



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE
BIOMEDICINA MOLECULAR

**“Participación de la Myo1e en la migración de las
células B de ratón”**

TESIS

Que presenta:

M. en C. Daniel Alberto Girón Pérez

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE

BIOMEDICINA MOLECULAR

Director de la tesis:

Dr. Leopoldo Santos Argumedo

Ciudad de México

Agosto, 2019

Director de la tesis

Dr. Leopoldo Santos Argumedo

Investigador Titular del Departamento de Biomedicina Molecular

CINVESTAV-IPN

ASESORES

Dr. Vianey Ortiz Navarrete

Investigador Titular del Departamento de Biomedicina Molecular

CINVESTAV-IPN

Dr. Michael Schnoor

Investigador Titular del Departamento de Biomedicina Molecular

CINVESTAV-IPN

Dr. José Manuel Hernández Hernández

Investigador Titular del Departamento de Biología Celular

CINVESTAV-IPN

Dr. José Moreno Rodríguez

Jefe de Investigación del Hospital Juárez. SSA

Este trabajo se realizó en el laboratorio del Dr. Leopoldo Santos Argumedo del Departamento de Biomedicina Molecular perteneciente al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN).

Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). con el apoyo 255053 otorgados al Dr. Leopoldo Santos Argumedo y la beca otorgada 305392 al M. en C. Daniel Alberto Girón Pérez.

Agradecimientos

Primeramente, quiero agradecer al Dr. Leopoldo Santos Argumedo, por su apoyo incondicional en el desarrollo del proyecto. El trabajar en su laboratorio es una experiencia única donde se aprende día a día. Así mismo le agradezco su confianza de estar en su laboratorio desde la Maestría y hasta concluir el Doctorado.

Al Dr. Vianey Navarrete, por todo el apoyo, recursos y consejos brindados durante todo el proyecto

Al Dr. Michael Schnoor por los recursos proporcionados y su invaluable retroalimentación a este trabajo.

Al Dr. José Manuel Hernández, por sus innumerables consejos y la proporción de bibliografía críticos para el proyecto

Al Dr. José Moreno por su apoyo y sus valiosos comentarios

Al Dr. Héctor Romero Ramírez por su apoyo y sus consejos en la realización de este proyecto.

Al Dr. Julio Cordero por el apoyo y el asesoramiento de procedimientos experimentales que fueron críticos para la realización de este proyecto.

Al Técnico Lenin Estudillo por ser mi amigo y darme las facilidades en el desarrollo de todas las actividades diarias, además de los consejos proporcionados que hicieron invaluable su amistad, dando un ejemplo de la buena fe y humildad de las personas.

Al Técnico Jesús Guzmán (Chuchin) por ser mi amigo y dar las facilidades para el desarrollo del proyecto.

A la C. a Dra. Mariana Hernández, por ser un apoyo incondicional y aguantar mis platicas muy bobas; además de darme consejos tanto de la vida personal como de la profesional y pasar muy buenos momentos juntos, así mismo es una persona que aprecio demasiado en muchos aspectos de mi vida.

A la M en C. Karen Valenzuela y a la M en C. Verónica Martínez por su amistad y los momentos brindados.

A la médico y amiga Alejandra (Alemon) por sus consejos que me ayudaron a crecer como persona, además de hacer más amena la convivencia en el laboratorio con sus pláticas, bromas, risas, y memes generados (no publicables), Agradezco su invaluable amistad.

Al Dr. Eduardo Vadillo, por brindarme su amistad, confianza y asesoramiento en diferentes experimentos.

Al M. en C. Carlos Emilio, por su amistad y en otras palabras por ser Carlitos

A la B.Q. Diana (Dianita) por su amistad y apoyo cuando más se necesita, además de ser una persona con un carácter que ayuda a crecer a muchas personas.

A la M. en C. Anais Sulamita Fabela. Por su amistad y su apoyo en cualquier cosa que se necesite.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de antes y ahora: Noe, Cesar, Orestes, Julio, Noe Herminio, Carolina, David, Gabycita Misael, Diana Olguín, Shantall, Fernanda, Kaleb, Sosa, Héctor, Erick, Laura Manzanares. Muchas gracias por la ayuda y asesoría recibida durante la estancia del laboratorio

A mis compañeros y amigos de otros laboratorios. Samuel, Uriel, Dana, Paola, Juan Carlos, Itze, Edith, Rodrigo, los Pedros, Ramon, Idaira, Celeste, Paty, Laura, Julio, Gina, Anais, Dxine. Igualmente, muchas gracias por su ayuda y momentos compartidos.

Dedicatorias

A mis padres y hermanos que me han apoyado en todo momento y que me apoyan en cualquier momento

A toda mi familia que me respalda

A mis amigos de Nayarit

Para todos ustedes es este trabajo

Gracias por la confianza

Índice	Página
Resumen	1
Abstract.....	2
1.Introducción	3
1.1 Citoesqueleto.....	3
1.2. Migración celular.....	5
1.3. Migración celular de los linfocitos B	6
1.4. Células del endotelio alto (HEVs).	8
1.5. Miosinas.....	9
1.6. Las Miosinas de clase I.....	13
1.7. Las miosinas de clase I en las células del sistema inmunológico.	15
1.8. La Miosina 1e.....	18
1.9. Antecedentes directos	22
2. Justificación.	23
3. Hipótesis.	23
4.Objetivo General	23
5.Objetivos específicos.	23
6. Materiales y métodos.....	24
6.1. Ratones	24
6.2. Cuidado de los ratones.....	24
6.3. Aislamiento de linfocitos y citometría de flujo.	24
6.4. Anticuerpos y reactivos.....	25
6.5. Microscopia confocal	26
6.6. Ensayos de “homing”	26
6.7. Ensayo de quimiotaxis <i>in vitro</i>	27
6.8. Ensayos de adhesión	27

6.9. Western Blot.	28
6.10. Extracción de DNA	29
6.11. Condiciones de PCR	29
6.12. Microscopia Intravital.	29
6.13. Tratamiento de inhibición farmacológica	30
6.14. Ensayos de co-inmunoprecipitación.	30
6.15. Ensayos de “spreading”	30
6.16. Ensayos de adhesión.	31
6.17. Ensayos de proliferación celular.	31
6.18. Transmigración endotelial.....	32
6.19. Análisis estadístico.	32
7. Resultados	33
7.1. Tipificación del ratón deficiente de la Myo1e	33
7.2. La Myo1e es la miosina de clase I más expresada en las células B.	35
7.3. La ausencia de Myo1e no afecta las subpoblaciones de células B	38
7.4. Ensayos de migración in vivo de células totales en el cremáster del ratón Myo1e ^{+/+} y Myo1e ^{-/-}	45
7.5. Ensayos de migración <i>in vivo</i> de células B en el cremáster del ratón Myo1e ^{+/+}	47
7.6. Análisis de la participación de la Myo1e en el ganglio linfático inguinal	50
7.7. Ensayos de “homing” de las células B del ratón Myo1e ^{+/+} y del ratón Myo1e ^{-/-} marcadas con CFSE en diferentes órganos linfoides	59
7.8. Migración en 2D	62
7.9. Análisis de la transmigración celular y de las protrusiones de la membrana	64

7.10. Determinación de las moléculas en la membrana celular de las células B carentes de la Myo1e	66
7.11. Cuantificación de la adhesión celular en células B ausentes de la Myo1e	68
7.12. La Myo1e participa en la localización de LFA-1 pero no de CXCR4 ...	70
7.13. Myo1e interactúa con FAK y su ausencia disminuye la fosforilación en la tirosina 397 de FAK	73
7.14. La Myo1e afecta la polimerización de la actina en la protrusión de la membrana	75
7.15. La Myo1e interacciona con CARMIL y su ausencia repercute en una pérdida del “spreading” de las células B.....	77
7.16. Análisis de la actividad de la GTPasa Rac-1 y de la proteína AKT en linfocitos B carentes de la Myo1e	80
7.17. La Myo1e participa en la vía de señalización FAK/PI3K/Rac-1	83
7.18. Proliferación celular de las células B	86
8. Resumen Gráfico	88
9. Discusión	89
10. Conclusiones	96
11. Perspectivas	96
12. Bibliografía	97

Listas de abreviaciones

Miosina.....	Myo
Miosina 1e	Myo1e
Miosina 1c.....	Myo1c
Miosina 1g.....	Myo1g
Vénulas del endotelio alto.....	HEV
Fosfatidil inositol bi fosfato.....	PIP2
Fosfatidil inositol tri-fosfato.....	PIP3
Tail homology.....	TH
Pleckstrin homology.....	PH
Molécula de adhesión de uniones estrechas.....	JAM
Clúster de diferenciación.....	CD
Células dendríticas.....	DC
Calmodulinas.....	CAM
Proto-oncogene c-Src.....	Src
Tirosina cinasa de Bruton.....	BTK
Zona Marginal.....	MZ
Wiskott-Aldrich-Syndrome protein.....	WASp
Forbol-12-miristato-13-acetato.....	PMA

Resumen

El reclutamiento celular a diferentes órganos y tejidos es un paso crítico para montar la respuesta inmunológica, la migración celular es un proceso multidinámico donde participan diferentes moléculas del citoesqueleto, dentro de las cuales encontramos a las miosinas de clase I.

Las miosinas de clase I son proteínas motoras dependientes de ATP y están compuestas por un monómero de cadena pesada. Las miosinas de clase I comprenden 8 miembros tanto en humanos como en ratón y se pueden dividir en dos tipos: miosinas de cola corta y miosinas de cola larga. La miosina 1e (Myo1e) es una miosina de cola larga, abundante en células B; sin embargo, la función de esta proteína en el fenómeno de migración no ha sido estudiada.

En el estudio actual, nosotros observamos por ensayos de “Western Blot” que la Myo1e es abundantemente en las células B; sin embargo, la carencia de esta proteína no afecta el desarrollo de los linfocitos B o la proliferación celular. Además, en ensayos de microscopia intravital se revelo que la Myo1e es crítica para el reclutamiento, la adhesión, el “spreading” y la transmigración de las células B, tanto en las vénulas del cremáster como en las del ganglio linfático inguinal. Estas observaciones fueron confirmadas usando un sistema de migración en 2D, donde la ausencia de la Myo1e causa alteraciones en la migración celular, también se observó que la Myo1e participa en la localización de las integrinas en las protrusiones de membrana.

Interesantemente, la Myo1e puede interactuar con las proteínas del citoesqueleto como: la cinasa de adhesión focal (FAK) y la molécula CARMIL, lo que afecta la fosforilación de varias proteínas (Rac-1, AKT, FAK), así como la polimerización de actina en el borde líder de la célula. Esto hallazgos nos indica que Myo1e participa en la vía de señalización FAK/PI3K/Rac-1, la cual es crítica para el proceso de migración y adhesión de los linfocitos B.

Abstract

The cellular recruitment to different organs and tissues is a critical step to mount the immune response, the cell movement is a multidynamic process where various proteins are involved.

Class I myosins are ATP-dependent motor proteins. That are composed of one heavy chain with a single motor domain. Class I myosins are comprised of 8 members in both human and mouse which can be divided into two types, short-tailed myosins. and long-tailed myosins. Myosin 1e (Myo1e) is a long tail class 1 myosin that is found in abundance in B cells; however, the function of which in cellular migration has not been studied yet.

In current study we observed in western blot assay that Myo1e is expressed abundantly in B cells, however, its absence does not affect the development of B cell lineage or cell proliferation. Also, Intravital microscopy has revealed that Myo1e is critical for the recruitment, adhesion, spreading and transmigration of B cells, both in cremasteric and inguinal lymph node venules, these observations were confirmed by using a 2D migration system, where the loss of Myo1e causes alterations in cell migration. In turn, it was shown that Myo1e participates in the localization and expression of integrins in membrane protrusions.

Interestingly, Myo1e can interact with actin cytoskeletal proteins such as focal adhesion kinase (FAK) and CARMIL, which affects the phosphorylation of various proteins like Rac-1, AKT, as well as the polymerization of actin at the leading edge of the cell. These finding indicates that Myo1e participates in the FAK / PI3K / Rac-1 signaling pathway and thus play a critical role in cellular migration and cell adhesion of B lymphocytes.

1. Introducción.

1.1 Citoesqueleto

El citoesqueleto es una red interconectada de moléculas que dan soporte a la célula y es responsable de los cambios morfológicos. Existen diversas funciones donde participa el citoesqueleto entre las cuales encontramos: la mitosis, la división celular, el control de volumen, la rigidez celular, la adhesión, a los diferentes sustratos, la migración, la secreción de citocinas y en la polaridad celular [1]. El citoesqueleto es un sistema dinámico que recibe diversas señales extracelulares e intracelulares las cuales son integradas por la célula, esto ocasiona la movilización de moléculas y cambios en la forma de la célula. El citoesqueleto es una red de filamentos (actina, tubulina y filamentos intermedios), los cuales son necesarios para la organización de la célula (Figura 1) [2].

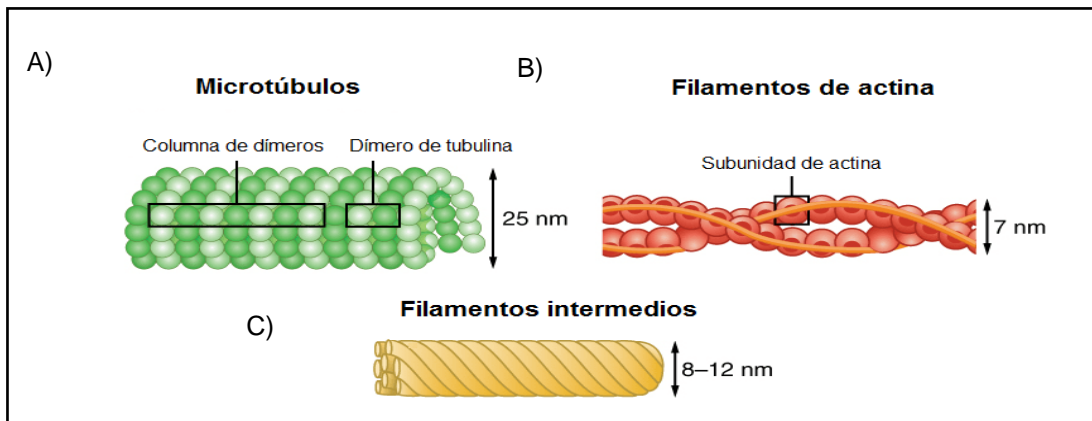


Figura 1 El citoesqueleto está compuesta, por una red de filamentos. A) Microtúbulos B) Filamentos intermedios C) Filamentos de actina [2].

Los filamentos intermedios (10 a 12 nm) son agregados de proteínas fibrosas los cuales están compuesto de queratina ácida y básica. Estructuralmente los filamentos intermedios tienen una estructura central con un dominio α -hélice que le sirve para la formación de complejos diméricos “coiled-coil”, que a su vez forman tetrámeros de proteínas fibrosas (unidad principal). La regulación de los filamentos intermedios es a través de la fosforilación permitiendo el ensamblaje y desensamblaje de estos filamentos; sin embargo, se desconoce si existe un centro organizador de filamentos intermedios. Las funciones

principales de los filamentos intermedios, es proveer fuerza mecánica y resistencia al estrés [3].

Los microtúbulos (25 nm) están formados por subunidades de α -tubulina y β -tubulina, que se unen por enlaces no covalentes y que se unen por medio de la acción de la γ -tubulina. Un microtúbulo está formado por una estructura cilíndrica compuesta por 13 protofilamentos, la formación de los protofilamentos se origina en el centro nucleador de microtúbulos (MTOC) y la regulación de estos filamentos esta dado por el intercambio entre GTP-GDP. La función de los microtúbulos es determinar la posición y movilización de los organelos [4]

Los filamentos de actina (6 nm) están compuestos por una cadena de filamentos, la cual tiene un sitio activo de unión a actina y está compuesta por dos protofilamentos que corren en paralelo enrolladas entre sí. Los filamentos de actina pueden formar ramificaciones de actina y son reguladas por proteínas de unión a actina (ABP). Existen dos formas de organización de la actina, la forma monomérica denominada actina globular (G-actina) y la forma filamentosa (F-actina). La regulación de la polimerización de actina es a través del intercambio de ADP-ATP. La función de la actina es determinar la forma celular y la locomoción de la célula [5].

El citoesqueleto es esencial para el acarreamiento de proteínas, el transporte vesicular, la división celular y los cambios morfológicos de la célula. Las proteínas motoras (dineína, kinesina y miosinas) participan en estas funciones celulares. Estas moléculas son maquinas moleculares que a través de la hidrolisis de ATP o GTP, sufren cambios conformacionales que les permite desplazarse a través de los filamentos. El desplazamiento de estas proteínas motoras es crítico para el transporte de diferentes proteínas, también participan en los cambios morfológicos e incrementan la rigidez de la membrana. [6, 7].

1.2. Migración celular.

La migración celular es un mecanismo complejo y heterogéneo; el cual requiere de un rearrreglo dinámico del citoesqueleto donde la adhesión y la transducción de señales son críticas para estas funciones. Cada estirpe celular requiere de la migración ya sea en fase no continua, como por ejemplo: en las células epiteliales y las neuronas, donde la migración celular es vital para la morfogénesis y la diferenciación celular, mientras que en otras linajes celulares como los leucocitos (fase continua) lo necesitan durante toda su vida [8, 9].

La migración requiere de un paso importante como es la adhesión a un sustrato, esto causa rearrreglos en el citoesqueleto y es regulado por diferentes proteínas como son: las selectinas o las integrinas. Los cambios morfológicos durante la migración celular nos permiten identificar los tipos de migración. (Figura 2) [9]. Los tipos de migración se dividen en ameboide y mesenquimal.

La migración ameboide es una característica de las células del linaje linfoide, donde se forman redes de actina cortical, pero no se forman adhesiones focales y las fibras de estrés están ausentes. La migración ameboide presenta una morfología elíptica, formando protrusiones pronunciadas [9].

La migración mesenquimal es característica de los fibroblastos, donde se forman adhesiones focales y las fibras de estrés son visibles, esto permite la contractibilidad del citoesqueleto. La migración mesenquimal presenta una morfología en forma de huso formando protrusiones alargadas [9].

Las células en conjunto también tienen un tipo de migración colectiva presente durante la morfogénesis, la regeneración y la remodelación de los tejidos. Las vénulas, las glándulas y el epitelio estratificado son ejemplos de este mecanismo de migración [10]; sin embargo, este tipo de migración puede ser clasificada como un subtipo de migración mesenquimal.

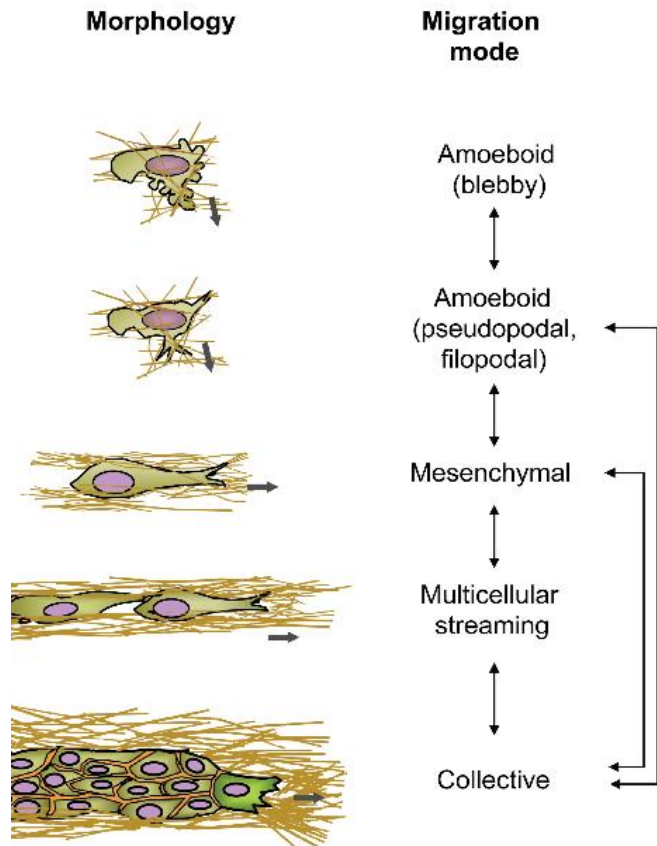


Figura 2. Morfología celular dependiendo de sus modos de migración. Modelos de migración, basada en sus cambios morfológicos (ameboide, mesenquimal y colectiva).

1.3. Migración celular de los linfocitos B

La diferenciación de los linfocitos B requiere de la migración celular, este proceso inicia en la médula ósea y continúa hasta los órganos linfoides secundarios (bazo, nódulos linfáticos). Esta migración está regulada principalmente por quimiocinas e integrinas [11].

El paso de las células B a los nódulos linfáticos es un proceso multidinámico caracterizado por una serie de pasos. Primero ocurre la captura o “tethering” el cual es mediado por selectinas, posteriormente ocurre un proceso denominado rodamiento o rodamiento lento, seguido de un proceso de adhesión regulado por integrinas (LFA-1 o VLA-4) y finalmente la célula se desparrama el cual es relevante para la trans migración celular [12].

El “tethering” o captura es mediada por selectina como CD62-L, esta molécula se puede unir a Glycam-1 o PSGL1 las cuales se expresan en células endoteliales de los vasos sanguíneos o en las vénulas del endotelio alto (HEV). Las proteínas ICAM-1 o VCAM-1 son esenciales para el rodamiento y son abundantes en las HEV [13].

El rodamiento o “rolling” se puede definir cómo el desplazamiento de los leucocitos mediado por selectinas (MAdCAM1 o PSGL1) o de integrinas ($\beta 1$ o $\beta 2$). El rodamiento se puede dividir en dos tipos: el rodamiento (el valor del desplazamiento de los linfocitos $> 15 \mu\text{m}$ en el endotelio) y el rodamiento lento (el valor del desplazamiento de los linfocitos $< 15 \mu\text{m}$ en el endotelio) [14].

La adhesión es un paso indispensable ya que permite que la célula interactúe con diferentes sustratos y permita que se realicen cambios morfológicos. Las moléculas más estudiadas en la adhesión son las integrinas (subunidades α y β), las selectinas (PSGL1) y la molécula de adhesión (CD44). La adhesión en las células B es crítica para el “spreading” celular, este fenómeno permite el incremento del área de contacto con diferentes sustratos (LFA-1, CD44, IgM y MHC-II) [15] también en otro contexto permite incrementar la captura de antígenos [16].

La extravasación es un proceso que permite el paso de los leucocitos al espacio intercelular, el cual es mediado por diferentes moléculas como CD99 o JAM-A, B y C, estas proteínas están presentes tanto en las células inmunes como en las células endoteliales [17]. La regulación de las moléculas JAM (Junction Adhesion Molecules) es importante, ya que se ha descrito que la deficiencia de estas proteínas altera el desarrollo de los linfocitos B y causa una disminución en la formación de los centros germinales. [18].

La extravasación es un proceso donde los leucocitos pasan del lado basal al lado apical de la célula endotelial y esto trae como consecuencia que las células puedan capturar antígenos o liberar citocinas [19, 20].

Las moléculas JAM regulan el proceso de extravasación y pertenecen a la super familia de las inmunoglobulinas. La expresión de las moléculas JAM se ha reportado en los leucocitos y en las células endoteliales. La principal función de las moléculas JAM es la formación de las uniones estrechas y de mantener la polaridad celular [21].

La molécula CD99 es una glicoproteína de 32 kDa, que se expresa en diferentes células del sistema inmune (células T, linfocitos B, neutrófilos, timocitos y las células endoteliales). La función principal de CD99 es la formación de (pockets) entre los leucocitos del endotelio y la matriz extracelular [22, 23].

1.4 Células del endotelio alto (HEVs).

Las vénulas del endotelio alto están caracterizadas por tener una morfología tipo rectangular contienen células endoteliales planas y una membrana basal gruesa (Fig. 3). Las HEV tiene un papel relevante en la migración celular debido a que son abundantes en moléculas de adhesión (CD62-L, ICAM-1, ICAM-2 o VCAM-1) [24] y tienen una baja expresión de la proteína ZO-1; sin embargo, dependiendo del sitio anatómico donde se encuentren las HEVs existen cambios en la expresión de estas proteínas. Las placas de Peyer contienen HEVs y expresan abundantemente la proteína MAdCAM-1 mientras que en los nódulos linfáticos periféricos (inguinales, mesentéricos, intestinales) esta proteína se encuentra ausente.[25].

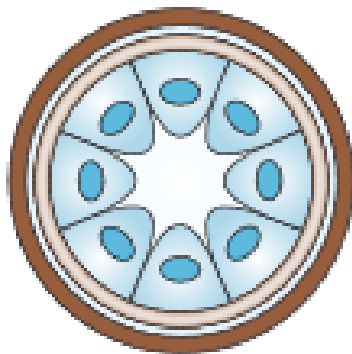


Figura .3 Morfología de las (HEVs)
de los nódulos linfáticos periféricos

Las HEVs de las placas de Peyer expresan otras proteínas como: CHST4, ST6Gal y CD22, las cuales regulan la migración específica a estos lugares ya que los nódulos linfáticos inguinales están ausentes estas moléculas [26]. La expresión diferencial de proteínas en las HEVs causa cambios en la migración celular; por ejemplo, en las placas de Peyer el “homing” de las células B está regulado por la quimiocina CXCL13, mientras en los nódulos linfáticos inguinales o periféricos el “homing” esta modulado por CXCL12 [27]. Esta regulación puede ser debido a una alta expresión de MAdCAM [28].

1.5 Miosinas

Las miosinas son proteínas motoras que se desplazan a través de los filamentos mediante la hidrólisis de ATP, esto permite convertir la energía química a energía mecánica. La primera miosina descubierta fue la miosina II (muscular) en 1864 [29], la cual se asocia a dos cadenas pesadas (dimérica) y se encuentra en las bandas A del musculo. En la actualidad existen diversas clases de miosinas que pueden ser monoméricas o diméricas [30].

Estructuralmente, las cadenas pesadas de las miosinas se pueden dividir en tres regiones: el dominio motor o de cabeza (tiene el sitio unión a actina-dependiente de ATP), el dominio de cuello (que es la encargada de unirse a las cadenas ligeras y permite regular la rigidez del dominio motor) [31] y el dominio de cola (permite la interacción con fosfolípidos de la membrana o con proteínas relacionadas al citoesqueleto) [32]. El análisis filogenético del dominio motor ha permitido determinar la existencia de 40 tipos de miosinas y agruparlas en 18 clases (Figura 4) [33].

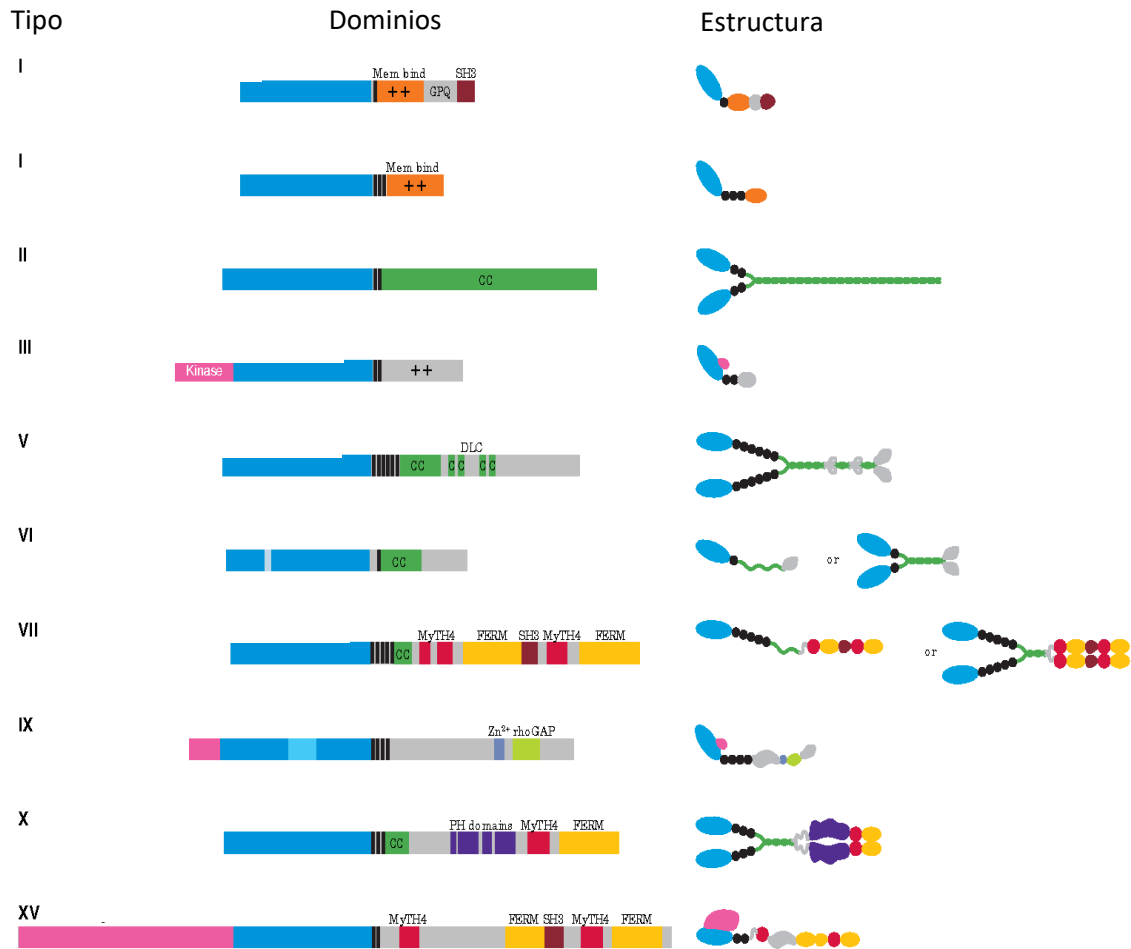


Figura 4. Clasificación de las miosinas de acuerdo con su dominio motor. Las miosinas se clasifican en 18 clases de acuerdo a su dominio motor, sin embargo, en su región de cola tienen diferentes dominios que interactúan con diferentes proteínas del citoesqueleto [32].

El dominio motor es la región más conservada entre las miosinas, ya que se ha descrito que conservan al menos 131 aminoácidos en esta región [34, 35]; además, en el dominio motor se localiza el sitio de unión a actina, el cual es dependiente de la hidrólisis de ATP y permite el desplazamiento de las miosinas por los filamentos de actina.

La región del motor tiene diferentes sitios de fosforilación putativos entre los aminoácidos 35-189. En invertebrados la fosforilación ocurre en sitios denominados TEDS (T: Treonina, E: Glutamato, D: Aspartato, S: serina), la fosforilación de estos residuos causa un incremento en la actividad del dominio motor y una relocalización celular de las miosinas. En vertebrados estos sitios son sustituidos por aminoácidos con carga negativa [34, 36].

El dominio de cuello se caracteriza por contener un número variable de motivos "IQ" (I-Isoleucina y Q-glutamina) y por la secuencia "IQXXXRGXXXR", que permite la interacción con proteínas de calmodulina (CAM) o similares a calmodulina (CAM-like). La región de cuello actúa como un brazo de palanca (lever arm) para modular el movimiento, se ha descrito que el número de dominios IQ afectan la velocidad del deslizamiento entre los filamentos de actina (miosinas II y V) [31, 37].

El dominio de cola es el más divergente entre todas las clases de miosinas, ya que su función es la de asociarse a los diversos fosfolípidos de la membrana o las proteínas cargo, así como también es la encargada de permitir la dimerización. Los dominios de la región de la cola son críticas para la función de las miosinas, un ejemplo de esto son las secuencias de hepta-repetidos, que pueden formar α -hélices "coiled-coil", ocasionando la dimerización de las cadenas pesadas (miosina II, V y XI); sin embargo, las miosinas (I y IX) no tiene esta secuencia, por lo tanto forman monómeros de cadenas pesadas [32]. Adicionalmente, se ha observado que la región de cola puede interaccionar con diferentes proteínas (Tabla 1).

Miosina	Proteínas
I	CARMIL [38], CDC42 [39], FAK [40]
III	INAD [41]
V	Rab 11 [42]
VI	Dab2 [43], GIPC [43]
VII	Slac-II [44]
IX	RhoA [45]
XV	Whirlin [46]

Tabla 1. Proteínas que se asocian a las miosinas a través de su región de cola

El análisis filogenético ha demostrado que todas las miosinas provienen de la duplicación génica y de la diversificación, a partir de una molécula progenitora ancestral. En años recientes se ha hipotetizado que las miosinas provienen de un “cenastor” (ultimo ancestro común) que se diversificó en tres tipos de miosinas: un ortólogo de miosina de clase I, miosinas con un dominio “Diluido” (CBD) encontrando en miosinas de clase V y XI y miosinas con dominio FERM (expresado en miosinas IV, VII, X, XII, XIV y XV) [32, 33, 47]. Esta diversificación entre las miosinas causa que compartan

similitudes entre ellas y da origen a un fenómeno denominado redundancia de funciones donde las miosinas comparten funciones dentro de la célula.

Las miosinas tienen en su dominio motor también llamado “cabeza” donde ocurre reacciones catalíticas de intercambio entre ADP-ATP. Las miosinas V, IX, X y XI exhiben el fenómeno denominado procesividad (donde el dominio motor sufre múltiples ciclos catalíticos que van acompañados de desplazamientos mecánicos entre los filamentos de actina) [48]. La hidrólisis de ATP en el sitio catalítico de la región motora ocasiona que el ADP, se una con gran fuerza a la actina; sin embargo, cuando se une el pirofosfato al ADP (Pi) este se convierte en ATP, ocasionando que la afinidad por la actina decrezca drásticamente ocasionando la separación del dominio de cabeza de la actina (Figure 5) [34, 47, 49, 50]. Este ciclo de intercambio entre ADP-ATP regula la unión a la actina [47] permitiendo que las miosinas se desplacen entre los filamentos.

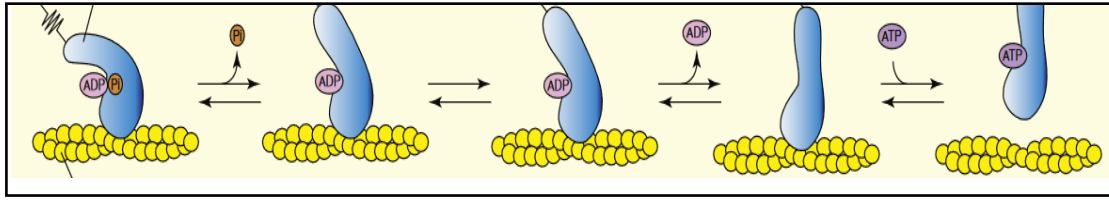


Figure 5. El intercambio entre ADP-ATP regula la unión a los filamentos de actina. El ciclo ADP-ATP regula la asociación de la actina filamentosa y .permite el desplazamiento de la miosina [51].

1.6 Las Miosinas de clase I

Las miosinas de clase I son proteínas monoméricas y participan en diversas funciones celulares como en la migración, la adhesión, la presentación antigénica y el tráfico vesicular.[52, 53]. La primera miosina de clase I fue descrita en *Acanthamoeba castellanii* en 1974 [54]. En humano y en el ratón se ha descrito 8 miosinas de clase I, que van desde la miosina la hasta la miosina lh y se dividen en dos tipos: miosinas de cola corta (miosina la, b, c, d, g y h) y miosinas de cola larga (miosina 1e y 1f) [34, 52].

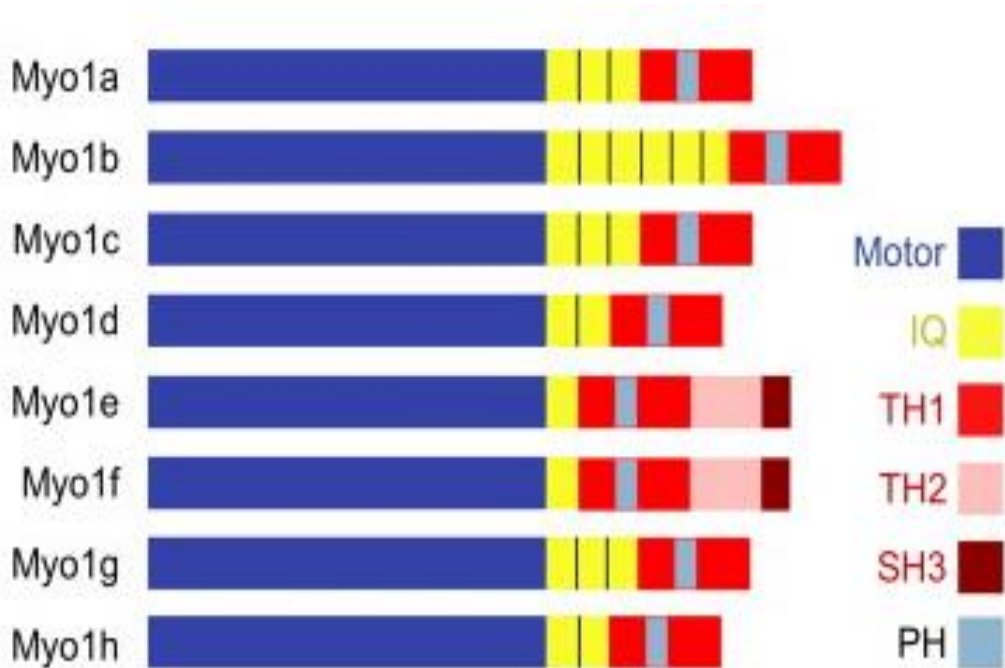


Figura 6. Miosinas de clase I. Existen 8 miembros de miosinas de clase I, que tienen tres regiones (motor, cuello y cola) que sirven para interaccionar con fosfolípidos de la membrana o con proteínas relacionadas al citoesqueleto.

Estructuralmente las miosinas de cola corta tienen: una región motora, una región de cuello que contiene uno o más sitios IQ y una región de cola que contiene un dominio TH1 (tail homology), que interactúan con los fosfolípidos de la membrana; mientras, que las miosinas de cola larga, además del dominio TH1, tienen un dominio TH2 (rico en prolina) y un dominio TH3 (SH3), el cual puede interactuar con proteínas del citoesqueleto [34, 52] (Figura 6).

Las miosinas de cola corta en su dominio de cola tienen un dominio TH1, que comprende 4 regiones betas plegadas ($\beta 1/2/3/4$), donde los dominios $\beta 1$ y $\beta 2$ flanquean el dominio PH (Pleckstrin Homology). El dominio PH tiene una secuencia consenso de “KXXXXXXXXKXR”, enriquecida en aminoácidos básicos (arginina y lisina) los cuales interactúan con las cargas negativas de los fosfolípidos de la membrana; entre los cuales encontramos a fosfatidil inositol 4,5 bifosfato (PIP2) y fosfatidil inositol 3,4,5, trifosfato (PIP3) [52].

El papel de los fosfolípidos PIP2 o PIP3 es anclar a las diferentes clases de miosinas a la membrana plasmática ocasionando que se lleven a cabo diferentes funciones en la célula, por ejemplo: la endocitosis, la secreción de citocinas y la retracción de membrana [38, 55, 56]. Las miosinas de cola larga en su región PH pierden el aminoácido arginina, la cual está cercana al dominio $\beta 2$ causando diferencias en la afinidad de unión de las miosinas de cola larga a la membrana plasmática [57, 58].

La región TH2 es rica en glicina, prolina, alanina o glutamina y puede unirse a la actina independientemente de la actividad ATPasa. Este dominio sirve como andamiaje para el reclutamiento de moléculas asociadas a las miosinas de clase I (paxilina). [59]; además, la delección del dominio TH2 afecta la formación de manojos (“bundles”) de actina [60].

La región TH3 o SH3 (Src homology 3) comprende 60 aminoácidos y estructuralmente comprende 8 beta plegadas antiparalelas en forma de barril

beta y puede unirse a secuencia de prolinas “qPxqP” o PxxP, donde x es un residuo hidrofóbico y “P” corresponde a la prolina [61], esta región está involucrada en proliferación, la migración celular y a las modificaciones del citoesqueleto [62]; además, regula la actividad ATPasa [63]. En *Acanthamoeba*, se ha descrito su interacción con CARMIL o con proteínas homologas a WASp [64]. Recientemente se ha descrito su posible función en acarrear moléculas a las adhesiones focales de la célula [65].

La expresión de miosinas de clase I es diferencial, por ejemplo la miosina 1a se encuentra en los bordes tipo cepillo del intestino permitiendo la estabilidad y la formación de prolongaciones de membrana [66], mientras que la miosina 1c (Myo1c) se expresa en múltiples células como son: los podocitos [67], las células epiteliales del intestino [68] y las células embrionarias [69]. La Myo1c participa en la estabilidad de las uniones estrechas [70], en el transporte de moléculas como Ra1A [71], Glut-4 [72] o la RNA-polimerasa II [73]; otro ejemplo, es la miosina 1h que se expresa en el cartílago de la mandíbula y su deficiencia causa el prognatismo mandibular [74]; sin embargo, el mecanismo molecular es desconocido.

1.7. Las miosinas de clase I en las células del sistema inmunológico.

En años reciente se ha visto la importancia del citoesqueleto en el sistema inmunológico, ya que la deficiencia de diversas GTPasas o factores promotores de la nucleación causan diversas patologías, por ejemplo: la deficiencia de DOCK8 (GTPasa) causa una reducción de las células T y de los linfocitos B; adicionalmente, se incrementan los niveles de IgE [75, 76]. En estudios de pacientes con el síndrome Wiskott-Aldrich (WAS), estos tienen pocas células B y tienen un alto umbral de activación mediado por el BCR [77] un fenómeno similar se observa cuando existe una pérdida de Rac-1 [78]. Hoy en día el estudio del citoesqueleto es relevante para entender la respuesta inmunológica.

Las miosinas de clase I (Miosina 1c, 1g, 1e y 1f) se expresan en diferentes células del sistema inmunológico (linfocitos T, las células B, los macrófagos, los neutrófilos y las células dendríticas) (Figura 7) y participan en diferentes funciones como: la presentación antigénica, la fagocitosis, la migración, la adhesión y la señalización celular.

Population/Subpopulation	Myo1a	Myo1b	Myo1c	Myo1d	Myo1e	Myo1f	Myo1g	Myo1h
Long-term repopulating hematopoietic stem cells	38	27	347	269	94	417	274	65
Short-term repopulating hematopoietic stem cells	36	28	488	160	63	625	442	73
ProB cells	45	46	909	76	63	156	389	46
PreB cells	38	29	1931	64	126	52	575	40
Spleen follicular B cells	34	30	1560	88	2146	234	920	49
Spleen germinal center B cells	44	31	1256	84	2509	89	991	46
Spleen marginal zone B cells	39	36	1187	74	1903	182	726	48
Peritoneal B-1a cells	40	30	1590	255	2604	104	1204	82
Thymus CD8+ dendritic cells	42	31	535	42	95	1459	1420	128
Spleen CD4+ dendritic cells	43	251	395	75	362	2162	1106	184
Spleen CD8+ dendritic cells	48	33	442	70	70	1224	1000	105
Spleen CD8+ plasmacytoid dendritic cells	39	27	690	52	63	505	487	275
Spleen CD8- plasmacytoid dendritic cells	39	29	700	56	63	521	442	226
Epidermal/Langerhans dendritic cells	43	271	1256	155	1910	469	1293	48
Red pulp macrophages	36	40	324	58	110	703	469	45
Peritoneal macrophages thioglycolate-elicited	43	102	744	88	1426	1980	575	44
Classical monocytes, MHCII-	47	26	652	64	47	3282	1346	110
Classical monocytes, MHCII+	51	40	767	68	63	2657	1275	72
Neutrophils	54	37	373	334	63	4298	841	59
Splenic natural killer cells	52	30	278	74	346	2110	575	63
Splenic natural killer cells Ly49CI- subset	51	36	300	76	457	1797	522	58
Splenic natural killer cells Ly49CI+ subset	50	37	232	72	346	1980	566	63
Doble-positive, small resting	49	30	334	78	63	234	381	51
CD4 single-positive, mature	44	23	140	70	94	104	899	61
CD8 single-positive, mature	43	26	140	56	63	339	1027	58
Spleen naive CD4	39	22	117	60	94	68	761	59
Spleen memory-phenotype CD4	42	31	258	72	520	781	788	95
Peyers patches naive CD4	52	33	122	70	63	52	504	46
Spleen CD25+ Tregs	53	34	301	78	510	287	611	79
Spleen naive CD8	47	26	140	66	63	391	619	59
Subcutaneous lymph nodes memory-phenotype CD8	57	37	163	102	79	1131	566	63
Thymic TCR $\gamma\delta$, all DN	44	27	168	62	220	208	673	58
Spleen TCR $\gamma\delta$, all DN	57	42	177	72	268	5343	535	60

-  +Heat map generated with data from: <http://www.immgen.org/>.

Figure 7. Expresión de miosinas de clase I en diferentes linajes celulares del sistema inmunológico [52].

La Myo1c se expresa abundantemente en las células B y se encuentra localizada en los microfilamentos. Estos microfilamentos contienen balsas de lípidos (lipids rafts) donde esta enriquecida la miosina 1c, adicionalmente la miosina 1c se moviliza a la estructura del agrupamiento supramolecular de activación (SMAC) central, que se forma durante la sinapsis inmunológica (Figura 8) [79].

Por lo tanto, la miosina 1c, posiblemente participe en la presentación antigénica.

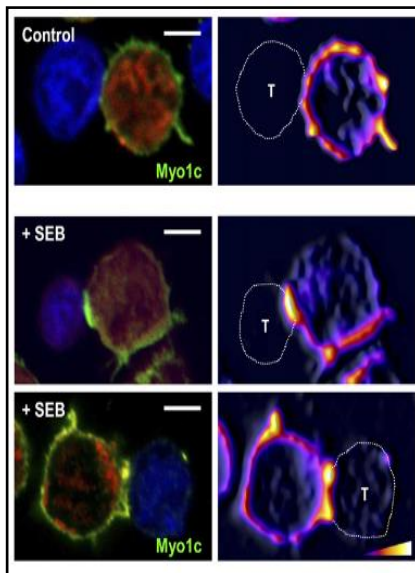


Figura 8. Localización de miosina 1c durante la sinapsis inmunológica.

Las células B de ratón (marcadas con un “cell tracker” rojo) y las células T purificadas, fueron colocadas en ausencia o presencia de enterotoxina B de estafilococos (SEB). La myo1c se localiza en el SMAC, cuando se estimula con SEB [79].

La miosina 1g es una proteína motora, que se expresa en células hematopoyéticas (las células T, los linfocitos B, los macrófagos, las células dendríticas y los neutrófilos) y tiene un peso de 100 kDa [80]. En las células B, la miosina 1g ha demostrado su participación en el reciclamiento de CD44; además, es crítica para mantener la rigidez de la membrana plasmática, [81]. Se ha observado que la deficiencia de miosina 1g en células T (CD4) del ratón OTI (con un TCR, transgénico que reconoce una secuencia específica de la OVA), causa una disminución en la activación de células T, cuando se les presentan OVA en un contexto de sinapsis inmunológica; además, existe una reducción en la supervivencia de los ratones cuando son inoculados con una dosis subletal de LM-OVA [82].

La miosina 1f (Myo1f) tiene un peso de 125 kDa y se expresa en el sistema mielóide (los neutrófilos, los macrófagos y las células dendríticas) [83]. En neutrófilos se ha observado que la Myo1f controla la exocitosis de vesículas y media la adhesión celular (a través de las $\beta 2$ integrinas). En ratones deficientes de la miosina 1f e infectados con *Listeria monocytogenes* se observa un incremento en la susceptibilidad a la infección, lo que sugiere que la Myo1f tiene un papel en la modulación de la respuesta inmunológica [84]. Estudios en macrófagos mostraron que la ausencia de Myo1f causa una disminución

en el “spreading” celular, cuando son estimuladas con LPS [83]. Nuestro grupo de trabajo demostró que la Myo1f, participa en la inflamación intestinal a través de la vía ILK/Akt/mTOR inducido por la actividad de las moléculas STAT1 y STAT3, esto en un modelo de colitis inducido por SDS (Dodecil Sulfato de Sodio) [85].

La Miosina1e (Myo1e) fue descrita inicialmente en áreas ricas de actina cercana a la membrana plasmática [86]. Esta miosina se ha estudiado en macrófagos, donde se ha observado que se localiza alrededor del fagosoma [87, 88]. La ausencia de Myo1e en los macrófagos estimulados con LPS afecta el “spreading” celular y en otro contexto, la ausencia de la Myo1e causa una reducción en la presentación antigénica tanto en los macrófagos como en las células dendríticas [83] debido, a que la miosina 1e interactúa con ARF7EP, la cual está involucrada en el transporte de vesículas que contiene MHC clase II [89].

La Myo1e es abundante en linfocitos B, esto se ha reportado a nivel de mensajero y de proteína [79]; sin embargo, su función en este linaje es desconocida.

1.8. La Miosina 1e

La Myo1e es una proteína motora que está comprendida en 1109 aminoácidos y tiene un peso de 127 kDa, en el ratón está localizada en el cromosoma 15q22.2 y en el humano se encuentra en el cromosoma 9q22. La Myo1e está codificada en 28 exones y se expresa en diversas células como son los podocitos, las células endocrinas, las células endoteliales y las células epiteliales. En células del sistema inmunológico se expresa en los macrófagos, las células dendríticas y los linfocitos B [84]. Estructuralmente la Myo1e (Figure 9) contiene un dominio motor que comprende los aminoácidos (1-692 aa) y su sitio de unión al ATP se encuentra entre los aminoácidos (112-119 aa), además, contiene un solo dominio IQ (700- 712 aa) en su región de cuello (692-724 aa) y en su región de cola, contiene el dominio TH1 (725-922 aa.), seguida de un dominio TH2 rico en prolinas (922-1001 aa.) y adicionalmente

contiene un dominio TH3 o SH3, que permite la interacción con otras proteínas del citoesqueleto (1001-1109) (www.uniprot.com).

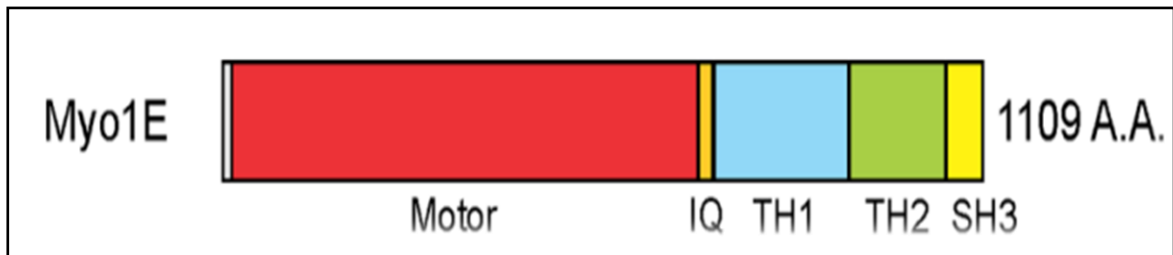


Figura 9. Estructura de la Miosina 1e. Representación gráfica de la miosina 1e la cual contiene un dominio motor, un dominio IQ, además en su región de la cola que contiene los dominios TH1, TH2 and TH3 [90].

La miosina 1e ha sido estudiada ampliamente en células del riñón, ya que en un corte de 52 pacientes con glomeruloesclerosis focal segmentada (FGS), se determinó que las mutaciones en Myo1e (A159P y Y695X) derivan en dos genealogías claramente identificadas. La mutación A159P causa una anormal localización celular, afectando posiblemente la interacción con proteínas relacionadas a la actina o a la membrana plasmática, mientras que la mutación Y695X causa la pérdida de la interacción con las calmodulinas [91].

Los podocitos son células epiteliales con prolongaciones de membrana parecidos a pie (foot-processes) que sirven como uniones estrechas, provocando la formación de una barrera de ultrafiltración la cual previene el paso de macromoléculas a la orina [92-94]. La reducción de la Myo1e en los podocitos causa cambios morfológicos (reducción en las prolongaciones de la membrana) [95] y están asociados a rearrreglos del citoesqueleto de actina [96]; además, la disminución de la Myo1e causa una reducción de las fibras de estrés, pero un incremento de la actina cortical [95]. Estas alteraciones en los rearrreglos de los filamentos de actina, pueden ser la causa de alteraciones en las funciones celulares, como puede ser en la migración y la proliferación celular. Esto se observó en la línea celular MPC5 (podocitos humanos inmortalizados) donde la sobreexpresión de la miosina 1e causa un incremento en la movilidad celular [97].

La función celular donde se ha estudiado con más detalle a la Myo1e es en la endocitosis mediada por clatrina. En la línea celular SK-MEL-28 (células de melanoma humanas) deficiente de la Myo1e, muestran una endocitosis defectuosa de transferrina, así como una reducción en la formación de los filamentos de actina en la copa endocítica. La Myo1e puede interactuar con proteínas nucleadoras de la actina (NPFs), como por ejemplo: la molécula CARMIL o la proteína WAVE [90]. La interacción de la Myo1e con CARMIL se ha reportado en las células HT-1080 (epiteliales humanas) [98]; sin embargo, la consecuencia de esta interacción es desconocida.

La endocitosis está regulada por diferentes proteínas, por ejemplo: la molécula dinamina-2, la proteína AP-1 y la GTPasa RAC 1 [99], las cuales son relevantes para que se lleve a cabo la endocitosis. En un estudio reciente se ha descrito la interacción del dominio SH3 de la Myo1e con la proteína dinamina-2 y esta asociación es necesaria para una eficiente endocitosis mediada por clatrina. La deficiencia de la Myo1e causa una reducción en el reclutamiento de la dinamina-2, que a su vez no permite la eficiente formación del anillo de contricción [100].

La activación celular es un evento donde se participan diferentes vías de señalización, que involucra fosforilaciones, la movilización de moléculas y la activación de las GTPasas; además, de un incremento en la expresión de moléculas como CD69 o CD44, así como también cambios morfológicos de la célula [101-105]. La vía de ERK regula la actividad de la Myo1e ya que permite la relocalización de esta proteína. Este fenómeno es debido a que la cinasa ERK activa la proteína ribosomal-6 (RSK-6) que fosforila la proteína SH3P2.

La molécula SH3P2 en las células en reposo se encuentra unida a los dominios TH2 y TH3, pero cuando la célula se activa a través de un estímulo, ocurre una fosforilación en la serina 62 de la proteína SH3P2 ocasionado cambios conformacionales que derivan en una pérdida de la afinidad por los dominios TH2 y TH3 [106].

La Myo1e se une a los fosfolípidos: fosfatidil inositol 4-5 bifosfato (PIP2) y fosfatidil inositol 3-4-5 trifosfato (PIP3) a través de su dominio TH1. El fosfolípido PIP3 se produce a través de la activación de la enzima PI3K, esta enzima fosforila la posición 3 del anillo del inositol ocasionando la incorporación de un fosfato lo que permite la formación de PIP3. La activación de PI3K se da por varios mecanismos, entre los cuales se encuentra la cinasa de adhesión focal (FAK), PKB (Akt) o RAS [107-109].

La participación de la Myo1e en migración ha sido pobremente evaluada; sin embargo, la Myo1e interactúa con el factor estimulante de osteoclasto 1 (OSTF1), el cual ancla la Myo1e a la membrana plasmática y previene su translocación a sitios de nucleación de la actina, (lamelipodios o pseudopodos) [110]; sin embargo, cuando la célula se activó por medio de Forbol-12-Miristato-13-Acetato (PMA) la Myo1e, pierda la afinidad por la molécula OSTF1 causando la relocalización a los sitios de polimerización de la actina a través de la interacción con los factores promotores de la nucleación.

La Myo1e como ya se había mencionado, se expresa en las células B; sin embargo, no se conocen estudios de esta proteína durante la migración celular en los linfocitos B.

1.9 Antecedentes directos

Nuestro laboratorio se ha enfocado en el estudio de las miosinas de clase I que se expresan en el sistema inmunológico, entre las cuales encontramos a la Myo1c y Myo1g.

Nuestro grupo de trabajo ha demostrado que la Myo1c se expresa en las células B y se ha visto que colocaliza con las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II; esto sugiere su participación en la presentación antigénica [79]; además, participa en la migración celular y en la formación de pseudopodos [111]

La Myo1g se expresa en el sistema hematopoyético. En las células B participa en la migración celular, la presentación antigénica, el tráfico vesicular, el “spreading” y en la tensión de membrana [39, 81, 82].

La Myo1e es abundante en las células B, pero no se ha evaluado su papel en esta estirpe celular. En este trabajo nos enfocamos en la participación de la Myo1e en la migración de los linfocitos B tanto *in vivo* como *in vitro*.

2. Justificación.

La miosina 1e es una proteína motora que es abundantemente en las células B. Estudios en líneas celulares muestran que la reducción de esta proteína causa alteraciones en la adhesión y en la transmigración celular. Existen diferentes factores promotores de la nucleación que colocalizan con la Myo1e; sin embargo, no se ha demostrado su interacción. Hoy en día se desconoce el papel de la Myo1e en los linfocitos B en un contexto de migración celular..

3 Hipótesis.

La Myo1e participa en el proceso de migración y se asocia a proteínas nucleadoras de la actina

4.Objetivo General

Determinar la participación de la miosina 1e en el proceso de migración.

5.Objetivos específicos.

- Determinar la expresión de las miosinas de clase I en las células B
- Investigar la función de la miosina 1e durante la migración celular
- Cuantificar la expresión de diferentes moléculas de adhesión y de los receptores de quimiocinas
- Examinar la asociación de la miosina 1e con moléculas nucleadoras de la actina.

6. Materiales y métodos.

6.1 Ratones

En todos los experimentos se utilizaron ratones control Myo1e^{+/+} (C57BL6J) o ratones Myo1e^{-/-} (B6.129S6(Cg)-Myo1e^{tm1.1Flv}/J) de 8-10 semanas en todos los experimentos. Los ratones fueron proporcionados por el Dr. Richard Flavell (Escuela de medicina de Yale, USA) y la cepa de ratones fue mantenida en el bioterio del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV) (Ciudad de México, México). El comité de ética del cuidado y uso de animales del CINVESTAV aprobó el protocolo que considera los experimentos realizados en este proyecto.

6.2 Cuidado de los ratones

Todos los ratones fueron tuvieron libre acceso al agua y mantuvieron a una dieta que contiene 20% proteína (PicoLab® mouse diet 20, LabDiet® 5058, St. Louis, MO, USA), se mantuvieron en un periodo cíclico de 12 horas de luz y oscuridad con una temperatura de 22 ± 2°C y humedad 50 ± 10%. Todas las cajas contienen el “Aspen chip and Aspen Shaving” (50/50%) (NEPCO® Warrensburg, NY, USA).

6.3 Aislamiento de linfocitos y citometría de flujo.

Las células mononucleares fueron aisladas por Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare) (Little Chalfont, United Kingdom) a través de un gradiente de densidad. Después las células B220⁺ fueron enriquecidas por “panning” usando placas de plástico recubiertas con el anticuerpo s α-Thy-1 (NIM-R1) [112].

Para la activación celular, 2 millones de células B fueron incubadas en medio RPMI 1640 (Life Technologies Cat. # 12633012) (Grand Island, NY, USA) con 10% de suero fetal bovino (FBS) (Thermo Fischer, Scientific) (Waltham, MA, USA). Posteriormente, al cultivo se le adiciono LPS de *Escherichia coli* O55:B5 (40 mg/ml) (Sigma Chemical Co, St) (Louis, MO, USA) además 10 U/ml IL-4

(R&D Systems) (Minneapolis, MN, USA). Las placas se incubaron por 48 hrs a 37 °C con 5% CO₂.

Para la tinción, para la citometría de flujo, los receptores Fc se bloquearon usando 10% de suero de chivo, posteriormente, la suspensión celular fue lavada con PBA (PBS 1X, 1% BSA y 0.01% NaN₃). Cada millón de células, fue teñida por 15 minutos usando los anticuerpos correspondientes. Después de la incubación, las células fueron lavadas con PBA y fijadas con 1% de formaldehído. Los “dobletes” fueron excluidos con el histograma FSC-H contra FSC-A. Después la región de linfocitos fue identificada por su tamaño y granularidad (FSC-A vs. SSC-A). Posteriormente, se seleccionó una región dependiendo del anticuerpo o del fluorocromo requerido. La compensación fue realizada usando tinciones sencillas para cada fluorocromo. El citómetro donde se adquirieron las muestras fue “BD LSRFortessa” (Becton-Dickinson) (San Jose, CA). Las muestras fueron analizadas por el programa “FlowJo v.10” (Tree Star, Inc.) (Ashland, Oregon). Todos los experimentos que se realizaron fueron de acuerdo a las guías de citometría de flujo [113].

6.4 Anticuerpos y reactivos

Los anticuerpos que se utilizaron fueron anti-B220-BV421 (clone RA3-6B2, BioLegend) (San Diego, California, USA), anti-B220/CD45R (clone RA3-6B2, BioLegend), anti-CD19 (Southern Biotechnology Associates) (Birmingham, Alabama, USA), anti-CD29 (clone hm B1-1, BioLegend), anti-LFA-1 (clone HI111, BioLegend), anti-CD62L (clone DREG-56, BioLegend), anti-TLR-4 (clone TF901, BioLegend), anti-CXCR4 (clone 2G8, BioLegend), anti-CD44 (clone IM7, BioLegend), anti-Myo1e (clone PAD434 Cloud Corp) (Katy, TX, USA), anti-CARMIL (clone E-10, Santa Cruz, Biotechnology) (Dallas, TX, USA), anti-WASp (Clone EP2541, Abcam) (Cambridge, UK) anti-Rac-1 (clone B-8, Santa Cruz, Biotechnology), anti-Rac-1 GTP (clone 26903, ser-61, Biomol) (Hamburg, Germany), anti-PI3K (clone sc-1637, Santa Cruz, Biotechnology) anti-AKT (clone sc-5298, Santa Cruz, Biotechnology), anti-phospho-AKT (clone sc-271966, Santa Cruz, Biotechnology). Los reactivos

que se utilizaron para este trabajo fueron TRITC-Faloidina (Thermo Fischer, Scientific), Hoescht 33342 (Thermo Fischer, Scientific), Ly294002 (Sigma Aldrich), La quimiocina murina CXCL12, que fue adquirida por PeproTech (Rocky Hill, NJ, USA).

6.5 Microscopia confocal

Primeramente, las células fueron fijadas por 20 minutos con para formaldehído al 4%. Después las células fueron lavadas con una solución permeabilizadora (triton X-100 (0.1%) disuelta en PBS 1X. por 30 minutos. Posteriormente, los receptores Fc fueron bloqueados con suero de chivo para evitar la unión inespecífica. Para la tinción con el anticuerpo primario, las células se incubaron a una dilución apropiada de dichos anticuerpos por 30 minutos a 4°C y después se lavaron con PBA. Enseguida, las células se incubaron con el anticuerpo incubo con el anticuerpo secundario o con Faloidina por 30 minutos a 4°C. Finalmente, las células fueron montadas en un portaobjetos cubierto con 4 µl de Vecta-shield (Cat. H-1000 Vector labs) (Burlingame, CA, USA). Las laminillas fueron analizadas en el microscopio confocal (Leica Microscopy, TCS SPE, Model DMI4000) (Wetzlar, Germany), en un objetivo de 63X, con un corte 0.5 µm, las ampliaciones se realizaron con un zoom de 2.5, el análisis de las laminillas fue realizadas usando el programa LAS AS lite 5.0 (Leica Microscopy).

6.6 Ensayos de “homing”

Aproximadamente 10 millones de células B purificadas de bazo, del ratón Myo1e^{+/+} o del ratón Myo1e^{-/-} fueron marcadas con diferentes concentraciones (0.1 µm o 0.6 µm o viceversa) de Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) (Thermo Fischer, Scientific). Las células fueron mezcladas a diferentes proporciones celulares 25%, 50% o 75% tanto de células B del ratón Myo1e^{+/+} como del ratón Myo1e^{-/-} hasta completar el 100%. La mezcla de células fue inyectada por la vena de la cola en el ratón con fenotipo silvestre (Myo1e^{+/+}). Previamente, el ganglio linfático derecho fue inoculado con la quimiocina CXCL12 (25 ng/ml), mientras que el ganglio linfático izquierdo fue

inoculado con PBS. El ratón hospedero fue sacrificado después de 2 horas de la inoculación. La sangre, el bazo, y los ganglios linfáticos fueron extraídos y macerados, la suspensión celular resultante fue adquirida en el citómetro de flujo “BD LSRFortessa” (Becton-Dickinson) (San Jose, CA, USA) Las muestras fueron analizadas por el programa “FlowJo v.10” (Tree Star, Inc.). Para las imágenes tomadas por microscopia intravital, ambos nódulos linfáticos fueron extraídos y se cuantificó el número de células por campo, se utilizaron 12 campos por experimento.

6.7. Ensayo de quimiotaxis *in vitro*.

Para la realización de este ensayo, se utilizó la cámara Zigmod (Neuroprobe) (Gaithersburg, MD, USA). Se colocaron 1 millón de células B activadas del ratón Myo1e^{+/+} o del ratón Myo1e^{-/-}. Previamente, las células fueron suspendidas en 0.5 ml de medio RPMI 1640 (Life Technologies). Inmediatamente las células fueron colocadas sobre el cubreobjetos de la cámara, el cual había sido previamente recubierto con fibronectina (2.5 µg/ml) (Sigma-Aldrich) por 30 min a 37°C y 5% CO₂, para permitir la adhesión. Posteriormente, el cubreobjeto fue lavado con PBS, para colocarlo sobre la cámara Zigmod, uno de los canales de la cámara Zigmod fue llenada con RPMI 1640 (Life Technologies) sin suplementar, mientras que el otro canal fue llenado con la quimiocina CXCL12 (2.5 µg/ml) (PreproTech), disuelta en medio base. Para el análisis se capturaron imágenes con una magnificación de 10X y para la secuencia se tomaron imágenes cada 30 segundos por una 1 hora. Las trayectorias y velocidad de migración fueron analizadas en 100 células B proveniente del ratón Myo1e^{+/+} o del ratón Myo1e^{-/-} en cinco experimentos independientes usando el programa ImageJ (NIH), además del plugin “chemotaxis and migration tool 2.0” (Ibidi, Martinsried, Munich, Germany) [114].

6.8 Ensayos de adhesión

Una placa de poliestireno de 96 pozos (Nalge Nunc International) (Penfield, NY, USA) fue recubierta con ácido hialurónico (2.5 mg/ml) (Sigma-Aldrich),

fibronectina (2.5 mg/ml) (Sigma-Aldrich) o poli-L-lisina (0.01%) (Sigma-Aldrich), por 1 hora a 37°C. Después de la incubación, la placa fue lavada dos veces con PBS, para agregar posteriormente, cuatrocientos mil células B en 200 µl de medio RPMI 1640 (Life Technologies) por pozo. Las células se dejaron adherir por 1 hora a 37°C, después la placa fue lavada con PBS, para posteriormente fijarse por 10 minutos con para formaldehído al 4%. Después se fijaron las células y se añadió cristal violeta (7.5 g/l cristal-violeta, 2.5 g/l NaCl, 1.5% formaldehído, 50% metanol), se incubó por 5 minutos. Posteriormente, se lavó la placa exhaustivamente hasta eliminar el exceso de colorante. Finalmente, se añadió SDS al 10% para solubilizar las células. La cantidad de colorante remanente a fue registrada a 540 nm (Multiskan Ascent) (Thermo Fischer Scientific),

6.9. Western Blot.

10 millones de células B fueron lisadas con el buffer RIPA (Tris-HCl 20 mM (pH 7.5), NaCl, 150 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Triton X-100 1%, leupeptina 1 µg/ml, aprotinina 10 µg/ml, and PMSF 1 mM) por 30 minutos a 4°C. La concentración de proteína fue determinada por el kit Modified Lowry Protein Assay (Thermo Fischer, Scientific). Las proteínas fueron separadas por un gel al 12% de SDS-PAGE a un voltaje de 85 se corrió el gel de electroforesis. La concentración de proteína que se colocó en cada pozo fue de 50 µg. Después de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (BIO-RAD) (Hercules, CA, USA) a un voltaje de 120 Miliamperes, por 1.5 hora. Después de la transferencia, la membrana fue bloqueada por 30 minutos con albumina sérica bovina (BSA) (5%) (Thermo Fischer, Scientific). Posteriormente de bloquear, la membrana fue incubada una hora a 37°C con anticuerpos específico para cada proteína que se analizó. Después de la incubación, la membrana se lavó con TBS-Tween 20 (0.01%) (Sigma Aldrich) después se colocaron los anticuerpos secundarios acoplados a HRP. Finalmente, la membrana fue revelada con el kit "Western Blotting Chemiluminescence Luminol Reagent" (Santa Cruz, Biotechnology). La tubulina o la actina fueron usadas como control de carga

6.10. Extracción de DNA

Se corto aproximadamente 0.2 cm de la cola de los ratones silvestres o deficiente de Myo1e en el bioterio del CINVESTAV-UPEAL, para extraer el DNA genómico por el método “Hot shot”, el cual consiste en poner la cola en un tubo de 1.5 ml y se le agrega 50 µl buffer de lisis alcalina (25 mM NaOH, 0.2 mM Na₂EDTA, PH 12). El tubo se incubo y se incubo a 96°C por 30 minutos, posteriormente se coloca en hielo entre 4-5 minutos. Después de la incubación se le agregan 50 µl de solución de neutralización (40 mM Tris-HCl, PH 5), se agito en un vortex y se colocaron 5 µl en tubo de PCR.

6.11 Condiciones de PCR

Las condiciones de PCR para genotipificar y los reactivos usados fueron los siguientes: H₂O (14.4 µl) Buffer PCR (2.5 µl) MgCl₂ (2.5 µl) dNTP (0.5 µl) Primer A (0.5 µl) Primer B (0,5 µl) Primer C (0.5 µl) Taq polimerasa (0.3 µl) DNA genómico (5 µl) en total 26.5 µl.

El primer A contiene la secuencia (TCATGTGTAGCCCAAGCTCACC) Primer B(TTCCGCTTACGGTGGAAATG),PrimerC(ACTCATTCTGTCATCTGACTCC ACC).

Las condiciones para PCR fueron las siguientes: un primer ciclo de 94°C por 5 minutos, después 40 ciclos de 94°C por 1 minuto, 60°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos, finalmente un último ciclo de 72°C por 4 minuto. Se corrió en un gel de agarosa (para verificar el tamaño del amplicón) al 2% por 30 minutos a 100 V.

6.12. Microscopia Intravital.

El ratón hospedero Myo1e^{+/+} fue anestesiado vía intraperitoneal con 12.5 mg/kg xylazina and 125 mg/kg ketamina hidroclicó (Sanofi, México-City, México). El nódulo linfático inguinal fue inoculado con CXCL12 (25ng/ml) (PeproTech), una hora después, 1x10⁷ de células B marcadas con Hoestch 333462 fueron inyectados directamente por la arteria carótida. Las vénulas del nódulo linfático inguinal fueron visualizadas a través del microscopio intravital (Axioscope, Model A1, Zeiss), (Oberkochen, Baden-Württemberg,

Germany) con el objetivo de 20 x y 0.75 con el objetivo de inmersión salina. Los videos e imágenes fueron analizadas usando el programa ImageJ (NIH, Bethesda, MD. USA) y el programa Zen Blue Edición 2.5 (Zeiss, Microscopy). El diámetro de las vénulas, el número de células transmigradas y la velocidad fueron medidas con el programa ImageJ (NIH, Bethesda, MD. USA). El flujo celular, el flujo sanguíneo, el rodamiento lento y el rodamiento normal fueron analizados por el programa Zen Blue Edición 2.5 (Zeiss, Microscopy).

6.13. Tratamiento de inhibición farmacológica

Diez millones de células B activadas fueron tratadas por 2 horas con 20 μ M de LY294002 (Sigma Aldrich). Las células fueron previamente estimuladas con CXCL12 (2.5 μ g/ml) (PeproTech) en medio RPMI 1640 (Life Technologies), suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS). Después del bloqueo y la estimulación, las células fueron usados en experimentos de inhibición de las prolongaciones de membrana, también se analizó la intensidad de pixeles producto de polimerización de actina.

6.14. Ensayos de co-inmunoprecipitación.

Células B en reposo o activadas fueron lisadas con medio RIPA a 14500 R.P.M por 30 minutos a 4°C. Los sobrenadantes fueron mezclados con anti-Myo1e, anti-Focal Adhesion Kinase (FAK) o anti-CARMIL, se utilizaron como controles IgG de conejo, o IgG de rata. Los sobrenadantes fueron incubados toda la noche a 4°C en agitación continua. Después los complejos fueron precipitados con proteína-G-agarosa (Life technology) manteniéndolos a 4°C. Los complejos fueron lavados tres veces con buffer RIPA, enseguida las muestras fueron puestas con buffer laemmli. Finalmente, las muestras fueron corridas en un gel de SDS-PAGE y transferidos en una membrana de PVDF, como previamente se mencionó.

6.15. Ensayos de “spreading”.

Cubreobjetos fueron recubiertos toda la noche con fibronectina (Takara, Clonetec) (Mountain View, Ca, USA) en PBS. Los cubreobjetos fueron

bloqueados con PBS con 10 % de (FBS) por 1 hora a 37°C, después de lo cual se lavaron con medio para colocar 1×10^6 de células B (Myo1e^{+/+} o Myo1e^{-/-}). Los cubreobjetos se dejaron incubar a diferentes intervalos de tiempo a 37°C. Después de la incubación, las células fueron fijadas con 4% de para formaldehído por 15, después se realizó la permeabilizo con Triton x-100 (0.1%) por 10 minutos. Después de la permeabilización, las células fueron lavadas con PBS, y teñidas con TRITC-Faloidina, para después ser montadas con Vecta shield (Cat. H-1000 Vector labs). Finalmente, las imágenes fueron adquiridas en el microscopio confocal (Leica Microscopy, TCS SPE, Model DMI4000), usando el objetivo de 63X. Las imágenes fueron analizadas con el software NIH ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/>).

6.16. Ensayos de adhesión.

Células b. End3 (células endoteliales de cerebro, de ratón) fueron colocadas en una placa de 24 pozos, se dejaron adherir por dos días con el factor de crecimiento endotelial (10 ng/ml), hasta formar una monocapa. Previamente las células B en reposo o activadas fueron marcadas con el “cell tracker” Hoeschst 33342 (10 nM) por 1 hora y media a 37°C, enseguida las células se lavaron con PBS, para quitar el excedente del colorante, una vez teñido 1×10^6 de células B se colocaron sobre la monocapa de las células b. End3 por 4 horas y se dejaron adherir. Posteriormente, la placa se lavó y se contaron las células adheridas en al menos 12 campos. Las placas se observaron en el microscopio de epifluorescencia (Zeis, Axio Scope.A1).

6.17. Ensayos de proliferación celular.

Se colocaron 1×10^6 células B activadas y en reposo en una placa de 96 pozos (Nalgene), posteriormente, se le agrego 80 μ L de ³H timidina (0.625 μ Ci/mL) en medio RPMI 1640. La placa se dejó incubar por 3 horas y medir la proliferación celular se utilizó el contador de centelleo (Beckman, Ls6000).

6.18. Transmigración endotelial

Cámaras “transwell” con un poro de 5 μ M fueron recubiertas con células b. End3 (células endoteliales de cerebro, de ratón) por 1 día hasta formar una monocapa. A las células endoteliales se les agrego TNF- α (5 ng/ml) y factor de crecimiento endotelial (10 ng/ml). En la monocapa se colocaron 1×10^6 células B en reposo o previamente activadas con LPS + IL-4 por 4 horas a 37°C. En la parte inferior de la cámara “transwell” se colocó la quimiocina CXCL12 (25 ng/ml) (prepotech) y medio RPPMI1640 (Life Technologies) como control. Las células fueron previamente teñidas con CFSE. El citómetro donde se adquirieron las muestras fue “BD LSRFortessa” (Becton-Dickinson) y los datos fueron analizados por el software “FlowJo v.10” (Tree Star, Inc.).

6.19. Análisis estadístico.

Los datos presentados muestran la media aritmética con su desviación estándar. Para evaluar diferencias estadísticas, se utilizó la *t* de Student. Un valor de *p* de <0.05 fue considerada como estadísticamente significativa. El valor de *p* es representado como **p*<0.05, ** *p*<0.01 y ****p*<0.001, el número de muestra o células (*n*) es mencionada en cada leyenda de figura.

7. Resultados

7.1. Tipificación del ratón deficiente de la Myo1e

La Myo1e es una proteína que se encuentra codificada en el cromosoma 15 en el humano y 9 en el ratón se encuentra codificada en 28 exones, con un marco de lectura de 236813bp. Para la generación del ratón deficiente de Myo1e se utilizó el sistema Cre-LoxP y por recombinación homóloga entre el gen blanco y el alelo del ratón silvestre ($Myo1e^{+/+}$) se logró eliminar la expresión de la proteína Myo1e. El alelo blanco contiene una inserción de un sitio LoXP y el gen de resistencia a neomicina, pero la estructura de la Myo1e permanece intacta. Cuando se realiza la recombinación en el ratón que contiene la recombinasa "Cre", se causa una deleción de línea germinal del exón 4, generando la formación de un alelo mutante (no funcional) (Figure 10) [115].

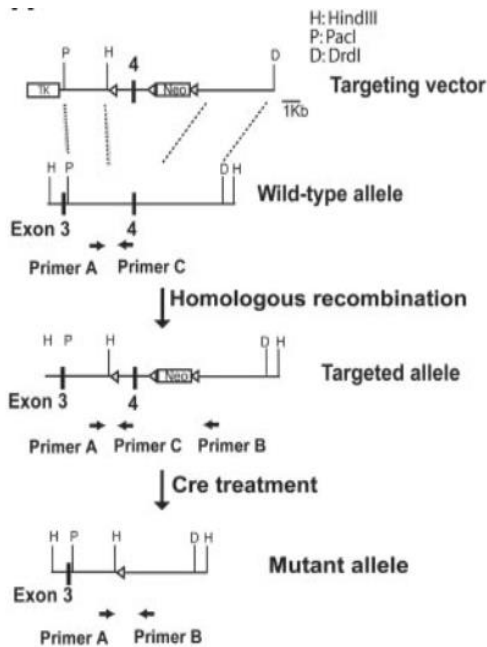


Figure 10. Generación del ratón deficiente de la Myo1e, a través del sistema Cre-LoxP El cual genera un alelo no funcional, eliminando el exón 4 del gen de Myo1e

Para la genotipificación del ratón *Myo1e*^{-/-} se utilizan los iniciadores A, B y C, a través de una PCR del DNA genómico. Los iniciadores A y C se diseñaron para amplificar un fragmento de 140-bp (el cual amplifica una región entre el intrón 3 y 4) en el ratón silvestre, sin embargo, en el ratón deficiente de *Myo1e* (*Myo1e*^{-/-}), no amplifica esta secuencia (ya que el ratón deficiente de *Myo1e* pierde la secuencia que reconoce el iniciador C). Los iniciadores A y B se diseñaron para amplificar un fragmento de 260-bp (el iniciador A amplifica una región del intrón 3 y el iniciador B amplifica una región río abajo del intrón 4) en el ratón deficiente de *Myo1e* (*Myo1e*^{-/-}); sin embargo, en el ratón silvestre (*Myo1e*^{+/+}) no se amplifica esta secuencia (ya que el ratón silvestre no tiene la secuencia que reconoce el iniciador B) (Figura 11).

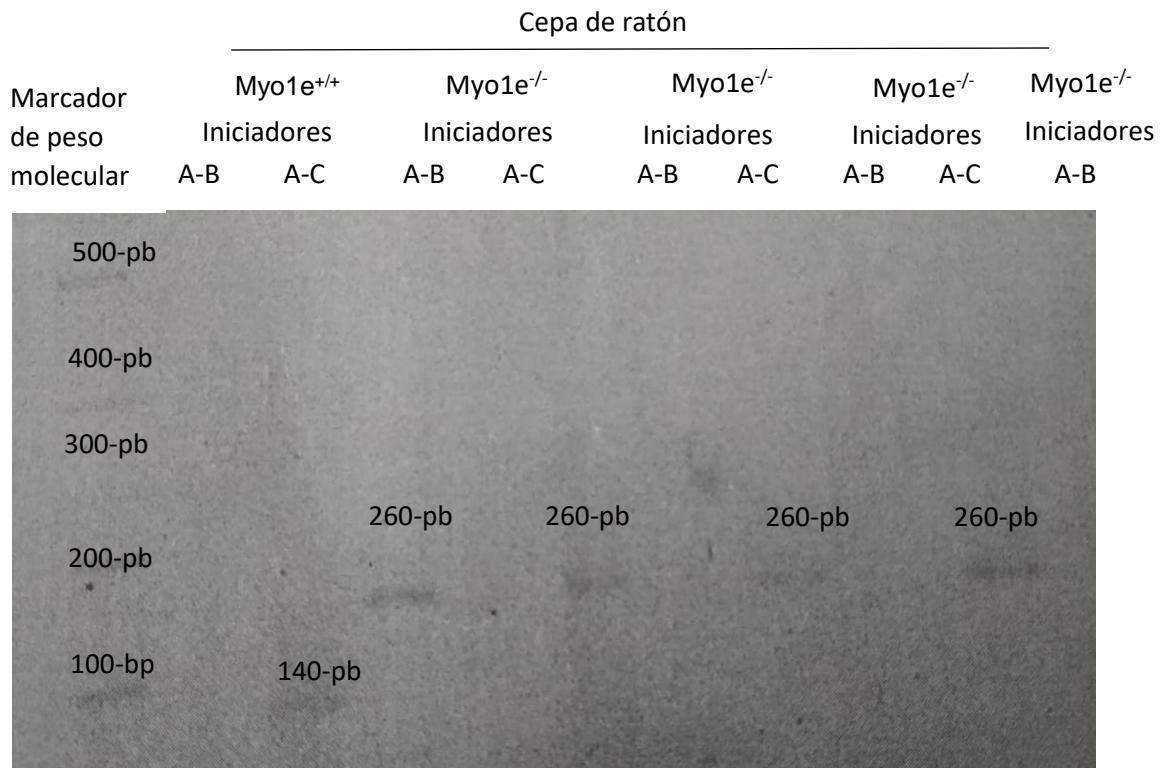


Figura 11. Genotipificación de los ratones deficientes de la *Myo1e*.

Gel de agarosa al 2% con los Iniciadores A , B y C, para genotipificar los ratones silvestres (*Myo1e*^{+/+}) y carentes de la *Myo1e* (*Myo1e*^{-/-})

7.2 La Myo1e es la miosina de clase I más expresada en las células B. La proteína Myo1e se expresa en diferentes estirpes celulares de acuerdo a los mapas de expresión de RNA [52]. Por lo que, se evaluó la expresión de tres miosinas de clase I (Myo1c, Myo1g y Myo1e). Los ensayos de “Western blot” nos mostró que la Myo1e es la miosina más expresada en células B (Figura 12-13), sin embargo, la expresión de la Myo1c y Myo1g también es abundante en los linfocitos B.

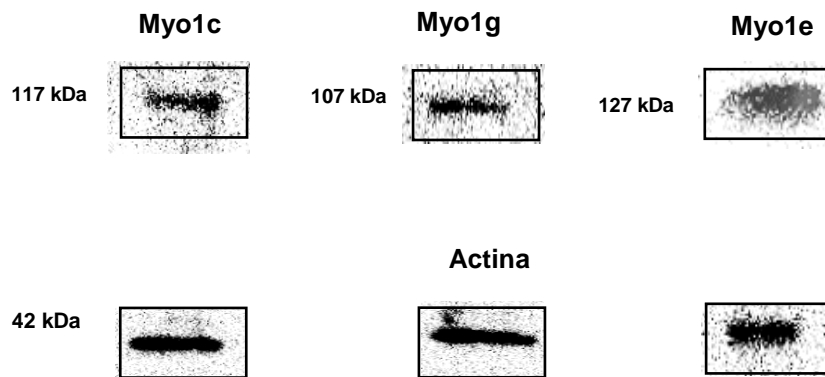


Figure 12. Expresión de las miosinas de clase I en las células B.

“Western blot” de las miosinas de clase I (Myo1c, Myo1g y la Myo1e) en las células B de bazo. Utilizando actina como control de carga. N=3.

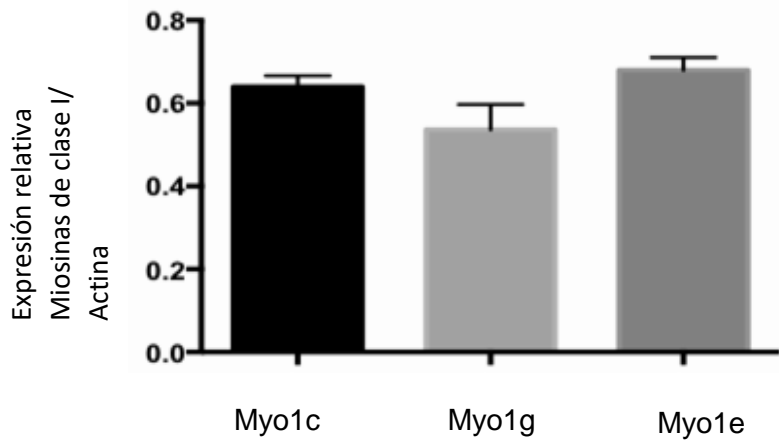


Figure 13. Expresión de las miosinas de clase I en las células B.

Análisis densitométrico de la expresión de la Myo1c, Myo1g y Myo1e, usando actina como control de carga. N=3. (media ± SD).

Las proteínas Myo1e, Myo1c y Myo1g se expresan abundantemente en las células B; por lo tanto, se evaluó si la ausencia de la Myo1e causa un incremento en la expresión de estas miosinas de clase I un fenómeno denominado compensación. Este fenómeno se ha descrito en las miosinas de clase II y de las miosinas de clase III (IIIa y IIIb) [116-118]. Por lo tanto, al realizar ensayos de “Western blot” en extractos proteicos de las células B carentes de la Myo1e encontramos que las miosinas 1c y 1g no incrementan su expresión (Figura 14-15); por consiguiente, podemos concluir que no existe una compensación de al menos de las proteínas Myo1c o Myo1g cuando existe una deficiencia de Myo1e.

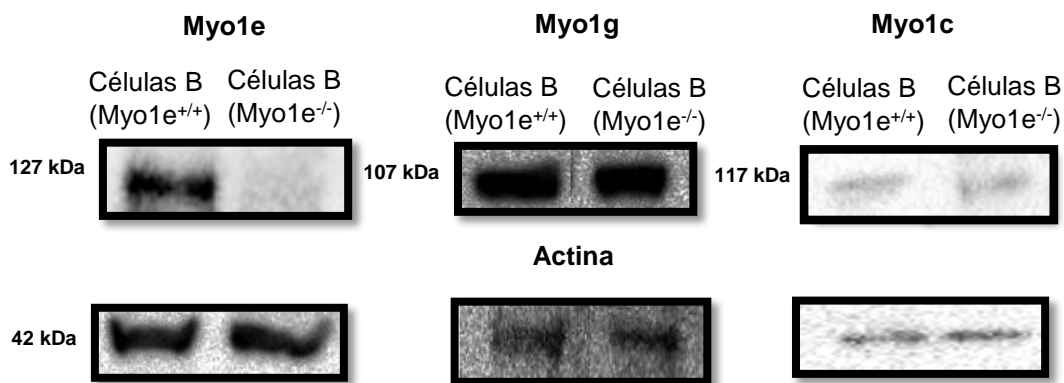


Figure 14. Expresión de la Myo1g y Myo1c en células B deficientes de Myo1e

“Western blot” de la expresión de la Myo1c y Myo1g en lisados de las células B de bazo de ratones silvestres y carentes de la Myo1e, se utilizó actina como control de carga. N=3.

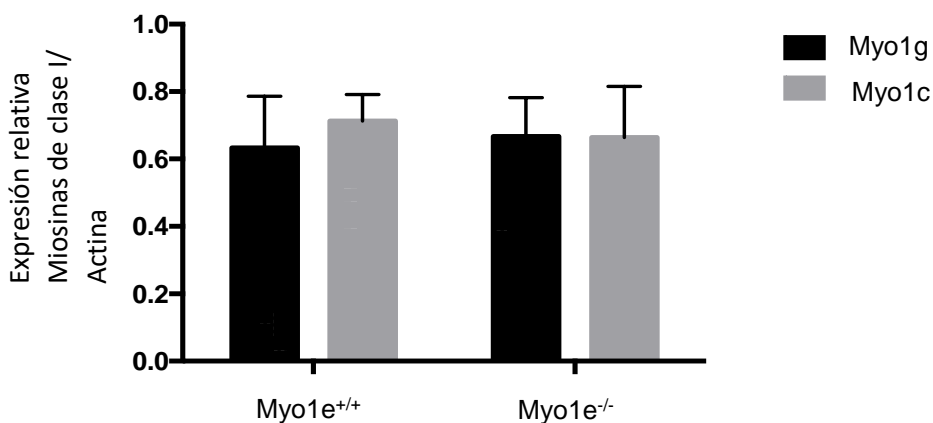


Figure 15. Expresión de la Myo1g y de la Myo1c en las células B de bazo

Análisis densitométrico de la expresión de Myo1c y Myo1g en lisados de las células B silvestres y carentes de la Myo1e, se utilizó actina como control de carga. N=3. (media ± SD).

Un fenómeno que se evaluó fue si la activación celular incrementaba la expresión de Myo1e en células B del ratón silvestre, esto debido a que las proteínas CD44, o CD69 incrementan su expresión cuando la célula B se activa [119-122]. Ensayos de “Western blot” en células B del ratón silvestre en reposo y activadas (LPS + IL-4) mostraron que no se incrementa la expresión de la Myo1e en esta estirpe celular (Figura 16).

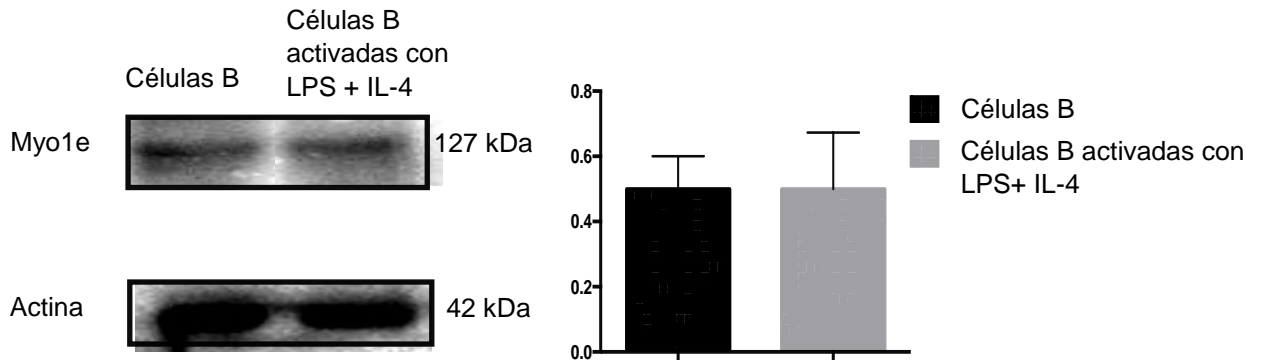


Figure 16. Expresión de la Myo1e en las células B en reposo y activadas

“Western Blot” y análisis densitométrico de la expresión de la Myo1e en lisados celulares de las células B en reposo y activadas (ver materiales y métodos) del ratón Myo1e^{+/+}. se utilizó actina como control de carga. N=3. (media ± SD).

7.3 La ausencia de Myo1e no afecta las subpoblaciones de células B

Los linfocitos B, tienen diferentes estadios de maduración; recientemente, se ha descrito que diferentes proteínas del citoesqueleto tiene un papel en el desarrollo de este linaje, por ejemplo: la ausencia de las GTPasas Rac-1/Rac-2, causa una reducción en las células B del bazo y del peritoneo, mientras que la deficiencia de VAV-1 (una GEF expresada en células B) afecta diferentes linajes (células T, linfocitos B y células NK); por lo tanto, evaluamos si la proteína motora Myo1e tiene repercusión en el desarrollo de células B. Se analizaron los números absolutos de las células B maduras (B220⁺, CD24^{Intermedio}, CD21^{Intermedio}), de las células B (T2) (B220⁺, CD24^{High}, CD21^{High}), de las células B (T1) (B220⁺, CD24^{High}, CD21^{low}). (Figura 17-18); así mismo, se evaluaron las células B del peritoneo como las B1a (B220⁺, CD5^{High}, CD23⁻), las células B1b (B220⁺, CD5⁻, CD23⁻) y las células B2 (B220⁺, CD5⁻, CD23⁺) (Figura 19-20); además, se analizó en las células B de las placas de Peyer (B2) (Figura 21-22). Esto fue posible gracias al uso de diversos anticuerpos específicos, que nos permiten identificar las diferentes poblaciones de linfocitos B.

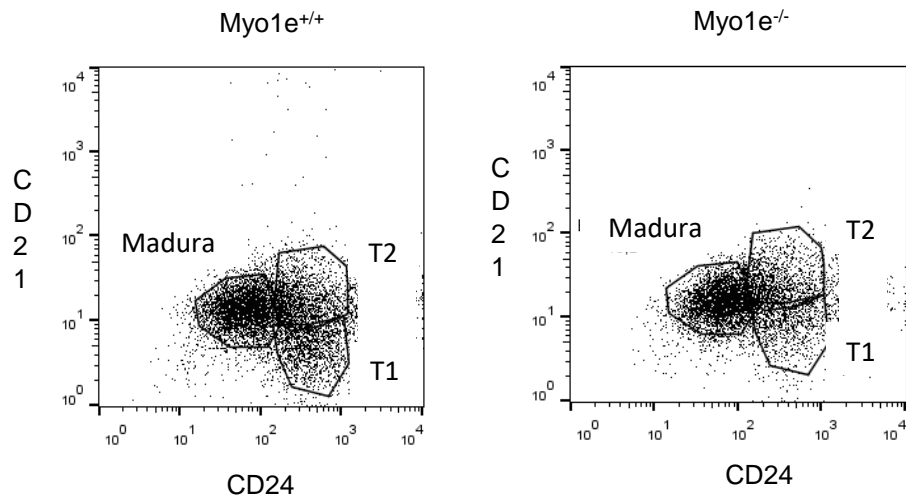


Figure 17. Grafica de puntos de las células B del bazo

Las células de bazo fueron analizadas por citometría de flujo. Se analizaron los eventos de la población B220+.y de acuerdo con la expresión de CD24 y CD21. Se identificó a las poblaciones de células B (maduras), las células B (T2) y las células B (T1). N=3. Para el análisis se utilizó el programa Flowjo v.10

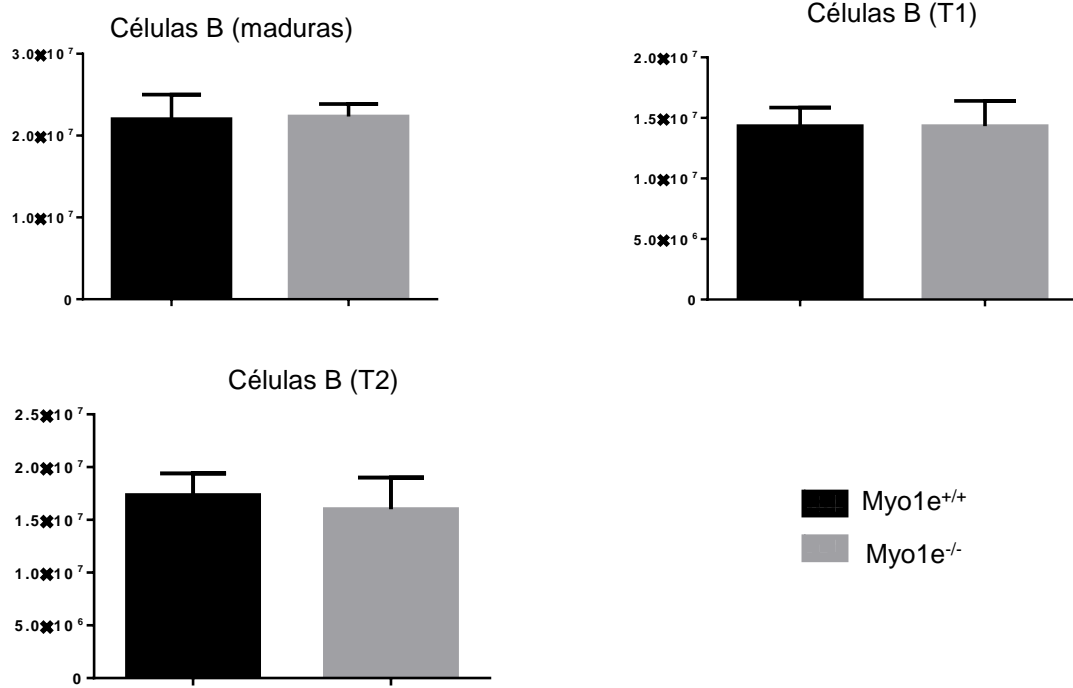


Figure 18. Números absolutos de las poblaciones de las células B.

Números absolutos de las poblaciones de células B (Maduras, T1 y T2) determinadas por citometría de flujo, utilizando los anticuerpos B220, CD24 y CD21. N=3 (media \pm SD)

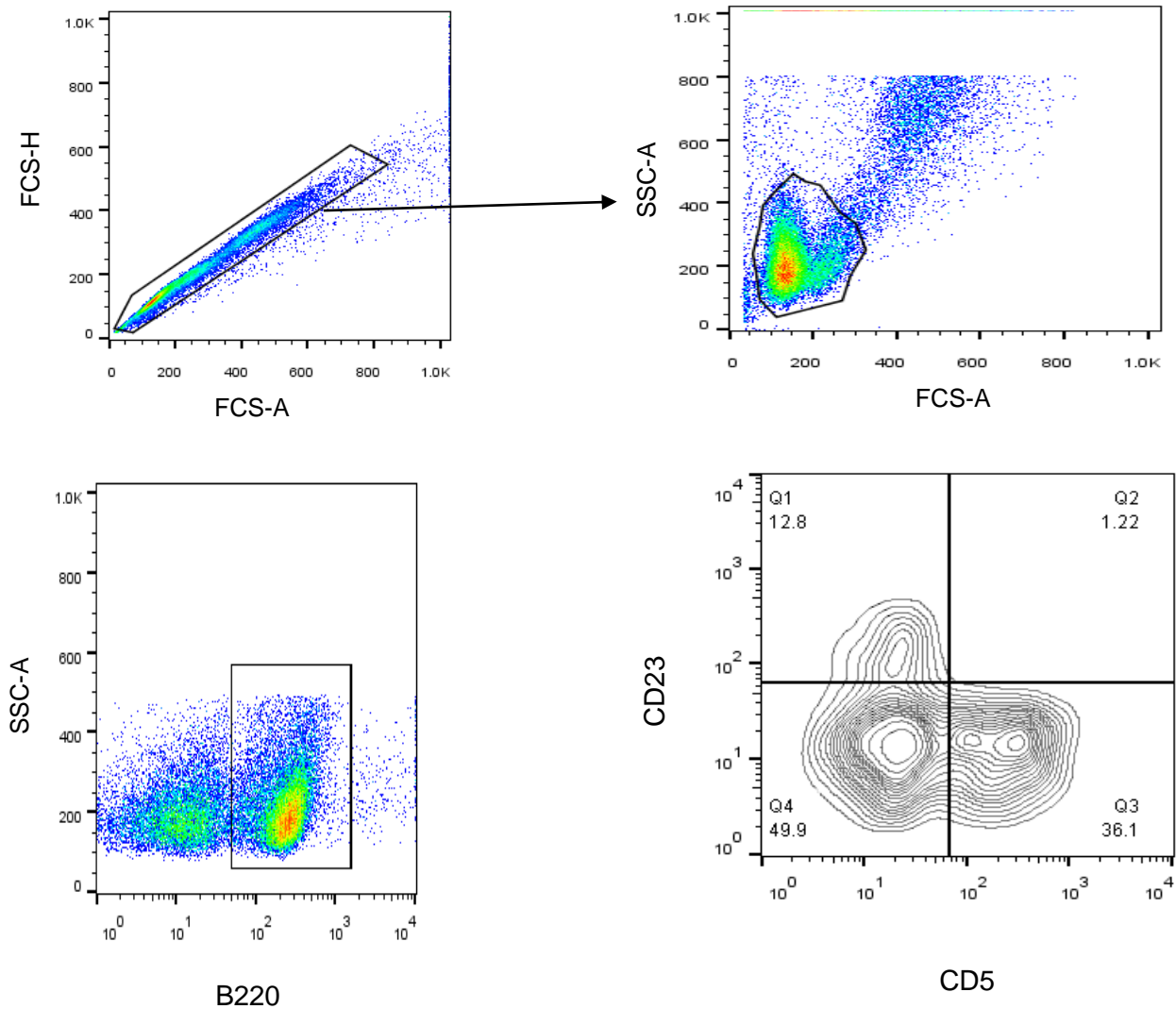


Figure 19. Grafica de puntos de las células B de la cavidad peritoneal

Las células de cavidad peritoneal fueron analizadas por citometría de flujo. Las células se seleccionaron de la población B220+.y se analizaron con base en la expresión de CD5 y CD23. Se identificó a las poblaciones de células B2, B1a y B1b. N=3. Para el análisis se utilizó el programa Flowjo v.10

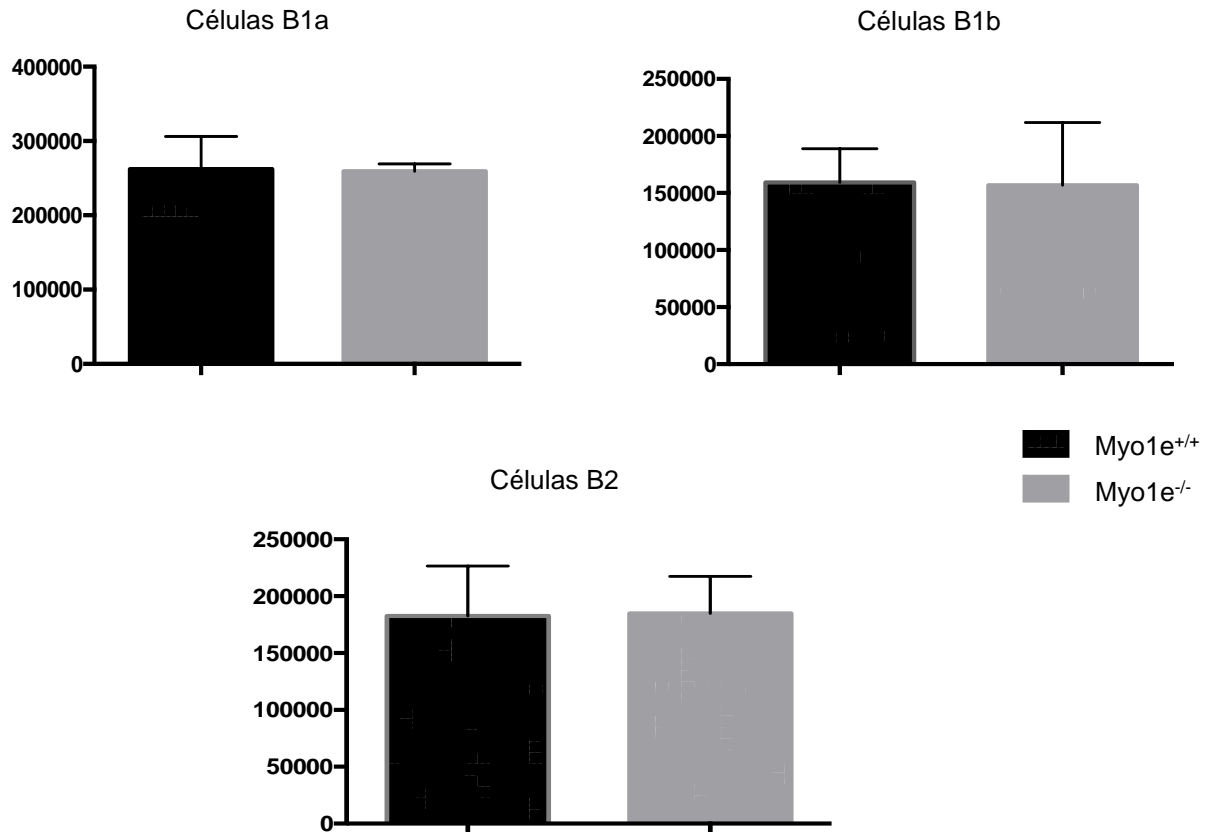


Figure 20. Números absolutos de las poblaciones de las células B

Números absolutos de las poblaciones de células B de cavidad peritoneal (B2, B1a y B1b) determinadas por citometría de flujo, utilizando los anticuerpos B220, CD5 y CD23. N=3. (media \pm SD)

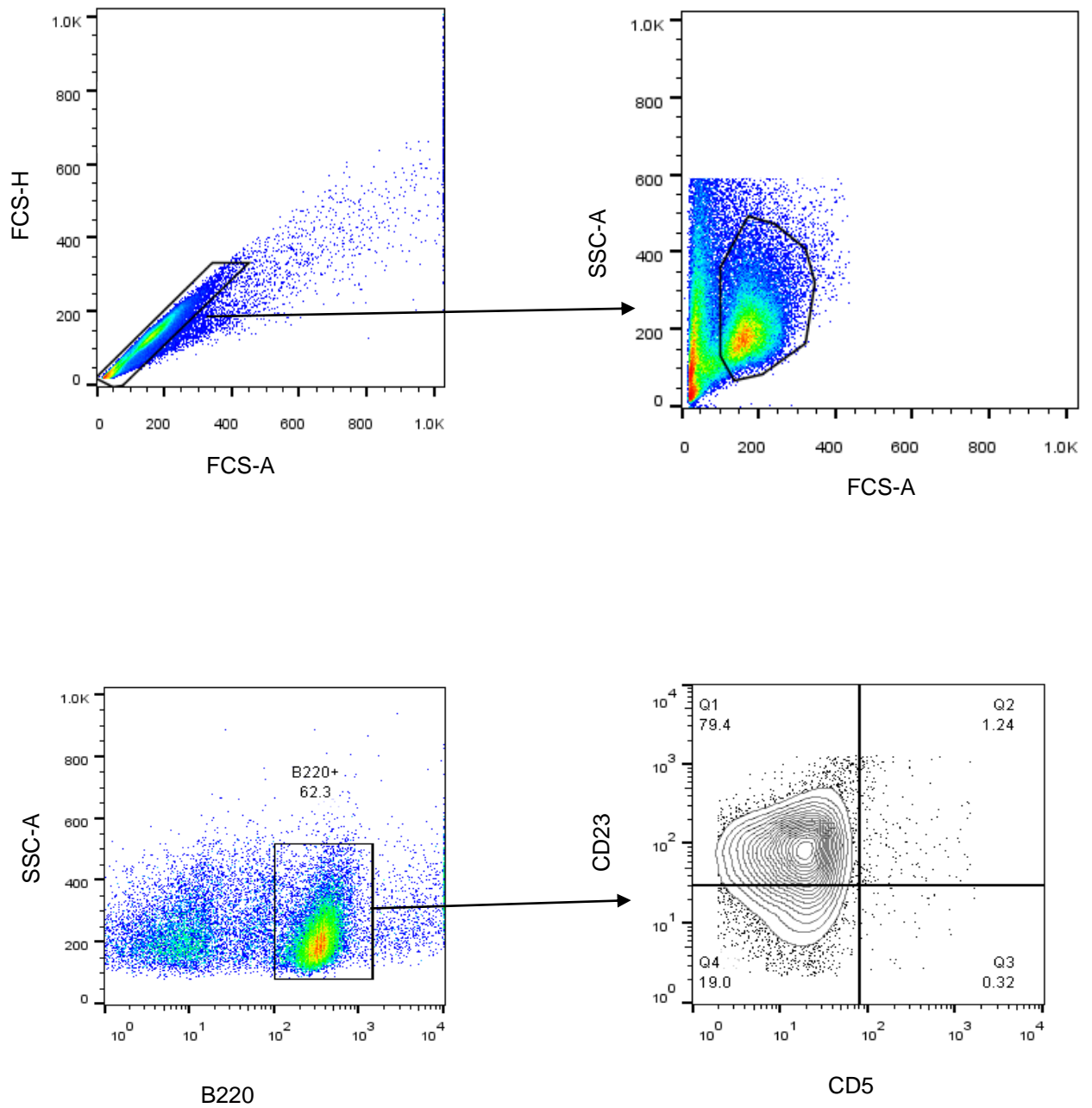


Figura 21. Grafica de puntos de las células B en las placas de Peyer.

Las células de placas de Peyer fueron analizadas por citometría de flujo. Las células se les hizo región en la población B220+.y se seleccionaron con base en la expresión de CD5 y CD23. N=3. Para el análisis se utilizó el programa Flowjo v.10

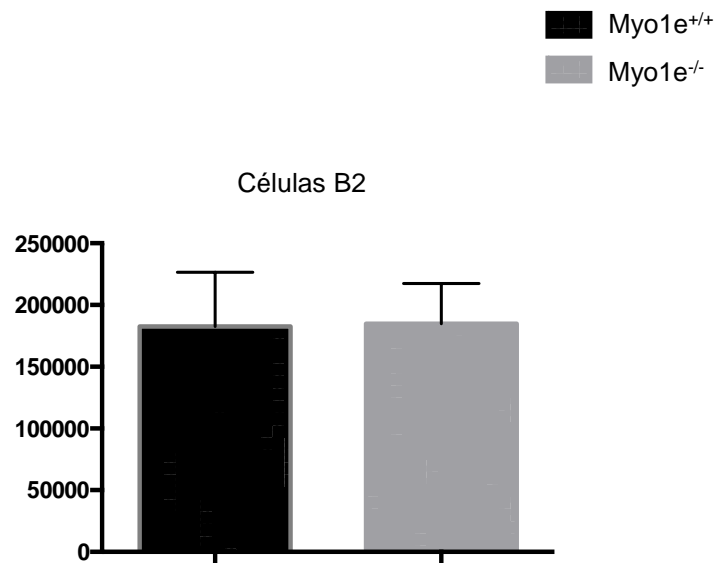


Figure 22. Números absolutos de las poblaciones de las células B en las placas de Peyer.

Números absolutos de poblaciones celulares de las células B de placas de Peyer (B2, B1 y MZ) determinadas por citometría de flujo, utilizando los anticuerpos contra B220, CD23 y CD5. N=3. (media \pm SD).

De acuerdo con estos resultados y dado que no encontramos diferencia a significativa en los números absolutos entre las diferentes subpoblaciones de células B, concluimos que la Myo1e no afecta el desarrollo de los linfocitos B.

7.4 Ensayos de migración in vivo de células totales en el cremáster del ratón Myo1e^{+/+} y Myo1e^{-/-}

La migración celular es un evento coordinado de diferentes proteínas, donde se ha visto que las miosinas de clase I participan en la migración celular tanto en las células T como de las células las B [123]. Para mostrar si la Myo1e participa en la migración celular se evaluó este fenómeno “*in vivo*” a través de la microscopia intravital de los leucocitos en el cremáster del ratón Myo1e^{+/+} y del ratón Myo1e^{-/-}. El análisis indica que la deficiencia de Myo1e afecta la velocidad, la adhesión y la transmigración celular de los leucocitos en el cremáster. (Figura 23-24).

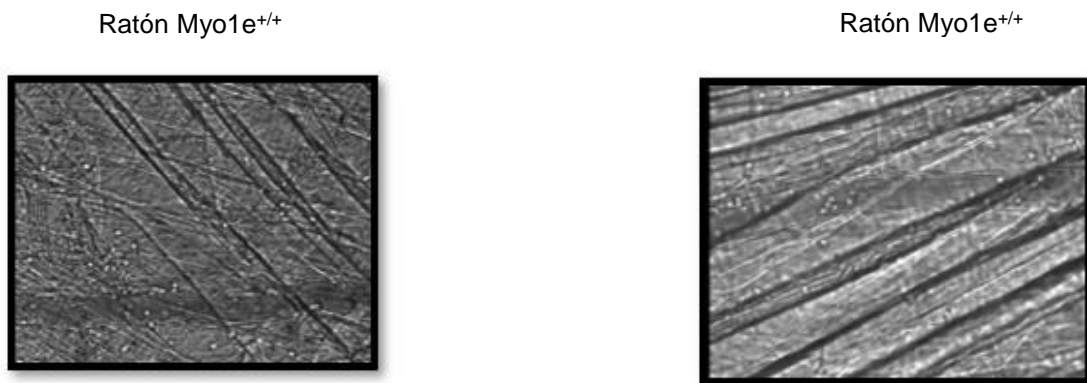


Figura 23 Imágenes representativas de la migración de los leucocitos en el cremáster de los ratones Myo1e^{+/+} y Myo1e^{-/-}.

Imágenes representativas de microscopia intravital (objetivo 40X) del cremáster del ratón Myo1e^{+/+} y del ratón Myo1e^{-/-}. N=3. Para el análisis se usó el programa Zeiss blue.

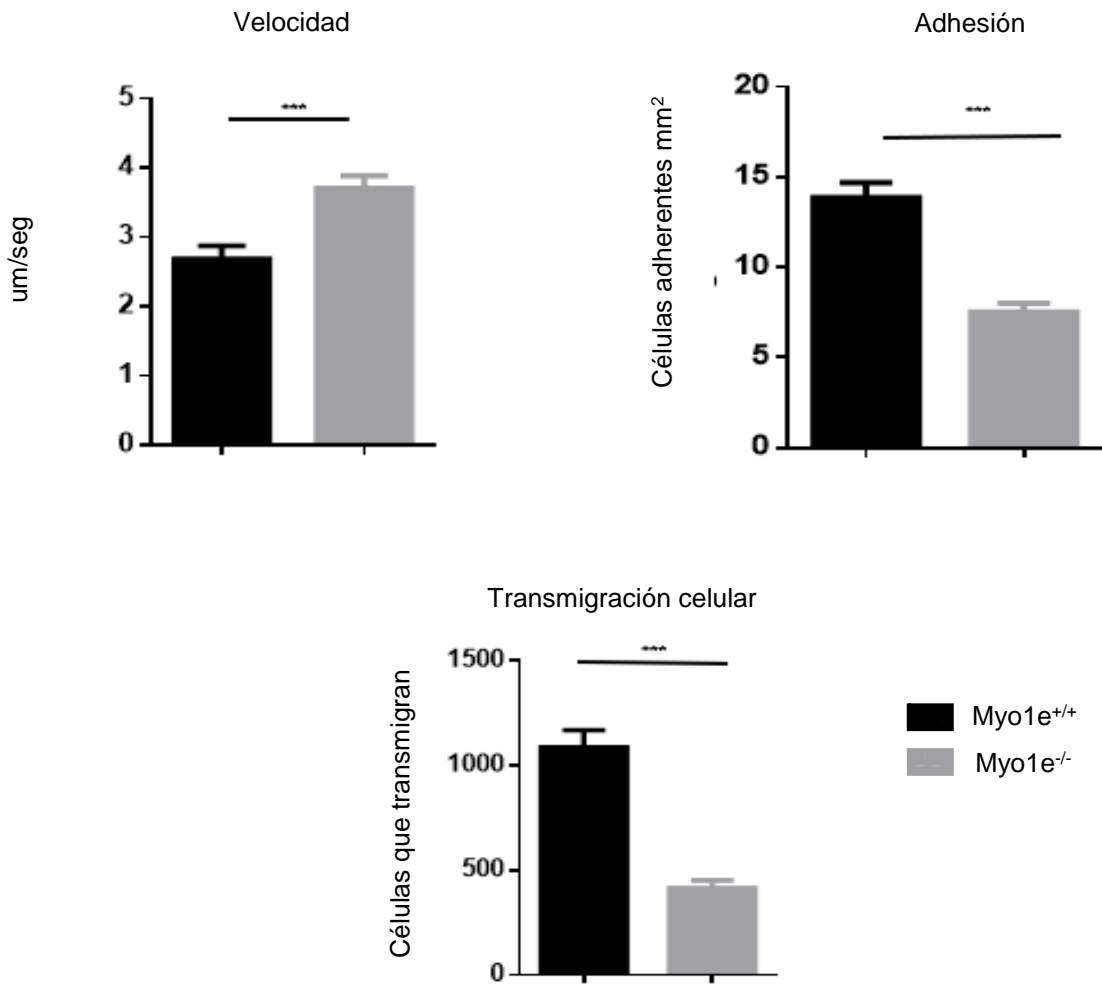


Figura 24. Parámetros de migración en el cremáster de los ratones silvestre y carente de la Myo1e^{-/-}. Análisis de tasa de transmigración, velocidad de migración y células adherentes en el cremáster en el ratón Myo1e^{+/+} y Myo1e^{-/-}. N=3. (media ± SD). *** p<0.001.

7.5 Ensayos de migración *in vivo* de células B en el cremáster del ratón Myo1e^{+/+}

Para determinar la participación de la Myo1e en las células B "*in vivo*". Evaluamos por microscopia intravital, la migración de los linfocitos B en el cremáster del ratón, por consiguiente, marcamos las células B tanto del ratón Myo1e^{+/+} como del ratón Myo1e^{-/-} con un "cell tracker" (Hoescht 33346) el cual se une al surco menor del ADN. (Ver materiales y métodos, sección 6.3). Las células B se inocularon a un ratón hospedero (Myo1e^{+/+}) previamente se le inyectó TNF- α (10 nM), Nuestros resultados indican que la ausencia de Myo1e causa un menor tiempo de adhesión y de transmigración en comparación con las células B del ratón Myo1e^{+/+} (Figura 25-26). De acuerdo con estos datos concluimos que la Myo1e participa en adhesión y migración de linfocitos B celular *in vivo*.

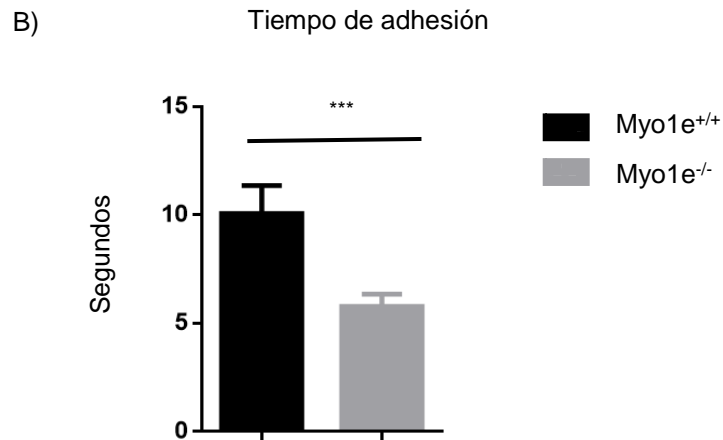
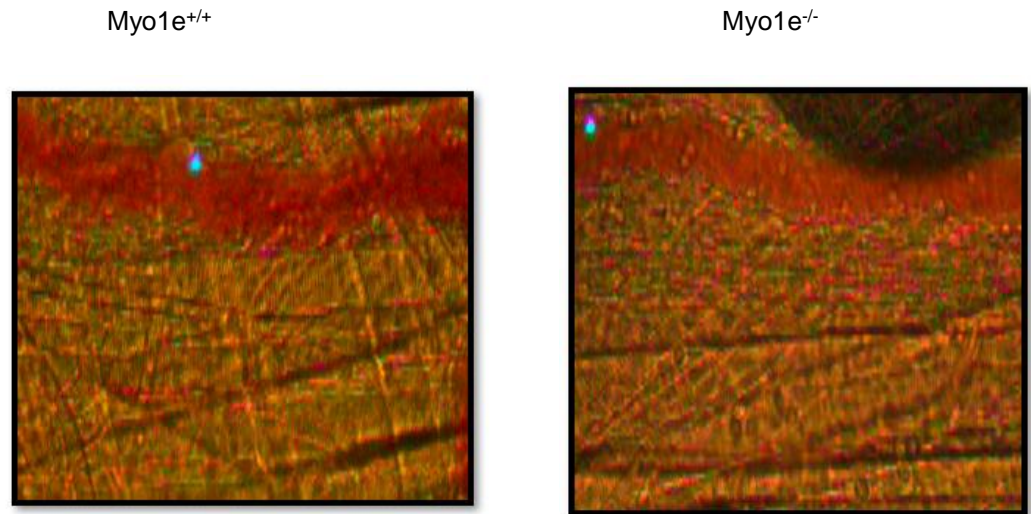


Figure 25. Tiempo de adhesión de las células B silvestre y carente de la Myo1e en el cremáster del ratón silvestre.

A) Imágenes representativas de la microscopia intravital (Objetivo 40X) de las células B silvestres (Myo1e^{+/+}) o carentes de la Myo1e (Myo1e^{-/-}) marcadas con Hoescht 33342. Las células fueron inoculadas en el ratón hospedero Myo1e^{+/+} que previamente le fue inoculado con TNF- α , B) Análisis del tiempo de adhesión celular de células B del ratón Myo1e^{+/+} o Myo1e^{-/-} en el endotelio del cremáster del ratón hospedero (Myo1e^{+/+}). N=3 (media \pm SD). *** p<0.001.

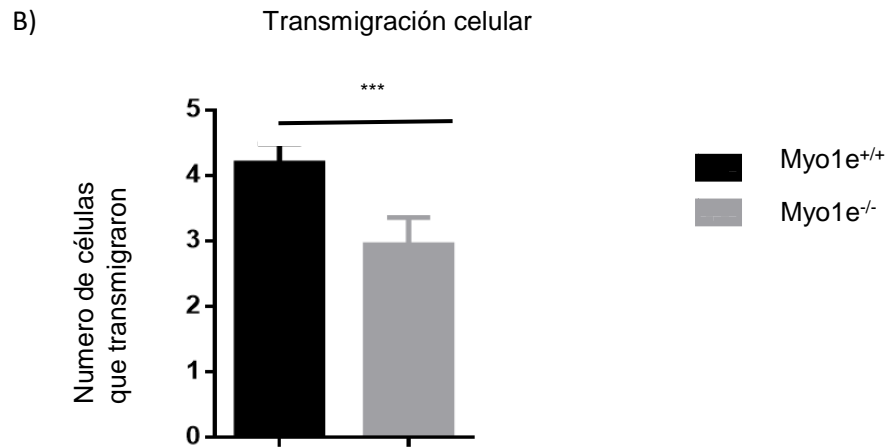
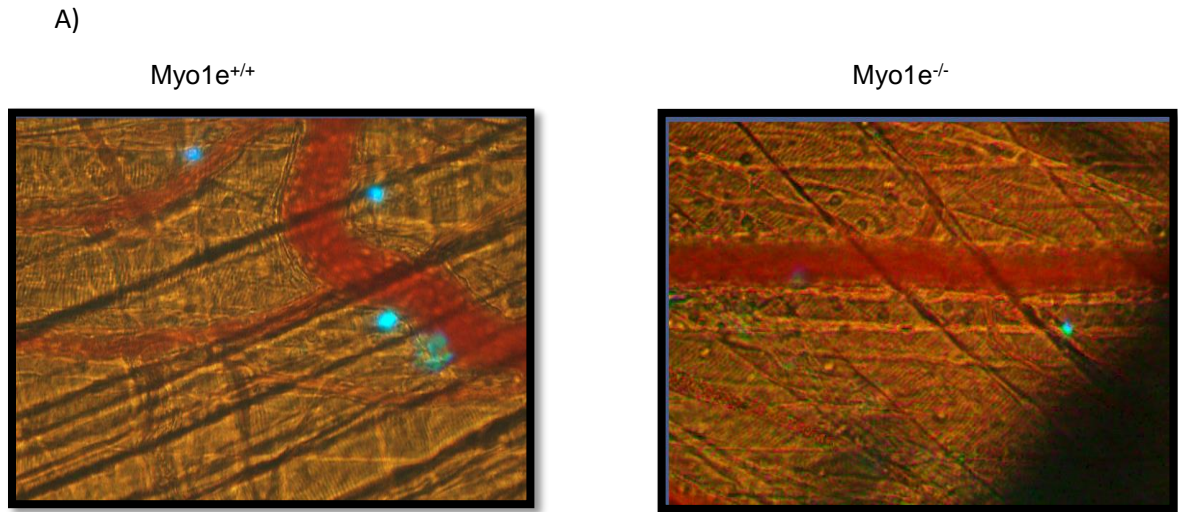


Figura 26. Tasa de transmigración celular de las células B silvestre y carente de la Myo1e en el ratón hospedero.

Imágenes representativas de la microscopia intravital (Objetivo 40X) de las células B silvestre (Myo1e^{+/+}) o deficientes de Myo1e (Myo1e^{-/-}) marcadas con Hoescht 33342, las células fueron colocadas en el ratón hospedero Myo1e^{+/+}, que previamente fue inoculado con TNF- α . B). Análisis del total de células que transmigraron en el cremáster del ratón hospedero. N=3 (media \pm SD).*** p<0.001.

7.6 Análisis de la participación de la Myo1e en el ganglio linfático inguinal

Para corroborar el resultado anterior, se realizó la microscopía intravital en los ganglios linfáticos inguinales. ya que los linfocitos B migran a los órganos linfoides secundarios (para montar una respuesta inmunológica). El ganglio linfático inguinal se localiza entre parte baja izquierda o derecha del abdomen, altamente irrigada por diferentes vénulas, venas y arterias (Figura 27)

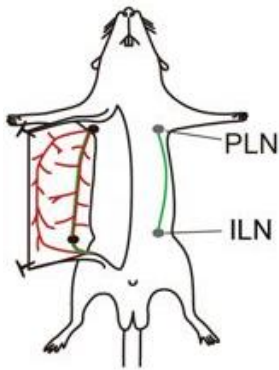


Figura 27. Localización del ganglio linfático inguinal en el ratón

Esquema representativo de la localización de los ganglios linfáticos inguinales en el ratón

Para evaluar la migración en este órgano, se expusieron los ganglios linfáticos inguinales y se clasificaron las vénulas del ganglio linfático inguinal de acuerdo a sus ramificaciones (Figura 28).

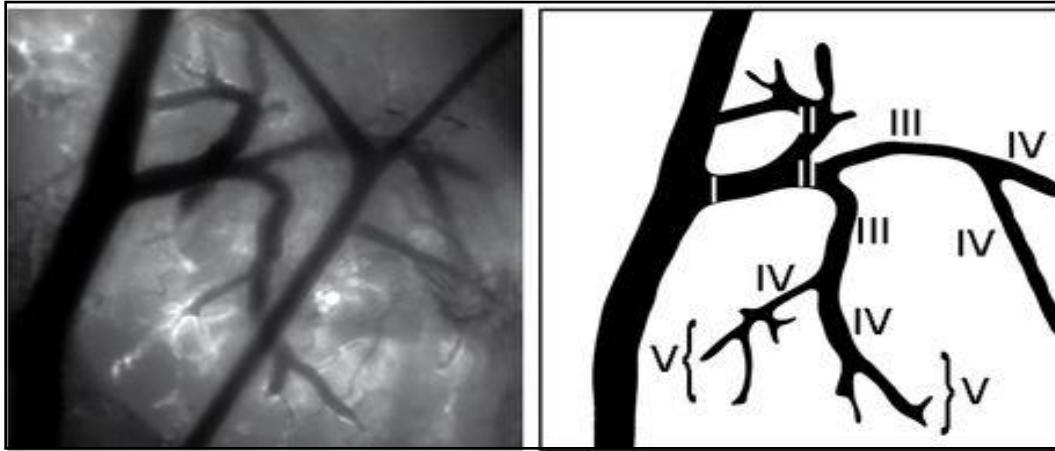


Figura 28, Diagrama representativo de las diferentes vénulas del ganglio linfático inguinal.

Clasificación de las diferentes vénulas del ganglio linfático inguinal que van numeradas de acuerdo al diámetro (I a V),

De acuerdo con esta clasificación las vénulas pueden numerarse de acuerdo con su diámetro. Así mismo se evaluó el flujo sanguíneo usando perlas de látex de un tamaño menor a $5\ \mu\text{m}$ (Figura 29). De acuerdo con esta clasificación las vénulas del endotelio alto (HEV) corresponden a las vénulas III y IV

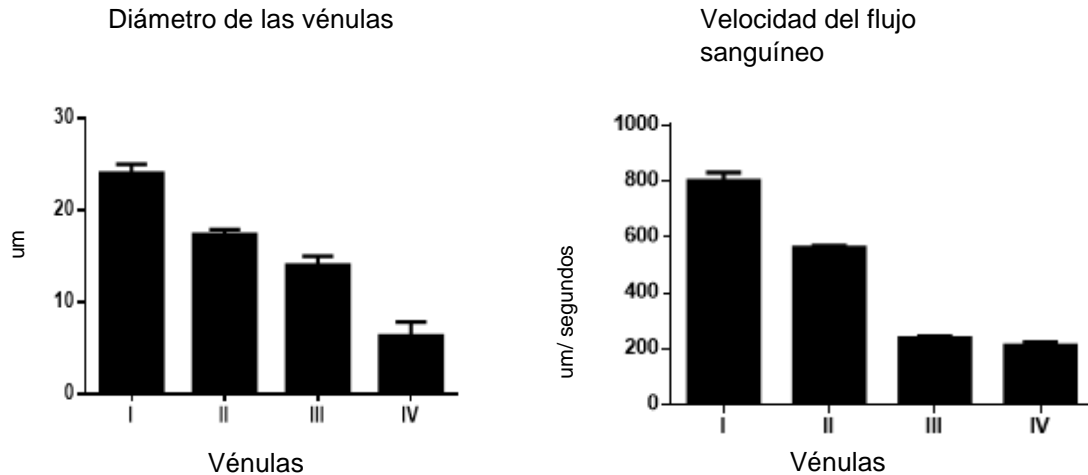


Figura 29. Determinación del diámetro y el flujo sanguíneo de las vénulas en el ratón silvestre

Determinación del diámetro de las vénulas y la velocidad del flujo sanguíneo en el ganglio linfático inguinal del ratón silvestre (*Myo1e^{+/+}*) que van desde la vénula I a la vénula IV

Al evaluar la migración de células B en el ganglio linfático inguinal, se le inoculo al ganglio linfático CXCL12 (25 ng/ml) por una hora, después se le inocularon los linfocitos B marcados con Hoescht (33346). Primeramente, se determinó el reclutamiento de las células B a diferentes tiempos en las vénulas del ganglio linfático (0, 30 y 45 minutos). En este análisis se observó una reducción en el reclutamiento de los linfocitos B carentes de la *Myo1e* (Figura 30A-B) comparados con el ratón silvestre.

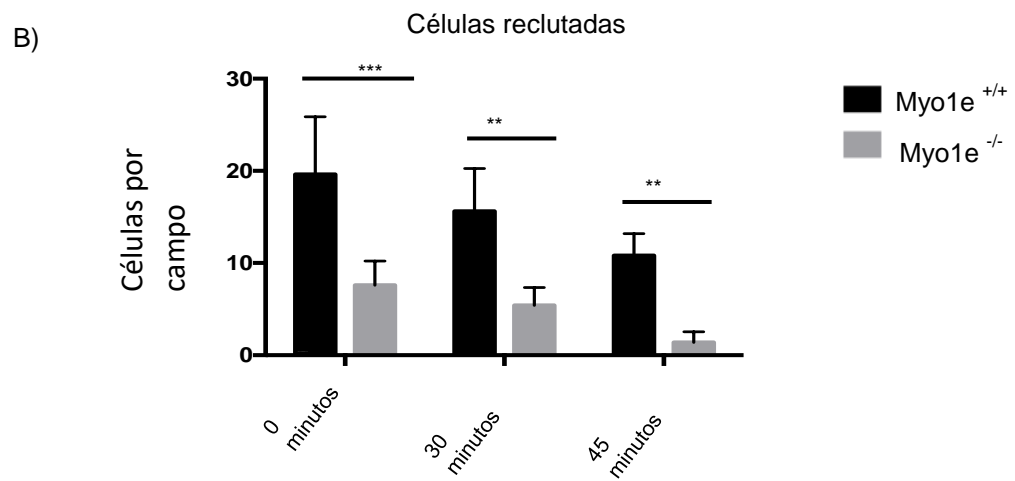
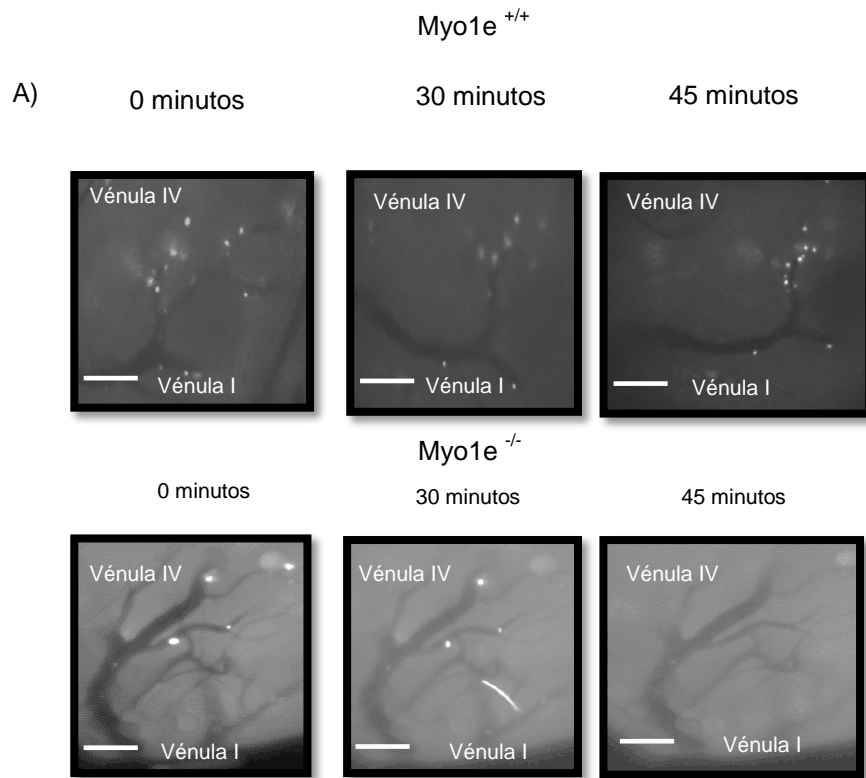
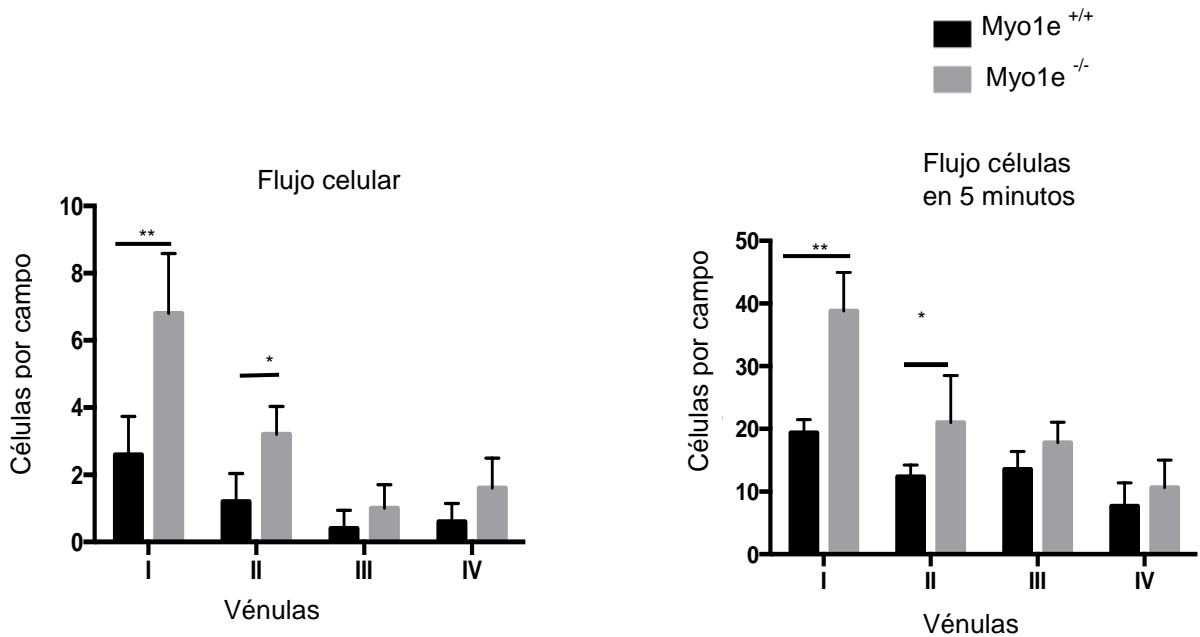


Figura 30. Reclutamiento de las células B en el nódulo linfático inguinal

Imágenes representativas de la microscopía intravital (Objetivo 40X) a de diferentes tiempos (0, 30 y 45 minutos) de células B activadas (marcadas con Hoescht 33342) del ratón *Myo1e^{+/+}* y del ratón *Myo1e^{-/-}* en las vénulas del ganglio linfático inguinal, el cual previamente había sido inoculado con CXCL12 (25ng/ml). Las vénulas fueron identificadas del IV a I, Barra de la escala 25 μ m. N=5. B) Cuantificación de las células B del ratón *Myo1e^{+/+}* y del ratón *Myo1e^{-/-}* reclutadas a diferentes tiempos (0, 30 y 45 minutos) en el ratón hospedero. N=3 (media \pm SD). *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$

El análisis del flujo celular (el cual puede ser definido como el movimiento uniforme del paso de las células entre las vénulas del sistema sanguíneo) nos mostró un incremento del flujo celular en las vénulas I y II en las células B carentes de la *Myo1e*, pero una disminución en la adhesión celular en las vénulas III y IV (corresponden a las HEV) comparadas con las células B del ratón silvestre. Figura 31 A-C, por lo que es posible que la expresión de moléculas de adhesión en los linfocitos B sea diferente cuando se pierde la expresión de la *Myo1e*.



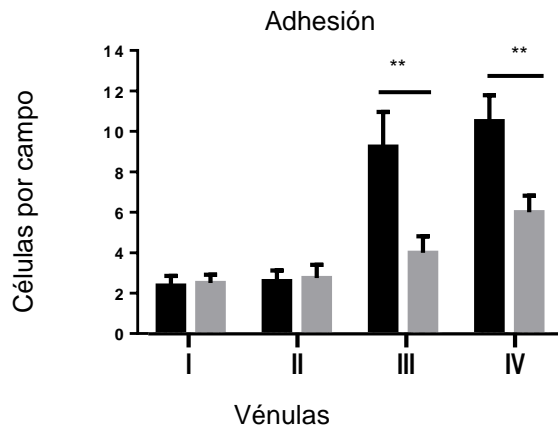


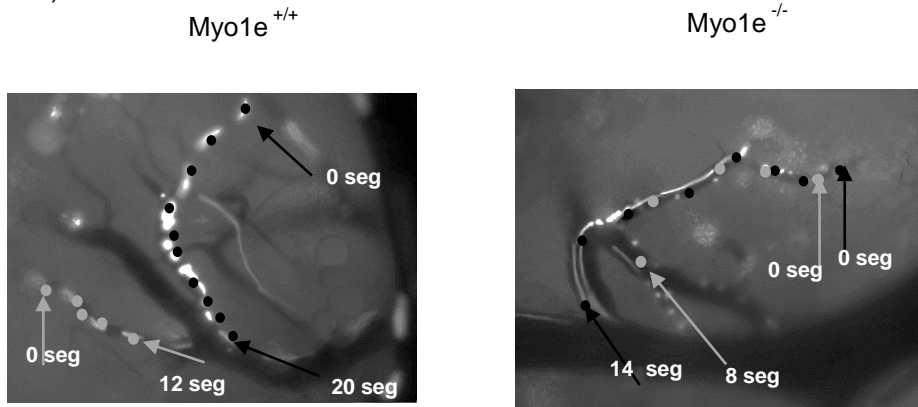
Figura 31. Cuantificación del flujo celular y de la adhesión en las células B de los ratones *Myo1e^{+/+}* y *Myo1e^{-/-}*

A) Cuantificación del flujo celular de las células B en las diferentes vénulas del ganglio linfático inguinal. B) Cuantificación del flujo celular de las células B por 5 minutos las diferentes vénulas del ganglio linfático inguinal. C) Numero de las células B adherentes en las diferentes vénulas . La cuantificación de las células fue realizada en diferentes vénulas (IV a I). N=5. (media \pm SD). **p<0.01 *p<0.05.

La velocidad del paso de las vénulas IV a las vénulas I es crítico para la adhesión, esto puede ser corroborado al medir la velocidad de desplazamiento. El análisis mostro que la carencia de la *Myo1e* en los linfocitos B causa un incremento en la velocidad (Figura 32 A-B) y esto repercute en el rodamiento normal y el rodamiento lento de las células en las HEVs. El rodamiento permite la interacción entre las células B y las moléculas de adhesión del endotelio, esta interacción es relevante para que las células se extiendan sobre el endotelio y migren al intersticio. El análisis del rodamiento normal y rodamiento lento (figura 33 A-B) mostro un incremento en las células B carentes de la *Myo1e*; mientras, que el rodamiento lento se encuentra disminuido cuando se pierde la expresión de *Myo1e* en los linfocitos B.

Para confirmar si la reducción del rodamiento lento tiene un efecto sobre las células B analizamos la transmigración celular, encontrando que los linfocitos B carentes de la Myo1e tienen una menor tasa de transmigración en comparación con las células B del ratón silvestre (Figura 34). Por lo que concluimos que la Myo1e es necesaria para la migración celular, la adhesión y la trasmigración celular.

A)



B)

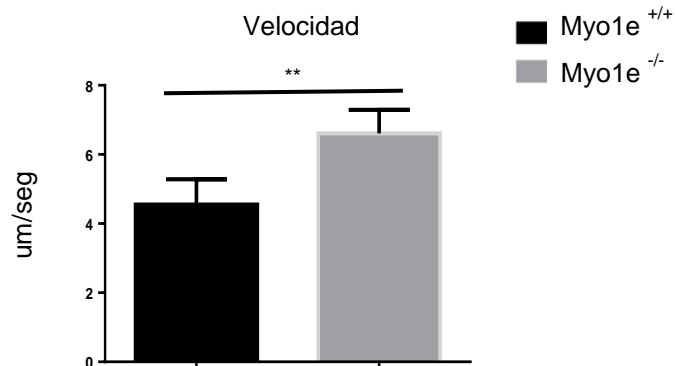
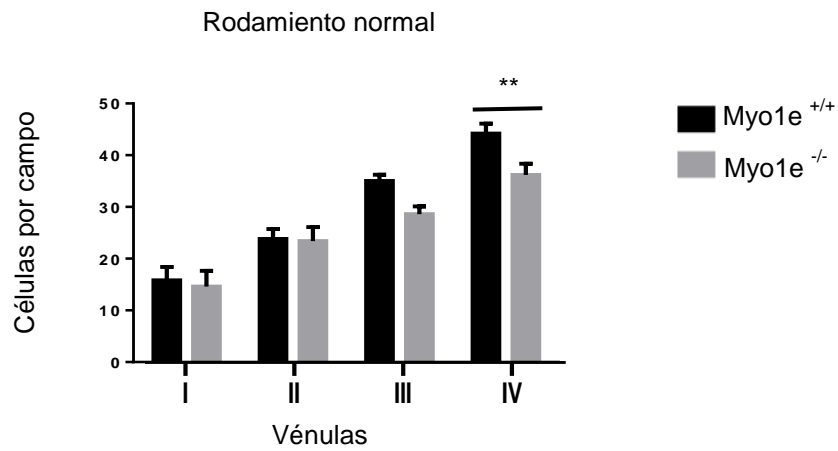


Figura 32. Cuantificación de la velocidad en las células B de los ratones $Myo1e^{+/+}$ y $Myo1e^{-/-}$ en las vénulas del ganglio linfático inguinal

A) Imágenes representativas de la microscopía intravital (Objetivo 40X) del desplazamiento de las células B del ratón $Myo1e^{+/+}$ y del ratón $Myo1e^{-/-}$ en las vénulas IV a la I B) Cuantificación de la velocidad de migración desde la vénula IV a la vénula I del ratón $Myo1e^{+/+}$ y del ratón $Myo1e^{-/-}$ N=5. (media \pm SD). $**p < 0.01$.

A)



B)

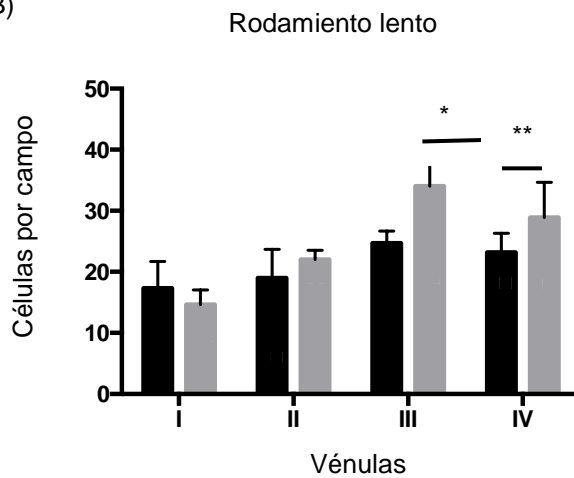


Figura 33. Cuantificación del rodamiento normal y del rodamiento lento en las células B de los ratones Myo1e^{+/+} y Myo1e^{-/-}

A) Cuantificación del rodamiento normal de las células B del ratón Myo1e^{+/+} y del ratón Myo1e^{-/-} en las vénulas del IV al I en el ganglio linfático inguinal. B) Cuantificación del rodamiento normal de las células B del ratón Myo1e^{+/+} y del ratón Myo1e^{-/-} en las vénulas del IV al I en el ganglio linfático inguinal. N=5. (media ± SD) **p<0.01 *p<0.05.

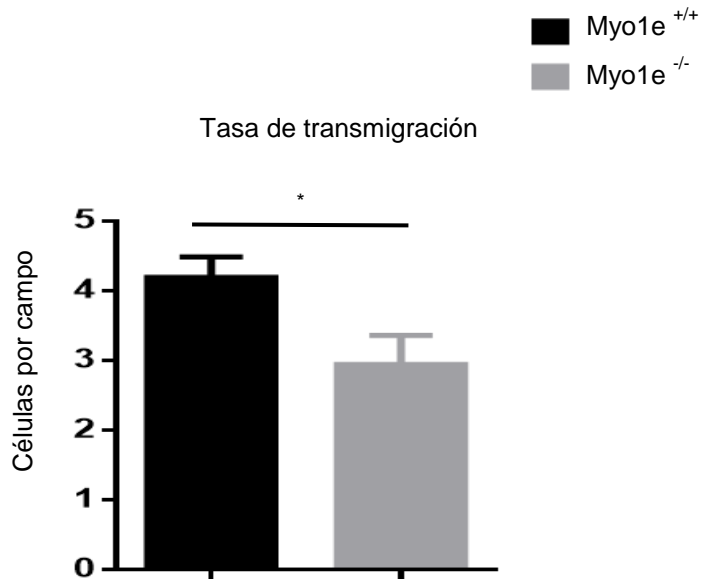
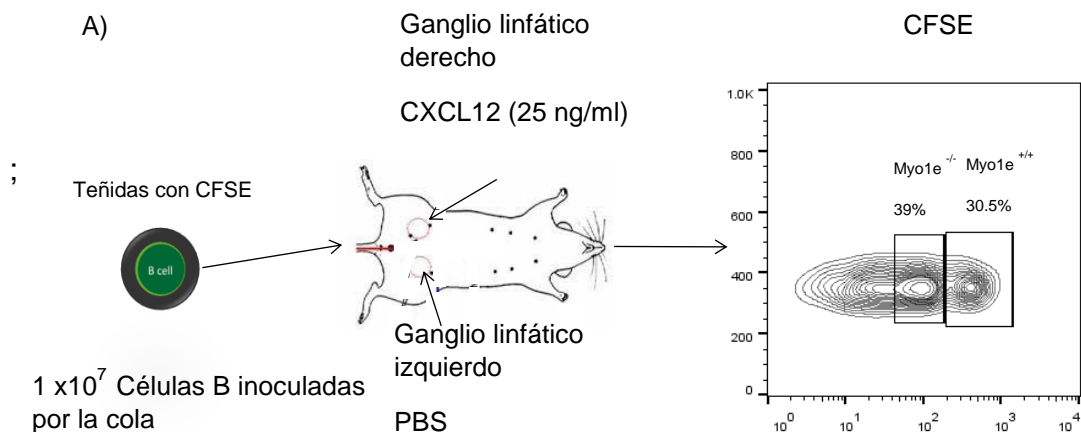


Figura 34. Cuantificación de la trans migración en las células B de los ratones Myo1e^{+/+} y Myo1e^{-/-}

A) Cuantificación de las células B del ratón Myo1e^{+/+} y del ratón Myo1e^{-/-} que transmigraron al espacio intercelular en el ganglio linfático inguinal del ratón hospedero Myo1e^{+/+}. N=5. (media ± SD). *p<0.05.

7.7 Ensayos de “homing” de las células B del ratón Myo1e^{+/+} y del ratón Myo1e^{-/-} marcadas con CFSE en diferentes órganos linfoides

Los ensayos *in vivo* nos indican que el reclutamiento de las células B está afectado, por consiguiente, se realizaron ensayos de “homing” al nódulo linfático, debido a que las células B ausentes de Myo1e tienen una reducción en la llegada al ganglio linfático inguinal. Para analizar el “homing” se inoculo en el ganglio inguinal derecho con la quimiocina CXCL12 y en el ganglio inguinal izquierdo con PBS; posteriormente, se inyectaron células B del ratón Myo1e^{+/+} y Myo1e^{-/-}; previamente marcadas con carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE). Para después exponer ambos ganglios (ver materiales y métodos). Encontramos una reducción de las células B carentes de la Myo1e en el ganglio inguinal derecho que fue inoculado con CXCL12 (Figura 35-C), pero incrementan en el bazo y en la sangre (Figura 35-B). Este resultado sugiere que la Myo1e tiene un papel relevante en el reclutamiento específico de células B al ganglio linfático. Esta aseveración fue corroborada a través de imágenes tomadas a los diferentes ganglios linfáticos inguinales, donde se contó una mayor cantidad de células en ganglio inoculado con CXCL12. (Figura 36 A-B).



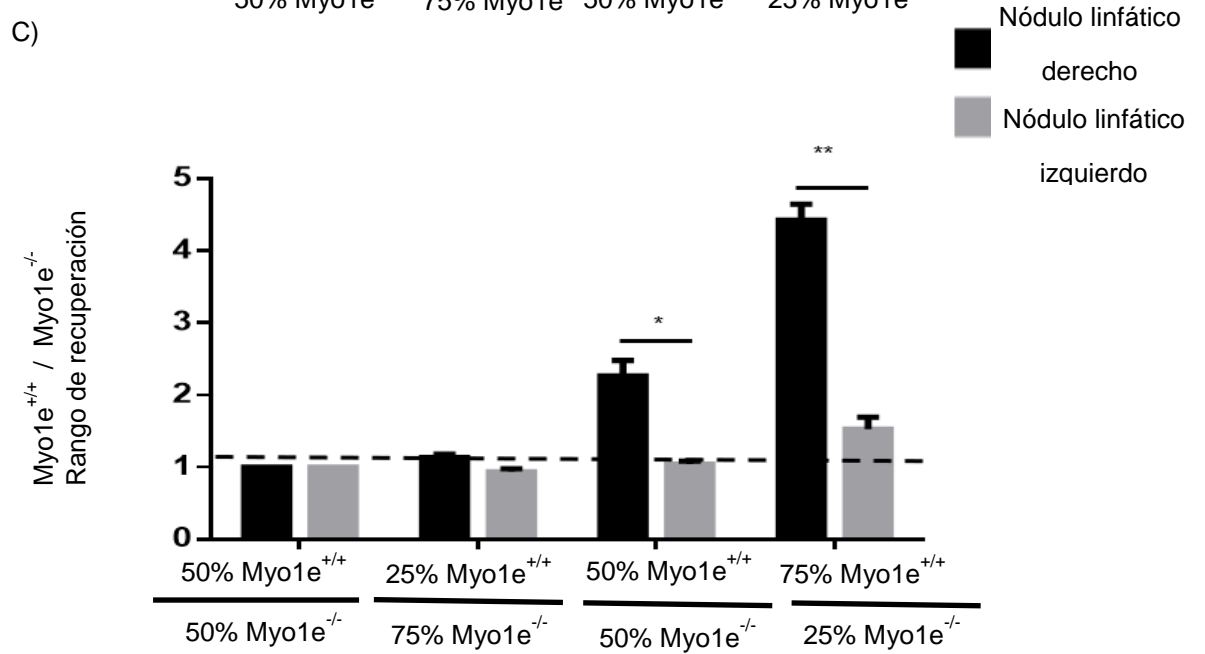
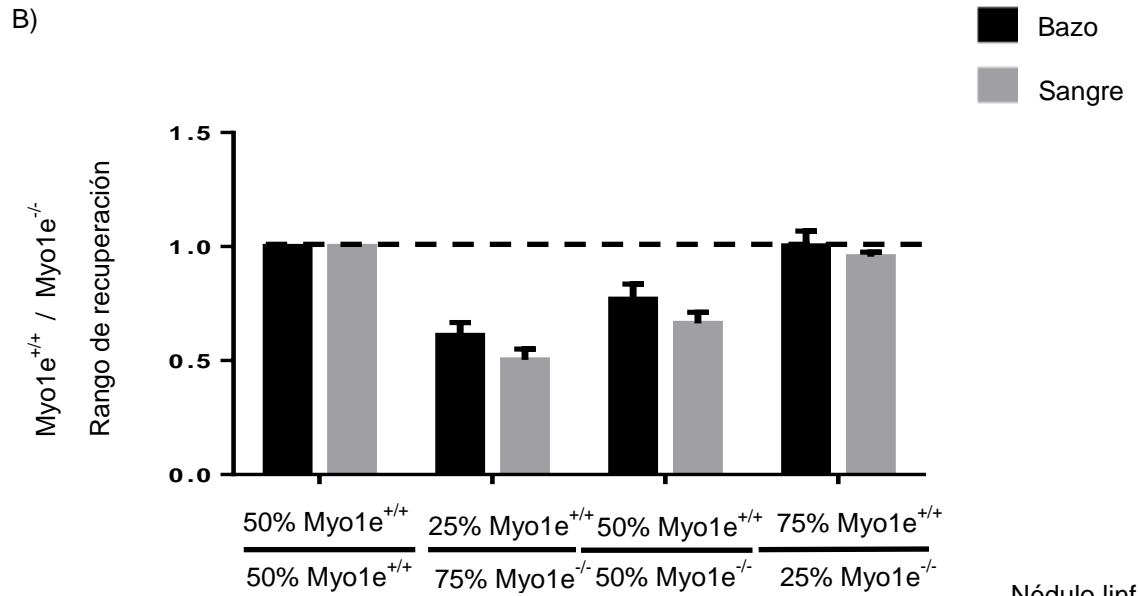


Figura 35. “Homing” de las células B de los ratones Myo1e^{+/+} y Myo1e^{-/-} en la sangre, bazo y en los ganglios linfáticos inguinal

A) Representación esquemática de inoculación del ratón Myo1e^{+/+} con CXCL12 en el ganglio linfático derecho y con PBS en el ganglio linfático izquierdo **B)** Cuantificación de rango de recuperación de las células B teñidas con CFSE del ratón Myo1e^{+/+} y del ratón Myo1e^{-/-} en la sangre y el bazo del ratón hospedero C) Cuantificación de rango de recuperación de las células B teñidas con CFSE del ratón Myo1e^{+/+} y del ratón Myo1e^{-/-} en el ganglio linfático inguinal derecho e izquierdo del ratón hospedero N=5. media ± SD., **p<0.01 *p<0.05.

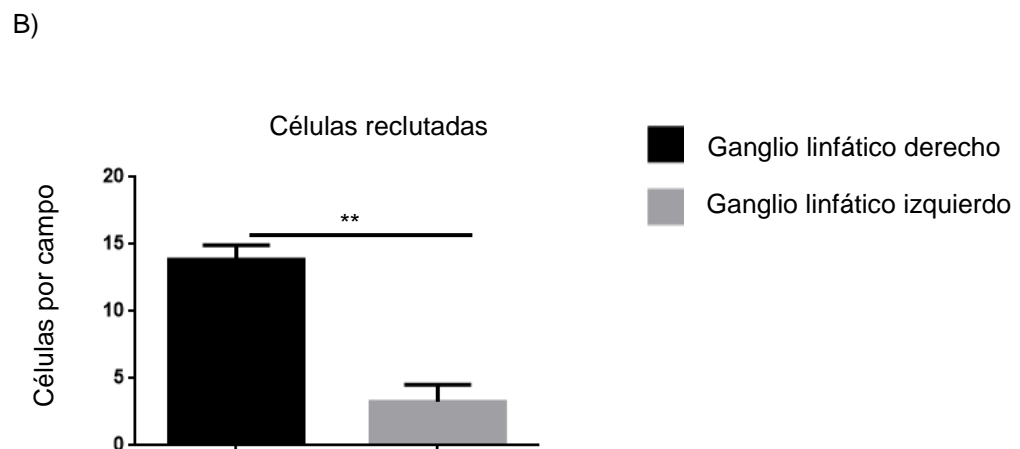
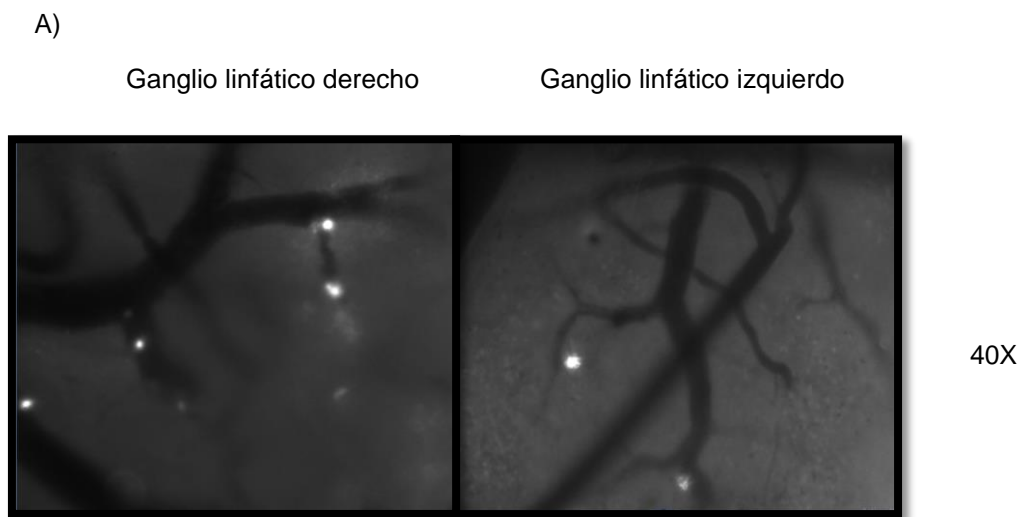


Figura 36. Reclutamiento de las células B en el ganglio linfático inguinal derecho e izquierdo

A) Imágenes representativas de la microscopía intravital (40X) del ganglio linfático derecho e izquierdo, previamente fueron inoculados con diferentes proporciones de linfocitos B tanto del ratón Myo1e^{+/+} como en el ratón Myo1e^{-/-} B) Cuantificación de número de las células B recuperadas del ganglio linfático izquierdo y del ganglio linfático derecho. N=5. (media ± SD). **p<0.01.

7.8 Migración en 2D

La migración en 2D es un sistema para evaluar las trayectorias de desplazamiento de diferentes estirpes celulares utilizando diferentes sustratos o quimioatrayentes. La cámara Zigmond (Neuroprobe) es una herramienta que nos permite evaluar este fenómeno. La cuantificación de la adhesión se realizó usando linfocitos B en reposo o activados (ver materiales y métodos), para adherir las células se usó como sustrato fibronectina (esta proteína interactúa con la integrina LFA-1) y como quimioatrayente CXCL12 (El receptor de esta quimiocina es CXCR4). El análisis de la migración mostro que las células B activadas del ratón carente de la Myo1e, las trayectorias son más cortas en comparación con las células B activadas del ratón silvestre (Figura 37-A).

El análisis de las distancias recorridas en los linfocitos B de ambos ratones nos mostró que el mismo contexto, se encontró que las células B activadas carentes de la Myo1e, recorren una menor distancia esto se determinó cuando se analizó los parámetros de la distancia euclidiana (la distancia lineal entre el punto inicial y el punto final) y la distancia acumulada (la suma de la distancia entre el punto inicial y el punto final) (Figura 37 B-C). La velocidad es una medida que nos permite determinar el tiempo que se tarda una célula en recorrer una distancia. En este trabajo se encontró que las células B activadas carentes de la Myo1e recorren en un tiempo mayor una distancia determinada, en comparación con los linfocitos B carentes de la Myo1e (Figura 37D). Una cosa interesante es que no se encontraron diferencias significativas en las células B en reposo de ambos ratones.

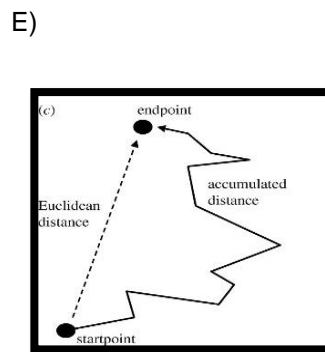
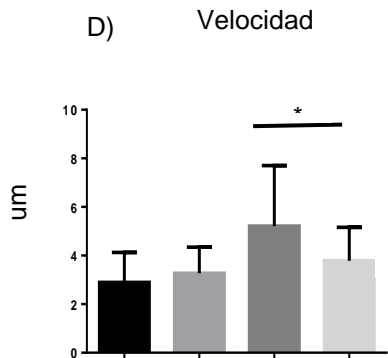
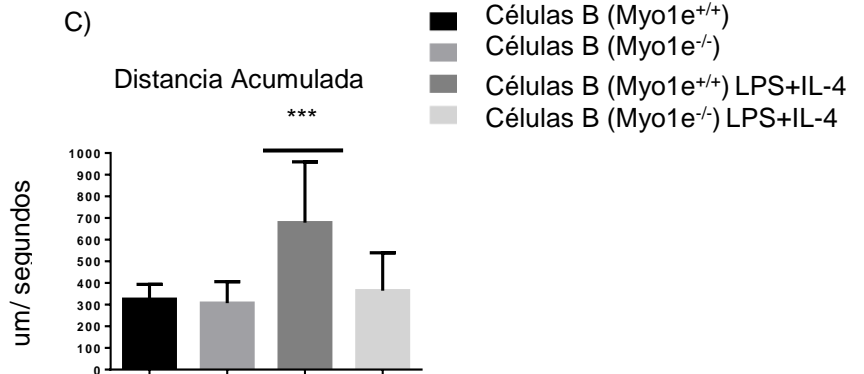
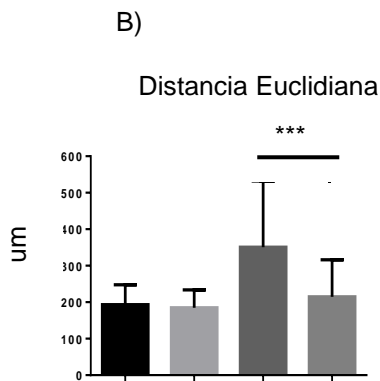
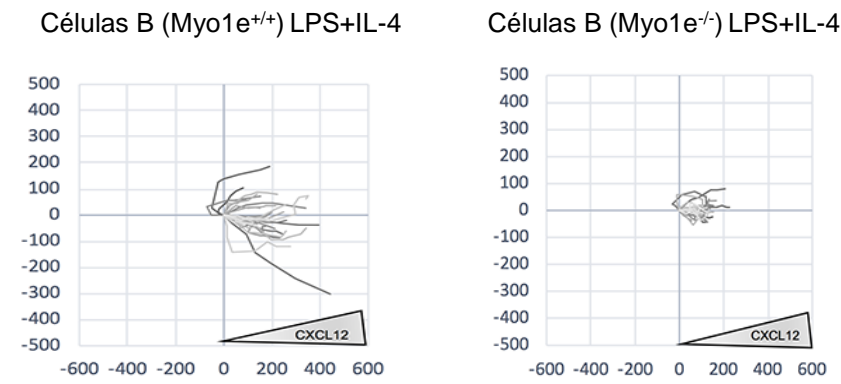
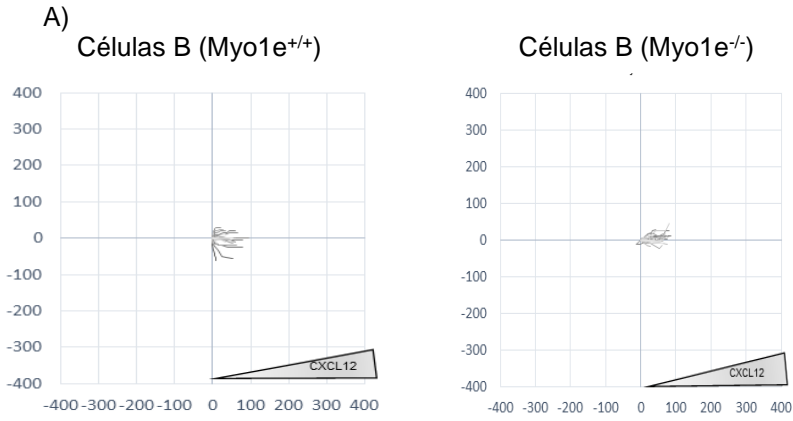


Figura 37. Trayectorias de desplazamiento en las células B de los ratones silvestres y de ratones carentes de la Myo1e en las condiciones de reposo y estado de activación

A) Representación esquemática de las diferentes trayectorias de las células B en reposo (Myo1e^{+/+} y Myo1e^{-/-}) y de las células B activadas (Myo1e^{+/+} y Myo1e^{-/-}) con el estímulo CXCL12, B) Distancia euclidiana de las células B en reposo (Myo1e^{+/+} y Myo1e^{-/-}) y de las células B activadas (Myo1e^{+/+} y Myo1e^{-/-}) C) Velocidad D) Distancia Acumulada E) Representación gráfica de tipos de distancia en la migración. N=5. (media ± SD). *** p<0.001, *p<0.05.

7.9 Análisis de la transmigración celular y de las protrusiones de la membrana

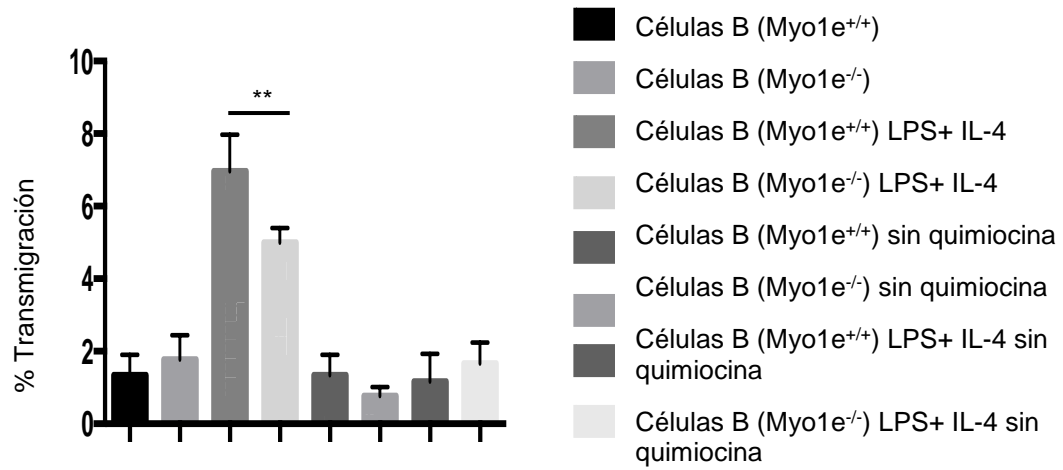
La transmigración celular es un evento importante en las células B para montar la respuesta inmunológica. Se evaluó este fenómeno utilizando una cámara transwell con un poro de 5 µm. Las células B en reposo y activadas (ver materiales y métodos) se colocaron en la parte superior de la cámara y en la parte inferior CXCL12 (un quimioatrayente) por 4 horas; previamente, la cámara fue recubierta con las células bEnd.3 que fueron estimuladas con la citocina TNF-α (10 nM) por 24 horas. Para la cuantificación de la transmigración los linfocitos B, se recuperaron las células de la parte inferior de la cámara transwell y se contaron el número de células por citometría de flujo. El análisis de transmigración mostro que los linfocitos B activados carentes de la Myo1e tienen una menor tasa de transmigración en comparación con los linfocitos B activados del ratón silvestre.

Un dato interesante es que no se encontraron diferencias significativas en los linfocitos B en reposo de ambos ratones (Figura 38-A).

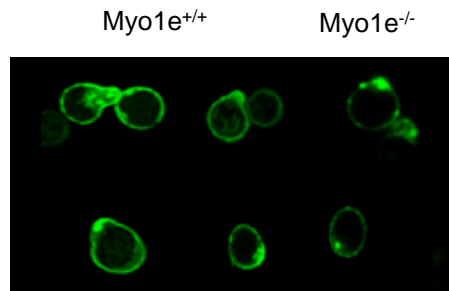
Los cambios en la morfología celular ocurren cuando una célula migra y se forman protrusiones de la membrana, que se hacen visibles a través de la tinción de la actina filamentosa. Las células B del ratón Myo1e^{+/+} y del ratón Myo1e^{-/-} fueron teñidas con Faloidina (TRITC) para visualizar la actina filamentosa, donde se observó que las células B carentes de la Myo1e tiene

una longitud de la prolongación más corta en comparación con las células B del ratón silvestre (Figura 38-B).

A)



B)



C)

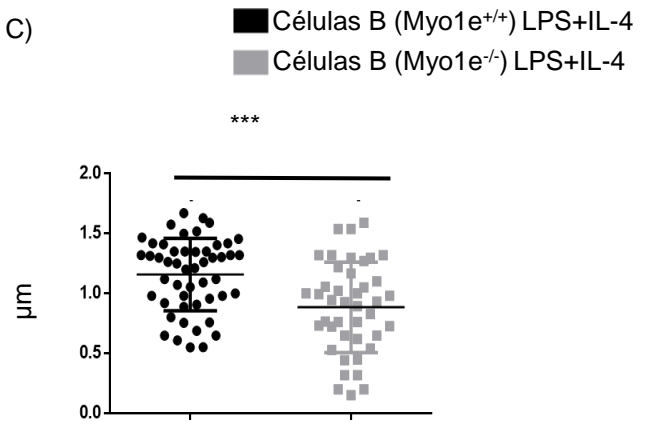


Figura 38. Tasa de trans migración y de la longitud de la prolongaciones de membrana

A) Tasa de trans migración de las células B en reposo y activadas del ratón Myo1e^{+/+} y del ratón Myo1e^{-/-} estimulados con CXCL12 o con medio base (RPMI 1640). N=3. media \pm SD. **p<0.01. B) Imágenes representativas (Objetivo 40X) de la longitud de la prolongación de las células B activadas del ratón Myo1e^{+/+} y del ratón Myo1e^{-/-}. Las células fueron teñidas con Faloidina (TRITC) C) Cuantificación de la longitud de las prolongaciones entre células B activadas del ratón Myo1e^{+/+} y del ratón Myo1e^{-/-}, la medición se realizó trazando una línea recta desde el centro de la célula hasta el final de la prolongación de membrana. N=3. (media \pm SD). *** p<0.001.

7.10 Determinación de las moléculas en la membrana celular de las células B carentes de la Myo1e

La migración, la adhesión, la trans migración y la formación de las prolongaciones de la membrana están determinadas por diferentes moléculas de la superficie entre las cuales encontramos las integrinas. Se determinó la expresión de estas proteínas a través de la citometría de flujo (LFA-1, VLA-4 y la molécula de adhesión CD44), se encontró una disminución en las células B activadas deficientes de la Myo1e en comparación con las células B del ratón silvestre (Figura 39), posteriormente se analizó la expresión total de las integrinas y de la proteína CD44 en los linfocitos B de ambos ratones. No se encontraron diferencias significativas en la expresión total de estas moléculas; así mismo, cuando se analizó la expresión de las moléculas CD62-L, CXCR4 y TLR-4.

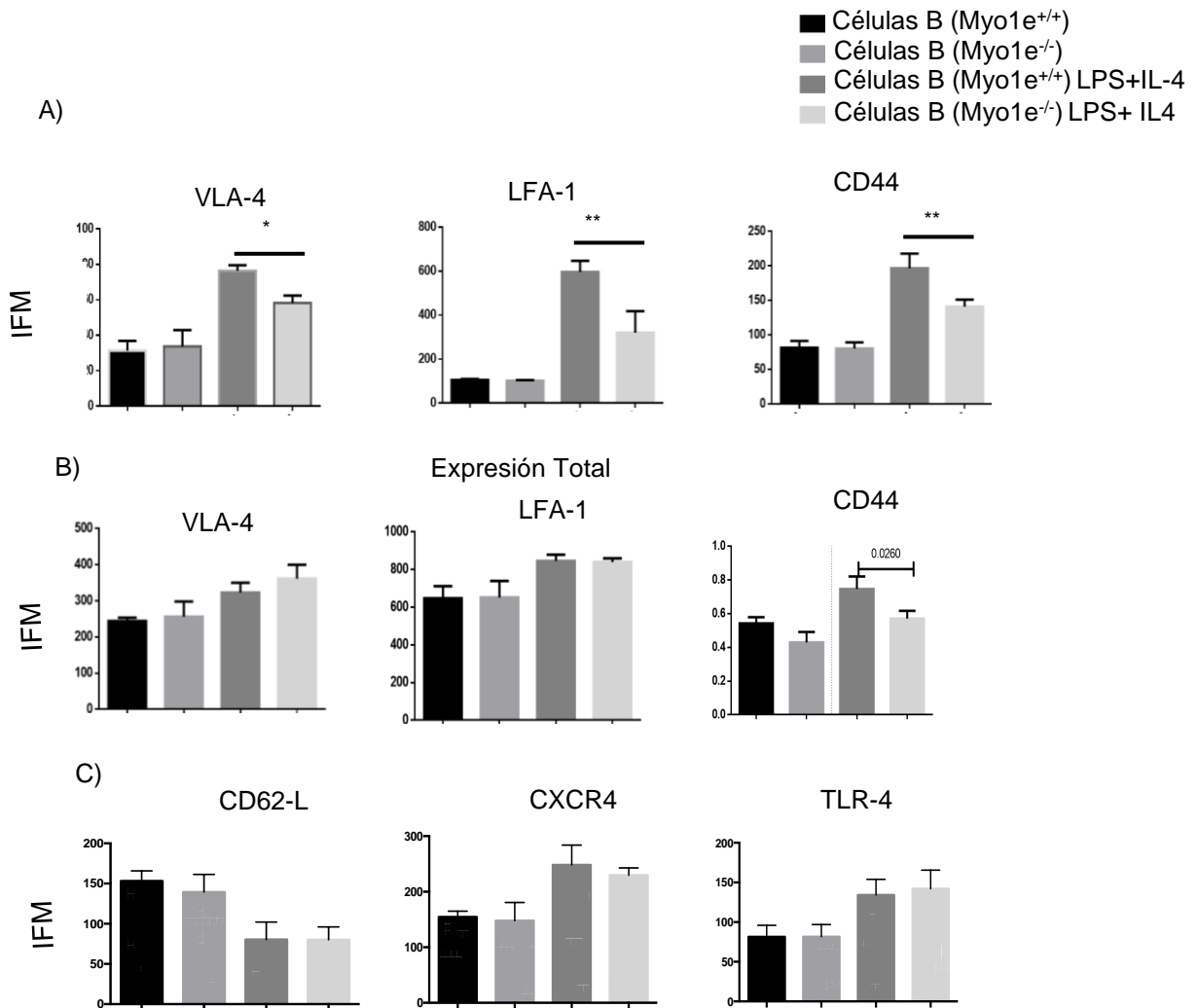
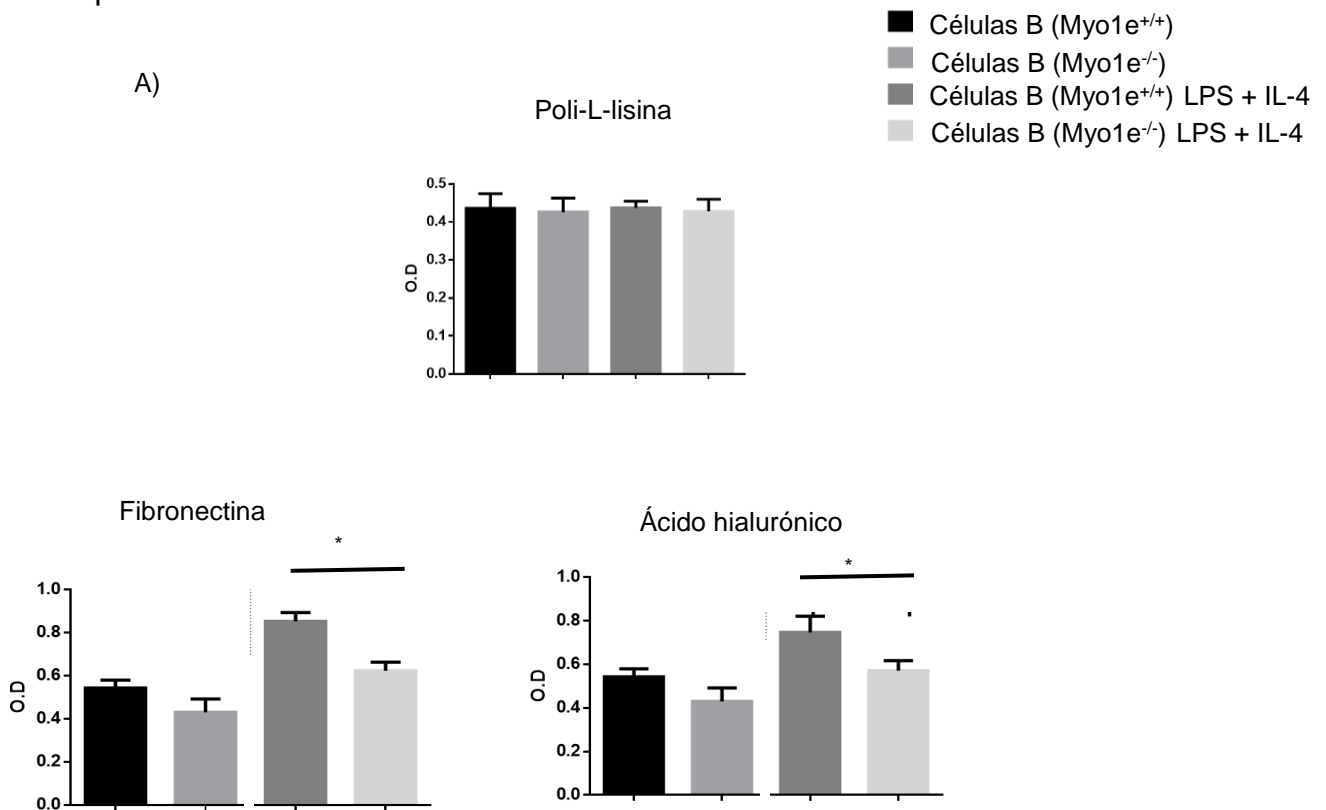


Figura 39. Expresión de diferentes moléculas en las células B analizadas por citometría de flujo

A) Expresión de LFA-1, VLA-4 y CD44 en la membrana de las células B del ratón Myo1e^{+/+} y Myo1e^{-/-} N=3. media ± SD. *** p<0.001, **p<0.01 *p<0.05 B) Expresión total de LFA-1, VLA-4 y de la molécula CD44 en el ratón Myo1e^{+/+} y Myo1e^{-/-} N=3 C) Expresión de las moléculas CD62-L, CXCR4 y TLR-4 en la membrana de las células B del ratón Myo1e^{+/+} y del ratón Myo1e^{-/-} N=3. (media ± SD).

7.11 Cuantificación de la adhesión celular en células B ausentes de la Myo1e

Las integrinas y las moléculas de adhesión como CD44 se pueden unir a diferentes sustratos como es ICAM-1, VCAM-1, fibronectina o ácido hialurónico. Los experimentos de adhesión *in vitro* es un modelo que nos permite evaluar la adherencia sobre ligandos específicos. Los ensayo de adhesión de las células B se realizaron en una placa de 96 pozos recubierta con fibronectina, ácido hialurónico y como control como poli-L lisina (Figura 40), Se encontró una reducción en la adhesión de las células B activadas carentes de la Myo1e comparadas con las células B del ratón silvestre, La disminución fue en la adhesión fue corroborada usando linfocitos B en reposo y activados tanto del ratón Myo1e^{+/+} como del Myo1e^{-/-} y colocados sobre una monocapa de células bEnd3 (Figura 40). En conclusión, la Myo1e tiene un papel crítico en la expresión de integrinas en la membrana celular y esto repercute en la adherencia celular.



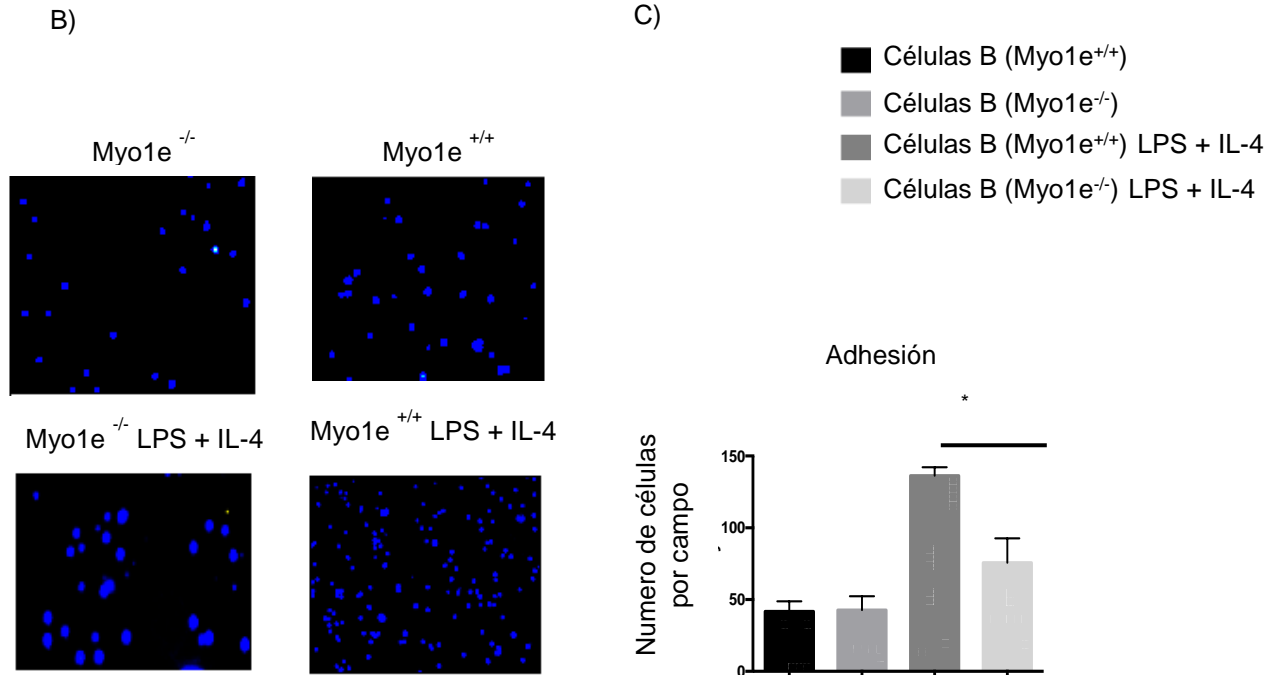


Figura 40. La pérdida de la Myo1e afecta la adhesión celular

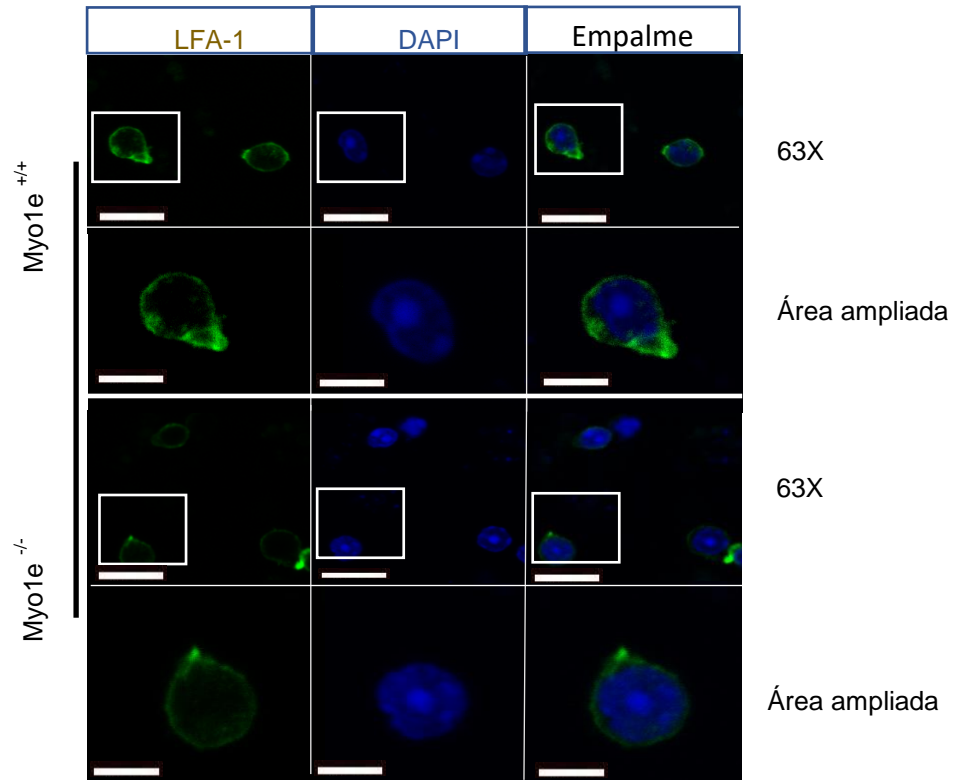
A) Cien mil células B activadas de los ratones Myo1e^{+/+} y Myo1e^{-/-} fueron colocadas en una placa de 96 pozos, previamente los pozos de la placa fue recubierta con ácido hialurónico, fibronectina y poli-L-lisina por 2 horas; después, la placa fue lavada exhaustivamente y las células que se adhirieron fueron teñidas con cristal violeta, finalmente inalmente, las células fueron lisadas y la absorbancia del colorante fue leído a la longitud de onda de 590 nm; N=3 media ± SD. *p<0.05 B) Imágenes representativas (10X, objetivo) de las células B activadas (teñidas con Hoescth 33342) de los ratones Myo1e^{+/+} y Myo1e^{-/-}. Las células fueron sembradas sobre las células b.End3 por 4 horas. Después de la adhesión, las células que no se adhirieron fueron lavadas y se observaron en el microscopio de epifluorescencia. C) Numero de las células B adherentes del ratón Myo1e^{+/+} y Myo1e^{-/-}. que se adhirieron a las células b.End3. N=3. (media ± SD) *p<0.05.

7.12 La Myo1e participa en la localización de LFA-1 pero no de CXCR4

De acuerdo con el resultado anterior; exploramos la posibilidad de que la Myo1e está involucrada en el transporte de moléculas de adhesión, por lo cual analizamos la localización de LFA-1 en las protrusiones de membrana.

La evaluación de LFA-1 se colocaron las células B de los ratones Myo1e^{+/+} y del Myo1e^{-/-} sobre la cámara Zigmond, tal como se describió anteriormente. Las células B fueron incubadas con el anticuerpo anti- LFA-1 (FITC) y se analizó su localización en la protrusión de la membrana (Figura 41-A). El análisis demostró que las células B activadas y carentes de la Myo1e tienen una menor cantidad de LFA-1 en la protrusión comparadas con las células B del ratón control (Figura 41-B). estos resultados indica que la Myo1e participa en esta vía de señalización mediada por integrinas. De la misma forma se realizó el mismo procedimiento analizando la localización de la molécula CXCR4, sin embargo, no se encontró diferencia significativa (Figura 42A-B)

A)



B)

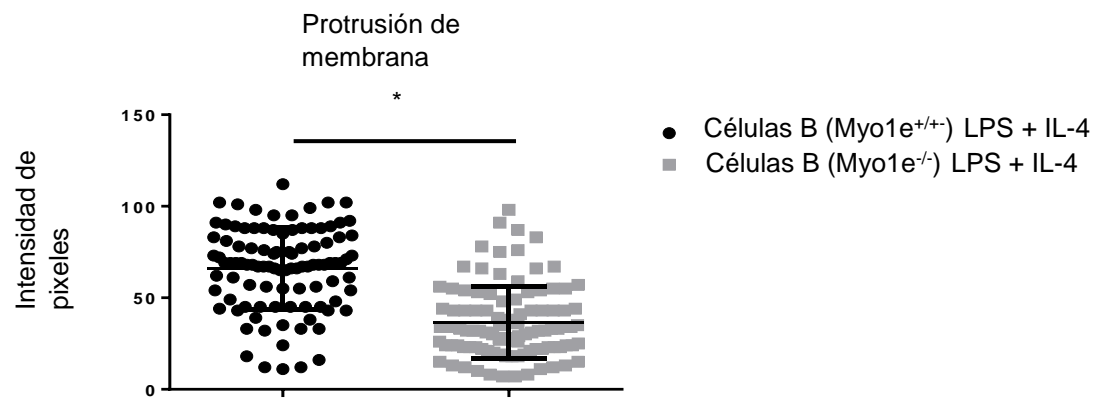


Figura 41 La ausencia de la Myo1e afecta la localización de LFA-1

A) Imágenes representativas (Objetivo 63x) de las células B activadas de los ratones $Myo1e^{+/+}$ y $Myo1e^{-/-}$, bajo un gradiente de CXCL12. Las células fueron teñidas con anti-LFA-1 (verde) y DAPI (Azul). Barra de escala 5 μ m. B) Intensidad de pixeles en la protrusión de membrana de las células B activadas de los ratones $Myo1e^{+/+}$ y $Myo1e^{-/-}$. La cuantificación fue realizada con el programa LAS X (Leica) N=3. (media \pm SD). * $p < 0.05$

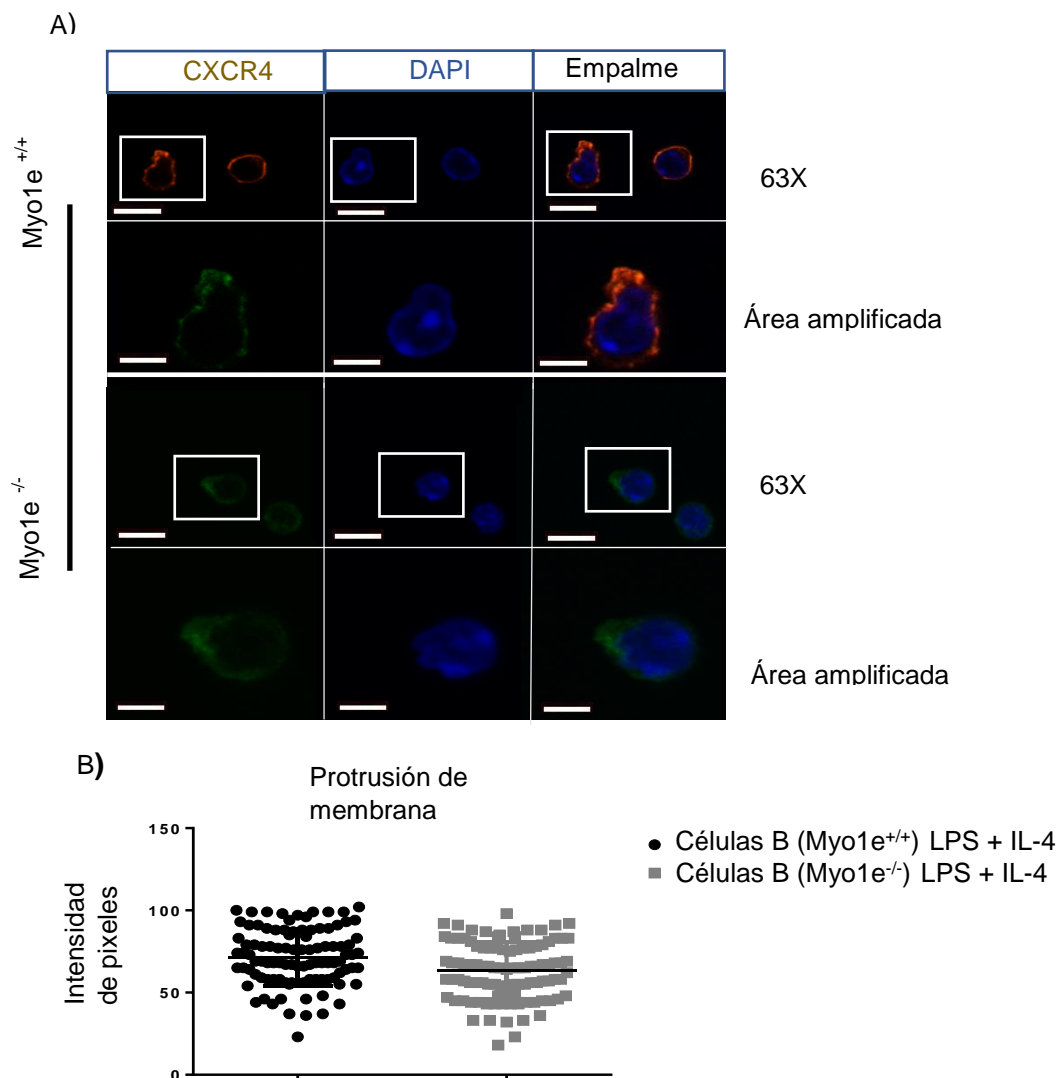


Figura 42 La ausencia de la Myo1e no afecta la localización de CXCR4

A) Imágenes representativas (Objetivo 63x) de las células B activadas del ratón Myo1e^{+/+} y del ratón Myo1e^{-/-} bajo un gradiente de CXCL12. Las células fueron teñidas con anti-CXCR4 (verde) y DAPI (Azul). Barra de escala 5 µm. B) Intensidad de píxeles en la protrusión de membrana de células B activadas de los ratones Myo1e^{+/+} y Myo1e^{-/-}. La cuantificación fue realizada con el programa LAS X (Leica). N=3. (media ± SD).

7.13 Myo1e interactúa con FAK y su ausencia disminuye la fosforilación en la tirosina 397 de FAK

La adhesión celular es un proceso determinado por la formación de “clúster” de integrinas en la membrana celular, donde diferentes proteínas pueden participar en este fenómeno, una proteína candidata es la Myo1e. Se evaluó por medio del método de la co-inmunoprecipitación, si la cinasa de adhesión focal (FAK) se asocia a Myo1e a las células B en un estado en reposo o activado. Se encontró una asociación en ambas condiciones; sin embargo, existe una mayor asociación de Myo1e con FAK en los linfocitos B activadas (Figura 43-A).

Este resultado es muy interesante, por lo que se evaluó la fosforilación de FAK. Por lo tanto, se realizaron ensayos de “Western blot” en las células B que fueron estimuladas con (CXCL12) donde se encontró que las células carentes de la Myo1e, bajo el estímulo de CXCL12, presentaban una reducción en la fosforilación de FAK; mientras, que las células sin estímulo de CXCL12 no presentan esta reducción (Figura 43 B-C). Esto resultados nos sugiere la participación de la Myo1e en la formación de los “clúster” de integrinas.

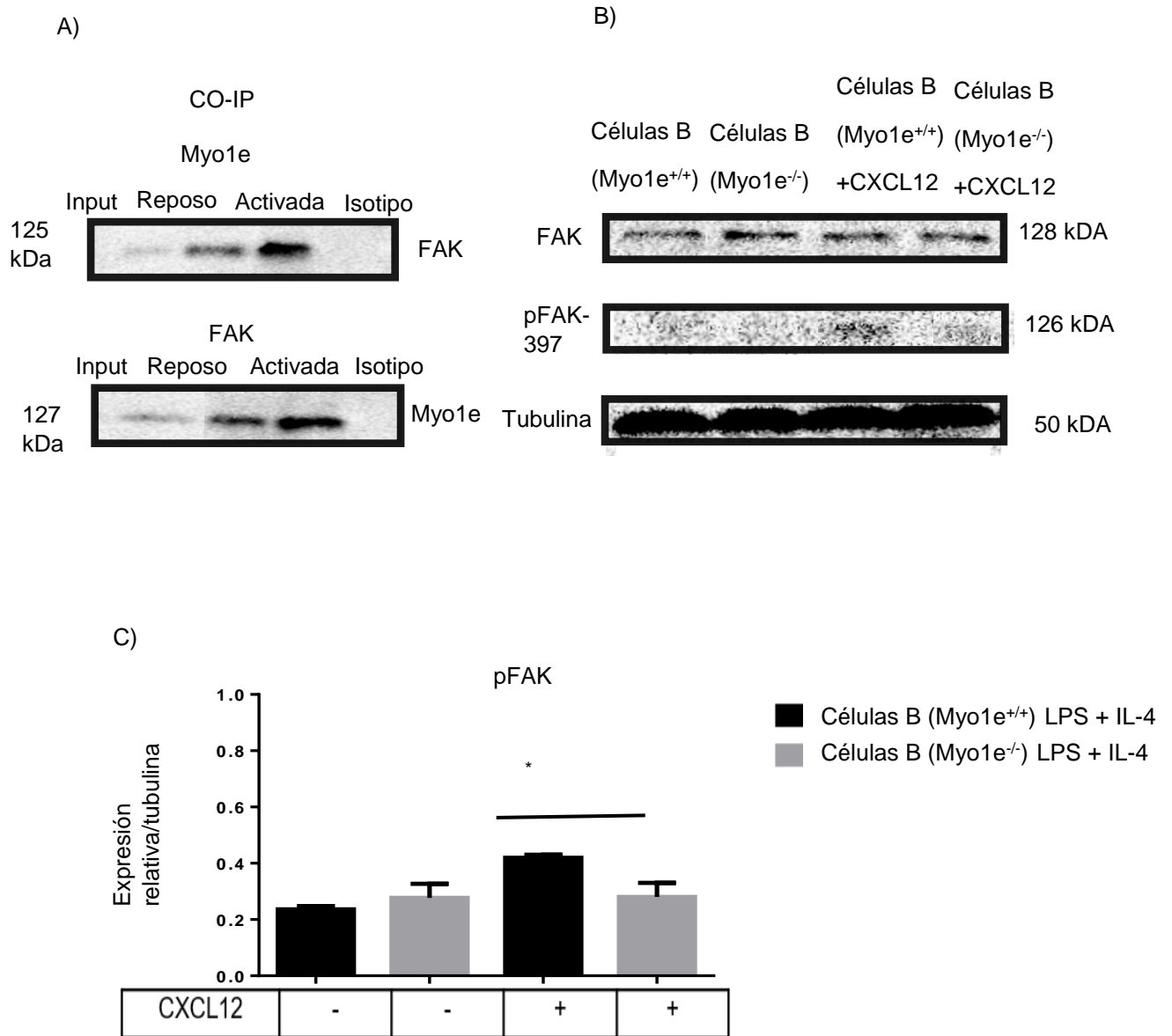


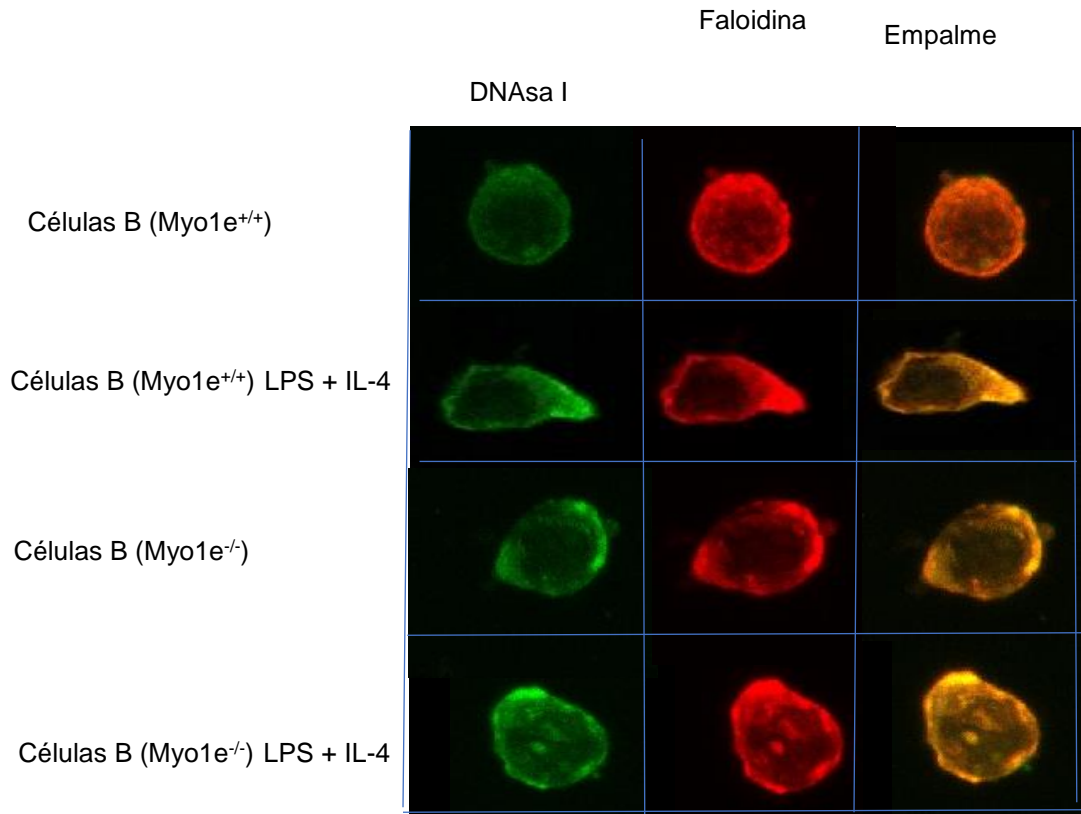
Figura 43. La proteína Myo1e interactúa con FAK, y su ausencia causa una reducción en la fosforilación de FAK

A) Ensayo de co-immunoprecipitación de la Myo1e con la cinasa de adhesión focal (FAK) en las células B en reposo y activadas. N=3. B) Western blot de la fosforilación de la tirosina 397 de la proteína FAK en células B estimuladas o con sin CXCL12. N=3. C) Análisis densitométrico de la fosforilación de la tirosina 397 en la proteína FAK. N=3. (media ± SD). *p<0.05

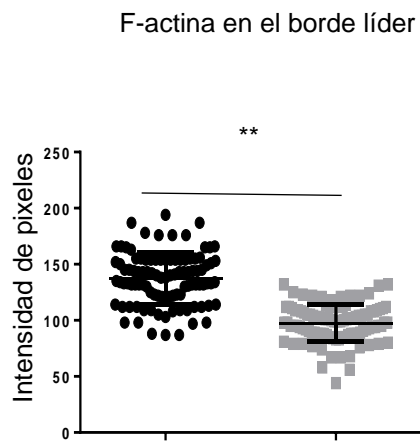
7.14 La Myo1e afecta la polimerización de la actina en la protrusión de la membrana

La polimerización de actina es un evento dinámico que participa en la adhesión y en la migración celular. La actina está regulada por un sistema de polimerización y despolimerización regulado por proteínas de unión a la actina (cofilina) y puede ser detectado estos eventos a través de la G-actina y la F-actina. Se cuantifico la G-actina mediante la enzima DNAsa I (FITC) y la actina filamentosa a través de la Falodina (TRITC) en las células B, esto se realizó a través de la citometría de flujo y el análisis de la intensidad de pixeles. La cantidad de G-actina o de F-actina en la célula no mostró diferencia significativa por ambos sistemas, pero cuando se analizó en la protrusión de membrana la cantidad de F-actina en las células B activadas, se encontró una disminución de la actina filamentosa en las células B activadas carentes de la Myo1e (Figura 44A-C).

A)



B)



C)

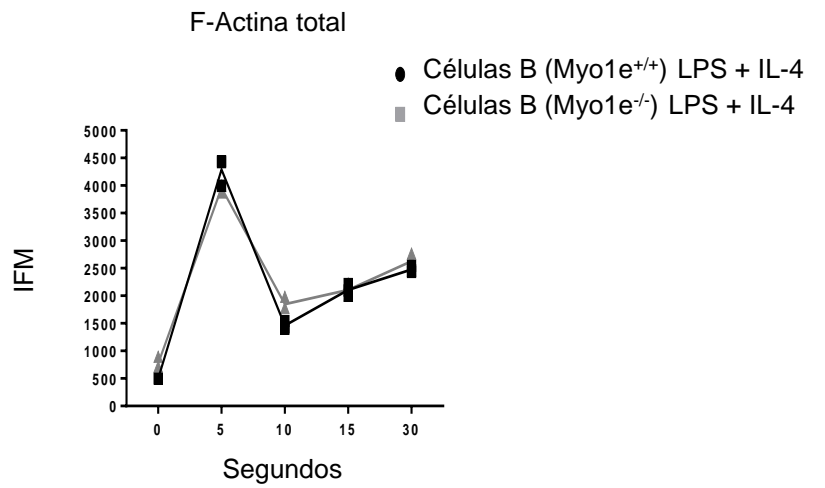


Figura 44. La deficiencia de la Myo1e causa una disminución de la F-actina en las prolongaciones de la membrana

A) Imágenes representativas (objetivo 63X) de las células B activadas del ratón Myo1e^{+/+} y del ratón Myo1e^{-/-} bajo estimulación de CXCL12. Las células fueron teñidas con Faloidina-TRITC (Rojo) y DNASA I (FITC). Barra de escala 5 μ m. N=5. B). Intensidad de pixeles de F-actina, en la protrusión de membrana. N=5. (media \pm SD), **p<0.01 C) Intensidad de media de fluorescencia de actina total en diferentes tiempos. N=5 (media \pm SD). **p<0.01.

7.15 La Myo1e interacciona con CARMIL y su ausencia repercute en una pérdida del “spreading” de las células B.

Las prolongaciones de la membrana requieren de la polimerización de actina, así como de factores promotores de la nucleación de la actina. La proteína CARMIL en su dominio amino terminal interacciona con las proteínas de “capping” α y β (son proteínas que se unen al extremo “+” del filamento de actina e inhiben la elongación tanto de los filamentos de actina, como de la membrana plasmática). La interacción de la molécula CARMIL con la Myo1e es relevante para formar prolongaciones de membrana.

Ensayos de co-inmunoprecipitación mostraron la interacción entre la Myo1e con la proteína CARMIL en células B activadas (Figura 43A-C). Este resultado indica que la Myo1e ayuda indirectamente a la formación de prolongaciones de membrana.

El “spreading” celular es un evento que permite ampliar el área de contacto con el antígeno, por lo que se evaluó este fenómeno. Se colocaron las células B se colocaron sobre fibronectina por una hora y se cuantificó el factor elíptico (es la razón entre la longitud y el ancho de la célula). Al evaluar este fenómeno en células B del ratón Myo1e^{-/-}, se observó que una reducción en la formación de dendritas y en el factor elíptico comparadas con las células B del ratón Myo1e^{+/+}. (Figura 45).

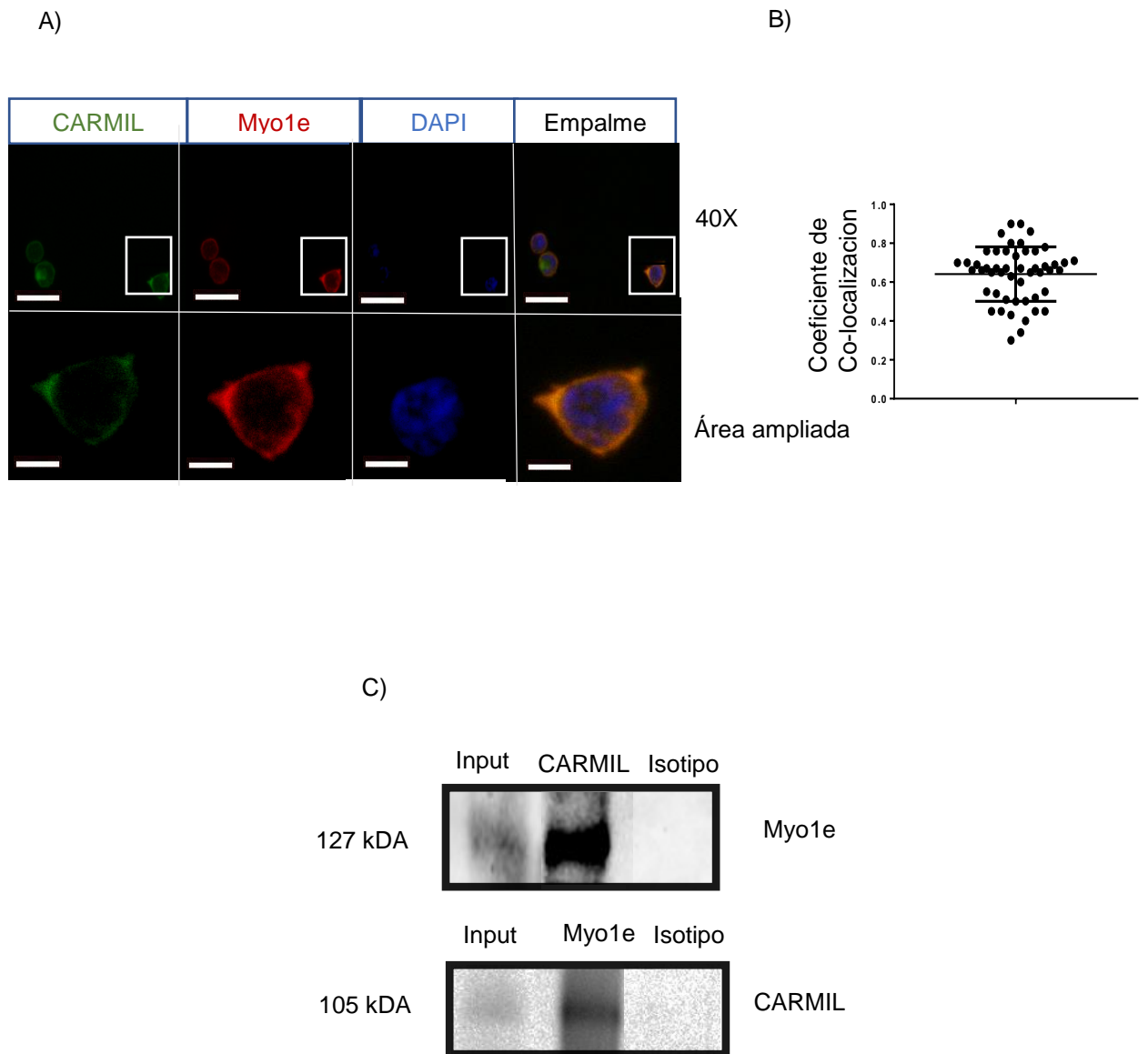
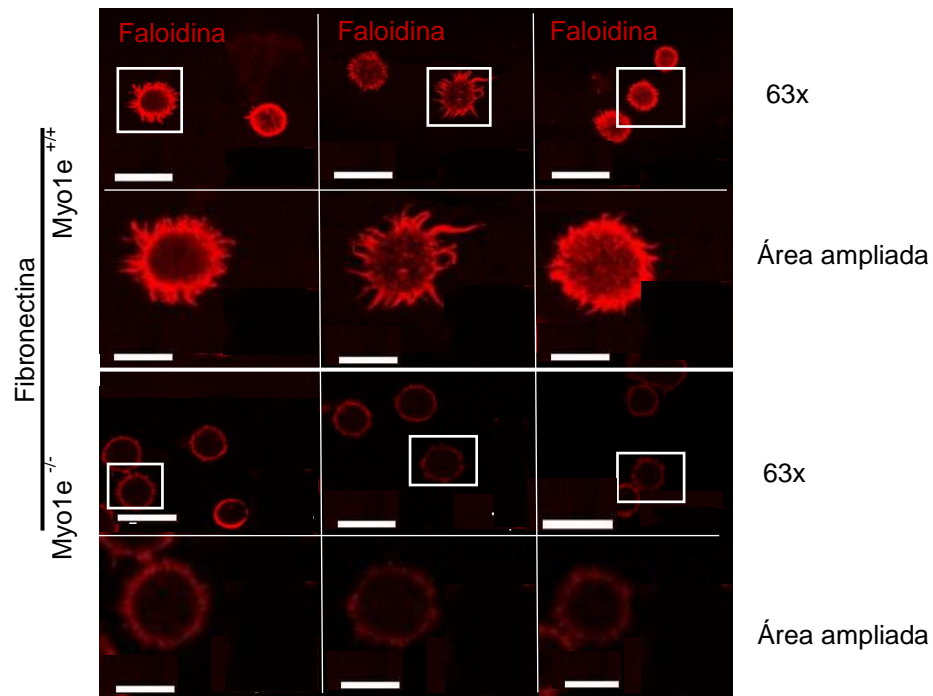


Figura 45. La Myo1e interactúa con CARMIL

A) Imágenes representativas (Objetivo 63x) de las células B activadas del ratón *Myo1e^{+/+}* teñidas con anti-Myo1e (Rojo) anti-CARMIL (Verde) y DAPI (Azul). Barra de escala 5 μ m. N=3. B) Ensayos de co-localización (correlación de Pearson) de la Myo1e con la proteína CARMIL. La colocalización fue medida en 50 células por experimento. N=3. (media \pm SD). C) Ensayo de co-inmunoprecipitación de la Myo1e con CARMIL en células B activadas del ratón *Myo1e^{+/+}* N=3

A)



B)

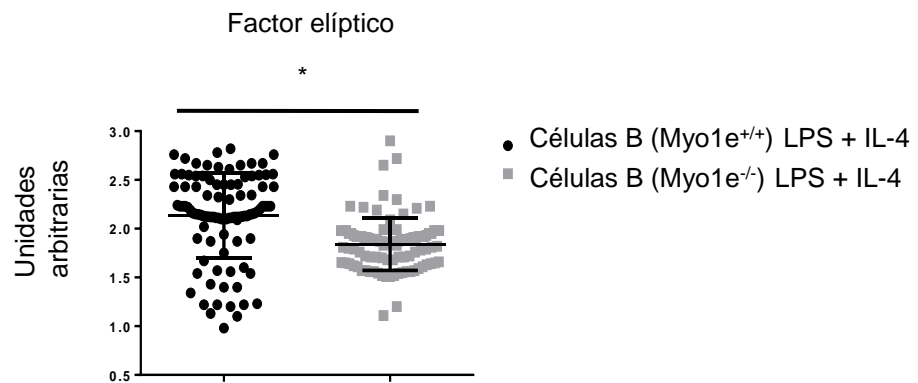


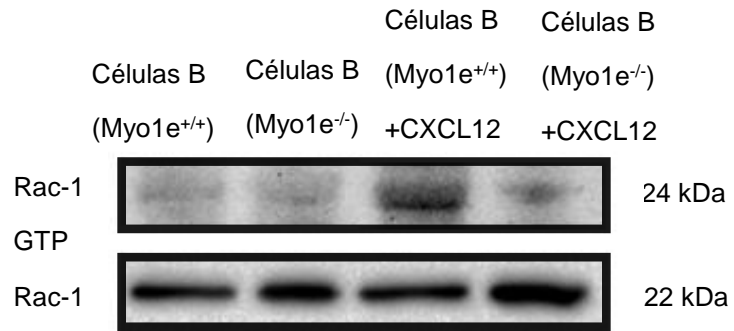
Figura 46 la ausencia de la Myo1e afecta el “spreading” celular

Imágenes representativas del “spreading” (Objetivo 63 X) de las células B activadas de los ratones Myo1e^{+/+} y Myo1e^{-/-} teñidas con Faloidina (Rojo) Barra de escala 5 μ m. B) Cuantificación del factor elíptico de células en spreading de células B del ratón Myo1e^{+/+} y del ratón Myo1e^{-/-}. N=3 (media \pm SD) *p<0.05

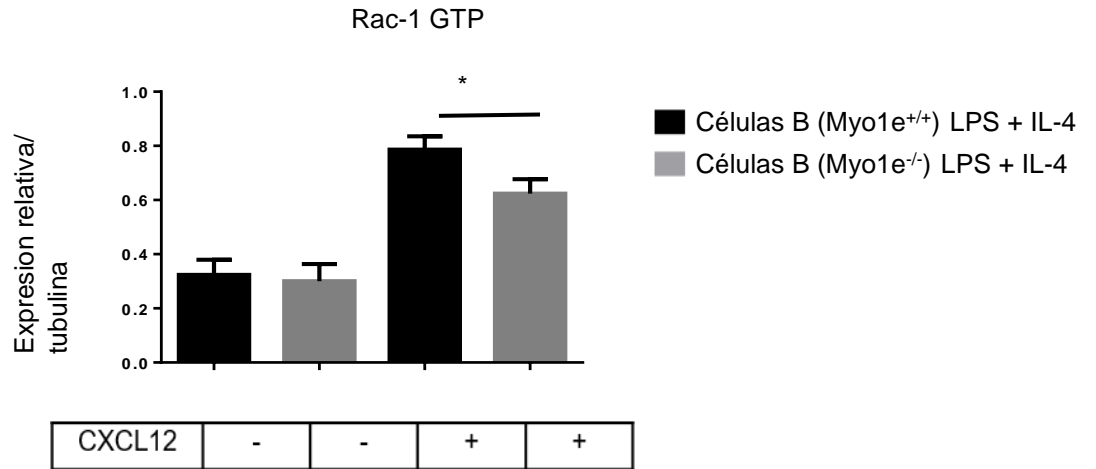
7.16 Análisis de la actividad de la GTPasa Rac-1 y de la proteína AKT en linfocitos B carentes de la Myo1e

Rac-1 es una GTPasa involucrada en la polimerización de actina, ya que activa el complejo WASp-ARP2/3 lo que permite la ramificación de los filamentos de actina [124]. Se evaluó la actividad de Rac-1 cuando se pierde la expresión de la Myo1e esto fue llevado a cabo mediante ensayos de “Western blot” en células B activadas con o sin el estímulo de CXCL12 encontrando una disminución de la forma activa de Rac-1 en las células B activadas carentes de la Myo1e y bajo el estímulo de CXCL12. La activación de Rac-1 es mediado por diferentes proteínas, una de ellas es la molécula AKT la cual se ancla a la membrana plasmática a través de su dominio BH (Basic Homology) ocasionando que se fosforile AKT y permita el reclutamiento de diversas GEFs como VAV1 [125]. Se analizó la fosforilación de AKT en la treonina 308 donde se observó una reducción en la fosforilación en las células B carentes de la Myo1e, bajo el estímulo de CXCL12 (Figura 47).

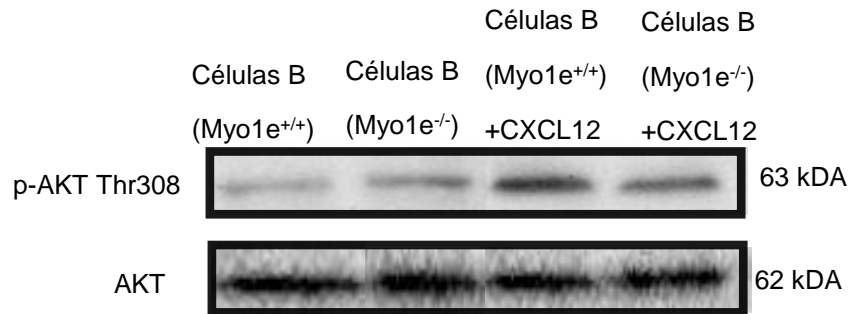
A)



B)



C)



D)

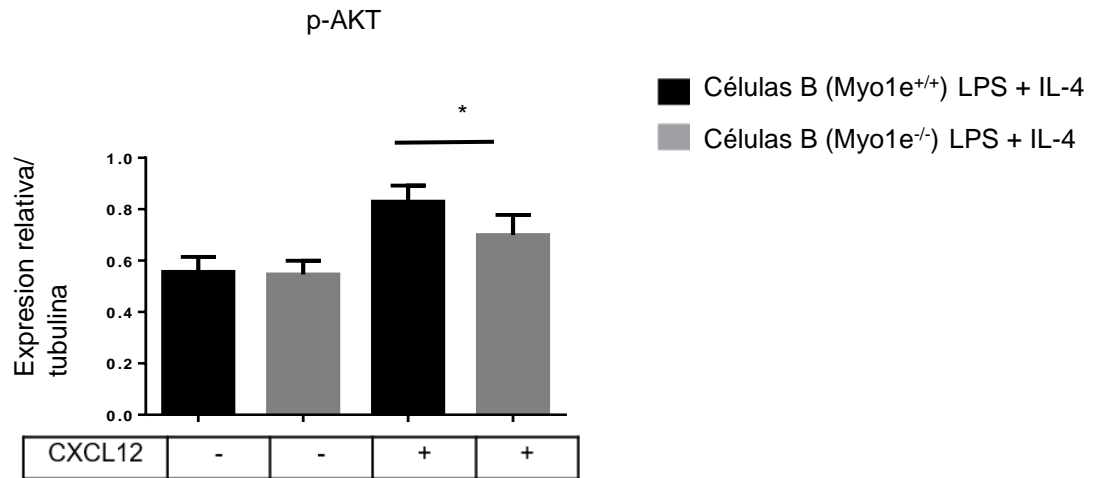
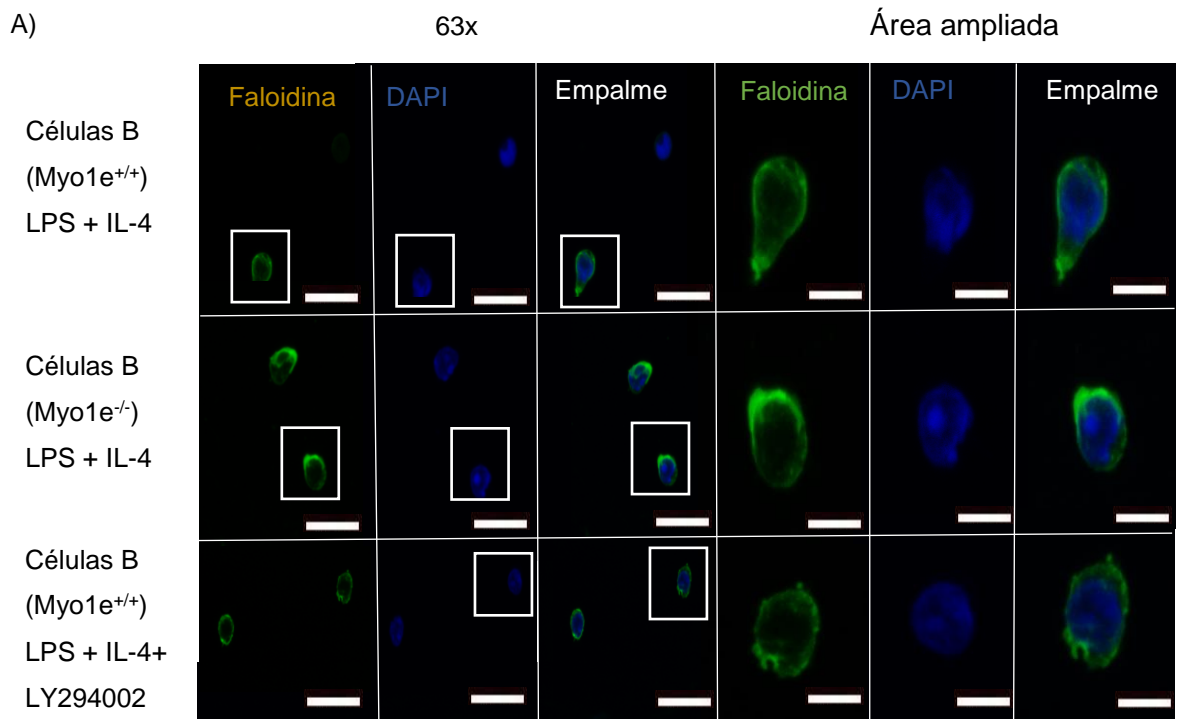


Figura 47. La deficiencia de la Myo1e causa una reducción en la actividad de Rac-1 y la fosforilación de AKT1

A) "Western blot" de Rac-1 en las células B activadas de los ratones Myo1e^{+/+} y Myo1e^{-/-}, con o sin estímulo de CXCL12 B) Análisis densitométrico de la actividad de Rac-1 en las células B activadas del ratón Myo1e^{+/+} y Myo1e^{-/-}, con o sin estímulo de CXCL12. N=3 (media ± SD) *p<0.05. C) "Western blot" de la fosforilación en la treonina 308 de AKT en las células activadas de los ratones Myo1e^{+/+} y Myo1e^{-/-}, con o sin estímulo de CXCL12 D) Análisis densitométrico de de la fosforilación en la treonina 308 de AKT en células B activadas de los ratones Myo1e^{+/+} y Myo1e^{-/-}, con o sin estímulo de CXCL12. N=3 (media ± SD). *p<0.05

7.17 La Myo1e participa en la vía de señalización FAK/PI3K/Rac-1

La Myo1e induce la actividad de Rac-1, pero esta proteína está regulada por la actividad enzimática de PI3K, la cual intercambia los fosfolípidos de PIP2 a PIP3. Para evaluar la participación de la Myo1e sobre la actividad de PI3K, se utilizó el inhibidor LY294002 (que actúa sobre el sitio activo de la enzima PI3K) y analizando los cambios morfológicos en los linfocitos B (Figura 48). El análisis mostro que utilizando el inhibidor LY294002 se observaron prolongaciones similares a las que presenta los linfocitos B activados carentes de la Myo1e. Esto nos sugiere la participación de la Myo1e sobre la actividad de la enzima PI3K.



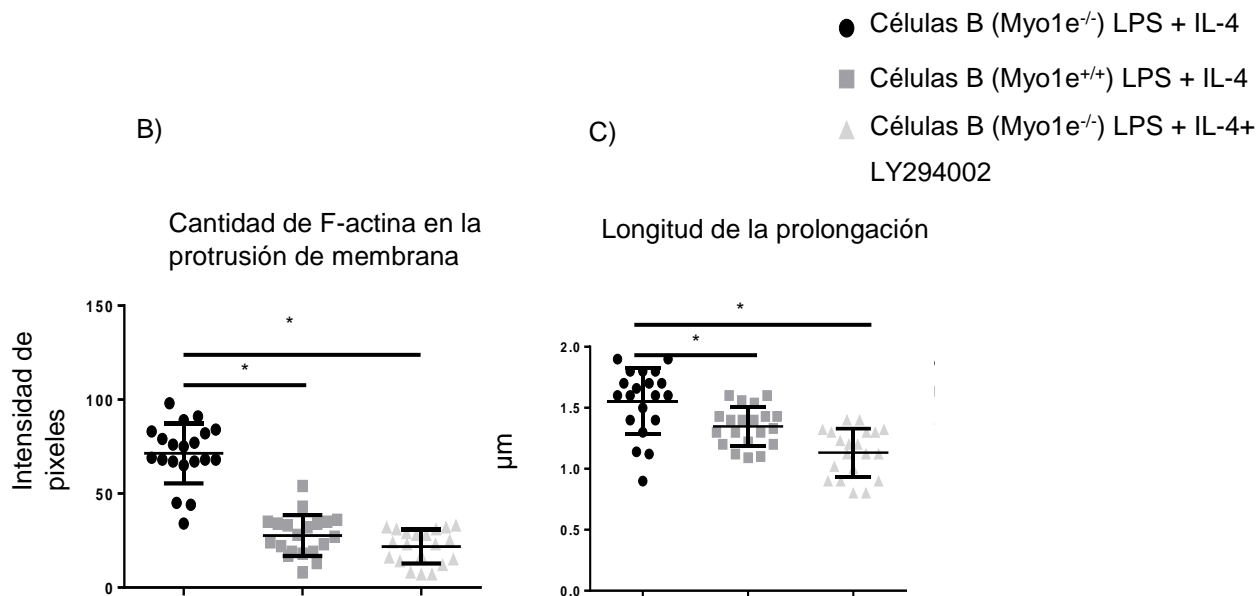
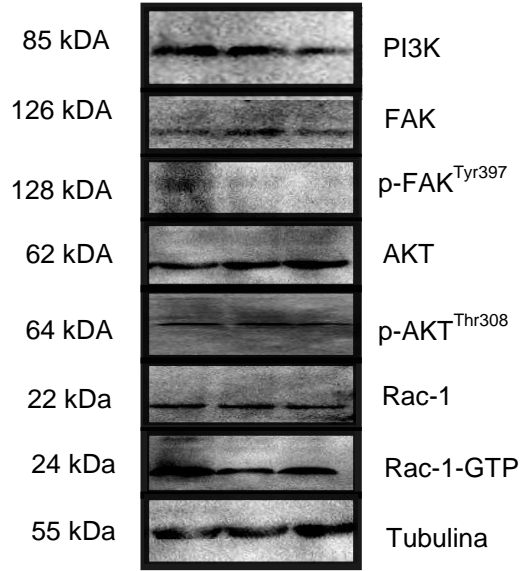


Figura 48. La pérdida de la Myo1e afecta la función de PI3K disminuyendo la polarización celular

A) Imágenes representativas (Objetivo 63X) de la longitud de la prolongación de membrana en las células B activadas de los ratones Myo1e^{+/+} y Myo1e^{-/-} con o sin estímulo de CXCL12; adicionalmente, las células B del ratón Myo1e^{+/+} fueron puesta con el inhibidor LY294002, y se tiñeron con Faloidina (Roja) y DAPI (Azul). N=3 B) Cuantificación de la longitud de las prolongaciones y la intensidad de pixeles entre las células B de los ratones Myo1e^{+/+} y Myo1e^{-/-}; además de las células B Myo1e^{+/+} con el inhibidor Ly294002. N=3. (media ± SD) **p<0.01 *p<0.05

La utilización del inhibidor LY294002 causa cambios morfológicos similares a los que se obtienen en las células B carentes de la Myo1e, por lo que se evaluó la actividad de Rac-1, la fosforilación de la molécula FAK y de la proteína AKT. Esto se realizó utilizando las células B de los ratones Myo1e^{+/+} y Myo1e^{-/-} y el inhibidor de PI3K anteriormente mencionado. En análisis mostro una reducción en la actividad de Rac-1, de FAK y de AKT. Por lo tanto, podemos concluir que la Myo1e participa en la vía de señalización FAK/PI3K/Rac-1.

A)



- Células B (Myo1e^{+/+}) LPS + IL-4
- Células B (Myo1e^{-/-}) LPS + IL-4
- Células B (Myo1e^{-/-}) LPS + IL-4+ LY294002

B)

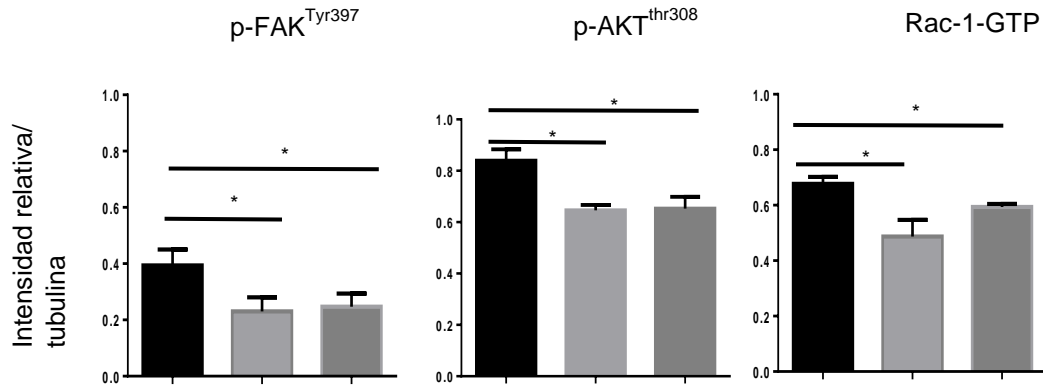


Figura 49. La ausencia de la Myo1e afecta la actividad de Rac-1 y las fosforilaciones de AKT así como de la proteína FAK

A) "Western blot!" para evaluar la actividad de Rac-1 y la fosforilación de FAK en la tirosina 398 además de la fosforilación de AKT en la treonina 308 en las células B activadas de los ratones Myo1e^{+/+} y Myo1e^{-/-} con o sin estímulo de CXCL12; además, se analizaron las células B Myo1e^{+/+} con el inhibidor LY294002 B) Análisis densitométrico de la actividad de Rac-1 y la fosforilación de FAK en la tirosina 398 así como la fosforilación de AKT en la treonina 308 en las células B activadas de los ratones Myo1e^{+/+} y Myo1e^{-/-} con o sin estímulo de CXCL12; además, se analizaron las células B del ratón Myo1e^{+/+} con el inhibidor LY294002. N=3 (media ± SD). *p<0.05.

7.18 Proliferación celular de las células B.

La proliferación celular es un evento presente en todas las células y que diversas proteínas están involucradas en este fenómeno. Se realizaron ensayos de incorporación de timidina tritiada (³H) en las células B activadas de los ratones Myo1e^{+/+} y Myo1e^{-/-}. El control negativo de la proliferación fueron células B en reposo. No se encontraron diferencias en la proliferación utilizando el estímulo de LPS + IL-4, esto indica que la Myo1e no participa en la proliferación celular inducida por TLR-4 o a través del receptor de IL-4 (Figura 50).

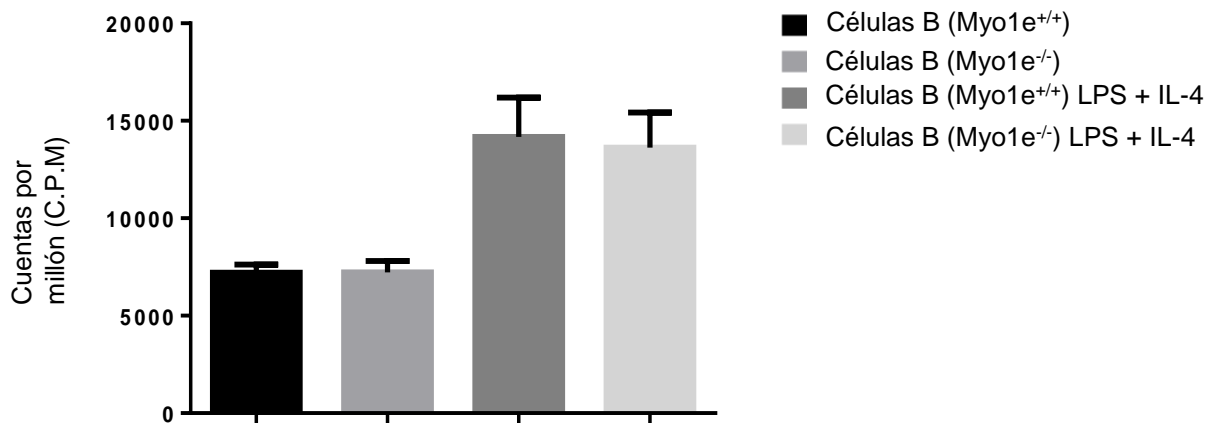
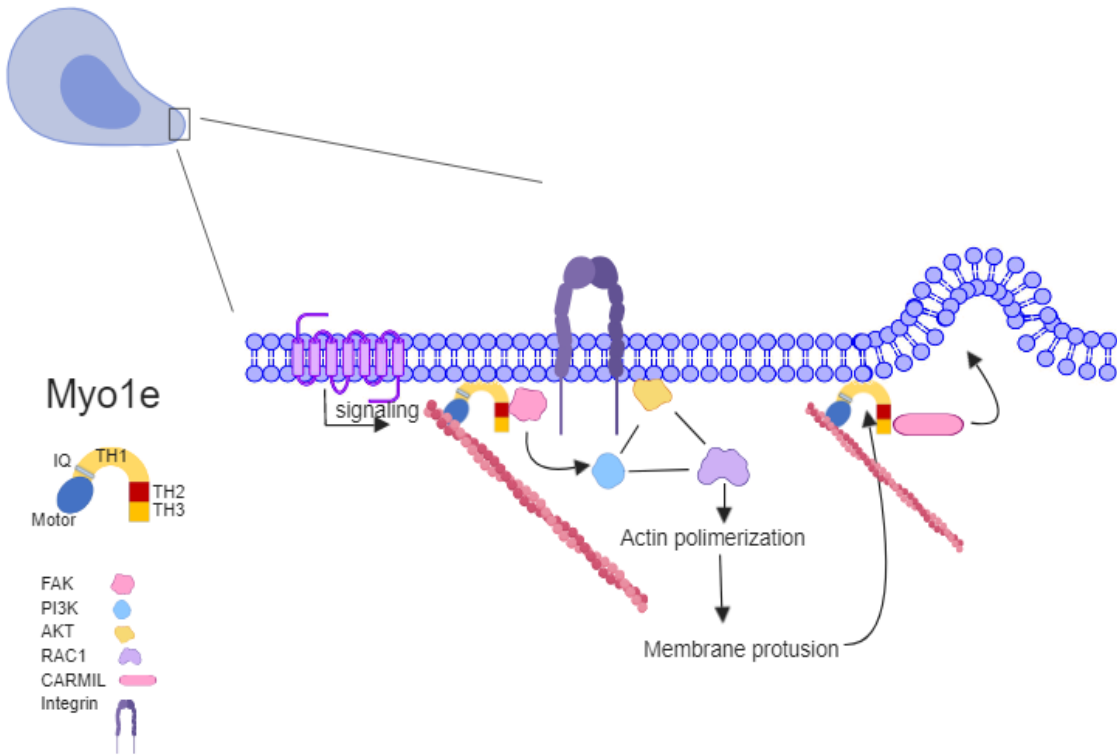


Figura 50 La deficiencia de la Myo1e no afecta la proliferación celular

Ensayo de proliferación mediada por la incorporación de timidina tritiada en las células B en reposo o activadas con LPS + IL-4 de los ratones Myo1e^{+/+} y Myo1e^{-/-}. N=3. (media ± SD).

En conclusión, la Myo1e es una proteína motora abundante en las células B del ratón participando en la adhesión, la migración y la transmigración celular de los linfocitos B. La Myo1e permite una eficiente expresión y localización de las integrinas en la membrana celular. La Myo1e se asocia a la proteína FAK permitiendo la formación de "clúster" de integrinas, esto favorece la activación de la enzima PI3K, la molécula AKT y la GTPasa Rac-1. El conjunto de estas proteínas son críticas para la activación de los factores promotores de la nucleación de la actina y la formación de protrusiones de membrana.

8. Resumen Gráfico



La migración celular es un evento regulado por diferentes proteínas. Las células B migran en respuesta a CXCL12 permitiendo que se activen diferentes vías de señalización. La presencia de la Myo1e ocasiona que se reclute la molécula FAK y se autofosforile en la tirosina 397, posteriormente la proteína FAK fosforila el dominio p85 de la enzima PI3K, causando el intercambio de fosfolípidos de la membrana de PIP2 a PIP3.

El fosfolípido PIP3 permite que se ancle la molécula AKT a la membrana plasmática ocasionando su fosforilación en la treonina 308, esto permite que se activen la GTPasa Rac-1. La activación de la vía FAK/PI3K/Rac-1, causa que los factores promotores de la nucleación (CARMIL o WASP) se recluten a sitios específicos de la célula B y se formen prolongaciones de membrana las cuales son críticas para la migración y la adhesión celular.

9. Discusión

La adhesión celular a los diferentes sustratos causa cambios en el rearrreglo del citoesqueleto de actina, esto promueve el “spreading” celular y la formación de protrusiones de membrana durante el proceso de migración. Las protrusiones de membrana son críticas para generar una fuerza motriz que se requiere para el desplazamiento celular; concomitante a esta función, la adhesión celular requiere de sitios de la polimerización de actina para la formación de puntos de adhesión [126].

Los leucocitos en el torrente sanguíneo se adhieren al endotelio vascular, esto causa cambios morfológicos en la célula que son necesarios para el rodamiento y transmigración [127]. En órganos linfoides secundarios es posible que los linfocitos B establezcan sitios de adhesión en las vénulas del endotelio alto (HEVs), estos sitios contienen moléculas de adhesión como: LFA-1, VLA-4, MAdCAM-1. En las placas de Peyer la primera interacción con el endotelio es a través de las selectinas (CD62-L) y de las integrinas ($\alpha 4\beta 7$ y LFA-1). Estas proteínas regulan el arresto y el “spreading” de las células en el endotelio [128].

Las integrinas son moléculas de adhesión, las cuales se dividen en 24 miembros con subunidades hetero-diméricas α y β , estas median la adherencia a la matriz extracelular y la interacción célula-célula. Las integrinas las podemos clasificar de acuerdo con su naturaleza, tenemos los receptores tipo RGD (arginina, glicina y ácido aspártico), las integrinas de reconocimiento a laminina y de reconocimiento a colágeno; además, de los receptores específicos de leucocitos. La integrina denominada: antígeno 1 asociado a la función de linfocitos (LFA-1), pertenece a la familia de receptores específicos de leucocitos y está compuesta por la subunidad αL y $\beta 2$ [129].

La integrina LFA-1 es una molécula que consiste en un heterodímero, que contiene una subunidad α de 180 kDa, que se asocia no covalentemente a una subunidad β de 95 kDa. Esta proteína está expresada en todos los leucocitos, existen entre 15,000 a 40,000 moléculas de LFA-1 en las células B y se

expresa abundantemente desde los estadios pre-proB hasta los linfocitos B maduros. La participación de LFA-1 no solo se limita a la adhesión celular, sino también en la presentación antigénica, la liberación de anticuerpos, la formación de centros germinales y el anclaje a otras células para la liberación de citocinas [130].

Las miosinas de clase I están involucradas en la adhesión, la motilidad y el reciclamiento de receptores, esto es llevado a cabo por medio del transporte de vesículas [81, 85]. En el presente estudio, nosotros demostramos a través de la microscopia intravital y de un sistema de migración en 2D, la relevancia de la Myo1e en la motilidad de las células B activadas

De acuerdo con la expresión de arreglos de RNA (www.lmmgen.com), la Myo1e se expresa en macrófagos, células dendríticas, células B de bazo y del peritoneo. Nuestros ensayos de “Western blot” demostraron que la Myo1e, es la miosina de clase I más expresada en linfocitos B; sin embargo, no se observa un incremento en la expresión de la Myo1e cuando se activan los linfocitos B con LPS + IL-4

Las miosinas se han visto involucradas en regular ciertas funciones de los linfocitos B, por ejemplo, se conoce que las miosinas de clase IIa regulan a las células B en la medula ósea, en el peritoneo, en los centros germinales [131]. Nuestros resultados indican que la Myo1e no participa en el proceso de maduración de los linfocitos B, ya que no encontramos diferencias en el ratón carente de la Myo1e en los números absolutos de las diferentes subpoblaciones de las células B

La pérdida de la Myo1e en las células B activadas causa una reducción en el reclutamiento a los nódulos linfáticos inguinales previamente inoculados con CXCL12, este proceso va acompañada de una reducción del rodamiento lento y en la adhesión a las vénulas del endotelio alto (HEVs). Un estudio similar en neutrófilos ha reportado que la Myo1f tienen una reducción en el “spreading”, la transmigración y la extravasación en las vénulas del cremáster. El motivo

de esta deficiencia es debido a una alteración en la morfología celular ocasionando una ineficiente adherencia a las células endoteliales [132].

En las placas de Peyer, la neutralización de la integrina LFA-1 o la subunidad $\alpha 4$, causa un decrecimiento en la adhesión y reclutamiento celular. Este mismo fenómeno se observa cuando se inhibe la molécula VCAM-1 en las células T [133]. Por lo tanto, las integrinas juegan un papel fundamental en la adhesión y migración de las células.

La disminución en el reclutamiento de las células B carentes de la Myo1e, puede ser debido a una ineficiente adhesión celular. Las vénulas del endotelio alto (HEVs), expresan abundantemente las selectinas CD62L, MAdCAM, así como las moléculas ICAM-1 y VCAM-1[134]. Estas proteínas están reguladas por diferentes estímulos, un ejemplo de esta regulación es dada por la proteína ICAM-1, la cual incrementa su expresión cuando existe en el medio citocinas pro inflamatorias (TNF α , IL-1 β o IL-6,) las cuales puede ser liberadas tanto por células dendríticas, por macrófagos y por células T [135], el caso contrario es la molécula VCAM-1 esta no es inducible por acción de citocinas inflamatorias y en ciertos tejidos mantiene una expresión similar todo el tiempo [136-138].

La deficiencia en el reclutamiento de las células B carentes de la Myo1e fue corroborada por ensayos de “homing” donde se observó una reducción en el arribo de estas células a los nódulos linfáticos; sin embargo, se acumularon en la sangre y el bazo. [139, 140]. Estos resultados sugieren que la adhesión es crítica para la llegada de las células B a los ganglios linfáticos.

Experimentos con miosinas de clase I muestran que la presencia de las integrinas es necesaria para la migración celular; por ejemplo, la Myo1g es una miosina de cola corta que se expresa en células hematopoyéticas y su ausencia en los linfocitos B provoca una disminución en el desplazamiento celular, este fenómeno también se ha observado en neutrófilos carentes de la Myo1f. Esta reducción en el desplazamiento se puede atribuir a que las miosinas de clase I participan en la expresión y localización de integrinas en la membrana plasmática [84, 123].

La migración es dependiente de la adhesión celular. Las integrinas y los receptores de quimiocinas (CXCR4, CXCR5, CCR7) se incrementan con la activación celular [141] [142, 143], esto ocasiona cambios en el rearrreglo del citoesqueleto de actina. El papel de la Myo1e en la adhesión es crítica ya que observamos una reducción en la adherencia celular cuando se pierde la expresión de la Myo1e; así mismo, se observó prolongaciones de membrana fueran más cortas en los linfocitos B carentes de Myo1e, esta reducción está relacionada con la activación celular debido a que se incrementa la actividad de los factores promotores de la nucleación bajo ciertos estímulos.

La formación de las prolongaciones de la membrana es modulada por moléculas de adhesión (CD44, CD62-L, LFA-1, LFA-2, VLA-4) las cuales contribuyen a la formación de puntos focales, que permiten que la célula se deforme y se generen estructuras como lamelipodios y filopodios. La adherencia permite generar una fuerza motriz suficiente para deformar la membrana celular, la cual es crítica para la migración de las células [144, 145].

La ausencia de las integrinas $\beta 1$ en las células GD25 (blastocitos de ratón) afecta la formación de las protrusiones de la membrana [146]; a su vez, en neutrófilos se ha descrito que la pérdida de LFA-1 afecta el reclutamiento y la adhesión celular [147]. Por lo tanto, al evaluar si la deficiencia de Myo1e afecta la expresión de estas moléculas, medimos por citometría de flujo su expresión. Se encontró que las integrinas LFA-1, VLA-4 y la molécula de adhesión CD44 se encontraban disminuidas en las células B carentes de la Myo1e, mientras que las proteínas CD62-L y el receptor de quimiocina CXCR4 no mostraron diferencias con las células B del ratón Myo1e^{+/+}, esto nos habla de un transporte vesicular específico.

Las integrinas y receptores de quimiocinas son transportadas a través de las proteínas SNARE, ambos grupos de proteínas utilizan la proteína SNAP-23 para ser transportada a la membrana celular, pero difieren en los receptores de transporte (las sintaxinas), las integrinas LFA-1 y VLA-4 ocupan la sintaxina-5 [148], mientras los receptores de quimiocina utilizan la sintaxina-3

[149], esto sugiere que posiblemente la Myo1e interacciona selectivamente con estos receptores.

La formación de “clusters” sirven como centros de señalización y modula la migración celular. [150]. La formación de los “clusters” está regulado por diferentes proteínas del citoesqueleto como la paxilina [151], la tensina [152] y la talina [153], las cuales forman un complejo donde se recluta la cinasa de adhesión focal (FAK), este reclutamiento causa la autofosforilación en la tirosina 397 de FAK, [154]; que a su vez ocasiona la fosforilación de las tirosinas- 180, 652, y 958, que están presentes en el dominio SH2 de la FAK; sin embargo, no se conoce en detalle el mecanismo secuencial de fosforilación [155].

La asociación de la Myo1e con FAK, ha sido reportado en células de melanoma (WM858) [65]; así mismo, nosotros reportamos por primera vez la asociación en células B tanto en reposo y activadas. Se propone la hipótesis que la Myo1e permite el reclutamiento de FAK a los “clúster” de las integrinas ocasionando que se activen diferentes vías de señalización.

La interacción de la Myo1e con FAK permite un incremento en la fosforilación de FAK en la tirosina 397 cuando las células están bajo el estímulo de CXCL12. Se ha descrito en las células DU-145 (células epiteliales) y en los precursores hematopoyéticos, donde la quimiocina CXCL12 modula la autofosforilación de FAK y la expresión de las integrinas $\beta 3$ y $\alpha 5$, permitiendo la formación de los “clúster” y el rodamiento de las células a través del endotelio [156, 157].

El rodamiento lento es un mecanismo que permite la transmigración celular, la cual es precedida por cambios morfológicos. El “spreading” celular es un mecanismos donde la célula incrementa su área de contacto con los diferentes ligandos o permite un incremento en la tasa de captura antigénica [158, 159]. En neutrófilos deficientes de la Myo1f, la morfología de se encuentra alterada ocasionando una reducción en el “spreading” y por consiguiente una disminución en la adherencia y en el rodamiento de los neutrófilos en las

vénulas del cremáster. [132]. En este estudio se encontró que la ausencia de la Myo1e causa una disminución en el “spreading” celular, medido a través del factor elíptico, sugiriendo que el spreading afecta el rodamiento en la (HEVs).

La GTPasa Rac-1 se expresa en diversos tipos celulares y está involucrada en producir cambios morfológicos en la célula, en la movilidad y la formación de protrusiones de membrana. La deficiencia de Rac-1 altera la morfología celular, [160] a su vez, la molécula Rac-1 interacciona con otras proteínas del citoesqueleto (Rap-1) [161]. La actividad de Rac-1 es regulada por la molécula AKT mediante la interacción con las GEFs, esta interacción es debido a la fosforilación de AKT en la treonina 308 mediante la cinasa PDK1 [162-164]. La fosforilación de AKT ocasiona que se active Rac-1 y esta interaccione con WASp ocasionando rearrreglos en el citoesqueleto. En este trabajo demostramos a través de ensayos de “Western Blot” que la Myo1e participa en la regulación de Rac-1 y de la molécula AKT.

La actividad de AKT, requiere que su dominio BH (dominio básico) interactúe con los fosfolípidos de la membrana, específicamente con fosfatidilinositol, 3,4,5 trifosfato (PIP3) [165]. La molécula PI3K es una enzima involucrada en la conversión de fosfatidilinositol 4,5, bifosfato (PIP2) a fosfatidilinositol 3,4,5, trifosfato (PIP3) [109]; sin embargo, la enzima PI3K está regulada por la actividad de FAK, ya que permite la fosforilación del dominio P85 la cual es requerida para la activación de la unidad catalítica p110 de PI3K y de esta forma la proteína FAK, participa en la activación de PI3K [166, 167]

La enzima PI3K participa en diferentes vías de señalización, entre las cuales encontramos la vía FAK/PI3K/Rac-1 en la línea celular EA. hy926 (células humanas endoteliales) y en la línea celular MCF7 (células epiteliales humanas). La inhibición de esta vía de señalización causa una migración alterada [109, 168]. En este trabajo se encontró que la ausencia de Myo1e en las células B activadas, bajo el estímulo de CXCL12, muestran un fenotipo similar cuando son tratadas con el inhibidor Ly294002 (un inhibidor de PI3K).

Esos resultados nos indica que la Myo1e participa en la vía de señalización FAK/PI3K/Rac-1.

La vía de señalización FAK/PI3K/Rac-1, es muy importante en la migración celular, ya que permite la formación de cúmulos de integrinas necesarios para la adhesión celular y la deformación de la membrana plasmática. Esta vía está involucrada en el cambio de los fosfolípidos de membrana los cuales son necesarios para el anclaje de diversas proteínas que activan a los factores promotores de la nucleación.

10. Conclusiones

- La Myo1e es crítica para la migración de las células B que fueron previamente activadas con LPS + IL-4.
- La Myo1e participa en la vía de señalización FAK/PI3K/Rac-1.
- La Myo1e participa en el reclutamiento de células B en el ganglio linfático inguinal.
- La Myo1e regula el reclutamiento de las integrinas a sitios específicos de la célula.

11. Perspectivas

- Analizar la migración de las células B en el ganglio linfático inguinal en el ratón carente de la Myo1e.
- Analizar si la Myo1e participa en el tráfico vesicular de las integrinas
- Determinar si la Myo1e participa en la formación de centros germinales.
- Analizar la participación de la Myo1e en la vía “inside-out” o “outside-in” durante el proceso de adhesión.

12. Bibliografía

1. Bezanilla M, Gladfelter AS, Kovar DR, Lee W-L. Cytoskeletal dynamics: A view from the membrane. *The Journal of Cell Biology* 2015,**209**:329-337.
2. Mohapatra L, Goode BL, Jelenkovic P, Phillips R, Kondev J. Design Principles of Length Control of Cytoskeletal Structures. *Annual Review of Biophysics* 2016,**45**:85-116.
3. Steinert PM, Steven AC, Roop DR. The molecular biology of intermediate filaments. *Cell* 1985,**42**:411-419.
4. Brouhard GJ, Rice LM. Microtubule dynamics: an interplay of biochemistry and mechanics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2018,**19**:451-463.
5. Revenu C, Athman R, Robine S, Louvard D. The co-workers of actin filaments: from cell structures to signals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2004,**5**:635-643.
6. Fletcher DA, Mullins RD. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature* 2010,**463**:485-492.
7. Hoyt MA, Hyman AA, Bähler M. Motor proteins of the eukaryotic cytoskeleton. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1997,**94**:12747-12748.
8. Devreotes P, Horwitz AR. Signaling networks that regulate cell migration. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2015,**7**:59-59.
9. Friedl P, Wolf K. Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *The Journal of Cell Biology* 2010,**188**:11-19.
10. Alexander S, Koehl GE, Hirschberg M, Geissler EK, Friedl P. Dynamic imaging of cancer growth and invasion: a modified skin-fold chamber model. *Histochemistry and cell biology* 2008,**130**:1147-1154.
11. Nagasawa T. The Chemokine CXCL12 and Regulation of Hsc and B Lymphocyte Development in the Bone Marrow Niche. In: *Osteoimmunology*. Edited by Choi Y. Boston, MA: Springer US; 2007. 69-75.

12. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature Reviews Immunology* 2007,**7**:678-689.
13. Galkina E, Florey O, Zarbock A, Smith BRE, Preece G, Lawrence MB, *et al.* T lymphocyte rolling and recruitment into peripheral lymph nodes is regulated by a saturable density of L-selectin (CD62L). *European Journal of Immunology* 2007,**37**:1243-1253.
14. Pinner SE, Sahai E. Integrin-independent movement of immune cells. *F1000 biology reports* 2009,**1**:67-67.
15. Santos-Argumedo L, Kincade PW, Partida-Sánchez S, Parkhouse RM. CD44-stimulated dendrite formation ('spreading') in activated B cells. *Immunology* 1997,**90**:147-153.
16. Pietuch A, Janshoff A. Mechanics of spreading cells probed by atomic force microscopy. *Open Biology*,**3**:130084.
17. Muller WA. How endothelial cells regulate transmigration of leukocytes in the inflammatory response. *The American journal of pathology* 2014,**184**:886-896.
18. Ody C, Jungblut-Ruault S, Cossali D, Barnet M, Aurrand-Lions M, Imhof BA, *et al.* Junctional adhesion molecule C (JAM-C) distinguishes CD27+ germinal center B lymphocytes from non-germinal center cells and constitutes a new diagnostic tool for B-cell malignancies. *Leukemia* 2007,**21**:1285-1294.
19. Meyer-Hermann M, Mohr E, Pelletier N, Zhang Y, Victoria Gabriel D, Toellner K-M. A Theory of Germinal Center B Cell Selection, Division, and Exit. *Cell Reports* 2012,**2**:162-174.
20. Haynes NM, Allen CDC, Lesley R, Ansel KM, Killeen N, Cyster JG. Role of CXCR5 and CCR7 in Follicular Th Cell Positioning and Appearance of a Programmed Cell Death Gene-1 High Germinal Center-Associated Subpopulation. *The Journal of Immunology* 2007,**179**:5099-5108.
21. Ebnet K, Suzuki A, Ohno S, Vestweber D. Junctional adhesion molecules (JAMs): more molecules with dual functions? *Journal of Cell Science* 2004,**117**:19-29.

22. Manara MC, Pasello M, Scotlandi K. CD99: A Cell Surface Protein with an Oncojanus Role in Tumors. *Genes* 2018,**9**:159-169.
23. Azzali G, Arcari ML, Caldara GF. The “mode” of lymphocyte extravasation through HEV of Peyer's patches and its role in normal homing and inflammation. *Microvascular Research* 2008,**75**:227-237.
24. Strell C, Entschladen F. Extravasation of leukocytes in comparison to tumor cells. *Cell communication and signaling : CCS* 2008,**6**:10-10.
25. Miyasaka M, Tanaka T. Lymphocyte trafficking across high endothelial venules: dogmas and enigmas. *Nature Reviews Immunology* 2004,**4**:360-366.
26. Rosen SD, Daneman R. High endothelial venules through a transcriptomics lens. *Nature Immunology* 2014,**15**:906-916.
27. Okada T, Ngo VN, Ekland EH, Förster R, Lipp M, Littman DR, *et al.* Chemokine requirements for B cell entry to lymph nodes and Peyer's patches. *The Journal of experimental medicine* 2002,**196**:65-75.
28. Warnock RA, Campbell JJ, Dorf ME, Matsuzawa A, McEvoy LM, Butcher EC. The role of chemokines in the microenvironmental control of T versus B cell arrest in Peyer's patch high endothelial venules. *The Journal of experimental medicine* 2000,**191**:77-88.
29. Kölliker A, Engelmann W. *Icones histologicae oder Atlas der vergleichenden Gewebelehre: Der Feinere Bau der Protozoen. Abtheilung 1:* Wilhem Engelmann; 1864.67-69.
30. Howard J. Molecular motors: structural adaptations to cellular functions. *Nature* 1997,**389**:561-711.
31. Uyeda TQ, Abramson PD, Spudich JA. The neck region of the myosin motor domain acts as a lever arm to generate movement. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996,**93**:4459-4464.
32. Krendel M, Mooseker MS. Myosins: Tails (and Heads) of Functional Diversity. *Physiology* 2005,**20**:239-251.

33. Foth BJ, Goedecke MC, Soldati D. New insights into myosin evolution and classification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006,**103**:3681-3686.
34. Girón-Pérez DA, Piedra-Quintero ZL, Santos-Argumedo L. Class I myosins: Highly versatile proteins with specific functions in the immune system. *Journal of Leukocyte Biology*, 2019; 105: 973– 981
35. Cope MJTV, Whisstock J, Rayment I, Kendrick-Jones J. Conservation within the myosin motor domain: implications for structure and function. *Structure* 1996,**4**:969-987.
36. Bement WM, Mooseker MS. TEDS rule: a molecular rationale for differential regulation of myosins by phosphorylation of the heavy chain head. *Cell motility and the cytoskeleton* 1995,**31**:87-92.
37. Sakamoto T, Wang F, Schmitz S, Xu Y, Xu Q, Molloy JE, *et al.* Neck Length and Processivity of Myosin V. *Journal of Biological Chemistry* 2003,**278**:29201-29207.
38. Jung G, Remmert K, Wu X, Volosky JM, Hammer JA. The Dictyostelium CARMIL protein links capping protein and the Arp2/3 complex to type I myosins through their SH3 domains. *The Journal of cell biology* 2001,**153**:1479-1498.
39. López-Ortega O, Ovalle-García E, Ortega-Blake I, Antillón A, Chávez-Munguía B, Patiño-López G, *et al.* Myo1g is an active player in maintaining cell stiffness in B-lymphocytes. *Cytoskeleton* 2016,**73**:258-268.
40. Heim JB, Squirewell EJ, Neu A, Zocher G, Somnidi-Damodaran S, Wyles SP, *et al.* Myosin-1E interacts with FAK proline-rich region 1 to induce fibronectin-type matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2017,**114**:3933-3938.
41. Wes PD, Xu X-ZS, Li H-S, Chien F, Doberstein SK, Montell C. Termination of phototransduction requires binding of the NINAC myosin III and the PDZ protein INAD. *Nature neuroscience* 1999,**2**:447-457.

42. Lapierre LA, Kumar R, Hales CM, Navarre J, Bhartur SG, Burnette JO, *et al.* Myosin vb is associated with plasma membrane recycling systems. *Molecular biology of the cell* 2001,**12**:1843-1857.
43. Buss F, Spudich G, Kendrick-Jones J. Myosin VI: cellular functions and motor properties. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2004,**20**:649-676.
44. Fukuda M, Kuroda TS. Slac2-c (Synaptotagmin-like protein Homologue Lacking C2 domains-c), a novel linker protein that interacts with rab27, myosin Va/VIIa, and actin. *Journal of Biological Chemistry* 2002,**277**:43096-43103.
45. Post PL, Bokoch GM, Mooseker MS. Human myosin-IXb is a mechanochemically active motor and a GAP for rho. *Journal of Cell Science* 1998,**111**:941-950.
46. Delprat B, Michel V, Goodyear R, Yamasaki Y, Michalski N, El-Amraoui A, *et al.* Myosin XVa and whirlin, two deafness gene products required for hair bundle growth, are located at the stereocilia tips and interact directly. *Human molecular genetics* 2004,**14**:401-410.
47. Hartman MA, Spudich JA. The myosin superfamily at a glance. *Journal of Cell Science* 2012,**125**:1627-1632.
48. Mehta AD, Rock RS, Rief M, Spudich JA, Mooseker MS, Cheney RE. Myosin-V is a processive actin-based motor. *Nature* 1999,**400**:590-595.
49. JANMEY PA. The Cytoskeleton and Cell Signaling: Component Localization and Mechanical Coupling. *Physiological Reviews* 1998,**78**:763-781.
50. Syamaladevi DP, Spudich JA, Sowdhamini R. Structural and functional insights on the Myosin superfamily. *Bioinformatics and biology insights* 2012,**6**:11-21.
51. Kolomeisky AB. Motor proteins and molecular motors: how to operate machines at the nanoscale. *Journal of physics. Condensed matter : an Institute of Physics journal* 2013,**25**:463101-463101.

52. Santos-Argumedo L, Maravillas-Montero JL, López-Ortega O. Class I myosins in B-cell physiology: functions in spreading, immune synapses, motility, and vesicular traffic. *Immunological reviews* 2013,**256**:190-202.
53. Tuxworth RI, Titus MA. Unconventional myosins: anchors in the membrane traffic relay. *Traffic* 2000,**1**:11-18.
54. Pollard TD, Korn ED. Acanthamoeba myosin I. Isolation from *Acanthamoeba castellanii* of an enzyme similar to muscle myosin. *Journal of Biological Chemistry* 1973,**248**:4682-4690.
55. Novak KD, Peterson MD, Reedy MC, Titus MA. Dictyostelium myosin I double mutants exhibit conditional defects in pinocytosis. *The Journal of Cell Biology* 1995,**131**:1205-1221.
56. Bose A, Guilherme A, Robida SI, Nicoloso SM, Zhou QL, Jiang ZY, *et al*. Glucose transporter recycling in response to insulin is facilitated by myosin Myo1c. *Nature* 2002,**420**:832-845.
57. Miyata H, Bowers B, Korn ED. Plasma membrane association of *Acanthamoeba* myosin I. *The Journal of cell biology* 1989,**109**:1519-1528.
58. Hokanson DE, Laakso JM, Lin T, Sept D, Ostap EM. Myo1c binds phosphoinositides through a putative pleckstrin homology domain. *Molecular biology of the cell* 2006,**17**:4856-4865.
59. Ouder Kirk JL, Krendel M. Myosin 1e is a component of the invadosome core that contributes to regulation of invadosome dynamics. *Experimental cell research* 2014,**322**:265-276.
60. Lu H, Kennedy GG, Warshaw DM, Trybus KM. Simultaneous observation of tail and head movements of myosin V during processive motion. *The Journal of biological chemistry* 2010,**285**:42068-42074.
61. Kay BK, Williamson MP, Sudol M. The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *The FASEB journal* 2000,**14**:231-241.
62. Kurochkina N, Guha U. SH3 domains: modules of protein-protein interactions. *Biophysical reviews* 2012,**5**:29-39.

63. Lowey S, Saraswat LD, Liu H, Volkmann N, Hanein D. Evidence for an interaction between the SH3 domain and the N-terminal extension of the essential light chain in class II myosins. *Journal of molecular biology* 2007,**371**:902-913.
64. Jung G, Remmert K, Wu X, Volosky JM, Hammer JA, 3rd. The Dictyostelium CARMIL protein links capping protein and the Arp2/3 complex to type I myosins through their SH3 domains. *The Journal of cell biology* 2001,**153**:1479-1497.
65. Heim JB, Squirewell EJ, Neu A, Zocher G, Sominidi-Damodaran S, Wyles SP, *et al.* Myosin-1E interacts with FAK proline-rich region 1 to induce fibronectin-type matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2017,**114**:3933-3938.
66. Mazerik JN, Tyska MJ. Myosin-1A targets to microvilli using multiple membrane binding motifs in the tail homology 1 (TH1) domain. *The Journal of biological chemistry* 2012,**287**:13104-13115.
67. Arif E, Wagner MC, Johnstone DB, Wong HN, George B, Pruthi PA, *et al.* Motor protein Myo1c is a podocyte protein that facilitates the transport of slit diaphragm protein Nep1 to the podocyte membrane. *Molecular and cellular biology* 2011,**31**:2134-2150.
68. Tokuo H, Coluccio LM. Myosin-1c regulates the dynamic stability of E-cadherin-based cell-cell contacts in polarized Madin-Darby canine kidney cells. *Molecular biology of the cell* 2013,**24**:2820-2833.
69. Pyrpassopoulos S, Feeser Elizabeth A, Mazerik Jessica N, Tyska Matthew J, Ostap EM. Membrane-Bound Myo1c Powers Asymmetric Motility of Actin Filaments. *Current Biology* 2012,**22**:1688-1692.
70. Kannan N, Tang VW. Myosin-1c promotes E-cadherin tension and force-dependent recruitment of α -actinin to the epithelial cell junction. *Journal of Cell Science* 2018,**131**:334-350.
71. Chen X-W, Leto D, Chiang S-H, Wang Q, Saltiel AR. Activation of RalA Is Required for Insulin-Stimulated Glut4 Trafficking to the Plasma Membrane

via the Exocyst and the Motor Protein Myo1c. *Developmental Cell* 2007,**13**:391-404.

72. Boguslavsky S, Chiu T, Foley KP, Osorio-Fuentealba C, Antonescu CN, Bayer KU, *et al.* Myo1c binding to submembrane actin mediates insulin-induced tethering of GLUT4 vesicles. *Molecular biology of the cell* 2012,**23**:4065-4078.

73. Almuzzaini B, Sarshad AA, Farrants A-KÖ, Percipalle P. Nuclear myosin 1 contributes to a chromatin landscape compatible with RNA polymerase II transcription activation. *BMC biology* 2015,**13**:35-35.

74. Sun R, Wang Y, Jin M, Chen L, Cao Y, Chen F. Identification and Functional Studies of MYO1H for Mandibular Prognathism. *Journal of dental research* 2018,**97**:1501-1509.

75. Su HC, Jing H, Zhang Q. DOCK8 deficiency. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2011,**1246**:26-33.

76. Zhang Q, Davis JC, Lamborn IT, Freeman AF, Jing H, Favreau AJ, *et al.* Combined immunodeficiency associated with DOCK8 mutations. *New England Journal of Medicine* 2009,**361**:2046-2055.

77. Bai X, Zhang Y, Huang L, Wang J, Li W, Niu L, *et al.* The early activation of memory B cells from Wiskott-Aldrich syndrome patients is suppressed by CD19 downregulation. *Blood* 2016,**128**:1723-1734.

78. Henderson RB, Grys K, Vehlow A, de Bettignies C, Zachacz A, Henley T, *et al.* A novel Rac-dependent checkpoint in B cell development controls entry into the splenic white pulp and cell survival. *Journal of Experimental Medicine* 2010,**207**:837-853.

79. Maravillas-Montero JL, Gillespie PG, Patiño-López G, Shaw S, Santos-Argumedo L. Myosin 1c Participates in B Cell Cytoskeleton Rearrangements, Is Recruited to the Immunologic Synapse, and Contributes to Antigen Presentation. *The Journal of Immunology* 2011,**187**:3053-3063.

80. Olety B, Wälte M, Honnert U, Schillers H, Bähler M. Myosin 1G (Myo1G) is a haematopoietic specific myosin that localises to the plasma membrane and regulates cell elasticity. *FEBS letters* 2010,**584**:493-499.

81. López-Ortega O, Santos-Argumedo L. Myosin 1g Contributes to CD44 Adhesion Protein and Lipid Rafts Recycling and Controls CD44 Capping and Cell Migration in B Lymphocytes. *Frontiers in immunology* 2017,**8**:1731-1731.
82. Gérard A, Patino-Lopez G, Beemiller P, Nambiar R, Ben-Aissa K, Liu Y, *et al.* Detection of rare antigen-presenting cells through T cell-intrinsic meandering motility, mediated by Myo1g. *Cell* 2014,**158**:492-505.
83. Wenzel J, Ouderkirk JL, Krendel M, Lang R. Class I myosin Myo1e regulates TLR4-triggered macrophage spreading, chemokine release, and antigen presentation via MHC class II. *European journal of immunology* 2015,**45**:225-237.
84. Kim SV, Mehal WZ, Dong X, Heinrich V, Pypaert M, Mellman I, *et al.* Modulation of Cell Adhesion and Motility in the Immune System by Myo1f. *Science* 2006,**314**:136-139.
85. Piedra-Quintero ZL, Serrano C, Villegas-Sepúlveda N, Maravillas-Montero JL, Romero-Ramírez S, Shibayama M, *et al.* Myosin 1F Regulates M1-Polarization by Stimulating Intercellular Adhesion in Macrophages. *Frontiers in immunology* 2019,**9**:3118-3118.
86. Stöffler H-E, Ruppert C, Reinhard J, Bähler M. A novel mammalian myosin I from rat with an SH3 domain localizes to Con A-inducible, F-actin-rich structures at cell-cell contacts. *The Journal of Cell Biology* 1995,**129**:819-830.
87. Diakonova M, Bokoch G, Swanson JA. Dynamics of cytoskeletal proteins during Fcγ receptor-mediated phagocytosis in macrophages. *Molecular biology of the cell* 2002,**13**:402-411.
88. Swanson JA, Johnson MT, Beningo K, Post P, Mooseker M, Araki N. A contractile activity that closes phagosomes in macrophages. *Journal of Cell Science* 1999,**112**:307-316.
89. Paul P, van den Hoorn T, Jongsma ML, Bakker MJ, Hengeveld R, Janssen L, *et al.* A Genome-wide multidimensional RNAi screen reveals pathways controlling MHC class II antigen presentation. *Cell* 2011,**145**:268-283.

90. Cheng J, Grassart A, Drubin DG. Myosin 1E coordinates actin assembly and cargo trafficking during clathrin-mediated endocytosis. *Molecular biology of the cell* 2012,**23**:2891-2904.
91. Mele C, Iatropoulos P, Donadelli R, Calabria A, Maranta R, Cassis P, *et al.* MYO1E mutations and childhood familial focal segmental glomerulosclerosis. *The New England journal of medicine* 2011,**365**:295-306.
92. Reiser J, Gupta V, Kistler AD. Toward the development of podocyte-specific drugs. *Kidney international* 2010,**77**:662-668.
93. Mundel P, Reiser J. Proteinuria: an enzymatic disease of the podocyte? *Kidney international* 2010,**77**:571-580.
94. Machuca E, Benoit G, Antignac C. Genetics of nephrotic syndrome: connecting molecular genetics to podocyte physiology. *Human molecular genetics* 2009,**18**:185-194.
95. Mao J, Wang D, Mataleena P, He B, Niu D, Katayama K, *et al.* Myo1e Impairment Results in Actin Reorganization, Podocyte Dysfunction, and Proteinuria in Zebrafish and Cultured Podocytes. *PLOS ONE* 2013,**8**:727-750.
96. Sever S, Altintas MM, Nankoe SR, Möller CC, Ko D, Wei C, *et al.* Proteolytic processing of dynamin by cytoplasmic cathepsin L is a mechanism for proteinuric kidney disease. *The Journal of clinical investigation* 2007,**117**:2095-2104.
97. Jin X, Wang W, Mao J, Shen H, Fu H, Wang X, *et al.* Overexpression of Myo1e in Mouse Podocytes Enhances Cellular Endocytosis, Migration, and Adhesion. *Journal of Cellular Biochemistry* 2014,**115**:410-419.
98. Liang Y, Niederstrasser H, Edwards M, Jackson CE, Cooper JA. Distinct roles for CARMIL isoforms in cell migration. *Molecular biology of the cell* 2009,**20**:5290-5305.
99. Schmid SL. Reciprocal regulation of signaling and endocytosis: Implications for the evolving cancer cell. *The Journal of Cell Biology* 2017,**216**:2623-2632.

100. Krendel M, Osterweil EK, Mooseker MS. Myosin 1E interacts with synaptojanin-1 and dynamin and is involved in endocytosis. *FEBS letters* 2007,**581**:644-650.
101. Hiraiwa T, Yamada TG, Miki N, Funahashi A, Hiroi N. Activation of cell migration via morphological changes in focal adhesions depends on shear stress in MYCN-amplified neuroblastoma cells. *Journal of The Royal Society Interface* 2019,**16**:934-950.
102. Crispin, Martínez, Pablo D, Velasquillo, Alcocer-Varela. Participation of the CD69 Antigen in the T-Cell Activation Process of Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Scandinavian Journal of Immunology* 1998,**48**:196-200.
103. Mebratu Y, Tesfaigzi Y. How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: Is subcellular localization the answer? *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 2009,**8**:1168-1175.
104. Dzwonek J, Wilczynski GM. CD44: molecular interactions, signaling and functions in the nervous system. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 2015,**9**.
105. Aggarwal BB. Tumour necrosis factors receptor associated signalling molecules and their role in activation of apoptosis, JNK and NF- κ B. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2000,**59**:6-16.
106. Tanimura S, Hashizume J, Arichika N, Watanabe K, Ohyama K, Takeda K, *et al.* ERK signaling promotes cell motility by inducing the localization of myosin 1E to lamellipodial tips. *The Journal of cell biology* 2016,**214**:475-489.
107. Yu JSL, Cui W. Proliferation, survival and metabolism: the role of PI3K/AKT/mTOR signalling in pluripotency and cell fate determination. *Development* 2016,**143**:3050-3060.
108. Castellano E, Downward J. RAS Interaction with PI3K: More Than Just Another Effector Pathway. *Genes & cancer* 2011,**2**:261-274.
109. Kallergi G, Agelaki S, Markomanolaki H, Georgoulas V, Stournaras C. Activation of FAK/PI3K/Rac1 Signaling Controls Actin Reorganization and

Inhibits Cell Motility in Human Cancer Cells. *Cellular Physiology and Biochemistry* 2007,**20**:977-986.

110. Lyraki R, Lokaj M, Soares DC, Little A, Vermeren M, Marsh JA, *et al.* Characterization of a novel RP2-OSTF1 interaction and its implication for actin remodelling. *Journal of cell science* 1997,**131**:748-750.

111. Kim S, Flavell R. Myosin I: from yeast to human. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2008,**65**:2128-2137.

112. Chayen A, Parkhouse RME. Preparation and properties of a cytotoxic monoclonal rat anti-mouse Thy-1 antibody. *Journal of Immunological Methods* 1982,**49**:17-23.

113. Cossarizza A, Chang H-D, Radbruch A, Akdis M, Andrä I, Annunziato F, *et al.* Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies. *European Journal of Immunology* 2017,**47**:1584-1797.

114. Gorelik R, Gautreau A. Quantitative and unbiased analysis of directional persistence in cell migration. *Nature Protocols* 2014,**9**:1931-1998.

115. Krendel M, Kim SV, Willinger T, Wang T, Kashgarian M, Flavell RA, *et al.* Disruption of Myosin 1e Promotes Podocyte Injury. *Journal of the American Society of Nephrology* : 2009,**20**:86-94.

116. Betapudi V. Life without double-headed non-muscle myosin II motor proteins. *Frontiers in Chemistry* 2014,**2**, 14-25.

117. Tajsharghi H, Oldfors A. Myosinopathies: pathology and mechanisms. *Acta Neuropathologica* 2013,**125**:3-18.

118. Manor U, Grati Mh, Yengo CM, Kachar B, Gov NS. Competition and compensation: dissecting the biophysical and functional differences between the class 3 myosin paralogs, myosins 3a and 3b. *Bioarchitecture* 2012,**2**:171-174.

119. Fagerholm SC, Hilden TJ, Nurmi SM, Gahmberg CG. Specific integrin α and β chain phosphorylations regulate LFA-1 activation through affinity-dependent and -independent mechanisms. *The Journal of Cell Biology* 2005,**171**:705-715.

120. Katagiri K, Hattori M, Minato N, Irie S-k, Takatsu K, Kinashi T. Rap1 Is a Potent Activation Signal for Leukocyte Function-Associated Antigen 1 Distinct from Protein Kinase C and Phosphatidylinositol-3-OH Kinase. *Molecular and Cellular Biology* 2000,**20**:1956-1969.
121. Bjorklund CC, Baladandayuthapani V, Lin HY, Jones RJ, Kuitse I, Wang H, *et al.* Evidence of a role for CD44 and cell adhesion in mediating resistance to lenalidomide in multiple myeloma: therapeutic implications. *Leukemia* 2014,**28**:373-383.
122. Wang B, Niu D, Lai L, Ren EC. p53 increases MHC class I expression by upregulating the endoplasmic reticulum aminopeptidase ERAP1. *Nature Communications* 2013,**4**:2359-2366.
123. Maravillas-Montero JL, López-Ortega O, Patiño-López G, Santos-Argumedo L. Myosin 1g regulates cytoskeleton plasticity, cell migration, exocytosis, and endocytosis in B lymphocytes. *European Journal of Immunology* 2014,**44**:877-886.
124. Chen B, Chou H-T, Brautigam CA, Xing W, Yang S, Henry L, *et al.* Rac1 GTPase activates the WAVE regulatory complex through two distinct binding sites. *eLife* 2017,**6**:29795-29800.
125. Kwon T, Kwon DY, Chun J, Kim JH, Kang SS. Akt Protein Kinase Inhibits Rac1-GTP Binding through Phosphorylation at Serine 71 of Rac1. *Journal of Biological Chemistry* 2000,**275**:423-428.
126. De Pascalis C, Etienne-Manneville S. Single and collective cell migration: the mechanics of adhesions. *Molecular biology of the cell* 2017,**28**:1833-1846.
127. Muller WA. Mechanisms of leukocyte transendothelial migration. *Annual review of pathology* 2011,**6**:323-344.
128. Sengupta K, Aranda-Espinoza H, Smith L, Janmey P, Hammer D. Spreading of neutrophils: from activation to migration. *Biophysical journal* 2006,**91**:4638-4648.
129. Barczyk M, Carracedo S, Gullberg D. Integrins. *Cell and tissue research* 2010,**339**:269-280.

130. Springer TA, Dustin ML, Kishimoto TK, Marlin SD. The Lymphocyte Function Associated LFA-1, CD2, and LFA-3 Molecules: Cell Adhesion Receptors of the Immune System. *Annual Review of Immunology* 1987,**5**:223-252.
131. Hoogeboom R, Natkanski EM, Nowosad CR, Malinova D, Menon RP, Casal A, *et al.* Myosin IIa Promotes Antibody Responses by Regulating B Cell Activation, Acquisition of Antigen, and Proliferation. *Cell reports* 2018,**23**:2342-2353.
132. Salvermoser M, Pick R, Weckbach LT, Zehrer A, Löhr P, Drechsler M, *et al.* Myosin 1f is specifically required for neutrophil migration in 3D environments during acute inflammation. *Blood* 2018,**131**:1887-1898.
133. Faveeuw C, Di Mauro ME, Price AA, Ager A. Roles of α 4 integrins/VCAM-1 and LFA-1/ICAM-1 in the binding and transendothelial migration of T lymphocytes and T lymphoblasts across high endothelial venules. *International immunology* 2000,**12**:241-251.
134. Lawson C, Schlaepfer DD. Integrin adhesions: who's on first? What's on second? Connections between FAK and talin. *Cell adhesion & migration* 2012,**6**:302-306.
135. Frank PG, Lisanti MP. ICAM-1: role in inflammation and in the regulation of vascular permeability. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 2008,**295**:926-927.
136. Figenschau SL, Knutsen E, Urbarova I, Fenton C, Elston B, Perander M, *et al.* ICAM1 expression is induced by proinflammatory cytokines and associated with TLS formation in aggressive breast cancer subtypes. *Scientific reports* 2018,**8**:11720-11720.
137. Ren G, Zhao X, Zhang L, Zhang J, L'Huillier A, Ling W, *et al.* Inflammatory Cytokine-Induced Intercellular Adhesion Molecule-1 and Vascular Cell Adhesion Molecule-1 in Mesenchymal Stem Cells Are Critical for Immunosuppression. *The Journal of Immunology* 2010,**184**:2321-2328.
138. Li H, Cybulsky MI, Gimbrone MA, Jr., Libby P. Inducible expression of vascular cell adhesion molecule-1 by vascular smooth muscle cells in vitro and

within rabbit atheroma. *The American journal of pathology* 1993,**143**:1551-1559.

139. Nolte MA, Hamann A, Kraal G, Mebius RE. The strict regulation of lymphocyte migration to splenic white pulp does not involve common homing receptors. *Immunology* 2002,**106**:299-307.

140. Ager A. High Endothelial Venules and Other Blood Vessels: Critical Regulators of Lymphoid Organ Development and Function. *Frontiers in immunology* 2017,**8**:45-45.

141. Chung K-J, Mitroulis I, Wiessner JR, Zheng YY, Siegert G, Sperandio M, *et al.* A novel pathway of rapid TLR-triggered activation of integrin-dependent leukocyte adhesion that requires Rap1 GTPase. *Molecular biology of the cell* 2014,**25**:2948-2955.

142. Takabayashi T, Takahashi N, Okamoto M, Yagi H, Sato M, Fujieda S. Lipopolysaccharides increase the amount of CXCR4, and modulate the morphology and invasive activity of oral cancer cells in a CXCL12-dependent manner. *Oral Oncology* 2009,**45**:968-973.

143. Goichberg P, Kalinkovich A, Borodovsky N, Tesio M, Petit I, Nagler A, *et al.* cAMP-induced PKC ζ activation increases functional CXCR4 expression on human CD34 hematopoietic progenitors. *Blood* 2006,**107**:870-879.

144. Hood JD, Cheresch DA. Role of integrins in cell invasion and migration. *Nature Reviews Cancer* 2002,**2**:91-98.

145. Kritikou E. Recycling integrins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2008,**9**:826-833.

146. Zeller KS, Idevall-Hagren O, Stefansson A, Velling T, Jackson SP, Downward J, *et al.* PI3-kinase p110 α mediates β 1 integrin-induced Akt activation and membrane protrusion during cell attachment and initial spreading. *Cellular Signalling* 2010,**22**:1838-1848.

147. Henderson RB, Lim LH, Tessier PA, Gavins FN, Mathies M, Perretti M, *et al.* The use of lymphocyte function-associated antigen (LFA)-1-deficient mice to determine the role of LFA-1, Mac-1, and alpha4 integrin in the inflammatory

response of neutrophils. *The Journal of experimental medicine* 2001,**194**:219-226.

148. Williams KC, Coppolino MG. SNARE-dependent interaction of Src, EGFR and β integrin regulates invadopodia formation and tumor cell invasion. *Journal of Cell Science* 2014,**127**:1712-1725.

149. Frank SPC, Thon K-P, Bischoff SC, Lorentz A. SNAP-23 and syntaxin-3 are required for chemokine release by mature human mast cells. *Molecular Immunology* 2011,**49**:353-358.

150. Ata R, Antonescu CN. Integrins and Cell Metabolism: An Intimate Relationship Impacting Cancer. *International journal of molecular sciences* 2017,**18**:189-198.

151. Hu Y-L, Lu S, Szeto KW, Sun J, Wang Y, Lasheras JC, *et al.* FAK and paxillin dynamics at focal adhesions in the protrusions of migrating cells. *Scientific Reports* 2014,**4**:6024-6029.

152. Qian X, Li G, Vass WC, Papageorge A, Walker RC, Asnaghi L, *et al.* The Tensin-3 protein, including its SH2 domain, is phosphorylated by Src and contributes to tumorigenesis and metastasis. *Cancer cell* 2009,**16**:246-258.

153. Nader GPF, Ezratty EJ, Gundersen GG. FAK, talin and PIPK γ regulate endocytosed integrin activation to polarize focal adhesion assembly. *Nature Cell Biology* 2016,**18**:491-500.

154. Calalb MB, Zhang X, Polte TR, Hanks SK. Focal Adhesion Kinase Tyrosine-861 Is a Major Site of Phosphorylation by Src. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1996,**228**:662-668.

155. Chen H-C, Appeddu PA, Isoda H, Guan J-L. Phosphorylation of Tyrosine 397 in Focal Adhesion Kinase Is Required for Binding Phosphatidylinositol 3-Kinase. *Journal of Biological Chemistry* 1996,**271**:26329-26334.

156. Engl T, Relja B, Marian D, Blumenberg C, Müller I, Beecken W-D, *et al.* CXCR4 chemokine receptor mediates prostate tumor cell adhesion through α 5 and β 3 integrins. *Neoplasia (New York, N. Y.)* 2006,**8**:290-301.

157. Glodek A, Le Y, Dykxhoorn DM, Park S, Mostoslavsky G, Mulligan R, *et al.* Focal adhesion kinase is required for CXCL12-induced chemotactic and pro-adhesive responses in hematopoietic precursor cells. *Leukemia* 2007,**21**:1723-1731.
158. Wakatsuki T, Wysolmerski RB, Elson EL. Mechanics of cell spreading: role of myosin II. *Journal of Cell Science* 2003,**116**:1617-1625.
159. Kim D-H, Wirtz D. Predicting how cells spread and migrate: focal adhesion size does matter. *Cell adhesion & migration* 2013,**7**:293-296.
160. Chang F, Lemmon C, Lietha D, Eck M, Romer L. Tyrosine phosphorylation of Rac1: a role in regulation of cell spreading. *PloS one* 2011,**6**:e28587-e28587.
161. Arthur WT, Quilliam LA, Cooper JA. Rap1 promotes cell spreading by localizing Rac guanine nucleotide exchange factors. *The Journal of Cell Biology* 2004,**167**:111-122.
162. Higuchi M, Onishi K, Kikuchi C, Gotoh Y. Scaffolding function of PAK in the PDK1–Akt pathway. *Nature Cell Biology* 2008,**10**:1356-1366.
163. Niba ETE, Nagaya H, Kanno T, Tsuchiya A, Gotoh A, Tabata C, *et al.* Crosstalk between PI3 Kinase/PDK1/Akt/Rac1 and Ras/Raf/MEK/ERK Pathways Downstream PDGF Receptor. *Cellular Physiology and Biochemistry* 2013,**31**:905-913.
164. Liu Y, Dhall S, Castro A, Chan A, Alamat R, Martins-Green M. Insulin regulates multiple signaling pathways leading to monocyte/macrophage chemotaxis into the wound tissue. *Biology Open* 2018,**7**, 26187-26193.
165. Rong S-B, Hu Y, Enyedy I, Powis G, Meuillet EJ, Wu X, *et al.* Molecular Modeling Studies of the Akt PH Domain and Its Interaction with Phosphoinositides. *Journal of Medicinal Chemistry* 2001,**44**:898-908.
166. Matsuoka T, Yashiro M, Nishioka N, Hirakawa K, Olden K, Roberts JD. PI3K/Akt signalling is required for the attachment and spreading, and growth in vivo of metastatic scirrhous gastric carcinoma. *British Journal Of Cancer* 2012,**106**:1535-1541.

167. Xia H, Nho RS, Kahm J, Kleidon J, Henke CA. Focal Adhesion Kinase Is Upstream of Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt in Regulating Fibroblast Survival in Response to Contraction of Type I Collagen Matrices via a β 1 Integrin Viability Signaling Pathway. *Journal of Biological Chemistry* 2004,**279**:33024-33034.
168. Huang X, Shen Y, Zhang Y, Wei L, Lai Y, Wu J, *et al.* Rac1 mediates laminar shear stress-induced vascular endothelial cell migration. *Cell adhesion & migration* 2013,**7**:462-468.