

Nanocomplejos del receptor para el antígeno de linfocitos T: agruparse para cooperar

Recibido el 28 de mayo de 2008

WOLFGANG W. A. SCHAMEL¹, HISSE M. VAN SANTEN²,
MAHIMA SWAMY¹ Y BALBINO ALARCÓN^{2*}

¹*Max Planck-Institut für Immunbiologie and University of Freiburg,
Stübeweg 51, 79108 Freiburg, Alemania*

²*Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC-Universidad
Autónoma de Madrid, Madrid 28049*

RESUMEN

El receptor para antígeno de los linfocitos T (TCR) es un complejo multiproteico responsable de la activación y regulación de la respuesta inmune adaptativa. Este receptor muestra una gran especificidad y sensibilidad, a la vez que tiene una baja afinidad por su ligando. El ligando del TCR es un complejo formado por el péptido antigénico y una molécula del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Es más, los linfocitos T responden a antígeno en un rango muy amplio de concentraciones. Esto es, los linfocitos T continúan dando una respuesta aumentada a concentraciones de antígeno que exceden en varios órdenes de magnitud la concentración activadora mínima. La estequiometría y organización del TCR en la membrana han estado bajo intenso escrutinio porque pueden ser clave para explicar sus propiedades paradójicas. Esta revisión subraya la existencia de nuevos datos que indican que el TCR se presenta en linfocitos T intactos y en reposo como una mezcla variable de

*** Información de contacto:**

Dr. Balbino Alarcón.

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Universidad Autónoma de Madrid,
Cantoblanco, Madrid 28049.

Tel.: 914978458; FAX: 914974799.

E-mail: balarcon@cbm.uam.es

Abreviaturas: TCR, Receptor para antígeno de linfocitos T.

formas monovalentes (con sólo un sitio de unión para el ligando) y formas multivalentes de distinto grado. Estos resultados contrastan con datos anteriores de estequiometría del TCR obtenidos por procedimientos bioquímicos. No obstante, la mayor parte de estas discrepancias pueden deberse al efecto de distintos detergentes en la integridad del receptor. Aquí discutimos un modelo donde los complejos multivalentes del TCR son los responsables de dotar a los linfocitos T de sensibilidad a antígeno porque son activados por bajas concentraciones de antígeno, mientras que los complejos monovalentes son los responsables del amplio rango dinámico.

Palabras clave: Estequiometría.- Cambio conformacional.- Receptor para antígeno.- Transducción de señales.- Interacciones de membrana.

ABSTRACT

T cell receptor nanocomplexes: cooperating clusters

The T cell antigen receptor (TCR·CD3) is a multi-subunit complex responsible for triggering an adaptive immune response. It shows high specificity and sensitivity while having a low affinity for the ligand. Furthermore, T cells respond to antigen over a wide concentration range. The stoichiometry and architecture of TCR·CD3 in the membrane have been under intense scrutiny because they might be key to explaining its paradoxical properties. This review highlights new evidence that TCR·CD3 is found on intact, unstimulated T cells in monovalent (one ligand-binding site per receptor) as well as in several distinct multivalent forms. This is in contrast to the TCR·CD3 stoichiometries determined by several biochemical means, but these data can be explained by the effects of different detergents on the integrity of the receptor. Here, we discuss a model in which the multivalent receptors are important for the detection of low concentrations of ligand, and therefore confer sensitivity, whereas the co-expressed monovalent TCR·CD3s allow a wide dynamic range.

Key words: Stoichiometry.- Conformational change.- T cell antigen receptor.- Signal transduction.- Transmembrane interactions.

INTRODUCCIÓN

Cómo los receptores de membrana responden a sus ligandos con gran sensibilidad y plasticidad es objeto todavía de estudio. El receptor para antígeno de los linfocitos T (TCR) es un caso particularmente interesante. Está compuesto de los dímeros $TCR\alpha/\beta$, $CD3\gamma\epsilon$, $CD3\delta\epsilon$ y

CD3 ζ 2 (CD247) que se asocian entre sí de forma no covalente. Las subunidades invariables (CD3) contienen, cada una, una región transmembrana con un aminoácido ácido y un tallo citoplásmico con varios motivos de transducción de señales (1-3). Las subunidades TCR α y TCR β contienen cada una un dominio variable (V) de inmunoglobulina, los cuales forman conjuntamente la superficie de interacción con el ligando. Las subunidades TCR α y TCR β tienen también aminoácidos básicos en sus regiones transmembrana que están implicados en la interacción con las subunidades CD3 (4-6). El ligando del TCR es un péptido antigénico presentado por moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) en la superficie de células presentadoras de antígeno (APCs). Paradójicamente, los linfocitos T pueden ser activados por unas pocas moléculas de MHC asociado al péptido antigénico (pMHC) (7, 8), incluso cuando la afinidad de la interacción pMHC-TCR α/β es muy baja (entre 1 y 50 μ M) (9). Es más, las APCs expresan concentraciones de moléculas de MHC asociadas a péptidos propios que son de 10^3 a 10^4 veces superiores a las concentraciones de pMHC antigénico. Los complejos MHC asociados a péptidos propios no son capaces por sí mismos de activar una respuesta en los linfocitos T, incluso cuando su afinidad por el TCR α/β puede ser tan sólo 10 veces inferior a la afinidad del pMHC antigénico. Resulta por lo tanto difícil de entender cómo esta pequeña diferencia en afinidad resulta suficiente para obtener una gran especificidad cuando existe un gran exceso de péptidos propios unidos a MHC (10). Además de una gran sensibilidad, los linfocitos T son todavía capaces de mostrar efectos dosis-respuesta a concentraciones de ligando de 10^3 a 10^6 (8, 11, 12). Resulta por lo tanto también intrigante el comprender cómo los linfocitos T pueden mostrar una respuesta no saturada a un rango tan amplio de concentraciones de pMHC, dadas las propiedades del TCR.

El conocimiento de la estequiometría del TCR (es decir, el número de copias de cada subunidad por complejo) y el ordenamiento del TCR en la membrana es fundamental para intentar resolver estas paradojas. Esta revisión se centra en los avances concernientes a la arquitectura del TCR y trata de dar explicación a algunas de las preguntas mencionadas.

EL MODELO DE TCR MONOVALENTE

El consenso existente en cuanto a la composición del TCR es que está formado por los dímeros TCR $\alpha\beta$, CD3 $\gamma\epsilon$, CD3 $\delta\epsilon$ y CD3 $\zeta\zeta$ (Figura 1). La estequiometría mínima del TCR debe ser por lo tanto $\alpha\beta\gamma\epsilon\delta\epsilon\zeta\zeta$. De especial importancia es la valencia del TCR, es decir, el número de heterodímeros TCR α/β , responsables de la unión al ligando, por complejo.

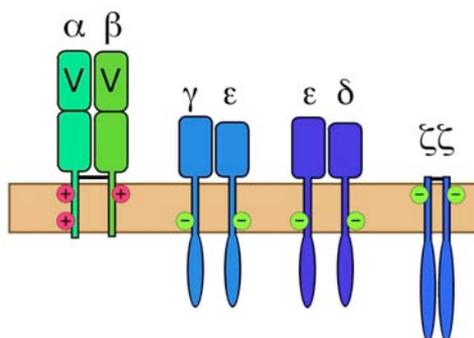


FIGURA 1.- *El receptor para antígeno de los linfocitos T (TCR) está compuesto por los dímeros $\alpha\beta$, $\gamma\epsilon$, $\delta\epsilon$ y $\zeta\zeta$. Las 6 subunidades del TCR se muestran de forma esquemática. Los dominios variables de tipo inmunoglobulina del TCR $\alpha\beta$ (V) reconocen el ligando, mientras que los tallos citoplásmicos de las subunidades CD3 ($\gamma\epsilon$, $\delta\epsilon$, $\zeta\zeta$) interaccionan con proteínas citoplásmicas encargadas de la transmisión de señales. Los puentes disulfuro se muestran como líneas negras gruesas. Las cargas potencialmente existentes en las regiones transmembrana han sido indicadas también.*

Los primeros trabajos dirigidos a dilucidar la valencia del TCR utilizaron el detergente digitonina para extraer el TCR de la membrana. Utilizando ratones transgénicos (13) o linfocitos T humanos (14) que expresan simultáneamente dos heterodímeros TCR α/β distintos, se demostró que la inmunoprecipitación de uno de los heterodímeros no resultaba en la co-precipitación del otro y viceversa. Estos datos

alimentaron la hipótesis de que el TCR es monovalente. En 2002 se presentó una estequiometría completa del TCR, incluyendo todas sus subunidades (6). Utilizando un procedimiento de co-purificación de complejos TCR producidos en un sistema de traducción *in vitro* acoplado a microsomas derivados del retículo endoplásmico (ER) (6, 15), la estequiometría $\alpha\beta\gamma\epsilon\delta\epsilon\zeta\zeta$ fue experimentalmente confirmada para el complejo TCR extraído en digitonina (Figura 2, modelo antiguo). Sin embargo, como CD3 ζ se ensambla con las otras subunidades sólo en el aparato de Golgi (16) y como el TCR se modifica postraduccionalmente a lo largo de la ruta secretora, resultaba poco claro si los datos obtenidos en el sistema de traducción *in vitro* representaban la estequiometría del TCR en la membrana plasmática o tan sólo su posible estequiometría en el ER.

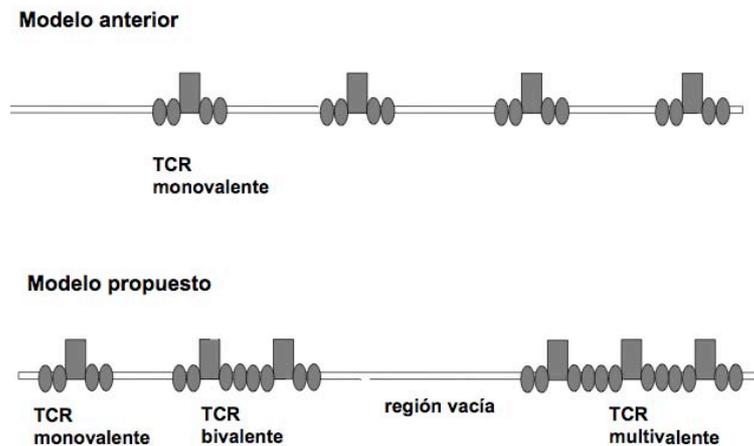


FIGURA 2.- **Distribución de los complejos TCR en la superficie celular en linfocitos en reposo.** Modelo anterior: los receptores monovalentes con una estequiometría $\alpha\beta\gamma\epsilon\delta\epsilon\zeta\zeta$ están distribuidos de forma uniforme en la membrana plasmática. Modelo propuesto: los receptores monovalentes coexisten en la membrana de linfocitos en reposo con una variedad de receptores multivalentes. Debido a la incertidumbre sobre la estequiometría última de los complejos monovalentes y multivalentes, no se ha querido mostrar ninguna relación real entre subunidades. Sin embargo, los TCR monovalentes podrían tener la estequiometría $\alpha\beta\gamma\epsilon\delta\epsilon\zeta\zeta$. La membrana tiene también grandes áreas carentes de cualquier TCR.

EL MODELO DE TCR MULTIVALENTE

Una estequiometría $\alpha\beta\gamma\delta\epsilon\zeta$ produciría un desequilibrio de cargas potencialmente negativas en la región transmembrana (Figura 1). Este problema podría teóricamente resolverse si el TCR contuviera un heterodímero $\text{TCR}\alpha/\beta$ adicional, resultando en un complejo bivalente $\gamma\epsilon\alpha\beta\zeta\alpha\beta\delta\epsilon$ con una región transmembrana neutra (17-19). Alternativamente, la estequiometría $\alpha\beta\gamma\delta\epsilon\zeta\zeta$ del TCR llevó a plantear que cada aminoácido básico contacta con dos aminoácidos ácidos en la membrana (6).

La primera evidencia experimental a favor de una estequiometría multivalente (esto es, un TCR con más de un heterodímero $\text{TCR}\alpha/\beta$) vino de mediciones hidrodinámicas del tamaño del TCR tras su extracción en octilglucósido, las cuales revelaron que el TCR era más grande que el complejo $\alpha\beta\gamma\delta\epsilon\zeta\zeta$ (20). Otros estudios realizados posteriormente y que no implicaban la solubilización de la membrana con detergentes sugirieron también la existencia de multivalencia (19). La existencia de señales de FRET (Resonancia de Transferencia de Energía por Fluorescencia) entre dos $\text{TCR}\alpha/\beta$ diferentes en linfocitos T primarios de ratones doblemente transgénicos demostró que al menos dos heterodímeros $\text{TCR}\alpha/\beta$ tenían que estar presentes en un complejo TCR único. Es más, cuando las células se lisaron con cualquiera de los detergentes Nonidet P-40 (NP40) y Brij96, se pudieron co-precipitar los dos heterodímeros $\text{TCR}\alpha/\beta$ en un complejo único. El tratamiento con endoglicosidasa H de los receptores demostró que era el TCR expresado en la membrana plasmática el que tenía dos $\text{TCR}\alpha/\beta$ (19). Estos datos claramente mostraron que el TCR está constituido por más de un heterodímero $\text{TCR}\alpha/\beta$, aunque no demostraron que la estequiometría fuera $\gamma\epsilon\alpha\beta\zeta\zeta\alpha\beta\delta\epsilon$. ¿Cómo podía resolverse la discrepancia entre los modelos monovalente y multivalente?

UN MODELO UNIFICADO DE LA VALENCIA DEL TCR

Los dominios transmembrana tienen un papel fundamental en las interacciones entre las subunidades TCR α/β y CD3 (4-6). Por lo tanto, la elección de detergente es crítica para el mantenimiento de las interacciones. El detergente debe también ser lo suficientemente eficaz como para disolver la membrana alrededor del complejo proteico. Por otro lado, no se debe asumir que el TCR deba existir en un complejo único. Por lo tanto, la aproximación experimental para estudiar un complejo multiproteico debería poder discriminar entre complejos con diferentes estequiometrías.

Se aplicó la electroforesis en condiciones nativas basada en azul Coomassie (Blue native polyacrylamide gel electrophoresis, BN-PAGE) (21, 22) con diferentes detergentes al estudio del tamaño y estequiometría del TCR (23, 34). Al contrario que los experimentos de co-precipitación y de FRET, el sistema BN-PAGE permite determinar la abundancia relativa y el número de complejos diferentes producidos por una proteína dada. Es más, los complejos se forman en condiciones nativas, lo que permite la interacción con otras proteínas tales como chaperonas, así como modificaciones postraduccionales. Cuando el TCR fue extraído en digitonina a partir tanto de linfocitos primarios como de líneas celulares de ratón y humanas, se detectó un único complejo (23-25). Este complejo resultó ser monovalente, con la estequiometría $\alpha\beta\gamma\delta\epsilon\zeta\zeta$. Por el contrario, los detergentes Brij96 y Brij98 permitieron la separación de varios complejos de tamaño diferente (23, 24). Una serie de controles excluyeron que el Brij96 causara una agregación artificial del TCR (23). Se demostró que los complejos grandes estaban en la membrana plasmática y que se fosforilaban en tirosina tras la estimulación con pMHC. Además, experimentos de coprecipitación a partir de células que expresan dos TCRs diferentes (esto es, con dos heterodímeros TCR α/β distintos), demostraron que ambos TCRs podían ser coprecipitados si se habían extraído en Brij96, pero no si se habían extraído en digitonina (23). Estos datos eran por lo tanto compatibles con que los complejos aislados en Brij96 contenían TCR multivalentes, mientras que en digitonina eran exclusivamente monovalentes.

La coexistencia de complejos TCR con diferentes valencias identificados por BN-PAGE en Brij96 y otros detergentes está de acuerdo con los datos de FRET previamente mencionados en células intactas. Es

más, los resultados de microscopía electrónica en células primarias y líneas celulares marcadas con anticuerpos anti-TCR demostraron que en células en reposo el TCR se expresa como una variedad de complejos multivalentes (23) (Figura 2, modelo nuevo). La misma conclusión fue alcanzada utilizando una técnica de microscopía electrónica diferente (B. Lillemeier & M.M. Davis, unpublished data). Los complejos más grandes del TCR consisten de alrededor de 20 unidades (23). Estos complejos TCR preformados son demasiado pequeños para ser detectados por microscopía confocal, y son por lo tanto diferentes a los llamados microcomplejos que se detectan por microscopía óptica tras la estimulación del TCR y la agregación subsiguiente (26, 27).

En resumen, los complejos TCR multivalentes eran coexpresados con receptores monovalentes en la membrana plasmática de linfocitos T en reposo (Figura 2). Como era de esperar, los diferentes detergentes tienen un impacto diferente en la integridad de los complejos del TCR. Brij96 es el detergente más suave, extrae todos los complejos TCR manteniendo intactos tanto los complejos monovalentes como los multivalentes. Por el contrario, la digitonina rompe los complejos multivalentes en sus componentes monovalentes. Teniendo en cuenta los diferentes efectos de los detergentes, la coexistencia de complejos monovalentes y multivalentes está de acuerdo con todos los datos previamente publicados (6, 13-15, 19, 20, 23, 25, 28, 29).

ARQUITECTURA DE LOS COMPLEJOS TCR MULTIVALENTES

En la línea T de ratón 2B4 la mitad de los heterodímeros TCR α/β están presentes como complejos monovalentes y el resto como complejos multivalentes con distinto grado de valencia (23). Esta proporción varía entre distintos tipos celulares para un heterodímero TCR α/β dado (24), indicando que factores distintos a la especificidad del TCR determinan el grado de multimerización en linfocitos T en reposo.

Como se muestra por microscopía electrónica, los complejos TCR grandes y pequeños están distribuidos de manera no homogénea por la superficie celular, dejando grandes áreas libres (Figura 2 e I. Arechaga, H.

M. van S., J.M. Valpuesta, W. S. & B. A., datos no publicados). Los complejos multivalentes se disponen de forma lineal, dejando muy poco espacio entre las partículas de oro utilizadas para visualizar los complejos. Puesto que la resolución del microscopio electrónico es mayor que 1 nm y el tamaño predicho de una unidad de TCR es superior al diámetro de las partículas de oro utilizadas (10 nm) (30), concluimos que las unidades del TCR deben estar lo suficientemente cerca como para establecer interacciones proteína-proteína. Además, el empaquetamiento de los complejos multivalentes en ordenamientos lineales, más que en dos dimensiones, supone un apoyo adicional a la idea que interacciones proteína-proteína son las responsables de la multimerización del TCR. No obstante, el desensamblaje de los complejos TCR multivalentes tras la extracción de colesterol (23), sugiere que interacciones lípido-proteína tienen también un papel estructural dentro de los complejos multivalentes. Es así probable que el colesterol confiera estabilidad a los complejos multivalentes, pero no a los monovalentes. Esta conclusión está apoyada también por un estudio que indica que existen dos poblaciones de TCR diferentes en la superficie de las células vivas, una sensible y la otra resistente a la extracción de colesterol (31). Debido a la dependencia de colesterol, los complejos TCR multivalente podrían estar presentes en balsas lipídicas, mientras que los receptores monovalentes estarían excluidos. Puesto que los niveles de colesterol en el ER son bajos (32), es cuestionable que los experimentos de traducción *in vitro* de Wucherpennig y colegas pudieran permitir detectar los complejos multivalentes (6, 15).

LA ESTEQUIOMETRÍA DEL TCR NO ESTÁ TODAVÍA RESUELTA

Aunque la estequiometría realmente relevante es la del TCR en la membrana plasmática, en el momento presente sólo se tiene información sobre estequiometrías en micelas de detergente. Las estequiometrías en detergentes más suaves que la digitonina está todavía por conocerse. Cuando se utilizó el detergente Lubrol, que mantiene los complejos multivalentes intactos, en el sistema de traducción *in vitro*, se encontró

una relación 1:1:1:1 para $\alpha\beta:\gamma\epsilon:\delta\epsilon:\zeta\zeta$ (15). Puesto que no se sabe si los complejos multivalentes se pueden formar en el ER, es difícil interpretar los datos de Lubrol, pero podrían indicar que el TCR monovalente tiene la estequiometría $\alpha\beta\gamma\epsilon\delta\epsilon\zeta\zeta$. Otra consideración importante es si los complejos multivalentes derivan directamente de la multimerización del complejo monovalente, o si dentro de los complejos multivalentes las distintas subunidades mantienen proporciones diferentes. Una posibilidad interesante es que en la membrana plasmática se establezca un equilibrio dinámico entre los receptores multivalentes y monovalentes.

Hasta que la estequiometría no esté resuelta es prematuro concluir si cada carga positiva potencial en la membrana plasmática está compensado por una (17, 19) o por dos cargas negativas (6). En este contexto, merece la pena mencionar que los estudios de mutagénesis llevados a cabo para determinar cómo se produce la interacción entre aminoácidos cargados (6), fue únicamente realizada en presencia de digitonina y, por lo tanto, puede no reflejar las interacciones que ocurren en membranas intactas.

AGRUPARSE PARA AUMENTAR LA SENSIBILIDAD

Hemos demostrado recientemente que los complejos multivalentes son activados por concentraciones bajas de pMHC, mientras que los monovalentes permanecen inalterados (23). Este descubrimiento podría explicarse por tres mecanismos diferentes. Primero, los complejos multivalentes probablemente aumentan la avidéz por el ligando (pMHC) que también se expresa en grupos en la superficie de las APCs (33-35). Una consecuencia podría ser que a bajas concentraciones de ligando solo los complejos multivalentes son contactados, mientras que los complejos monovalentes requieren concentraciones de ligando más altas (23). Esto es especialmente evidente cuando se consideran complejos de MHC con péptidos propios que tienen una afinidad intermedia por $\text{TCR}\alpha/\beta$. Estos complejos no pueden activar al TCR por sí mismos (Figura 3C), pero podrían aumentar la sensibilidad de los linfocitos T a concentraciones bajas de antígeno (36-38). En estas condiciones sólo los complejos multivalentes serían activados debido a su avidéz más alta por pMHC

comparada con la forma monovalente (Figura 3A). El TCR monovalente sería únicamente activado a concentraciones de agonista muy altas (Figura 3C y D). Segundo, los complejos multivalentes pueden permitir la propagación de señales de activación desde los TCR α/β ligados por pMHC a receptores no ligados dentro del mismo complejo multivalente, amplificando por lo tanto el efecto de unión (Figura 3B). Este mecanismo puede explicar la alta sensibilidad de los linfocitos T. En este modelo, las moléculas de MHC asociadas a péptidos propios juegan también un papel en la ocupación de heterodímeros TCR α/β no unidos a pMHC agonista dentro de los complejos multivalentes, contribuyendo a activar receptores adicionales (Figura 3B). Tercero, la organización lineal de los complejos multivalentes podría contribuir a que una única molécula de pMHC active de forma seriada a varios TCRs (39).

Los complejos multivalentes podrían ser los responsables de la respuesta de los linfocitos T a muy bajas concentraciones de antígeno; condiciones que se dan, por ejemplo, al comienzo de la respuesta inmune (Figura 3A). Mediante modelado matemático se ha propuesto que los complejos multivalentes permiten efectos cooperativos que permiten amplificar pequeñas diferencias en la afinidad del ligando (40). Por lo tanto, los complejos multivalentes del TCR podrían ser más eficaces que los monovalentes en la discriminación entre complejos pMHC distintos. Este mecanismo podría resolver la paradoja de baja afinidad/gran especificidad de la interacción TCR-pMHC.

LOS COMPLEJOS MONOVALENTES ELEVAN EL UMBRAL DE SATURACIÓN DEL TCR

Los linfocitos T responden a un amplio rango de concentraciones (8, 11, 12). Cuando los complejos multivalentes estén ya saturados por pMHC, los monovalentes serían todavía susceptibles de ser estimulados a concentraciones crecientes de pMHC (23). De hecho, según el modelo de Bray y colegas, la expresión de formas monovalentes y multivalentes de un receptor dado en la células puede dotar a las mismas de gran sensibilidad a bajas concentraciones de ligando y respuestas escaladas al ligando cuando las concentraciones del mismo ya son altas (41). Por lo

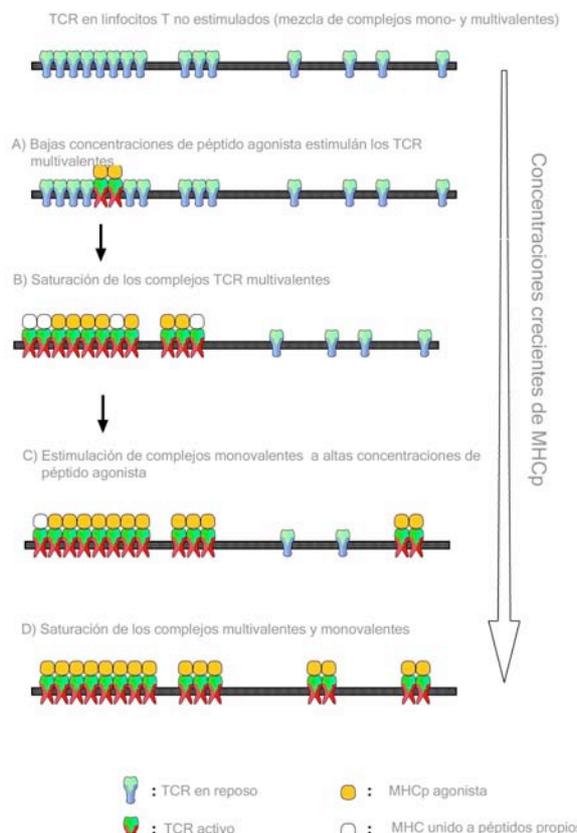


FIGURA 3.- La combinación de complejos multivalentes y monovalentes dota a los linfocitos de T de gran sensibilidad a antígeno y de un amplio rango de respuesta. En linfocitos T en reposo, el TCR está organizado en agrupaciones más o menos grandes, resultando en una mezcla de receptores monovalentes y multivalentes de distinto grado. **A)** Sólo los complejos multivalentes son capaces de responder a bajas concentraciones de péptido agonista asociado a MHC (MHCp), debido a su mayor avidez por TCR multimérico (representado como una rueda con dos raíces). **B)** A concentraciones medias de MHCp agonista, los complejos multivalentes del TCR resultan saturados. Algunos TCRs de los complejos multivalentes pueden ser ocupados por moléculas de MHC unidas a péptidos propios de baja afinidad (en blanco). **C)** A concentraciones altas de MHCp agonista los complejos monovalentes del TCR empiezan a ser ocupados. Esto permite a los linfocitos T seguir respondiendo a concentraciones crecientes de antígeno cuando los TCR multivalentes están ya ocupados en su totalidad. **D)** Sólo a muy altas concentraciones de MHCp, cuando todos los complejos TCR, multivalentes y monovalentes, están ocupados, se satura la respuesta del linfocito T.

tanto, la presencia de los TCRs monovalentes podría dotar a la célula T de la capacidad de producir una respuesta dosis-dependiente incluso a concentraciones de pMHC altas, cuando los complejos multivalentes ya estén saturados (Figura 3C y D).

CONCLUSIONES

La controversia sobre la estequiometría del TCR ha sido resuelta mediante la combinación de métodos bioquímicos avanzados utilizando detergentes de distinto tipo en combinación con técnicas no invasivas tales como e inmunomicroscopía electrónica. La demostración de la coexistencia de complejos TCR monovalentes y multivalentes en la superficie de los linfocitos T sirve de base para la construcción de nuevas hipótesis. Esperamos que la demostración de la expresión simultánea de complejos monovalentes y multivalentes del TCR sirva para comprender el funcionamiento del mismo y de la biología de los linfocitos T.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido posible gracias a la financiación recibida de la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (SAF2006-01391), por la Comunidad de Madrid (S-SAL-0159-2006) y por la Deutscher Akademischer Austauschdienst (D/0232957). Se agradece también el apoyo institucional de la Fundación Ramón Areces al Centro de Biología Molecular Severo Ochoa.

REFERENCIAS

- (1) MALISSEN, B. (2003) An evolutionary and structural perspective on T cell antigen receptor function. *Immunol. Rev.* 191: 7-27.
- (2) ALARCON, B.; GIL, D.; DELGADO, P. AND SCHAMEL, W. W. A. (2003) Initiation of TCR signaling: regulation within CD3 dimers. *Immunol. Rev.* 191:38-46.
- (3) RETH, M. (1989) Antigen receptor tail clue. *Nature.* 338: 383.

- (4) BLUMBERG, R. S.; ALARCON, B.; SANCHO, J.; MCDERMOTT, F. V.; LOPEZ, P.; BREITMEYER, J. AND TERHORST, C. (1990) Assembly and function of the T cell antigen receptor. Requirement of either the lysine or arginine residues in the transmembrane region of the alpha chain. *J. Biol. Chem.* 265: 14036-14043.
- (5) COSSON, P.; LANKFORD, S. P.; BONIFACINO, J. S. AND KLAUSNER, R. D. (1991) Membrane protein association by potential intramembrane charge pairs. *Nature.* 351: 414-416.
- (6) CALL, M. E.; PYRDOL, J.; WIEDMANN, M. AND WUCHERPFENNIG, K. W. (2002) The organizing principle in the formation of the T cell receptor-CD3 complex. *Cell.* 111: 967-979.
- (7) PURBHOO, M. A.; IRVINE, D. J.; HUPPA, J. B. AND DAVIS, M. M. (2004) T cell killing does not require the formation of a stable mature immunological synapse. *Nat. Immunol.* 5: 524-530.
- (8) IRVINE, D. J.; PURBHOO, M. A.; KROGSGAARD, M. AND DAVIS, M. M. (2002) Direct observation of ligand recognition by T cells. *Nature.* 419: 845-849.
- (9) DAVIS, M. M.; BONIFACE, J. J.; REICH, Z.; LYONS, D.; HAMPL, J.; ARDEN, B. AND CHIEN, Y. (1998) Ligand recognition by alpha/beta T cell receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 16: 523-544.
- (10) BONIFACE, J. J.; RABINOWITZ, J. D.; WÜLFING, C.; HAMPL, J.; REICH, Z.; ALTMAN, J. D.; KANTOR, R. M.; BEESON, C.; MCCONNELL, H. M. AND DAVIS, M. M. (1998) Initiation of signal transduction through the T cell receptor requires the peptide multivalent engagement of MHC ligands. *Immunity.* 9: 459-466.
- (11) BACHMANN, M.F.; SPEISER, D. E.; ZAKARIAN, A. AND OHASHI, P. S. (1998) Inhibition of TCR triggering by a spectrum of altered peptide ligands suggests the mechanism for TCR antagonism. *Eur. J. Immunol.* 28: 3110-3119.
- (12) COCHRAN, J. R.; CAMERON, T. O. AND STERN, L. J. (2000) The relationship of MHC-peptide binding and T cell activation probed using chemically defined MHC class II oligomers. *Immunity.* 12: 241-250.
- (13) PUNT, J. A.; ROBERTS, J. L.; KEARSE, K. P. AND SINGER, A. (1994) Stoichiometry of the T cell antigen receptor (TCR) complex: each TCR/CD3 complex contains one TCR α , one TCR β and two CD3 ϵ chains. *J. Exp. Med.* 180: 587-593.
- (14) HOU, X.; DIETRICH, J.; KUHLMANN, J.; WEGENER, A. M. AND GEISLER, C. (1994) Structure of the T cell receptor in a T_H1 alpha V beta 2, alpha V beta 8-positive T cell line. *Eur. J. Immunol.* 24: 1228-1233.
- (15) CALL, M. E.; PYRDOL, J. AND WUCHERPFENNIG, K. W. (2004) Stoichiometry of the T-cell receptor-CD3 complex and key intermediates assembled in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* 16: 2348-2357.
- (16) DIETRICH, J.; KASTRUP, J.; LAURITSEN, J. P.; MENNE, C.; VON BULOW, F. AND GEISLER, C. (1999) TCRzeta is transported to and retained in the Golgi

- apparatus independently of other TCR chains: implications for TCR assembly. *Eur. J. Immunol.* 29: 1719-1728.
- (17) GREEN, N. M. (1991) Biological membranes. The semiotics of charge. *Nature.* 351: 349-350.
- (18) ROJO, J. M. AND PORTOLES, P. (1991) A symmetrical view of the T-cell receptor-CD3 complex. *Immunol. Today.* 12: 377-378.
- (19) FERNANDEZ-MIGUEL, G.; ALARCON, B.; IGLESIAS, A.; BLUETHMANN, H.; ALVAREZ-MON, M.; SANZ, E. AND DE LA HERA, A. (1999) Multivalent structure of an alphabeta T cell receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 1547-1552.
- (20) EXLEY, M.; WILEMAN, T.; MUELLER, B. AND TERHORST, C. (1995) Evidence for multivalent structure of T-cell antigen receptor complex. *Mol. Immunol.* 32: 829-839.
- (21) SCHÄGGER, H. AND VON JAGOW, G. (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* 199: 223-231.
- (22) SCHAMEL, W. W. AND RETH, M. (2000) Monomeric and oligomeric complexes of the B cell antigen receptor. *Immunity.* 13: 5-14.
- (23) SCHAMEL, W. W.; ARECHAGA, I.; RISUENO, R. M.; VAN SANTEN, H. M.; CABEZAS, P.; RISCO, C.; VALPUESTA, J. M. AND ALARCON, B. (2005) Coexistence of multivalent and monovalent TCRs explains high sensitivity and wide range of response. *J. Exp. Med.* 202: 493-503.
- (24) HELLWIG, S.; SCHAMEL, W. W.; PFLUGFELDER, U.; GERLICH, B. AND WELTZIEN, H. U. (2005) Differences in pairing and cluster formation of T cell receptor alpha- and beta-chains in T cell clones and fusion hybridomas. *Immunobiol.* 210: 685-694.
- (25) ZAPATA, D. A.; SCHAMEL, W. W.; TORRES, P. S.; ALARCON, B.; ROSSI, N. E.; NAVARRO, M. N.; TORIBIO, M. L. AND JR, R. (2004) Biochemical differences in the alphabeta T cell receptor. CD3 surface complex between CD8+ and CD4+ human mature T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 279: 24485-24492.
- (26) MOSSMAN, K. D.; CAMPI, G.; GROVES, J. T. AND DUSTIN, M. L. (2005) Altered TCR signaling from geometrically repatterned immunological synapses. *Science.* 310: 1191-1193.
- (27) YOKOSUKA, T.; SAKATA-SOGAWA, K.; KOBAYASHI, W.; HIROSHIMA, M.; HASHIMOTO-TANE, A.; TOKUNAGA, M.; DUSTIN, M. L. AND 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.
- (28) BLUMBERG, R. S.; LEY, S.; SANCHO, J.; LONBERG, N.; LACY, E.; MCDERMOTT, F.; SCHAD, V.; GREENSTEIN, J. L. AND TERHORST, C. (1990) Structure of the T-cell antigen receptor: evidence for two CD3 epsilon subunits in the T-cell receptor-CD3 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 7220-7224.

- (29) DE LA HERA, A.; MULLER, U.; OLSSON, C.; ISAAZ, S. AND TUNNACLIFFE, A. (1991) Structure of the T cell antigen receptor (TCR): two CD3 epsilon subunits in a functional TCR/CD3 complex. *J. Exp. Med.* 173: 7-17.
- (30) SUN, Z. Y.; KIM, S. T.; KIM, I. C.; FAHMY, A.; REINHERZ, E. L. AND WAGNER, G. (2004) Solution structure of the CD3epsilon delta ectodomain and comparison with CD3epsilon gamma as a basis for modeling T cell receptor topology and signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 101: 16867-16872.
- (31) UHLIN, M.; MASUCCI, M. G. AND LEVITSKY, V. (2003) Pharmacological disintegration of lipid rafts decreases specific tetramer binding and disrupts the CD3 complex and CD8 heterodimer in human cytotoxic T lymphocytes. *Scand. J. Immunol.* 57: 99-106.
- (32) HOLTHUIS, J. C. AND LEVINE, T. P. (2005) Lipid traffic: floppy drives and a superhighway. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 6: 209-220.
- (33) KRISHNA, S.; BENAROCH, P. AND PILLAI, S. (1992) Tetrameric cell-surface MHC class I molecules. *Nature.* 357: 164-167.
- (34) KROPSHOFER, H.; SPINDELDREHER, S.; ROHN, T. A.; PLATANIA, N.; GRYGAR, C.; DANIEL, N.; WOLPL, A.; LANGEN, H.; HOREJSI, V. AND VOGT, A. B. (2002) Tetraspan microdomains distinct from lipid rafts enrich select peptide-MHC class II complexes. *Nat. Immunol.* 3: 61-68.
- (35) ANDERSON, H. A.; HILTBOLD, E. M. AND ROCHE, P. A. (2000) Concentration of MHC class II molecules in lipid rafts facilitates antigen presentation. *Nat. Immunol.* 1: 156-162.
- (36) WÜLFING, C.; SUMEN, C.; SJAASTAD, M. D.; WU, L. C.; DUSTIN, M. L. AND DAVIS, M. M. (2002) Costimulation and endogenous MHC ligands contribute to T cell recognition. *Nat. Immunol.* 3: 42-47.
- (37) KROGSGAARD, M.; LI, Q. J.; SUMEN, C.; HUPPA, J. B.; HUSE, M. AND DAVIS, M. M. (2005) Agonist/endogenous peptide-MHC heterodimers drive T cell activation and sensitivity. *Nature.* 434: 238-243.
- (38) YACHI, P. P.; AMPUDIA, J.; GASCOIGNE, N. R. AND ZAL, T. (2005) Nonstimulatory peptides contribute to antigen-induced CD8-T cell receptor interaction at the immunological synapse. *Nat. Immunol.* 6: 785-792.
- (39) VALITUTTI, S.; MULLER, S.; CELLA, M.; PADOVAN, E. AND LANZAVECCHIA, A. (1995) Serial Triggering of many T-Cell Receptors by a few Peptide-MHC Complexes. *Nature.* 375: 148-151.
- (40) SCHAMEL, W. W.; RISUENO, R. M.; MINGUET, S.; ORTIZ, A. R. AND ALARCON, B. (2006) A conformation- and avidity-based proofreading mechanism for the TCR-CD3 complex. *Trends Immunol.* 27: 176-182.
- (41) BRAY, D.; LEVIN, M. D. AND MORTON-FIRTH, C. J. (1998) Receptor clustering as a cellular mechanism to control sensitivity. *Nature.* 393: 85-88.