

La comunicación intercelular en la respuesta inmunitaria



Intercellular communication in the immune response

Francisco Sánchez-Madrid

Catedrático de Inmunología
Servicio de Inmunología, Hospital Universitario de la Princesa,
Universidad Autónoma, Madrid



Editorial
Universidad
Cantabria

**La comunicación intercelular en
la respuesta inmunitaria**



**Intercellular communication in
the immune response**

Colección FLORILOGIO # 100: Lecciones 44



CONSEJO EDITORIAL

Dña. Silvia Tamayo Haya

Presidenta. Secretaria General, Universidad de Cantabria

D. Vitor Abrantes

Facultad de Ingeniería, Universidad de Oporto

D. Ramón Agüero Calvo

ETS de Ingenieros Industriales y de Telecomunicación, Universidad de Cantabria

D. Miguel Ángel Bringas Gutiérrez

Facultad de Ciencias Económicas y Empresariales, Universidad de Cantabria

D. Diego Ferreño Blanco

ETS de Ingenieros de Caminos, Canales y Puertos, Universidad de Cantabria

Dña. Aurora Garrido Martín

Facultad de Filosofía y Letras, Universidad de Cantabria

D. José Manuel Goñi Pérez

Modern Languages Department, Aberystwyth University

D. Carlos Marichal Salinas

Centro de Estudios Históricos, COLMEX

D. Salvador Moncada

Faculty of Biology, Medicine and Health, The University of Manchester

D. Agustín Oterino Durán

Neurología (HUMV), investigador del IDIVAL

D. Luis Quindós Poncela

Radiología y Medicina Física, Universidad de Cantabria

D. Marcelo Norberto Rougier

Historia Económica y Social Argentina, UBA y CONICET (IIEP)

Dña. Claudia Sagastizábal

IMPA (Instituto Nacional de Matemática Pura e Aplicada)

Dña. Belmar Gándara Sancho

Directora, Editorial Universidad de Cantabria

La comunicación intercelular en la respuesta inmunitaria

LECCIÓN DE APERTURA DEL CURSO ACADÉMICO 2024-2025

Francisco Sánchez-Madrid

Catedrático de Inmunología
Servicio de Inmunología, Hospital Universitario de la Princesa,
Universidad Autónoma, Madrid



Editorial
Universidad
Cantabria

Sánchez Madrid, Francisco, 1954-, autor

La comunicación intercelular en la respuesta inmunitaria : lección de apertura del Curso Académico 2024-2025 = Intercellular communication in the immune response : opening lecture, Academic course 2024-2025 / Francisco Sánchez-Madrid. – Santander : Editorial de la Universidad de Cantabria, 2024
55 páginas. – (Florilégio ; 100. Lecciones ; 44)

Texto en español y en inglés.

1. Inmunología. I. Intercellular communication in the immune response.

577.27

THEMA: MJCM

Esta edición es propiedad de la EDITORIAL DE LA UNIVERSIDAD DE CANTABRIA; cualquier forma de reproducción, distribución, traducción, comunicación pública o transformación solo puede ser realizada con la autorización de sus titulares, salvo excepción prevista por la ley. Diríjase a CEDRO (Centro Español de Derechos Reprográficos, www.cedro.org) si necesita fotocopiar o escanear algún fragmento de esta obra.

© Francisco Sánchez-Madrid (UAM)

© Editorial de la Universidad de Cantabria

Edif. Tres Torres. Torre C, planta -1. Santander 39005

Tlfno. +34 942 20 087

ISNI: 0000000506860180

www.editorial.unican.es

DOI: <https://doi.org/10.22429/Euc2024.024>

Hecho en España - *Made in Spain*

Sumario

La comunicación intercelular en la respuesta inmunitaria	9
Conclusiones	27
Referencias	28

Summary

Intercellular communication in the immune response	35
Concluding remarks	52
References	53

La comunicación intercelular en la respuesta inmunitaria

Es para mí un gran honor y privilegio ser distinguido con la invitación del Rector de la Universidad de Cantabria para pronunciar la lección inaugural del próximo curso académico 2024-25. Quiero hacer extensivo mi agradecimiento al Rector y al Consejo de Gobierno de la Universidad por este reconocimiento. Este honor no sólo reconoce los esfuerzos de los profesores e investigadores que trabajan en Biomedicina y Ciencias de la Vida, sino que también celebra las contribuciones de nuestro grupo de investigación universitario en el Hospital Universitario de la Princesa y el Instituto de Investigación Sanitaria Princesa (IIS-Princesa) y la Universidad Autónoma de Madrid.

Desde principios de la década de 1980, he participado en el descubrimiento de los receptores de adhesión y activación de las células inmunitarias. Desentrañar los actores y los mecanismos moleculares implicados en el diálogo entre células inmunitarias, junto con sus consecuencias funcionales y fisiopatológicas, es un empeño científico que puede abarcar toda una vida. Con esta conferencia, me gustaría compartir con ustedes una visión del papel de los recepto-

res de adhesión celular a la hora de guiar la extravasación y migración de las células inmunitarias a los órganos diana, lo cual es crucial para combatir las infecciones y proteger el organismo. Además, presentaré una perspectiva funcional de la sinapsis inmunológica como punto focal para controlar el movimiento de orgánulos y la activación de linfocitos T, y como mecanismo para la transferencia eficiente de información transportada por vesículas extracelulares o exosomas.

El principio del sistema inmunitario: la discriminación entre lo propio y lo ajeno

La función principal del sistema inmunitario es proteger la identidad y mantener la salud de los organismos reconociendo y reaccionando contra agentes extraños (no autoantígenos), activando mecanismos celulares y moleculares contra las amenazas potenciales y distinguiendo al mismo tiempo los autocomponentes. Por lo tanto, el sistema inmunitario puede reconocer los autoelementos, induciendo la tolerancia sin generar respuestas inmunitarias. En esencia, el sistema inmunitario protege al organismo de amenazas tanto internas como externas. En condiciones patológicas, el sistema inmunitario puede reaccionar contra los propios tejidos del organismo, dando lugar a enfermedades autoinmunes y procesos inflamatorios y alérgicos. El concepto de autodiscriminación/no autodiscriminación es crucial para comprender el sistema inmunitario. Así, el sistema inmunitario está constantemente expuesto a una miríada de patógenos y evoluciona reconociendo y aprendiendo a combatir futuros encuentros con estos patógenos.

Existen varios mecanismos de diferenciación que dan lugar a múltiples tipos de glóbulos blancos o leucocitos, como los fagocitos, los linfocitos vírgenes, los de memoria y los efectores. Una propiedad inherente a los leucocitos es su capacidad para migrar, recircular y comunicarse entre sí mediante contactos intercelulares o mediadores solubles, actuando como mensajeros dentro del sistema inmunitario.

Comunicación intercelular durante la adhesión y migración de leucocitos

Los leucocitos son células muy dinámicas capaces de circular, extravasarse y pasar rápidamente de un estado adherente a otro migratorio, patrullando constantemente el organismo. El desarrollo de respuestas inmunitarias implica la migración de leucocitos a través del endotelio desde el torrente sanguíneo hasta los tejidos diana, donde desempeñan su función efectora para eliminar agentes infecciosos. Procesos clave como la migración celular, el inicio y la inducción de la respuesta inmunitaria, las interacciones linfocito T-célula dendrítica (CD) y la actividad citotóxica mediada por linfocitos T son funciones reguladas por moléculas de adhesión celular.

La migración de linfocitos está orquestada por la interacción de receptores de adhesión celular y factores quimiotácticos solubles, principalmente quimiocinas. Estas proteínas regulan diferentes etapas de la extravasación de leucocitos mediante la interacción con receptores expresados en su superficie. El paradigma de los distintos pasos de la cascada de adhesión celular está mediado por varias familias de receptores moleculares, entre los que se incluyen las

selectinas, mucinas, integrinas, inmunoglobulinas (IgSF) y receptores quimioatrayentes. Los pasos iniciales de este proceso se han ilustrado claramente mediante estudios *in vivo* e *in vitro*, que muestran la interacción y migración de los leucocitos a través del endotelio. Se trata de un proceso secuencial que implica el anclaje y el rodamiento de los leucocitos en la pared del vaso sanguíneo, la adhesión firme y el cruce a través de la barrera endotelial (**diapédesis**). La adhesión inicial (fijación) de los leucocitos al endotelio está mediada principalmente por la interacción de las selectinas con sus ligandos. La L-selectina, expresada por la mayoría de los leucocitos, y las selectinas E y P del endotelio activado interactúan con ligandos sialilados expresados por el endotelio (EC) y los leucocitos (LK), respectivamente, y median el rodamiento.

El siguiente paso de la extravasación leucocitaria es la fijación firme (**detención**) de los leucocitos en la superficie del endotelio activado, mediante la interacción de las proteínas endoteliales VCAM-1 e ICAM-1 respectivamente con las integrinas alfa4beta1 (VLA-4) y beta2 (especialmente LFA-1) expresadas en la membrana del leucocito. Las proteínas VCAM-1 e ICAM-1 (miembros del IgSF) se redistribuyen y agrupan en una estructura de acoplamiento endotelial, formada en la superficie apical de las células endoteliales, y se concentran fuertemente alrededor de los leucocitos adheridos durante la interacción endotelio-leucocito.

Una pregunta clave sigue siendo: ¿cuáles son los mecanismos moleculares que controlan la migración transendotelial y el cruce de la barrera endotelial? La estructura de

acoplamiento mencionada es bastante dinámica y tanto los receptores de integrina leucocitaria LFA-1/VLA-4 como sus contrarreceptores endoteliales (ICAM-1/VCAM-1) se congregan y co-localizan cuando el leucocito penetra a través de las uniones célula-célula endoteliales, en el lugar donde se produce la apertura y cierre de la unión CE. Los últimos avances en este campo indican claramente que el LK y el CE se comunican entre sí durante la migración transendotelial (TEM). La mayoría de los componentes moleculares de las uniones interendoteliales interactúan homofilicamente. Por lo tanto, las proteínas de la familia de las moléculas de adhesión de las uniones (JAM) pueden interactuar homofilicamente en las uniones estrechas del CE para regular la permeabilidad paracelular y heterofilicamente con los contrarreceptores de integrina del LK para favorecer la TEM. Durante el modo de transmigración paracelular, la rápida recuperación de las uniones laterales tras el paso del LK sugiere la existencia de un mecanismo de «cremallera», que implica el desplazamiento local y transitorio de complejos moleculares de la zona LK-endotelio. Estudios recientes han propuesto mecanismos alternativos como la migración transcelular, en la que intervienen orgánulos vesículo-vacuolares, caveolina y filamentos intermedios como la vimentina, formando un canal que permite la migración del LK a través de la monocapa celular de la CE. La importancia biológica de estas dos vías, si ambas son necesarias y si están interconectadas, son cuestiones que merecen más investigación. Además, es esencial explorar si los endotelios de diferentes órganos y tejidos utilizan preferentemente una o ambas vías de transmigración.

Cuando los linfocitos extravasan y migran al tejido circundante, desarrollan una morfología polarizada en respuesta a señales activadoras y quimioatrayentes. Esta forma celular asimétrica, muy eficaz para la migración, se mantiene gracias a la persistencia de un gradiente químico. Los linfocitos T que migran a lo largo de un gradiente de quimioatrayentes presentan dos compartimentos celulares distintos. En la parte anterior, en el frente de avance de la célula, es donde se produce la maquinaria de polimerización de β -actina y donde se concentran los receptores de quimioquinas responsables de la detección del gradiente de quimioatrayentes. El segundo compartimento, el urópodo, se encuentra en el extremo posterior y sobresale de la zona de contacto con el sustrato. Las moléculas de adhesión intercelular ICAM-1, -2 y -3, PSGL-1, CD43 y CD44 también se concentran en el urópodo de los linfocitos migratorios. Se ha observado la redistribución de receptores quimioatrayentes en el borde anterior de la célula, así como la activación diferencial de proteínas G asociadas a receptores quimioatrayentes y a la señalización de la familia Rho GTPasa, en el lado de la célula que percibe el estímulo quimioatrayente, teniendo una polarización espacialmente regulada de la transmisión de la señal y de la generación de segundos mensajeros.

Los avances en el conocimiento de los mecanismos moleculares subyacentes a la migración celular y la cascada de extravasación han permitido identificar moléculas diana para terapias antiadhesión contra la inflamación. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales (mAbs) dirigidos contra las cadenas de integrinas $\alpha 4$ y αL han demostrado claros efectos beneficiosos en diferentes modelos animales

de trastornos autoinmunes e inflamatorios, así como en enfermedades humanas como la esclerosis múltiple, la enfermedad inflamatoria intestinal y la psoriasis. Se obtuvieron resultados similares en modelos animales con diferentes bloqueantes sintéticos de VLA-4. Los prometedores resultados obtenidos en estos estudios con animales impulsaron a distintos grupos y desarrolladores de fármacos a pasar a los ensayos clínicos. En este sentido, un mAb humanizado anti-VLA-4 ha mostrado un claro efecto terapéutico en la esclerosis múltiple remitente-recurrente y la enfermedad de Crohn. Otros usos potenciales de los mAb terapéuticos son las afecciones inflamatorias y/o autoinmunitarias de gran impacto en la población general, como la artritis reumatoide, el asma o la diabetes mellitus de tipo I.

Los mAbs anti-LFA-1 también han mostrado un efecto notable en diferentes modelos animales de enfermedades inflamatorias, como el rechazo de aloinjertos renales, el asma y la enfermedad de injerto contra huésped. Estos anticuerpos también han demostrado un importante potencial terapéutico en humanos. Por ejemplo, un mAb humanizado anti-alfaL fue aprobado para el tratamiento de formas moderadas a graves de psoriasis, pero su administración a pacientes se interrumpió debido a su fuerte efecto inmunosupresor. Se ha supuesto ampliamente que el efecto terapéutico de estos anticuerpos se debe principalmente al bloqueo de la adhesión de los leucocitos al endotelio, inhibiendo su extravasación y la respuesta inflamatoria. Sin embargo, es evidente que la integrina LFA-1 desempeña otras funciones cruciales en otros fenómenos inmunitarios, como la formación de la sinapsis inmunitaria. La administración a largo plazo de este tipo de agentes terapéuticos puede

tener consecuencias inesperadas e incluso potencialmente indeseadas. Por lo tanto, es esencial tener en cuenta toda la información derivada tanto de la investigación básica como de los estudios preclínicos para orientar adecuadamente los futuros ensayos clínicos con estos agentes biológicos.

Interacciones inmunitarias célula-célula impulsadas por antígenos: La sinapsis Inmunitaria

Una vez reclutados en el tejido u órgano específico, los diferentes tipos de leucocitos deben cumplir sus tareas específicas. Para que funcionen correctamente, la mayoría de las actividades inmunitarias implican contactos e interacciones íntimos entre diferentes tipos de leucocitos, como las células T-células presentadoras de antígeno (APC).

Cuando el antígeno entra en contacto con el receptor de células T (TCR), se forma en la interfase célula T-APC una estructura especializada de unión célula-célula con una compleja organización de moléculas, denominada sinapsis inmunitaria. La sinapsis célula-célula es una forma muy evolucionada de comunicación entre células. Las moléculas de adhesión, coestimuladoras, citoesqueléticas y de señalización se organizan en grupos de activación supramolecular (SMAC), que comprenden un SMAC central (cSMAC), que incluye TCR, CD3 y quinasas asociadas (PKC, Lck y Fyn), y un SMAC periférico (pSMAC). Las moléculas de adhesión, como las integrinas LFA-1 y VLA-4, se localizan en el pSMAC o anillo periférico, que rodea a los receptores de reconocimiento de antígenos cSMAC-CD3/TCR, proporcionando una plataforma física estable que permite una interacción productiva sostenida y la señalización a través

del TCR. VLA-4 y LFA-1 activados se localizan en la Sinapsis Inmunitaria (SI) sólo en presencia de estimulación antigénica.

La formación de la SI comprende varios pasos: 1) Las interacciones adhesivas de baja afinidad facilitan la exploración de la superficie de la APC por parte de las células T; 2) Comienzan a reclutarse elementos sinápticos en la zona de contacto T-APC, y se organizan los dos SMAC (C y P); 3) Por último, la activación de las células T dependiente de antígeno promueve la translocación del centro organizador de microtúbulos (MTOC) y el aparato de Golgi asociado al lugar de contacto con la APC.

La formación de SI está estrechamente regulada por la inter-relación de los citoesqueletos de actina y tubulina. La dinámica de la actina es crítica para la segregación de los receptores y su localización en el C- o P-SMAC. El flujo retrógrado de actina domina la formación del pSMAC y el control y localización de los receptores de tipo integrina y moléculas asociadas en el pSMAC.

Partiendo de esta base, me centraré en nuestros estudios más recientes sobre la SI. Presentaré el papel de la translocación MTOC/centrosoma que orquesta el tráfico de MT, orgánulos y nanovesículas en la SI, y hablaré de: 1) la transferencia de información genética, en particular miARN y mitADN, a través de la sinapsis inmunitaria impulsada por vesículas extracelulares (VE); 2) los papeles funcionales de esta transferencia durante la colaboración entre células T-B y la comunicación T-CD, y su impacto en el destino de las CD; y 3) la reprogramación epigenética de las CD en su diálogo con linfocitos T controlado por antígenos.

Translocación del centrosoma/MTOC y secreción polarizada en la sinapsis inmunitaria

La activación de la célula T dependiente de antígeno implica la translocación del centro organizador de microtúbulos (MTOC)/centrosoma al lugar de contacto con la APC. La red de microtúbulos se organiza desde el centrosoma polarizado bajo la membrana plasmática en la célula T, formando una estructura tipo paraguas que permite la reorganización de diferentes orgánulos en la SI.

Hemos obtenido la imagen 3D de una SI, mediante el uso de cryoSXT, utilizando radiación de sincrotrón para la observación tridimensional de la SI con mayor resolución mediante tomografía de rayos X. El tipo de información obtenida, tras la alineación de los stacks, la deconvolución y segmentación de las imágenes, y su reconstrucción 3D nos permitió observar la localización relativa de los orgánulos, proporcionando así una evaluación a escala nanométrica de las regiones subcelulares. La resolución obtenida con esta técnica permitió el cálculo de diferentes parámetros relativos a la orientación de los centriolos en el interior del centrosoma, y del propio centrosoma con respecto a la sinapsis inmune. El centrosoma en reposo cambia su orientación con la activación celular para reubicarse en un plano paralelo a la sinapsis inmune. Esta orientación sirve a la célula T para polarizar la polimerización de los microtúbulos hacia la sinapsis inmunitaria.

También hemos analizado los cambios en células T CD4 primarias humanas durante la formación de la SI mediante esta técnica de tomografía de rayos X y hemos descubierto que las células reorganizan sus orgánulos al-

rededor del centrosoma. El centrosoma aparece cerca de la zona de la sinapsis inmunitaria, rodeado por el resto de orgánulos, incluidas las vesículas secretoras. Las nanovesículas de señalización y las mitocondrias se desplazan hacia la sinapsis inmunitaria de forma coordinada y se reorganizan alrededor del centrosoma. El aparato secretor se asocia al centrosoma, lo que favorece la secreción polarizada en la SI.

Transferencia de exosomas/vesículas extracelulares en la sinapsis inmunitaria

Los exosomas son pequeñas vesículas de 50-100 nm de tamaño que son secretadas al medio extracelular por la mayoría de los tipos celulares. Los exosomas se originan en compartimentos endosómicos específicos denominados cuerpos multivesiculares (MVB), que son endosomas tardíos que contienen múltiples vesículas intraluminales (ILV). Cuando los MVB se fusionan con la membrana plasmática, las ILV se liberan en forma de exosomas.

Los exosomas (VE) procedentes de distintos tipos celulares muestran un enriquecimiento en un conjunto compartido de proteínas específicas, como tetraspaninas (CD63, CD81), moléculas de adhesión, proteínas endosómicas (Tsg101, Alix) y proteínas de choque térmico (hsp90, hsp70), entre otras. También están enriquecidas en ARN, incluidos miARN y otros ARN no codificantes.

Una vez liberados, los exosomas pueden adherirse a la superficie de las células receptoras e inducir respuestas específicas. Además, pueden ser internalizados por las células receptoras y liberar su contenido en ellas. Así pues, los exosomas actúan como mediadores de la comunicación célula-

célula en muchos contextos diferentes, por ejemplo, entre células neuronales y glía, o endotelio y músculo liso, en el desarrollo fetal y en la coagulación.

La composición de los exosomas no es una mera copia del contenido citosólico, sino que proteínas y ácidos nucleicos específicos se clasifican selectivamente en los exosomas. En los últimos años, nos hemos centrado en el estudio de las modificaciones postraduccionales que controlan la clasificación molecular de los exosomas, con especial interés en los mecanismos de regulación de la localización selectiva de los miARN. Hemos observado que ciertas poblaciones de miRNAs se enriquecen en las VE en comparación con las células progenitoras, lo que apunta a un mecanismo de clasificación activo a nivel del ARN. Además, identificamos un enriquecimiento de ARN que contiene motivos nucleotídicos específicos (EXOmotifs), el tetra bucle GGAG, en los miARN de las VE. Nuestros datos indican que los EXOmotifs presentes en miRNAs maduros determinan su clasificación en EVs, a través de la unión del EXO-motif a la proteína sumoilada hnRNPA2B1.

Transferencia de miARN exosómico en la SI

Las consecuencias de la presentación de antígenos durante la SI en las células T se han estudiado ampliamente, mientras que el destino de las células dendríticas (CD) después de las sinapsis inmunes productivas (CD postsinápticas, psCD) se ha relegado en gran medida. Estudios anteriores de nuestro grupo describieron que la información transportada por EVs que contienen miRNAs viaja desde la célula T hasta las APCs. Me referiré brevemente a

nuestro trabajo, que muestra varias pruebas experimentales que apoyan el papel de la SI como dispositivo para la transferencia eficiente de información genética de miARNs y de constituyentes mitocondriales, con una relevancia funcional significativa.

Una de las cuestiones que abordamos fue si las VE de origen endosomal pueden transferirse de T a APC durante la SI. Observamos que los MVB en el linfocito T se congregan cerca de la SI en los primeros 10 minutos. Nuestro primer estudio demostró que había una transferencia unidireccional de proteínas y microARN transportados por exosomas desde las células T a las APC. Además, los miARN transportados a través de la SI pueden tener un papel funcional en la célula receptora, ya que los miARN derivados de células T regulan dianas específicas en las APC.

A continuación, evaluamos el repertorio de miARN endógenos transferidos durante la colaboración de células T y B primarias en la SI. Para determinar los microARN específicos transferidos de las células T CD4⁺ a las células B durante la SI, utilizamos células receptoras de ratones CD19-condicionales deficientes en DICER (DICER KO) que prácticamente no contienen microARN maduros endógenos, lo que permite discriminar los microARN transferidos exógenamente tras la formación de la SI.

Además, se ha descubierto un nuevo mecanismo de regulación de la respuesta de las células B que implica la transferencia direccional de un conjunto sorprendentemente restringido de miARNs exosómicos de células T (mmu-miR-20a-5p, mmu-miR-25-3p y mmu-miR-155-3p) durante la sinapsis de células T y B. Estos miARNs

exosomales modulan dianas clave de ARNm en células B –incluyendo BIM y PTEN– y promueven la regulación del centro germinal (CG), incluyendo la recombinación por cambio de clase (CSR), y la proliferación y supervivencia de células B.

Transferencia de ADN mitocondrial durante los contactos sinápticos y su relevancia funcional

Las mitocondrias se reubican específicamente hacia la SI (p-SMAC) para fomentar la contracción de actomiosina y la arquitectura y maduración de la SI. Esta observación nos llevó a preguntarnos si las mitocondrias o cualquier producto relacionado podrían transferirse durante la formación de la SI. Nuestro objetivo era determinar si los exosomas podían contener algún material mitocondrial y si la sinapsis inmunitaria podía actuar como una plataforma eficiente que facilitara el paso de información genética.

El análisis proteómico de exosomas derivados de células T activadas reveló la presencia de proteínas asociadas al ADN mitocondrial (ADNmt) que cofraccionaron con marcadores de exosomas como CD81. En conjunto, estos hallazgos sugieren que los exosomas contienen proteínas de unión al ADNmt. Para evaluar con más detalle la presencia de ADNmt en los exosomas, el análisis de secuenciación profunda del ADN de las VE secretadas por linfoblastos T primarios identificó varias lecturas que abarcaban todo el genoma mitocondrial. La amplificación por PCR de varias regiones del genoma mitocondrial en muestras de exosomas de linfoblastos T primarios humanos confirmó los resultados de la secuenciación. Además, evaluamos si los

componentes mitocondriales podían transferirse durante la formación de la SI utilizando células T J77 transfectadas con marcadores mitocondriales y conjugadas con células APC Raji cargadas con súper antígeno E. El análisis por citometría de flujo de las APC receptoras reveló que los componentes mitocondriales se transferían durante la formación de la SI. Además, también detectamos ADNmt derivado de las células CD4+T sólo en presencia de estimulación antigénica en las células dendríticas receptoras. Estos datos revelan que el ADNmt puede transferirse de las células T a las CD de forma dependiente del antígeno.

Como resultado de estas investigaciones, postulamos que la transferencia horizontal de contenido mitocondrial y ADNmt durante los contactos sinápticos puede representar un modo de transmisión de célula a célula de mensajes asociados al peligro. Hemos caracterizado los cambios en el perfil genético de las CD tras la incubación con exosomas de células T mediante un análisis de secuenciación profunda de ARN. El perfil de expresión génica identificó más de 1600 genes significativamente alterados en las CD receptoras expuestas a exosomas de células T. El análisis de los genes que cambiaron su perfil de expresión en respuesta a los exosomas de células T indicó que estaban implicados principalmente en la señalización del IFN, la detección de ADN y ARN exógenos y el reconocimiento de bacterias y virus. Así pues, los exosomas regulaban la expresión de un importante conjunto de genes implicados en las respuestas al interferón (IFN) de tipo I y en la actividad antiviral, incluidos los genes estimulados por IFN (ISG). La preincubación de las CD con exosomas de células T redujo la

infección viral, medida por el número de CD positivas al virus vaccinia.

Por lo tanto, la transferencia de ADNmt entre células inmunitarias constituye un mecanismo dependiente de señales para alertar las respuestas de las células inmunitarias innatas.

Reprogramación de células dendríticas mediante contactos sinápticos

A continuación, exploramos las consecuencias de cómo la SI educa a las CD postsinápticas (psCD) para prepararlas para combatir posteriores desafíos patógenos. Estudiamos este proceso utilizando el modelo de ratón específico de antígeno OTII, en el que los CD4⁺ reconocen un fragmento específico de la ovoalbúmina de pollo. Aislamos CD después de una sinapsis productiva (CD postsinápticas; psCD) y realizamos análisis de RNA-Seq, epigenómicos y proteómicos, en comparación con las no-sinápticas (nsCD). Identificamos un conjunto de genes expresados diferencialmente entre nsCD y psCD. Estos genes estaban implicados en diversas funciones, como la respuesta a virus, la respuesta inflamatoria y otras. Los ensayos de validación mediante qPCR mostraron que genes como *ccr7* e *Isg15* se expresaban en alto grado sólo después de una sinapsis inmunitaria productiva. Otros genes incluyen *cd40* y una serie de genes antivirales como *ifit1* y *cxcl10*.

Basándonos en estas observaciones, postulamos que la interacción afin específica de Ag de las CD con las células T CD4 modifica el estado transcripcional y epigenético de las CD, preparándolas para responder a posteriores de-

safios de patógenos microbianos y virus. La accesibilidad de la cromatina de las psCD se evaluó mediante ATAC-Seq. Además, verificamos que algunos productos génicos regulados al alza, como Cd40, CCR7 y Fscn1 también presentaban una mayor accesibilidad a la cromatina en las psCDs. La qPCR de las regiones abiertas mostró que los picos asociados a CCR7 o Cd40 estaban enriquecidos en las psCDs en este ensayo, confirmando la correlación entre los datos transcriptómicos y epigenéticos. Estos cambios en la accesibilidad del ADN y en las marcas epigenéticas de las psCDs reflejan una reprogramación dependientes del contacto.

A continuación, abordamos la capacidad migratoria de las psCD, ya que presentan mayores niveles de CCR7. Así pues, para estudiar las propiedades migratorias de las psCD realizamos experimentos de quimiotaxis hacia el ligando de CCR7, la quimioquina CCL19. Descubrimos que las psCD migraban más rápida y direccionalmente hacia CCL19 en ensayos bajo agarosa. Se observó un aumento de las psCD hacia el ganglio linfático de drenaje (poplíteo), de acuerdo con una mayor migración dependiente de CCR7.

Al recibir ayuda de células T CD4+, las CD postsinápticas (psCD) se licencian y generan y potencian sus capacidades de presentación antigénica cruzada a células T CD8+, produciendo respuestas en términos de activación y proliferación celular. Sin embargo, se desconocían los mecanismos celulares y moleculares que permiten la licencia de las psCD. Un ensayo no sesgado de espectrometría de masas en psCD frente a nsCD estimuladas *in vitro*, reveló que la educación sináptica durante la presentación del antígeno

inducía una regulación al alza de moléculas presentadoras de antígeno MHC-I y un aumento de la peroxidación lipídica en psCDs *in vitro* e *in vivo*. Demostramos que estos eventos eran esenciales para el licenciamiento de CD y la presentación cruzada para activar linfocitos T CD8. En particular, la prevención de la peroxidación lipídica con α -tocoferol anuló la presentación cruzada por psCDs. Por lo tanto, la SI induce la regulación al alza de las vías implicadas en la presentación cruzada de antígenos, incluidas las moléculas MHC de clase I. Así pues, las psCD muestran una mayor capacidad de presentación cruzada de OVA soluble a células T CD8+ *in vitro*, en un proceso que implica la peroxidación lipídica.

El mayor estatus antipatogénico de las psCD revelado por nuestros datos transcriptómicos nos llevó a investigar el uso de estas psCD como terapia preventiva no específica frente a la infección. Por lo tanto, probamos el efecto protector de las psCD en un modelo de bacterias intracelulares –*Listeria monocytogenes*–, y un virus –*Gripe A*–. Curiosamente, la inyección de psCDs confirió protección a ratones tratados con cualquiera de los patógenos, aumentando significativamente las tasas de supervivencia. La transferencia adoptiva de psCD protegió a los ratones de la infección por *Listeria monocytogenes* e Influenza A mediante un mecanismo dependiente de las células T CD8+ y las moléculas MHC-I de las psCD. En conjunto, estos estudios apoyan un novedoso mecanismo fisiológico para la transferencia horizontal de material genético, componentes mitocondriales, miRNAs y transferencia de genoma en el contexto de interacciones inmunocognitivas.

Conclusiones

Nuestros estudios han arrojado luz sobre los intrincados mecanismos de la comunicación intercelular durante la adhesión y migración de leucocitos, las interacciones impulsadas por antígenos dentro de las SI y la transferencia de miARNs exosomales y ADN mitocondrial durante los contactos sinápticos. Estos hallazgos subrayan la relevancia funcional de la reprogramación molecular de las células dendríticas a través de contactos sinápticos, destacando la naturaleza dinámica y multifacética de la comunicación entre células inmunitarias. En conjunto, estos conocimientos allanan el camino para nuevas estrategias terapéuticas dirigidas a las interacciones de las células inmunitarias y su carga molecular para mejorar la protección y la modulación inmunitarias. Los datos aquí expuestos apoyan la idea de que la investigación continuada en universidades y hospitales es crucial para seguir desentrañando estos complejos procesos y traducir estos descubrimientos en aplicaciones clínicas, subrayando la relevancia de las contribuciones académicas al avance de la ciencia médica y la mejora de la salud pública.

Referencias

- BARREIRO O., DE LA FUENTE H., MITTELBRUNN M., SÁNCHEZ-MADRID F., 2007. Functional insights on the polarized redistribution of leukocyte integrins and their ligands during leukocyte migration and immune interactions. *Immunol Rev.* 218: 147-64.
- CALZADA-FRAILE D., SÁNCHEZ-MADRID F., 2023. Reprogramming dendritic cells through the immunological synapse: A two-way street. *Eur J Immunol.* 53(11): e2350393.
- FOOKSMAN D.R., VARDHANA S., VASILIVER-SHAMIS G., LIESE J., Blair D.A., Waite J., SACRISTÁN C., VICTORA G.D., ZANNIN-ZHOROV A., DUSTIN M.L., 2010. Functional anatomy of T cell activation and synapse formation. *Annu Rev Immunol.* 28: 79-105.
- GONZÁLEZ-AMARO R., MITTELBRUNN M., SÁNCHEZ-MADRID F., 2005. Therapeutic anti-integrin ($\alpha 4$ and αL) monoclonal antibodies: two-edged swords? *Immunology.* 116(3): 289-96.
- GUTIÉRREZ-VÁZQUEZ C., VILLARROYA-BELTRI C., MITTELBRUNN M., SÁNCHEZ-MADRID F., 2013. Transfer of extracellular vesicles during immune cell-cell interactions. *Immunol Rev.* 251(1): 125-42.
- HUSE M., QUANN E.J., DAVIS M.M., 2008. Shouts, whispers and the kiss of death: directional secretion in T cells. *Nat Immunol.* 9(10): 1105-11.
- LEY K., LAUDANNA C., CYBULSKY M.I., NOURSHARGH S., 2007. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol.* 7: 678-89.

- MARTÍN-CÓFRECES N.B., BAIXAULI F., SÁNCHEZ-MADRID F., 2014. Immune synapse: conductor of orchestrated organelle movement. *Trends Cell Biol.* 24(1): 61-72.
- MARTIN-COFRECES N.B., VALPUESTA J.M., SÁNCHEZ-MADRID F., 2021. T cell asymmetry and metabolic crosstalk can fine-tune immunological synapses. *Trends Immunol.* 42(8): 649-653.
- MITTELBRUNN M., VICENTE MANZANARES M., SÁNCHEZ-MADRID F., 2015. Organizing polarized delivery of exosomes at synapses. *Traffic.* 16(4): 327-337
- MITTELBRUNN M., SÁNCHEZ-MADRID F., 2012. Intercellular communication: diverse structures for exchange of genetic information. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 13(5): 328-35.
- MONTOYA M.C., SANCHO D., VICENTE-MANZANARES M., SÁNCHEZ-MADRID F., 2002. Cell adhesion and polarity during immune interactions. *Immunol Rev.* 186: 68-82.
- NOURSHARGH S., HORDIJK P.L., SIXT M., 2010. Breaching multiple barriers: leukocyte motility through venular walls and the interstitium. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11: 366-78
- NOURSHARGH S., ALON R., 2014. Leukocyte migration into inflamed tissues. *Immunity.* 41(5): 694-70.
- SÁNCHEZ-MADRID F., DEL POZO M.A., 1999. Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. *EMBO J.* 18(3): 501-11.
- SÁNCHEZ-MADRID F., SERRADOR J.M., 2009. Bringing up the rear: defining the roles of the uropod. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10(5): 353-9.

- VICENTE-MANZANARES M., SÁNCHEZ-MADRID F., 2004. Role of the cytoskeleton during leukocyte responses. *Nat Rev Immunol.* Feb;4(2): 110-22.
- VICENTE-MANZANARES M., SÁNCHEZ-MADRID F., 2018. Getting the integrin interactome in human disease. *Curr Opin Cell Biol.* 55: 17-23.
- VILLARROYA-BELTRI C., BAIXAULI F., GUTIÉRREZ-VÁZQUEZ C., SÁNCHEZ-MADRID F., MITTELBRUNN M., 2014. Sorting it out: regulation of exosome loading. *Semin Cancer Biol.* 28: 3-13.
- VON ANDRIAN U.H., MACKAY C.R., 2000. T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *N Engl J Med.* 343(14): 1020-34.
- WEBER C., FRAEMOHS L., DEJANA E., 2007. The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation. *Nat Rev Immunol.* 7(6): 467-77.

Intercellular communication in the immune response

OPENING LECTURE, ACADEMIC COURSE 2024-2025

Francisco Sánchez-Madrid

Immunology Service, Hospital Universitario de la Princesa,
Universidad Autónoma, Madrid

Intercellular communication in the immune response

It is my great honor and privilege to be distinguished with the invitation from The Rector of Universidad de Cantabria to deliver the inaugural lecture for the upcoming academic course 2024-25. I would like to extend my gratitude to the Rector and the University Government Council for this recognition. This honor not only acknowledges the efforts of professors and researchers working in Biomedicine and Lifesciences but also celebrates the contributions of our university research group at Hospital Universitario de la Princesa & Instituto de Investigación Sanitaria Princesa (IIS-Princesa) and Universidad Autónoma at Madrid.

Since the early 1980s, I have been involved in the discovery of adhesion and activation receptors of immune cells. Unraveling the players and molecular mechanisms implicated in the dialog between immune cells, along with their functional and pathophysiologic consequences is a scientific endeavor that can span an entire lifetime. With this lecture, I would like to share with you an insight into the role of cell adhesion receptors in guiding the extravasation and migration of immune cells to target organs, which is cru-

cial for combating infections and protecting the organism. Additionally, I will present a functional perspective on the immunological synapse as a focal point to control organelles motion and T cell activation, and as a mechanism for the efficient transfer of information carried by extracellular vesicles or exosomes.

The immune system principle: the self/non-self-discrimination

The primary function of the immune system is to protect the identity and maintain the health of organisms by recognizing and reacting against foreign agents (non-self-antigens), activating cellular and molecular mechanisms against potential threats while distinguishing self-components. Hence, the immune system can recognize self-elements, inducing the tolerance without generating immune responses. In essence, the immune system safeguards the organism from both internal and external threats. In pathologic conditions, the immune system can react against the body's own tissues, leading to autoimmune diseases, inflammatory and allergic processes. The concept of self/non-self-discrimination is crucial for understanding the immune system. Thus, the immune system is constantly exposed to a myriad of pathogens and evolves by recognizing and learning to combat future encounters with these pathogens.

There are several differentiation mechanisms that give rise to multiple types of white blood cells or leukocytes, such as phagocytes, naive, memory and effector lymphocytes. An inherent property of leukocytes is their ability to migrate, recirculate, and communicate with each other

through intercellular contacts or soluble mediators, acting as messengers within the immune system.

Intercellular communication during adhesion and migration of leukocytes

Leukocytes are highly dynamic cells capable of circulating, extravasating and transitioning swiftly between adherent and migrating states, constantly patrolling the body. The development of immune responses involves the migration of leukocytes across endothelium from the bloodstream to target tissues, where they perform their effector function to eliminate infectious agents. Key processes such as cell migration, initiation and induction of the immune response, T lymphocyte-Dendritic Cell (DC) interactions, and T lymphocyte-mediated killing activity are functions regulated by cell adhesion molecules.

Lymphocyte migration is orchestrated by the interplay of cell-adhesion receptors and soluble chemotactic factors, mainly chemokines. These proteins regulate different stages of leukocyte extravasation by interacting with receptors expressed on their surface. The paradigm of the different steps of the cascade of cell adhesion is mediated by several families of molecular receptors, including selectins, mucins, integrins, immunoglobulins (IgSF), and chemoattractant receptors. The initial steps of this process have been clearly illustrated through *in vivo* and *in vitro* studies, showing the interaction and migration of leukocytes across endothelium. This is a sequential process that involves tethering and rolling of leukocytes on the blood vessel wall, firm adhesion, and crossing through the endothelial barrier (**diapedesis**).

Initial attachment (tethering) of leukocytes to endothelium is mainly mediated by the interaction of selectins with their ligands. L-selectin, expressed by most leukocytes, and E- and P-selectins on activated endothelium interact with sialylated ligands expressed by endothelium (EC), and leukocytes (LK), respectively, and mediates rolling.

The next step of leukocyte extravasation is the firm attachment (**arrest**) of leukocytes on the surface of activated endothelium, through the interaction of endothelial VCAM-1 and ICAM-1 respectively with alpha4beta1 (VLA-4) and beta2 integrins (specially LFA-1) expressed on the membrane of the leukocyte. Both VCAM-1 and ICAM-1 proteins (IgSF members) are redistributed and clustered at an endothelial docking structure, formed at the apical surface on endothelial cells, and it was strongly concentrated around attached leukocytes during endothelium-leukocyte interaction.

A key question remains: what are the molecular mechanisms that control transendothelial migration and the crossing of the endothelial barrier? The mentioned docking structure is quite dynamic and both the leukocyte integrin receptors LFA-1/VLA-4 and their endothelial counter-receptors (ICAM-1/VCAM-1) co-localize when the leukocyte penetrates through the endothelial cell-to-cell junctions, at the site where the opening and closure of the EC junction takes place. Recent progress in this area strongly indicates that LK and EC communicate with each other during transendothelial migration (TEM). Most of the molecular components of interendothelial junctions interact homophilically. Hence, Junctional Adhesion Mo-

lecule (JAM) family proteins can interact homophilically at EC tight junctions to regulate paracellular permeability and heterophilically with integrin counter-receptors from LK to support TEM. During paracellular transmigration mode, the rapid recovery of lateral junctions after LK passage suggests the existence of a «zipper» mechanism, which involves the local and transient displacement of molecular complexes from LK-endothelium area. Recent studies have proposed alternative mechanisms such as transcellular migration, which involves vesiculo-vacuolar organelles, caveolin and intermediate filaments like vimentin, forming a channel that allows LK migration through EC cell monolayer. The biological significance of these two pathways, whether both are necessary, and if they are interconnected, are questions that warrant further research. Additionally, it is essential to explore whether endothelia from different organs and tissues preferentially utilize one or both transmigration pathways.

When lymphocytes extravasate and migrate to the surrounding tissue, they develop a polarized morphology in response to activator and chemoattractant signals. This asymmetric cell shape, which is highly effective for migration, is maintained by the persistence of a chemical gradient. T lymphocytes migrating along a chemoattractant gradient exhibit two distinct cell compartments. The leading edge, located at the cell's advancing front, is where β -actin polymerization machinery occurs and where the chemokine receptors responsible for detection of the chemoattractant gradient are concentrated. The second compartment, the uropod, is at the trailing edge and protrudes from the contact area with the substratum. The intercellular adhe-

sion molecules ICAM-1, -2 and -3, PSGL-1, CD43 and CD44 are also concentrated in the uropod of migrating lymphocytes. Chemoattractant receptor redistribution at the cell leading edge as well as the differential activation of G proteins associated to chemoattractant receptors and Rho GTPase family signaling, has been observed on the cell side that senses the chemoattractant stimulus, having a spatially regulated polarization of the signal transmission and second messenger generation.

Advances in our understanding of the molecular mechanisms underlying cell migration and extravasation cascade have identified target molecules for anti-adhesion therapies for inflammation. For instance, monoclonal antibodies (mAbs) targeting the α_4 and α_L integrin chains have demonstrated clear beneficial effects in different animal models of autoimmune and inflammatory disorders, as well as in human diseases including multiple sclerosis, inflammatory bowel disease, and psoriasis. Similar results were obtained in animal models with different synthetic blockers of VLA-4. The promising results obtained in these animal studies prompted to different groups and drug developers to move into clinical trials. In this regard, a humanized anti-VLA-4 mAb has showed a clear-cut therapeutic effect in relapsing-remitting multiple sclerosis and Crohn's disease. Other potential uses of therapeutic mAbs include inflammatory and/or autoimmune conditions with a high impact in general population, including rheumatoid arthritis, asthma, type I diabetes mellitus.

Anti-LFA-1 mAbs have also shown a remarkable effect in different animal models of inflammatory diseases, including kidney allograft rejection, asthma, and graft-versus-host

disease. These antibodies have also demonstrated significant therapeutic potential in humans. For example, a humanized anti- α L mAb was approved for the therapy of moderate-to-severe forms of psoriasis, but its administration to patients was discontinued due to its strong immune-suppressive effect. It has been widely assumed that the therapeutic effect of these antibodies is primarily due to the blockade of leukocyte adhesion to endothelium, inhibiting their extravasation and the inflammatory response. However, it is evident that LFA-1 integrin plays additional crucial roles in other immune phenomena, including the formation of the immune synapse. Long-term administration of this type of therapeutic agents may have unexpected and even potentially undesirable consequences. Therefore, it is essential to consider all the information derived from both basic research and pre-clinical studies to properly guide the future clinical trials with these biological agents.

Antigen-driven immune cell-to-cell interactions: The Immunological Synapse

Once recruited to the tissue or specific organ, the different types of leukocytes must accomplish their specific tasks. For a proper function, most of immune activities involve intimate contacts and interactions among different types of leukocytes, such as T cell-Antigen Presenting Cells (APC).

Upon T Cell Receptor (TCR)-antigen engagement, a specialized cell-cell junctional structure with a complex organization of molecules is formed at the T-cell-APC interface, termed the immunological synapse. Cell-cell synapses

are a highly evolved way of communication between cells. Adhesion, co-stimulatory, cytoskeletal and signaling molecules are organized in supramolecular activation clusters (SMACs), which comprise a central SMAC (cSMAC), including TCR, CD3, and associated kinases (PKC, Lck and Fyn), and a peripheral SMAC (pSMAC). Adhesion molecules such as integrins LFA-1 and VLA-4 are localized at the pSMAC or peripheral ring, which surrounds the cSMAC-CD3/TCR antigen recognition receptors, providing a physical stable platform to allow a sustained productive interaction and signaling through the TCR. Activated VLA-4 and LFA-1 localize at the IS only in the presence of antigenic stimulation.

The formation of the Immunological Synapse (IS) comprises several steps: 1) Low affinity adhesive interactions facilitate the exploration of APC surface by T cells; 2) Synaptic elements begin to be recruited at the T-APC contact area, and the two SMAC (C and P) are organized; 3) Finally, antigen-dependent T cell activation promotes the translocation of the microtubule organizing center (MTOC) and the associated Golgi apparatus to the contact site with the APC.

IS formation is tightly regulated by the interplay of the actin and tubulin. Actin dynamics is critical for the Segregation of receptors and their localization at the C- or P-SMAC. Actin retrograde flow dominates the pSMAC formation and the control and localization of integrin receptors and associated molecules at the pSMAC.

Building on this foundation, I will focus on our most recent studies on the IS. I will introduce the role of MTOC/

centrosome translocation orchestrating MT, organelle and nanovesicle trafficking at the IS, and I will discuss: 1) Extracellular Vesicle (EV)-driven transfer of genetic information, particularly miRNA and mitDNA, through Immune Synapse; 2) Functional roles of this transfer during T-B cell collaboration and T-DC communication, and its impact on DC fate; and 3) The epigenetic reprogramming of DCs upon their antigen-driven dialog with T lymphocytes.

Centrosome/MTOC translocation and polarized secretion at Immune Synapse

Antigen-dependent T cell activation involves the translocation of the Microtubule Organizing Centre (MTOC)/Centrosome to the contact site with the APC. The microtubule network is organized from the polarized centrosome beneath the plasma membrane at the T cell, forming an umbrella-like structure that allows the re-organization of different organelle at the IS.

We have obtained 3D image of an IS, by using cryoSXT, using synchrotron radiation as a source for beam light to improve resolution of IS. The kind of information obtained, upon alignment of stacks, deconvolution and segmentation of images, and its 3D reconstruction allowed us to observe the relative localization of organelles, thus providing nanometric scale assessment of subcellular regions. The resolution obtained with this technique allowed the calculation of different parameters regarding the orientation of the centrioles inside the centrosome, and the centrosome itself with respect to the immune synapse. The resting centrosome changes its orientation with cell activation to relocate

in a parallel plane to the immune synapse. This orientation serves the T cell to polarize the polymerization of microtubules towards the immune synapse.

We have also analyzed the changes in human primary CD4 T cells during IS formation through soft X rays tomography and found that the cells reorganize their organelles around the centrosome. The centrosome appears near the area of the immune synapse, surrounded by the rest of the organelles, including the secretory vesicles. Signaling nanovesicles and mitochondria move towards the immune synapse in a coordinate manner and reorganize around the centrosome. The secretory apparatus is associated to the centrosome, which favors the polarized secretion at the IS.

Exosome/Extracellular Vesicles transfer at the Immune Synapse

Exosomes are small vesicles of 50-100 nm in size that are secreted to the extracellular medium by most cell types. Exosomes originate in specific endosomal compartments called multivesicular bodies (MVBs), which are late endosomes containing multiple intraluminal vesicles (ILV). When MVBs fuse with the plasma membrane, ILVs are released as exosomes.

Exosomes arising from different cell types show enrichment for a shared set of specific proteins, including tetraspanins (CD63, CD81), adhesion molecules, endosomal proteins (Tsg101, Alix), and heat-shock proteins (hsp90, hsp70), among others. They are also enriched in RNAs, including miRNAs and other non-coding RNAs.

Once they are released, exosomes can adhere to the surface of recipient cells and induce specific responses. Additionally, they can be internalized by the recipient cells, and release their content into them. Thus, exosomes act as mediators of cell-cell communication in many different contexts, for example between neuron and glia cells, or endothelium and SMC, in fetus development and in coagulation.

Exosome composition is not a mere copy of cytosolic content; rather, specific proteins and nucleic acids are selectively sorted into exosomes. During the last years, we have focused on studying post-translational modifications controlling exosome molecular sorting, with a special interest in the mechanisms of regulation of miRNA sorting. We found that certain populations of miRNAs are enriched in EVs compared to parent cells, pointing out towards an active sorting mechanism occurring at RNA level. Moreover, we identified an enrichment of RNA containing specific nucleotide motifs (EXOmotifs), the GGAG tetra loop, in the miRNAs from EVs. Our data indicated that EXOmotifs present in mature miRNAs determine their sorting into EVs, through EXO-motif binding to sumoylated hnRNPA2B1 protein.

Exosomal miRNA Transfer at the IS

The consequences of antigen presentation during IS on T cells have been widely studied, whereas the fate of dendritic cells (DCs) after productive immune synapses (post-synaptic DCs, psDCs) has been largely neglected. Previous studies from our group described that information shuttled by EVs containing miRNAs travels from the T cell to

APCs. I will briefly refer to our work showing several pieces of experimental evidence supporting the role of the IS as a device for efficient transfer of genetic information of miRNAs and of mitochondrial constituents, with significant functional relevance.

One of the questions we addressed was whether EVs of endosomal origin can be transferred from T to APC during the IS. We observed that MVBs in T lymphocyte congregate near the IS within the first 10 minutes. Our early study demonstrated that there was a unidirectional transfer of proteins and microRNA carried by exosomes from the T cells to the APCs. In addition, miRNAs delivered via the IS can have a functional role in the recipient cell, as T cell-derived miRNAs regulate specific targets in APCs.

Next, we assessed the repertoire of endogenous miRNAs transferred during the collaboration of primary T and B cells at the IS. To determine the specific microRNAs transferred from the CD4⁺ T cells to the B cells during the IS, we used recipient cells from CD19-conditional DICER deficient mice (DICER KO) that contain virtually no endogenous mature microRNAs, allowing to discriminate exogenously transferred microRNAs after IS formation.

Moreover, a novel mechanism for the regulation of the B cell response that involves the directional transfer of a surprisingly restricted set of T-cell exosome miRNAs (mmu-miR-20a-5p, mmu-miR-25-3p, and mmu-miR-155-3p) during T and B synapsis was discovered. These exosomal miRNAs modulate key mRNA targets in B cells—including BIM and PTEN— and promote germinal cen-

ter (GC) regulation, including class switch recombination (CSR), and B cell proliferation and survival.

Mitochondria DNA transfer during synaptic contacts and its functional relevance

Mitochondria specifically relocate towards IS (p-SMAC) to fuel actomyosin contraction and IS architecture and maturation. This observation led us to wonder whether mitochondria or any related product could be transferred during IS formation. We aimed to determine if exosomes could contain any mitochondrial material and whether the immune synapse could act as an efficient platform facilitating the passage of genetic information.

Proteomic analysis of exosomes derived from activated T cells revealed the presence of mitochondrial-DNA-associated proteins (mtDNA-associated proteins) which co-fractionated with exosome markers like CD81. Overall, these findings suggest that exosomes contain mitochondrial DNA-binding proteins. To further assess the presence of mitochondrial DNA in exosomes, deep-sequencing analysis of DNA in the EVs secreted by primary T lymphoblasts identified several reads that covered the entire mitochondrial genome. Amplification by PCR of various regions of the mitochondrial genome in exosome samples from human primary T lymphoblasts confirmed the sequencing results. Additionally, we assessed whether mitochondria could be transferred during IS formation by using J77 T cells transfected with mitochondrial markers and conjugated with Raji APCs cells loaded with SuperAntigen E. Flow cytometry analysis of recipient APCs revealed

that mitochondria components transfer during IS formation. Moreover, we also detected mtDNA derived from the CD4+T cells only in the presence of antigen stimulation with OVA in the dendritic recipient cells. These data reveal that mtDNA can be transferred from T cells to DCs in an antigen dependent manner.

As a result of these investigations, we postulated that the horizontal transfer of mitochondrial content and mtDNA during synaptic contacts may represent a mode of cell-to-cell transmission of danger-associated messages. We characterized the changes to the gene profile of DCs upon incubation with T cell exosomes by RNA deep sequencing analysis. Gene expression profiling identified more than 1600 significantly altered genes in recipient DCs exposed to T cell exosomes. Analysis of the genes that changed their expression profile in response to T cell exosomes indicated they were mainly involved in IFN signaling, exogenous DNA and RNA sensing, bacteria and viruses' recognition. Thus, exosomes regulated the expression of a major set of genes involved in interferon (IFN) type I responses and antiviral activity, including IFN-stimulated genes (ISGs). Pre-incubation of DCs with T cell exosomes reduced viral infection, as measured by the number of vaccinia virus- positive DCs.

Hence, the transfer of mitDNA between immune cells constitutes a signal-dependent mechanism for alerting responses in innate immune cells.

Reprogramming Dendritic cells by synaptic contacts

Next, we explored the consequences of how IS educates post-synaptic DCs (psDCs) to prepare them to fight sub-

sequent pathogen challenges. We studied this process using the antigen specific mice model OTII, where CD4⁺ recognize a specific fragment of the chicken ovalbumin. We isolated DCs after a productive synapse (post-synaptic DCs; *ps*DCs) and performed RNA-Seq, epigenomic and proteomic analyses, compared with non-synaptic (*ns*DCs). We identified a set of genes differentially expressed between *ns*DCs and *ps*DCs. These genes were implicated in a diversity of functions such as response to virus, inflammatory response and others. Validation assays by qPCR showed that genes such as *ccr7* and *Isg15* were highly expressed only after a productive immune synapse. Other genes include *cd40* and a number of antiviral genes as *ifit1* and *cxcl10*.

Based on these observations, we postulated that Ag-specific cognate interaction of DCs with CD4 T cells modify the transcriptional and epigenetic status of DCs, priming them to respond to subsequent challenges from microbial pathogens and viruses. The accessibility of chromatin of *ps*DCs was evaluated using ATAC-Seq. Furthermore, we verified that some upregulated gene products, like *Cd40*, *Ccr7* and *Fscn1* also presented higher chromatin accessibility in *ps*DCs. qPCR of the open regions showed that *Ccr7* or *Cd40* associated peaks were enriched in *ps*DCs in this assay, confirming the correlation between the transcriptomic and epigenetic data. These changes in DNA accessibility and the epigenetic marks of the *ps*DCs reflect a contact-dependent priming and reprogramming.

We then addressed the migratory capacity of *ps*DCs as they display increased levels of *CCR7*. Thus, to study the migratory properties of *ps*DCs we performed chemotax-

is experiments towards the CCR7 ligand, the chemokine CCL19. We found that *ps*DCs migrated faster and more directionally towards CCL19 in under-agarose assays. An increased homing of *ps*DCs to the draining lymph node (popliteal) was observed, in agreement with an enhanced CCR7-dependent migration.

Upon receiving CD4+ T cell help, post-synaptic DCs (*ps*DCs) are licensed and they generate and enhance their cross-presentation abilities to CD8+ T cell responses, in terms of their activation and cell proliferation. However, the cellular and molecular mechanisms that enable *ps*DCs licensing were not known. An unbiased mass spectrometry assay in *ps*DCs versus *ns*DCs stimulated *in vitro*, revealed that IS education during antigen presentation induced an upregulation of MHC-I protein molecules and increased lipid peroxidation on *ps*DCs *in vitro* and *in vivo*. We showed that these events were essential for DC licensing and cross-presentation to activate CD8 T lymphocytes. Notably, preventing lipid peroxidation with α -tocopherol abrogated cross-presentation by *ps*DCs. Thus, the IS induces upregulation of pathways involved in antigen cross-presentation, including MHC class I molecules. Thus, *ps*DCs display enhanced abilities to cross-present soluble OVA to CD8+ T cells *in vitro*, in a process that involves lipid peroxidation.

The increased anti-pathogenic status of *ps*DCs revealed by our transcriptomic data led us to investigate the use of *ps*DCs as a non-specific preventive therapy for infection. Therefore, we tested the protective effect of *ps*DCs in a model of intracellular bacteria –*Listeria monocytogenes*–, and a virus –*Influenza A*. Interestingly, *ps*DCs injection con-

ferred protection to mice challenged with either pathogen, significantly increasing survival rates. Adoptive transfer of *ps*DCs protected mice from *Listeria monocytogenes* and *Influenza A* infection by a mechanism dependent on CD8⁺ T cells and the MHC-I molecules of *ps*DCs. Overall, these studies support a novel physiological mechanism for the horizontal transfer of genetic material, mitochondrial components, miRNAs and genome transfer in the context of immune cognate interactions.

Concluding remarks

Our studies have shed light on the intricate mechanisms of intercellular communication during leukocyte adhesion and migration, the antigen-driven interactions within IS, and the transfer of exosome miRNAs and mitochondrial DNA during synaptic contacts. These findings underscore the functional relevance of molecular reprogramming dendritic cells through synaptic contacts, highlighting the dynamic and multifaceted nature of immune cell communication. Collectively, these insights pave the way for novel therapeutic strategies targeting immune cell interactions and their molecular cargo to enhance immune protection and modulation. Continued research in universities and hospitals is crucial to further unravel these complex processes and translate these discoveries into clinical applications, emphasizing the relevance of academic contributions to advancing medical science and improving public health.

References

- BARREIRO O, DE LA FUENTE H, MITTELBRUNN M, SÁNCHEZ-MADRID F. 2007. Functional insights on the polarized redistribution of leukocyte integrins and their ligands during leukocyte migration and immune interactions. *Immunol Rev.* 218:147-64.
- CALZADA-FRAILE D, SÁNCHEZ-MADRID F. 2023. Reprogramming dendritic cells through the immunological synapse: A two-way street. *Eur J Immunol.* 53(11):e2350393.
- FOOKSMAN DR, VARDHANA S, VASILIVER-SHAMIS G, LIESE J, BLAIR DA, WAITE J, SACRISTÁN C, VICTORA GD, ZANIN-ZHOROV A, DUSTIN ML. 2010. Functional anatomy of T cell activation and synapse formation. *Annu Rev Immunol.* 28:79-105.
- GONZÁLEZ-AMARO R, MITTELBRUNN M, SÁNCHEZ-MADRID F. 2005. Therapeutic anti-integrin (alpha4 and alphaL) monoclonal antibodies: two-edged swords? *Immunology.* 116(3):289-96.
- GUTIÉRREZ-VÁZQUEZ C, VILLARROYA-BELTRI C, MITTELBRUNN M, SÁNCHEZ-MADRID F. 2013. Transfer of extracellular vesicles during immune cell-cell interactions. *Immunol Rev.* 251(1):125-42
- HUSE M, QUANN EJ, DAVIS MM. 2008. Shouts, whispers and the kiss of death: directional secretion in T cells. *Nat Immunol.* 9(10):1105-11.
- LEY K, LAUDANNA C, CYBULSKY MI, NOURSHARGH S. 2007. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol.* 7:678-89.

- MARTÍN-CÓFRECES NB, BAIXAULI F, SÁNCHEZ-MADRID F. 2014. Immune synapse: conductor of orchestrated organelle movement. *Trends Cell Biol.* 24(1):61-72.
- MARTIN-COFRECES NB, VALPUESTA JM, SÁNCHEZ-MADRID F. 2021. T cell asymmetry and metabolic crosstalk can fine-tune immunological synapses. *Trends Immunol.* 42(8):649-653.
- MITTELBRUNN M, VICENTE MANZANARES M, SÁNCHEZ-MADRID F. 2015. Organizing polarized delivery of exosomes at synapses. *Traffic.* 16(4):327-337
- MITTELBRUNN M, SÁNCHEZ-MADRID F. 2012. Intercellular communication: diverse structures for exchange of genetic information. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 13(5):328-35.
- MONTOYA MC, Sancho D, VICENTE-MANZANARES M, SÁNCHEZ-MADRID F. 2002. Cell adhesion and polarity during immune interactions. *Immunol Rev.* 186:68-82.
- NOURSHARGH S, HORDIJK PL, SIXT M. 2010. Breaching multiple barriers: leukocyte motility through venular walls and the interstitium. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11:366-78
- NOURSHARGH S, ALON R. 2014. Leukocyte migration into inflamed tissues. *Immunity.* 41(5):694-70.
- SÁNCHEZ-MADRID F, DEL POZO MA. 1999. Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. *EMBO J.* 18(3):501-11.
- SÁNCHEZ-MADRID F, SERRADOR JM. 2009. Bringing up the rear: defining the roles of the uropod. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10(5):353-9.

- VICENTE-MANZANARES M, SÁNCHEZ-MADRID F. 2004. Role of the cytoskeleton during leukocyte responses. *Nat Rev Immunol.* Feb;4(2):110-22.
- VICENTE-MANZANARES M, SÁNCHEZ-MADRID F. 2018. Getting the integrin interactome in human disease. *Curr Opin Cell Biol.* 55:17-23.
- VILLARROYA-BELTRI C, BAIXAULI F, GUTIÉRREZ-VÁZQUEZ C, SÁNCHEZ-MADRID F, MITTELBRUNN M. 2014. Sorting it out: regulation of exosome loading. *Semin Cancer Biol.* 28:3-13.
- VON ANDRIAN UH, MACKAY C R. 2000. T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *N Engl J Med.* 343(14):1020-34.
- WEBER C, FRAEMOHS L, DEJANA E. 2007. The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation. *Nat Rev Immunol.* 7(6):467-77.



Septiembre, 2024

APERTURA
DEL CURSO
ACADÉMICO
2024-25

LECCIONES

