse balances T cell receptor signaling and degradation. *Science* **302**, 1218-1222.
- Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP, Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M & Fouser LA. (2006). Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med* **203**, 2271-2279.
- Lillemeier BF, Pfeiffer JR, Surviladze Z, Wilson BS & Davis MM. (2006). Plasma membrane-associated proteins are clustered into islands attached to the cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 18992-18997.
- Lim HW, Hillsamer P & Kim CH. (2004). Regulatory T cells can migrate to follicles upon T cell activation and suppress GC-Th cells and GC-Th cell-driven B cell responses. *J Clin Invest* **114**, 1640-1649.
- Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Martin SR, Horuk R, MacDonald ME, Stuhlmann H, Koup RA & Landau NR. (1996). Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* **86**, 367-377.
- Locati M, Deuschle U, Massardi ML, Martinez FO, Sironi M, Sozzani S, Bartfai T & Mantovani A. (2002). Analysis of the gene expression profile activated by the CC chemokine ligand 5/RANTES and by lipopolysaccharide in human monocytes. *J Immunol* **168**, 3557-3562.
- Locher CP, Witt SA, Kassel R, Dowell NL, Fujimura S & Levy JA. (2005). Differential effects of R5 and X4 human immunodeficiency virus type 1 infection on CD4+ cell proliferation and activation. *J Gen Virol* **86**, 1171-1179.
- Loo DT, Kanner SB & Aruffo A. (1998). Filamin binds to the cytoplasmic domain of the beta1-integrin. Identification of amino acids responsible for this interaction. *J Biol Chem* **273**, 23304-23312.
- Macian F, Im SH, Garcia-Cozar FJ & Rao A. (2004). T-cell anergy. *Curr Opin Immunol* **16**, 209-216.

- Manickasingham SP, Anderton SM, Burkhart C & Wraith DC. (1998). Qualitative and quantitative effects of CD28/B7-mediated costimulation on naive T cells in vitro. *J Immunol* **161**, 3827-3835.
- Marinari B, Costanzo A, Viola A, Michel F, Mangino G, Acuto O, Levrero M, Piccolella E & Tuosto L. (2002). Vav cooperates with CD28 to induce NF-kappaB activation via a pathway involving Rac-1 and mitogen-activated kinase kinase 1. *Eur J Immunol* **32**, 447-456.
- Marshak-Rothstein A & Ohashi PS. (2007). Intricate connections between innate and adaptive autoimmunity. *Curr Opin Immunol* **19**, 603-605.
- Marsland BJ, Battig P, Bauer M, Ruedl C, Lassing U, Beerli RR, Dietmeier K, Ivanova L, Pfister T, Vogt L, Nakano H, Nembrini C, Saudan P, Kopf M & Bachmann MF. (2005). CCL19 and CCL21 induce a potent proinflammatory differentiation program in licensed dendritic cells. *Immunity* **22**, 493-505.
- Martin M, Schneider H, Azouz A & Rudd CE. (2001). Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 and CD28 modulate cell surface raft expression in their regulation of T cell function. *J Exp Med* **194**, 1675-1681.
- Marullo S & Bouvier M. (2007). Resonance energy transfer approaches in molecular pharmacology and beyond. *Trends Pharmacol Sci* **28**, 362-365.
- Matloubian M, Lo CG, Cinamon G, Lesneski MJ, Xu Y, Brinkmann V, Allende ML, Proia RL & Cyster JG. (2004). Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* **427**, 355-360.
- Mellado M, Rodriguez-Frade JM, Manes S & Martinez AC. (2001a). Chemokine signaling and functional responses: the role of receptor dimerization and TK pathway activation. *Annu Rev Immunol* **19**, 397-421.
- Mellado M, Rodriguez-Frade JM, Vila-Coro AJ, de Ana AM & Martinez AC. (1999). Chemokine control of HIV-1 infection. *Nature* **400**, 723-724.
- Mellado M, Rodriguez-Frade JM, Vila-Coro AJ, Fernandez S, Martin de Ana A, Jones DR, Toran JL & Martinez AC. (2001b). Chemokine receptor homo- or heterodimerization activates distinct signaling pathways. *Embo J* **20**, 2497-2507.
- Mempel TR, Henrickson SE & Von Andrian UH. (2004). T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature* **427**, 154-159.
- Mempel TR, Pittet MJ, Khazaie K, Weninger W, Weissleder R, von Boehmer H & von Andrian UH. (2006). Regulatory T cells reversibly suppress cytotoxic T cell function independent of effector differentiation. *Immunity* **25**, 129-141.
- Mesturini R, Nicola S, Chiocchetti A, Bernardone IS, Castelli L, Bensi T, Ferretti M, Comi C, Dong C, Rojo JM, Yagi J & Dianzani U. (2006). ICOS cooperates with CD28, IL-2,

- and IFN-gamma and modulates activation of human naive CD4⁺ T cells. *Eur J Immunol* **36**, 2601-2612.
- Michel F, Grimaud L, Tuosto L & Acuto O. (1998). Fyn and ZAP-70 are required for Vav phosphorylation in T cells stimulated by antigen-presenting cells. *J Biol Chem* **273**, 31932-31938.
- Millan J, Montoya MC, Sancho D, Sanchez-Madrid F & Alonso MA. (2002). Lipid rafts mediate biosynthetic transport to the T lymphocyte uropod subdomain and are necessary for uropod integrity and function. *Blood* **99**, 978-984.
- Millard TH, Sharp SJ & Machesky LM. (2004). Signalling to actin assembly via the WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein)-family proteins and the Arp2/3 complex. *Biochem J* **380**, 1-17.
- Miller MJ, Hejazi AS, Wei SH, Cahalan MD & Parker I. (2004a). T cell repertoire scanning is promoted by dynamic dendritic cell behavior and random T cell motility in the lymph node. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 998-1003.
- Miller MJ, Safrina O, Parker I & Cahalan MD. (2004b). Imaging the single cell dynamics of CD4⁺ T cell activation by dendritic cells in lymph nodes. *J Exp Med* **200**, 847-856.
- Miller MJ, Wei SH, Cahalan MD & Parker I. (2003). Autonomous T cell trafficking examined in vivo with intravital two-photon microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 2604-2609.
- Mills KH. (2004). Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nat Rev Immunol* **4**, 841-855.
- Minguet S, Swamy M, Alarcon B, Luescher IF & Schamel WW. (2007). Full activation of the T cell receptor requires both clustering and conformational changes at CD3. *Immunity* **26**, 43-54.
- Molon B, Gri G, Bettella M, Gomez-Mouton C, Lanzavecchia A, Martinez AC, Manes S & Viola A. (2005). T cell costimulation by chemokine receptors. *Nat Immunol* **6**, 465-471.
- Monks CR, Freiberg BA, Kupfer H, Sciaky N & Kupfer A. (1998). Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* **395**, 82-86.
- Montixi C, Langlet C, Bernard AM, Thimonier J, Dubois C, Wurbel MA, Chauvin JP, Pierres M & He HT. (1998). Engagement of T cell receptor triggers its recruitment to low-density detergent-insoluble membrane domains. *Embo J* **17**, 5334-5348.
- Mossman KD, Campi G, Groves JT & Dustin ML. (2005). Altered TCR signaling from geometrically repatterned immunological synapses. *Science* **310**, 1191-1193.
- Munro S. (2003). Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell* **115**, 377-388.

- Murphy PM. (1994). The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. *Annu Rev Immunol* **12**, 593-633.
- Musgrave BL, Watson CL, Haeryfar SM, Barnes CA & Hoskin DW. (2004). CD2-CD48 interactions promote interleukin-2 and interferon-gamma synthesis by stabilizing cytokine mRNA. *Cell Immunol* **229**, 1-12.
- Mustelin T & Tasken K. (2003). Positive and negative regulation of T-cell activation through kinases and phosphatases. *Biochem J* **371**, 15-27.
- Negulescu PA, Krasieva TB, Khan A, Kerschbaum HH & Cahalan MD. (1996). Polarity of T cell shape, motility, and sensitivity to antigen. *Immunity* **4**, 421-430.
- Nishimura M, Umehara H, Nakayama T, Yoneda O, Hieshima K, Kakizaki M, Dohmae N, Yoshie O & Imai T. (2002). Dual functions of fractalkine/CX3C ligand 1 in trafficking of perforin+/granzyme B+ cytotoxic effector lymphocytes that are defined by CX3CR1 expression. *J Immunol* **168**, 6173-6180.
- Niv H, Gutman O, Kloog Y & Henis YI. (2002). Activated K-Ras and H-Ras display different interactions with saturable nonraft sites at the surface of live cells. *J Cell Biol* **157**, 865-872.
- Nobes CD & 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.
- Nurmi SM, Gahmberg CG & Fagerholm SC. (2006). 14-3-3 proteins bind both filamin and alphaLbeta2 integrin in activated T cells. *Ann N Y Acad Sci* **1090**, 318-325.
- O'Keefe JP & Gajewski TF. (2005). Cutting edge: cytotoxic granule polarization and cytolysis can occur without central supramolecular activation cluster formation in CD8+ effector T cells. *J Immunol* **175**, 5581-5585.
- O'Shea JJ, McVicar DW, Bailey TL, Burns C & Smyth MJ. (1992). Activation of human peripheral blood T lymphocytes by pharmacological induction of protein-tyrosine phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 10306-10310.
- Oh P & Schnitzer JE. (2001). Segregation of heterotrimeric G proteins in cell surface microdomains. G(q) binds caveolin to concentrate in caveolae, whereas G(i) and G(s) target lipid rafts by default. *Mol Biol Cell* **12**, 685-698.
- Ohta Y, Stossel TP & Hartwig JH. (1991). Ligand-sensitive binding of actin-binding protein to immunoglobulin G Fc receptor I (Fc gamma RI). *Cell* **67**, 275-282.
- Ohta Y, Suzuki N, Nakamura S, Hartwig JH & Stossel TP. (1999). The small GTPase RalA targets filamin to induce filopodia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 2122-2128.

- Pal Sharma C & Goldmann WH. (2004). Phosphorylation of actin-binding protein (ABP-280; filamin) by tyrosine kinase p56lck modulates actin filament cross-linking. *Cell Biol Int* **28**, 935-941.
- Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q & Dong C. (2005). A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* **6**, 1133-1141.
- Peacock JW & Jirik FR. (1999). TCR activation inhibits chemotaxis toward stromal cell-derived factor-1: evidence for reciprocal regulation between CXCR4 and the TCR. *J Immunol* **162**, 215-223.
- Percherancier Y, Berchiche YA, Slight I, Volkmer-Engert R, Tamamura H, Fujii N, Bouvier M & Heveker N. (2005). Bioluminescence resonance energy transfer reveals ligand-induced conformational changes in CXCR4 homo- and heterodimers. *J Biol Chem* **280**, 9895-9903.
- Perez-Villar JJ & Kanner SB. (1999). Regulated association between the tyrosine kinase Emt/Itk/Tsk and phospholipase-C gamma 1 in human T lymphocytes. *J Immunol* **163**, 6435-6441.
- Pike LJ. (2006). Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J Lipid Res* **47**, 1597-1598.
- Pitcher LA & van Oers NS. (2003). T-cell receptor signal transmission: who gives an ITAM? *Trends Immunol* **24**, 554-560.
- Pizzo P, Giurisato E, Bigsten A, Tassi M, Tavano R, Shaw A & Viola A. (2004). Physiological T cell activation starts and propagates in lipid rafts. *Immunol Lett* **91**, 3-9.
- Pizzo P, Giurisato E, Tassi M, Benedetti A, Pozzan T & Viola A. (2002). Lipid rafts and T cell receptor signaling: a critical re-evaluation. *Eur J Immunol* **32**, 3082-3091.
- Pizzo P & Viola A. (2003). Lymphocyte lipid rafts: structure and function. *Curr Opin Immunol* **15**, 255-260.
- Pizzo P & Viola A. (2004). Lipid rafts in lymphocyte activation. *Microbes Infect* **6**, 686-692.
- Poznansky MC, Olszak IT, Evans RH, Wang Z, Foxall RB, Olson DP, Weibrecht K, Luster AD & Scadden DT. (2002). Thymocyte emigration is mediated by active movement away from stroma-derived factors. *J Clin Invest* **109**, 1101-1110.
- Pralle A, Keller P, Florin EL, Simons K & Horber JK. (2000). Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells. *J Cell Biol* **148**, 997-1008.
- Prinster SC, Hague C & Hall RA. (2005). Heterodimerization of G protein-coupled receptors: specificity and functional significance. *Pharmacol Rev* **57**, 289-298.

- Proszynski TJ, Klemm R, Bagnat M, Gaus K & Simons K. (2006). Plasma membrane polarization during mating in yeast cells. *J Cell Biol* **173**, 861-866.
- Purbhoo MA, Irvine DJ, Huppa JB & Davis MM. (2004). T cell killing does not require the formation of a stable mature immunological synapse. *Nat Immunol* **5**, 524-530.
- Quinn P, Griffiths G & Warren G. (1984). Density of newly synthesized plasma membrane proteins in intracellular membranes II. Biochemical studies. *J Cell Biol* **98**, 2142-2147.
- Raab M, Cai YC, Bunnell SC, Heyeck SD, Berg LJ & Rudd CE. (1995). p56Lck and p59Fyn regulate CD28 binding to phosphatidylinositol 3-kinase, growth factor receptor-bound protein GRB-2, and T cell-specific protein-tyrosine kinase ITK: implications for T-cell costimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 8891-8895.
- Rachmilewitz J & Lanzavecchia A. (2002). A temporal and spatial summation model for T-cell activation: signal integration and antigen decoding. *Trends Immunol* **23**, 592-595.
- Rao A, Luo C & Hogan PG. (1997). Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol* **15**, 707-747.
- Reichert P, Reinhardt RL, Ingulli E & Jenkins MK. (2001). Cutting edge: in vivo identification of TCR redistribution and polarized IL-2 production by naive CD4 T cells. *J Immunol* **166**, 4278-4281.
- Reis e Sousa C. (2006). Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol* **6**, 476-483.
- Richie LI, Ebert PJ, Wu LC, Krummel MF, Owen JJ & Davis MM. (2002). Imaging synapse formation during thymocyte selection: inability of CD3zeta to form a stable central accumulation during negative selection. *Immunity* **16**, 595-606.
- Ridley AJ. (2001). Rho proteins: linking signaling with membrane trafficking. *Traffic* **2**, 303-310.
- Rimoldi V, Reversi A, Taverna E, Rosa P, Francolini M, Cassoni P, Parenti M & Chini B. (2003). Oxytocin receptor elicits different EGFR/MAPK activation patterns depending on its localization in caveolin-1 enriched domains. *Oncogene* **22**, 6054-6060.
- Rivero-Lezcano OM, Marcilla A, Sameshima JH & Robbins KC. (1995). Wiskott-Aldrich syndrome protein physically associates with Nck through Src homology 3 domains. *Mol Cell Biol* **15**, 5725-5731.
- Rodgers W, Crise B & Rose JK. (1994). Signals determining protein tyrosine kinase and glycosyl-phosphatidylinositol-anchored protein targeting to a glycolipid-enriched membrane fraction. *Mol Cell Biol* **14**, 5384-5391.
- Rodgers W, Farris D & Mishra S. (2005). Merging complexes: properties of membrane raft assembly during lymphocyte signaling. *Trends Immunol* **26**, 97-103.

- Rodriguez-Boulan E & Nelson WJ. (1989). Morphogenesis of the polarized epithelial cell phenotype. *Science* **245**, 718-725.
- Rodriguez-Frade JM, Mellado M & Martinez AC. (2001). Chemokine receptor dimerization: two are better than one. *Trends Immunol* **22**, 612-617.
- Rodriguez-Frade JM, Vila-Coro AJ, Martin A, Nieto M, Sanchez-Madrid F, Proudfoot AE, Wells TN, Martinez AC & Mellado M. (1999). Similarities and differences in RANTES- and (AOP)-RANTES-triggered signals: implications for chemotaxis. *J Cell Biol* **144**, 755-765.
- Round JL, Tomassian T, Zhang M, Patel V, Schoenberger SP & Miceli MC. (2005). Dlg1 coordinates actin polymerization, synaptic T cell receptor and lipid raft aggregation, and effector function in T cells. *J Exp Med* **201**, 419-430.
- Rozelle AL, Machesky LM, Yamamoto M, Driessens MH, Insall RH, Roth MG, Luby-Phelps K, Marriott G, Hall A & Yin HL. (2000). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate induces actin-based movement of raft-enriched vesicles through WASP-Arp2/3. *Curr Biol* **10**, 311-320.
- Rudd CE & Schneider H. (2003). Unifying concepts in CD28, ICOS and CTLA4 co-receptor signalling. *Nat Rev Immunol* **3**, 544-556.
- Sad S, Marcotte R & Mosmann TR. (1995). Cytokine-induced differentiation of precursor mouse CD8⁺ T cells into cytotoxic CD8⁺ T cells secreting Th1 or Th2 cytokines. *Immunity* **2**, 271-279.
- Sadra A, Cinek T & Imboden JB. (2004). Translocation of CD28 to lipid rafts and costimulation of IL-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 11422-11427.
- Saint-Ruf C, Panigada M, Azogui O, Debey P, von Boehmer H & Grassi F. (2000). Different initiation of pre-TCR and gammadeltaTCR signalling. *Nature* **406**, 524-527.
- Saito T & Yokosuka T. (2006). Immunological synapse and microclusters: the site for recognition and activation of T cells. *Curr Opin Immunol* **18**, 305-313.
- Salazar-Fontana LI, Barr V, Samelson LE & Bierer BE. (2003). CD28 engagement promotes actin polymerization through the activation of the small Rho GTPase Cdc42 in human T cells. *J Immunol* **171**, 2225-2232.
- Salgame P, Abrams JS, Clayberger C, Goldstein H, Convit J, Modlin RL & Bloom BR. (1991). Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. *Science* **254**, 279-282.
- Sallusto F, Lenig D, Mackay CR & Lanzavecchia A. (1998). Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J Exp Med* **187**, 875-883.

- Samstag Y, Eibert SM, Klemke M & Wabnitz GH. (2003). Actin cytoskeletal dynamics in T lymphocyte activation and migration. *J Leukoc Biol* **73**, 30-48.
- Sato W, Aranami T & Yamamura T. (2007). Cutting edge: Human Th17 cells are identified as bearing CCR2+CCR5- phenotype. *J Immunol* **178**, 7525-7529.
- Schmitz ML, Bacher S & Dienz O. (2003). NF-kappaB activation pathways induced by T cell costimulation. *Faseb J* **17**, 2187-2193.
- Schutz GJ, Kada G, Pastushenko VP & Schindler H. (2000). Properties of lipid microdomains in a muscle cell membrane visualized by single molecule microscopy. *Embo J* **19**, 892-901.
- Sechi AS & Wehland J. (2004). Interplay between TCR signalling and actin cytoskeleton dynamics. *Trends Immunol* **25**, 257-265.
- Seveau S, Eddy RJ, Maxfield FR & Pierini LM. (2001). Cytoskeleton-dependent membrane domain segregation during neutrophil polarization. *Mol Biol Cell* **12**, 3550-3562.
- Shakhar G, Lindquist RL, Skokos D, Dudziak D, Huang JH, Nussenzweig MC & Dustin ML. (2005). Stable T cell-dendritic cell interactions precede the development of both tolerance and immunity in vivo. *Nat Immunol* **6**, 707-714.
- Shamri R, Grabovsky V, Gauguet JM, Feigelson S, Manevich E, Kolanus W, Robinson MK, Staunton DE, von Andrian UH & Alon R. (2005). Lymphocyte arrest requires instantaneous induction of an extended LFA-1 conformation mediated by endothelium-bound chemokines. *Nat Immunol* **6**, 497-506.
- Sharma P, Varma R, Sarasij RC, Ira, Gousset K, Krishnamoorthy G, Rao M & Mayor S. (2004). Nanoscale organization of multiple GPI-anchored proteins in living cell membranes. *Cell* **116**, 577-589.
- Sharpe AH & Freeman GJ. (2002). The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol* **2**, 116-126.
- Shaw AS & Dustin ML. (1997). Making the T cell receptor go the distance: a topological view of T cell activation. *Immunity* **6**, 361-369.
- Shefcyk J, Yassin R, Volpi M, Molski TF, Naccache PH, Munoz JJ, Becker EL, Feinstein MB & Sha'afi RI. (1985). Pertussis but not cholera toxin inhibits the stimulated increase in actin association with the cytoskeleton in rabbit neutrophils: role of the "G proteins" in stimulus-response coupling. *Biochem Biophys Res Commun* **126**, 1174-1181.
- Siegmund K, Feuerer M, Siewert C, Ghani S, Haubold U, Dankof A, Krenn V, Schon MP, Scheffold A, Lowe JB, Hamann A, Syrbe U & Huehn J. (2005). Migration matters: regulatory T-cell compartmentalization determines suppressive activity in vivo. *Blood* **106**, 3097-3104.
- Silvius JR. (2003). Role of cholesterol in lipid raft formation: lessons from lipid model systems. *Biochim Biophys Acta* **1610**, 174-183.

- Simons K & Ikonen E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 569-572.
- Simons K & van Meer G. (1988). Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry* **27**, 6197-6202.
- Singleton K, Parvaze N, Dama KR, Chen KS, Jennings P, Purtic B, Sjaastad MD, Gilpin C, Davis MM & Wulfing C. (2006). A large T cell invagination with CD2 enrichment resets receptor engagement in the immunological synapse. *J Immunol* **177**, 4402-4413.
- Sloan-Lancaster J & Allen PM. (1996). Altered peptide ligand-induced partial T cell activation: molecular mechanisms and role in T cell biology. *Annu Rev Immunol* **14**, 1-27.
- Sohy D, Parmentier M & Springael JY. (2007). Allosteric transinhibition by specific antagonists in CCR2/CXCR4 heterodimers. *J Biol Chem* **282**, 30062-30069.
- Sozzani S, Allavena P, D'Amico G, Luini W, Bianchi G, Kataura M, Imai T, Yoshie O, Bonecchi R & Mantovani A. (1998). Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *J Immunol* **161**, 1083-1086.
- Springael JY, Le Minh PN, Urizar E, Costagliola S, Vassart G & Parmentier M. (2006). Allosteric modulation of binding properties between units of chemokine receptor homo- and hetero-oligomers. *Mol Pharmacol* **69**, 1652-1661.
- Springael JY, Urizar E & Parmentier M. (2005). Dimerization of chemokine receptors and its functional consequences. *Cytokine Growth Factor Rev* **16**, 611-623.
- Stefanova I, Horejsi V, Ansoetgui IJ, Knapp W & Stockinger H. (1991). GPI-anchored cell-surface molecules complexed to protein tyrosine kinases. *Science* **254**, 1016-1019.
- Steinman RM, Hawiger D & Nussenzweig MC. (2003). Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* **21**, 685-711.
- Stinchcombe JC, Majorovits E, Bossi G, Fuller S & Griffiths GM. (2006). Centrosome polarization delivers secretory granules to the immunological synapse. *Nature* **443**, 462-465.
- Stossel TP, Condeelis J, Cooley L, Hartwig JH, Noegel A, Schleicher M & Shapiro SS. (2001). Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 138-145.
- Stowers L, Yelon D, Berg LJ & Chant J. (1995). Regulation of the polarization of T cells toward antigen-presenting cells by Ras-related GTPase CDC42. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 5027-5031.

- Subczynski WK & Kusumi A. (2003). Dynamics of raft molecules in the cell and artificial membranes: approaches by pulse EPR spin labeling and single molecule optical microscopy. *Biochim Biophys Acta* **1610**, 231-243.
- Suzuki KG, Fujiwara TK, Edidin M & Kusumi A. (2007a). Dynamic recruitment of phospholipase C gamma at transiently immobilized GPI-anchored receptor clusters induces IP3-Ca²⁺ signaling: single-molecule tracking study 2. *J Cell Biol* **177**, 731-742.
- Suzuki KG, Fujiwara TK, Sanematsu F, Iino R, Edidin M & Kusumi A. (2007b). GPI-anchored receptor clusters transiently recruit Lyn and G alpha for temporary cluster immobilization and Lyn activation: single-molecule tracking study 1. *J Cell Biol* **177**, 717-730.
- Tai X, Cowan M, Feigenbaum L & Singer A. (2005). CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2. *Nat Immunol* **6**, 152-162.
- Takamori S, Holt M, Stenius K, Lemke EA, Grønborg M, Riedel D, Urlaub H, Schenck S, Brügger B, Ringler P, Müller SA, Rammner B, Gräter F, Hub JS, De Groot BL, Mieskes G, Moriyama Y, Klingauf J, Grubmüller H, Heuser J, Wieland F & Jahn R. (2006). Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell* **127**, 831-846.
- Taub DD, Turcovski-Corrales SM, Key ML, Longo DL & Murphy WJ. (1996). Chemokines and T lymphocyte activation: I. Beta chemokines costimulate human T lymphocyte activation in vitro. *J Immunol* **156**, 2095-2103.
- Tavano R, Gri G, Molon B, Marinari B, Rudd CE, Tuosto L & Viola A. (2004). CD28 and lipid rafts coordinate recruitment of Lck to the immunological synapse of human T lymphocytes. *J Immunol* **173**, 5392-5397.
- Terrillon S & Bouvier M. (2004). Roles of G-protein-coupled receptor dimerization. *EMBO Rep* **5**, 30-34.
- Thrasher AJ. (2002). WASp in immune-system organization and function. *Nat Rev Immunol* **2**, 635-646.
- Toth PT, Ren D & Miller RJ. (2004). Regulation of CXCR4 receptor dimerization by the chemokine SDF-1alpha and the HIV-1 coat protein gp120: a fluorescence resonance energy transfer (FRET) study. *J Pharmacol Exp Ther* **310**, 8-17.
- Trautmann A. (2005). Chemokines as immunotransmitters? *Nat Immunol* **6**, 427-428.
- Tuosto L & Acuto O. (1998). CD28 affects the earliest signaling events generated by TCR engagement. *Eur J Immunol* **28**, 2131-2142.
- Tuosto L, Michel F & Acuto O. (1996). p95vav associates with tyrosine-phosphorylated SLP-76 in antigen-stimulated T cells. *J Exp Med* **184**, 1161-1166.

- Tuosto L, Parolini I, Schroder S, Sargiacomo M, Lanzavecchia A & Viola A. (2001). Organization of plasma membrane functional rafts upon T cell activation. *Eur J Immunol* **31**, 345-349.
- Tybulewicz VL. (2002). Chemokines and the immunological synapse. *Immunology* **106**, 287-288.
- Valitutti S, Muller S, Cella M, Padovan E & Lanzavecchia A. (1995). Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes. *Nature* **375**, 148-151.
- van der Flier A & Sonnenberg A. (2001). Structural and functional aspects of filamins. *Biochim Biophys Acta* **1538**, 99-117.
- van der Merwe PA & Davis SJ. (2003). Molecular interactions mediating T cell antigen recognition. *Annu Rev Immunol* **21**, 659-684.
- Varma R, Campi G, Yokosuka T, Saito T & Dustin ML. (2006). T cell receptor-proximal signals are sustained in peripheral microclusters and terminated in the central supramolecular activation cluster. *Immunity* **25**, 117-127.
- Varma R & Mayor S. (1998). GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface. *Nature* **394**, 798-801.
- Veillette A, Bookman MA, Horak EM & Bolen JB. (1988). The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck. *Cell* **55**, 301-308.
- Vila-Coro AJ, Rodriguez-Frade JM, Martin De Ana A, Moreno-Ortiz MC, Martinez AC & Mellado M. (1999). The chemokine SDF-1alpha triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway. *Faseb J* **13**, 1699-1710.
- Villalba M, Bi K, Rodriguez F, Tanaka Y, Schoenberger S & Altman A. (2001). Vav1/Rac-dependent actin cytoskeleton reorganization is required for lipid raft clustering in T cells. *J Cell Biol* **155**, 331-338.
- Viola A. (2001). The amplification of TCR signaling by dynamic membrane microdomains. *Trends Immunol* **22**, 322-327.
- Viola A, Contento RL & Molon B. (2006). T cells and their partners: The chemokine dating agency. *Trends Immunol* **27**, 421-427.
- Viola A & Gupta N. (2007). Tether and trap: regulation of membrane-raft dynamics by actin-binding proteins. *Nat Rev Immunol* **7**, 889-896.
- Viola A & Lanzavecchia A. (1996). T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds. *Science* **273**, 104-106.
- Viola A & Luster AD. (2008). Chemokines and Their Receptors: Drug Targets in Immunity and Inflammation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **48**, 171-197.

- Viola A, Schroeder S, Sakakibara Y & Lanzavecchia A. (1999). T lymphocyte costimulation mediated by reorganization of membrane microdomains. *Science* **283**, 680-682.
- Wang J, Alvarez R, Roderiquez G, Guan E & Norcross MA. (2004). Constitutive association of cell surface CCR5 and CXCR4 in the presence of CD4. *J Cell Biochem* **93**, 753-760.
- Wange RL & Samelson LE. (1996). Complex complexes: signaling at the TCR. *Immunity* **5**, 197-205.
- Ward SG. (2004). Do phosphoinositide 3-kinases direct lymphocyte navigation? *Trends Immunol* **25**, 67-74.
- Watts TH. (2005). TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses. *Annu Rev Immunol* **23**, 23-68.
- Wei S, Kryczek I & Zou W. (2006). Regulatory T-cell compartmentalization and trafficking. *Blood* **108**, 426-431.
- Wiedemann A, Depoil D, Faroudi M & Valitutti S. (2006). Cytotoxic T lymphocytes kill multiple targets simultaneously via spatiotemporal uncoupling of lytic and stimulatory synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 10985-10990.
- Wulfing C, Bauch A, Crabtree GR & Davis MM. (2000). The vav exchange factor is an essential regulator in actin-dependent receptor translocation to the lymphocyte-antigen-presenting cell interface. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 10150-10155.
- Wulfing C & Davis MM. (1998). A receptor/cytoskeletal movement triggered by costimulation during T cell activation. *Science* **282**, 2266-2269.
- Wurbel MA, Malissen M, Guy-Grand D, Meffre E, Nussenzweig MC, Richelme M, Carrier A & Malissen B. (2001). Mice lacking the CCR9 CC-chemokine receptor show a mild impairment of early T- and B-cell development and a reduction in T-cell receptor gamma delta(+) gut intraepithelial lymphocytes. *Blood* **98**, 2626-2632.
- Xu J, Wang F, Van Keymeulen A, Herzmark P, Straight A, Kelly K, Takuwa Y, Sugimoto N, Mitchison T & Bourne HR. (2003). Divergent signals and cytoskeletal assemblies regulate self-organizing polarity in neutrophils. *Cell* **114**, 201-214.
- Yashiro-Ohtani Y, Zhou XY, Toyo-Oka K, Tai XG, Park CS, Hamaoka T, Abe R, Miyake K & Fujiwara H. (2000). Non-CD28 costimulatory molecules present in T cell rafts induce T cell costimulation by enhancing the association of TCR with rafts. *J Immunol* **164**, 1251-1259.
- Ye P, Rodriguez FH, Kanaly S, Stocking KL, Schurr J, Schwarzenberger P, Oliver P, Huang W, Zhang P, Zhang J, Shellito JE, Bagby GJ, Nelson S, Charrier K, Peschon JJ & Kolls JK. (2001). Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC

chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J Exp Med* **194**, 519-527.

- Yokosuka T, Sakata-Sogawa K, Kobayashi W, Hiroshima M, Hashimoto-Tane A, Tokunaga M, Dustin ML & 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**, 1253-1262.
- Zapico I, Coto E, Rodriguez A, Alvarez C, Torre JC & Alvarez V. (2000). CCR5 (chemokine receptor-5) DNA-polymorphism influences the severity of rheumatoid arthritis. *Genes Immun* **1**, 288-289.
- Zeng R, Cannon JL, Abraham RT, Way M, Billadeau DD, Bubeck-Wardenberg J & Burkhardt JK. (2003). SLP-76 coordinates Nck-dependent Wiskott-Aldrich syndrome protein recruitment with Vav-1/Cdc42-dependent Wiskott-Aldrich syndrome protein activation at the T cell-APC contact site. *J Immunol* **171**, 1360-1368.
- Zhang J, Shehabeldin A, da Cruz LA, Butler J, Somani AK, McGavin M, Koziaradzki I, dos Santos AO, Nagy A, Grinstein S, Penninger JM & Siminovitch KA. (1999). Antigen receptor-induced activation and cytoskeletal rearrangement are impaired in Wiskott-Aldrich syndrome protein-deficient lymphocytes. *J Exp Med* **190**, 1329-1342.
- Zinselmeyer BH, Dempster J, Gurney AM, Wokosin D, Miller M, Ho H, Millington OR, Smith KM, Rush CM, Parker I, Cahalan M, Brewer JM & Garside P. (2005). In situ characterization of CD4⁺ T cell behavior in mucosal and systemic lymphoid tissues during the induction of oral priming and tolerance. *J Exp Med* **201**, 1815-1823.
- Zou L, Barnett B, Safah H, Larussa VF, Evdemon-Hogan M, Mottram P, Wei S, David O, Curiel TJ & Zou W. (2004). Bone marrow is a reservoir for CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells that traffic through CXCL12/CXCR4 signals. *Cancer Res* **64**, 8451-8455.
- Zou W, Borvak J, Marches F, Wei S, Galanaud P, Emilie D & Curiel TJ. (2000). Macrophage-derived dendritic cells have strong Th1-polarizing potential mediated by beta-chemokines rather than IL-12. *J Immunol* **165**, 4388-4396.

Publicazioni

1. Viola A, Contento RL, Molon B. T cells and their partners: The chemokine dating agency. *Trends Immunol.* 2006 Sep;27(9):421-7. Epub 2006 Jul 21.
2. Tavano R¹, Contento RL¹, Baranda SJ, Soligo M, Tuosto L, Manes S, Viola A. CD28 interaction with filamin-A controls lipid raft accumulation at the T-cell immunological synapse. *Nat Cell Biol.* 2006 Nov;8(11):1270-6. Epub 2006 Oct 22. ¹equal contribution.
3. Viola A, Molon B, Contento RL. Chemokines: coded messages for T cell missions. *Front Biosci.* *In press*

Poster

Rita Lucia Contento, Barbara Molon and Antonella Viola. I recettori chemochinici nell'attivazione dei linfociti T: eterodimerizzazione e cosegregazione di microdomini. Riunione nazionale dei dottorandi in Biologia Cellulare, Centro Internazionale Il Ciocco, Castelvecchio Pascoli (Lucca), Italia, 16-18 Maggio 2005.

Rita Lucia Contento, Barbara Molon, Santos Mañes, Mario Mellado and Antonella Viola. Tcell costimulation by chemokine receptors heterodimers. Riunione nazionale dei dottorandi in Biologia Cellulare, Pontignano (Siena), Italia, 06-08 Luglio 2006.

Regina Tavano, *Rita Lucia Contento*, Sonia Jimenez Baranda, Marzia Soligo, Loretta Tuosto, Santos Manes and Antonella Viola. CD28 interaction with filamin-A controls lipid raft accumulation at the T cell immunological synapse. Shaping immunity in healthy and diseased tissues. EMBO Conference co-sponsored by ENII. Capo Caccia, Sardegna, Italia, 7-12 Maggio 2007.

Presentazioni orali

Rita Lucia Contento, Barbara Molon, Sergio Pantano, Denis Sohy, Jean-Yves Springael, Santos Manes, Mario Mellado, Marc Parmentier and Antonella Viola. CXCR4-CCR5 heterodimer: a new couple modulating T cell functions. Riunione nazionale dei dottorandi in Biologia Cellulare, Rimini, Italia, 17-19 Maggio 2007.

Premi

Premio ABCD (Associazione di Biologia Cellulare e del Differenziamento) per la miglior presentazione orale alla riunione nazionale dei dottorandi in Biologia Cellulare, Rimini, Italia, 17-19 Maggio 2007.

Esperienze all'estero

- 20/03-19/04 2007 Collaborazione con il Prof. Martin J. Lohse, Institute for Pharmacology and Toxicology, University of Würzburg, Würzburg, Germany.
- 28/06-16/07 2007 Collaborazione con il Prof. Stefano Marullo, Cell Biology Department, Institute Cochin, Paris, France.