



**POLITÉCNICA**



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID**

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA**

**AGRONÓMICA, ALIMENTARIA Y DE BIOSISTEMAS**

**GRADO EN BIOTECNOLOGÍA**

**DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA-BIOLOGÍA VEGETAL**

***Estudio del control del tráfico polarizado en la sinapsis inmunitaria: papel de la formina FMNL1***

**TRABAJO FIN DE GRADO**

Autor/a: Marta García Silverio

Tutor/a: Maria de la Paz González García

Co-tutor: Manuel Izquierdo Pastor

**7 de Julio de 2025**



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID**  
**Escuela Técnica Superior De**  
**Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas**

**GRADO DE BIOTECNOLOGÍA**

**ESTUDIO DEL CONTROL DEL TRÁFICO POLARIZADO EN LA SINAPSIS  
INMUNITARIA: PAPEL DE LA FORMINA FMNL1**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**Marta García Silverio**

**MADRID, 2025**

Tutor: Maria de la Paz González García

Dpto de Biotecnología-Biología Vegetal

Co-tutor: Manuel Izquierdo Pastor

Instituto de Investigaciones Biomédicas Sols-Morreale (CSIC-UAM)



## **ESTUDIO DEL CONTROL DEL TRÁFICO POLARIZADO EN LA SINAPSIS INMUNITARIA: PAPEL DE LA FORMINA FMNL1**

**Memoria presentada por Marta García Silverio para la obtención del título de  
Graduado en Biotecnología por la Universidad Politécnica de Madrid**

**Fdo: Marta García Silverio**

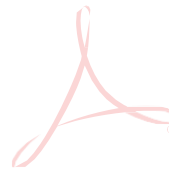
**VºBº Tutora UPM del TFG**

**D. Maria de la Paz González García**  
**Dpto de Biotecnología-Biología Vegetal-ETSIAAB UPM**  
**Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (UPM-INIA-CSIC)**



**VºBº Tutor Profesional:**

**D. Manuel Izquierdo Pastor**  
**Dpto de Bioquímica**  
**Instituto de Investigaciones Biomédicas Sols-Morreale (CSIC-UAM)**



**ETSIAAB Universidad Politécnica de Madrid**

**Madrid, 7 de Julio 2025**

*A mis padres, Juan y Teresa*  
*Por hacerme llegar a donde estoy ahora*  
*A Álvaro*  
*Por el apoyo constante en este camino*

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero expresar mi agradecimiento a Marypaz González García por haber hecho con sus clases que la inmunología se convirtiera en mi asignatura favorita y por toda la dedicación, tiempo, orientación y valiosas aportaciones durante el desarrollo de este trabajo. Su ayuda no solo ha contribuido a este trabajo, sino también a mi desarrollo académico.

Gracias a todos los profesores que me han dado clase estos 4 años, porque todos los retos que nos han puesto me han hecho desarrollarme no solo académicamente sino también personalmente.

Gracias a mis amigos de la universidad, por todos los apuntes compartidos, las tardes en la biblioteca, las partidas de mus y todos los momentos altos y bajos que hemos compartido durante estos 4 años.

A mi amigo Álvaro, gracias por tus clases de genética, si hoy me gusta, es en parte es gracias a ti.

A mis abuelos, Antonio y Elisa, por siempre haber estado orgullosos de mí, sé que hoy también lo estaríais.

A mi hermana, por ser tan risueña y soñadora.

A Álvaro, el mejor compañero que podría tener, gracias por tu apoyo y ser mi equipo siempre.

Finalmente, doy las gracias a mis padres, Juan y Teresa, por permitirme llegar hasta aquí.

## **ÍNDICE**

ÍNDICE DE TABLAS.....	VII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IX
RESUMEN.....	X
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	1
Sinapsis inmunitaria.....	1
Citoesqueleto de Actina y dinámica mitocondrial.....	1
Papel de INF2 y Drp1 en la dinámica mitocondrial durante la sinapsis Inmunitaria.....	2
Forminas y polarización del MTOC durante la sinapsis inmunitaria.....	3
Objetivos.....	4
CAPÍTULO II: MATERIAL Y MÉTODOS.....	6
Células.....	6
Transfección y plásmidos.....	6
Gradiente de Ficoll.....	7
Formación de la sinapsis inmunitaria.....	7
Inmunofluorescencia.....	8
Microscopia de epifluorescencia.....	9
Microscopia confocal.....	10
Análisis de imagen.....	10
Análisis Estadístico.....	14
Elaboración de figuras y gráficos.....	14
CAPÍTULO III: RESULTADOS.....	15
Interferencia de FMNL1 endógeno.....	15
Papel de FMNL1 en la polarización del MTOC hacia la sinapsis inmunitaria en células Jurkat.....	17
Papel de FMNL1 en la morfología mitocondrial durante la sinapsis inmunitaria.....	19
Papel de FMNL1 en la energización mitocondrial durante la sinapsis inmunitaria.....	20
Papel de FMNL1 en la polarización y energización mitocondrial durante la sinapsis inmunitaria.....	21
CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN.....	23
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES.....	26
CAPÍTULO VI: BIBLIOGRAFÍA.....	27

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Anticuerpos primarios utilizados para la inmunofluorescencia .....	8
Tabla 2. Sondas fluorescentes utilizados para Actina y mitocondrias .....	8
Tabla 3. Anticuerpos secundarios utilizados para la inmunofluorescencia .....	9
Tabla 4. Parámetros de excitación y emisión en microscopía de epifluorescencia .....	9
Tabla 5. Canales de fluorescencia utilizados para el análisis de imagen por microscopía confocal .....	10

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Construcciones utilizadas para transfectar los Linfocitos T Jurkat .....	6
Figura 2. Representación gráfica de la relación entre la MFI de FMNL1 y la MFI de YFP para las células Jurkat transfectadas con los plásmidos ShControl-YFP (n=24) y ShFMNL1-YFP (n=27)	15
Figura 3: Análisis de la expresión de FMNL1 en células Jurkat transfectadas con plásmido ShFMNL1-YFP y ShControl-YFP.....	16
Figura 4. Análisis del índice de polarización del MTOC en células Jurkat sin transfectar (YFP <sup>-</sup> ) y transfectadas con los plásmidos ShControl-YFP y ShFMNL1-YFP .....	18
Figura 5. Representación gráfica de la cantidad “Branch Junctions” para las células Jurkat transfectadas con los plásmidos ShControl-YFP y ShFMNL1-YFP .....	20
Figura 6. Representación gráfica del grado de energización en células Jurkat C3 transfectadas con los plásmidos ShControl-YFP y ShFMNL1-YFP.....	21
Figura 7. Representación gráfica de las diferencias existentes entre el índice de polarización de las mitocondrias y la dispersión mitocondrial entre el grupo de células Jurkat transfectadas con el plásmido ShControl-YFP y con ShFMNL1-YFP .....	22

## Abreviaturas

**2D:** 2 Dimensions

**3D:** 3 Dimensions

**AF 647:** Alexa Fluor 647

**APC:** Antigen Presenting Cell

**ATCC:** American Type Culture Collection

**BS:** Blocking Solution

**BSA:** Bovine Serum Albumin

**CMAC:** Cell Tracker Blue

**cSMAC:** Central Supramolecular Activation Complex

**DIA:** Adhesion Domain Interaction

**Drp1:** Dynamin related protein 1

**F-Actina:** Filamentous Actin

**FMNL1:** Formin like-1

**HEPES:** N-[2-hidroxiethyl]piperazina-N'-[2-etanosulfonico]

**Ig:** Immunoglobulin

**IP:** polarization index

**INF2:** Inverted Formin 2

**IMF:** Average Fluorescence Intensity

**LASX:** Leica Application Suite X

**Linfocito Tc:** Cytotoxic T lymphocyte

**Linfocitos Th:** T-helper lymphocytes

**NA:** Numerical Aperture

**NISAR:** Nis Elements Advanced AR

**MHC:** Major Histocompatibility Complex

**MT:** Microtubules

**MTOC:** Microtubule Organizing Centre

**PBS:** Phosphate Buffered Saline

**PS:** Permeation Solution

**RE:** Endoplasmic reticulum

**RNA:** Ribonucleic Acid

**ROI:** Region Of interest

**ROS:** Reactive Oxygen Species

**Rmp:** Revolutions Per Minute

**SEE:** Staphylococcus Enterotoxin E Superantigen

**SI:** Immune Synapse

**siRNA:** small interfering RNA

**TCR:** T-Cell Receptor

**TOM20:** Outer Membrane Translocase 20

**YFP:** Yellow Fluorescent Protein

## **Resumen**

La formación de la sinapsis inmunitaria (SI) entre linfocitos T y B, se produce cuando el Linfocito B actúa como célula presentadora de antígeno y presenta un antígeno a través de su complejo mayor de histocompatibilidad II (MCH II) al linfocito T, provocando así la activación de su receptor (TCR). La activación del linfocito T produce la reorganización de la F-Actina del citoesqueleto, la polarización del centro organizador de microtúbulos (MTOC) hacia la zona central de la SI y cambios en la morfología, energización, dispersión y polarización mitocondrial. En este trabajo se estudia el papel que tiene la proteína Formin like-1 (FMNL1) en todos estos acontecimientos en el contexto de la SI, debido a que estudios previos han demostrado que la fosforilación de su isoforma la  $\beta$  de FMNL1 por PKC $\delta$  es importante en estos procesos. Además, FMNL1 regula la polimerización de actina en el centrosoma y en los sitios de contacto entre la mitocondria y el retículo endoplasmático, influyendo en la dinámica mitocondrial y en la reorientación del MTOC hacia la SI<sup>(1)</sup>. Esta regulación de la reorganización del citoesqueleto de actina podría influir en la polarización mitocondrial y, de manera indirecta, en su energización. Esto sugiere que FMNL1 tiene un papel relevante en la regulación de la polarización del MTOC y en la dinámica mitocondrial durante la sinapsis inmunitaria.

## **Abstract**

The formation of the immune synapse (IS) between T and B lymphocytes occurs when the B lymphocyte acts as an antigen presenting cell and presents an antigen through its major histocompatibility complex II (MHC II) to the T lymphocyte, thus causing the activation of its receptor (TCR). T lymphocyte activation results in reorganization of cytoskeletal F-actin, polarization of the microtubule organizing center (MTOC) toward the central zone of the IS, and changes in mitochondrial morphology, energization, spreading, and polarization.

This work addresses the role of Formin like-1 (FMNL1) protein in all these events in an IS context, because previous studies have shown that phosphorylation of its FMNL1  $\beta$  isoform by PKC $\delta$  is important in these processes. In addition, FMNL1 regulates actin polymerization at centrosome and mitochondria-RE contact sites influencing mitochondrial dynamics and MTOC reorientation towards de IS<sup>(1)</sup>. This regulation of actin cytoskeleton reorganization could indirectly influence mitochondrial polarization and energization. This suggests that FMNL1 has a relevant role in the regulation of MTOC polarization and mitochondrial dynamics during immune synapses.

# **CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS**

## **Introducción**

### **Sinapsis inmunitaria**

La sinapsis inmunitaria (SI) es una estructura especializada y dinámica que se forma, entre otras situaciones, debido a una interacción entre un linfocito T y una célula presentadora de antígenos (APC) que puede ser una célula dendrítica, macrófagos o Linfocitos B, siendo esencial para la activación del linfocito T y permitir así el inicio de la respuesta inmune adaptativa<sup>(2)</sup>. También pueden formarse sinapsis inmunitarias entre los Linfocitos CD8+ y sus dianas, así como entre los “Natural Killers” (NK) y sus dianas<sup>(2)</sup>. Esta interacción se produce cuando la APC presenta a través de su Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) un péptido antigénico que es reconocido por el receptor de antígeno de los linfocitos T (TCR)<sup>(2)</sup>.

Durante la sinapsis inmunitaria se forma el “Supramolecular activation cluster” (SMAC) que tiene 3 regiones, central (cSMAC), que es el centro de la sinapsis es donde se produce la activación del linfocito T y donde se encuentran las moléculas co-estimuladoras y proteínas implicadas en señalización, periférico (pSMAC) rodeando el central y es donde se encuentran interactuando la LFA-1 del linfocito T con la ICAM-1 de la APC estabilizando la interacción y la distal (dSMAC), que es la zona más externa y tiene moléculas como CD43 y CD45 que mantienen la organización de la sinapsis y contribuyen a la señalización<sup>(2)</sup>.

La sinapsis inmunitaria es importante porque permite la activación, proliferación y diferenciación de los linfocitos T, regula la intensidad y duración de la respuesta inmune y permite una secreción dirigida de las citoquinas y moléculas citotóxicas únicamente hacia la célula diana, evitando daños en células circundantes que no presentan el antígeno y garantizando, por tanto, la especificidad antigénica<sup>(1)</sup>.

### **Citoesqueleto de Actina y dinámica mitocondrial**

Las mitocondrias son orgánulos altamente dinámicos que forman redes interconectadas, adaptándose constantemente a las necesidades energéticas y fisiológicas de la célula. Este equilibrio entre fusión y fisión mitocondrial es esencial para mantener la homeostasis y el metabolismo celular, permitiendo la distribución adecuada de mitocondrias y la eliminación de aquellas dañadas<sup>(3)</sup>. Se ha identificado un ciclo dinámico en el que la actina se ensambla transitoriamente alrededor de ciertas mitocondrias, induciendo una fisión local dependiente de Dynamin related protein 1 (Drp1)<sup>(4)</sup>. Posteriormente, el desensamblaje de la actina permite la fusión rápida de las mitocondrias fragmentadas, restaurando la red tubular mitocondrial<sup>(4)</sup>. La polimerización de actina en este contexto requiere la actividad de complejos como Arp2/3 y

forminas, como FMNL1, cuya inhibición bloquea el ciclo dinámico de actina, afectando la remodelación de la red mitocondrial<sup>(5)</sup>.

Drp1 es una GTPasa relacionada con la dinamina que regula la fisión mitocondrial durante el ciclo de actina<sup>(4)</sup>.

### **Papel de INF2 y Drp1 en la dinámica mitocondrial durante la sinapsis inmunitaria**

Estudios previos, muestran como en Linfocitos T Jurkat cuyo TCR se activa con la presentación de superantígeno de estafilococo (SEE) por parte de una célula presentadora de antígenos (APC), las mitocondrias se situaban en el centro de la Sinapsis inmunitaria (SI) dónde también se situaba el Centro Organizador de Microtúbulos (MTOC)<sup>(2)</sup>. Al silenciar la expresión de Drp1 la translocación de las mitocondrias hacia la sinapsis inmunitaria se redujo y la del MTOC siguió igual<sup>(6)</sup>. Además, al silenciar Drp1 no se forma el cSMAC y los microclusters de CD3 no se colocan en el centro de la sinapsis inmunitaria. Por último, también se ha estudiado como el silenciamiento de Drp1 produce un incremento en la producción de IL-2 lo que afecta a la activación del TCR. Drp1 es importante para la translocación de las mitocondrias al lugar de la sinapsis y para la formación del anillo de actina contráctil alrededor del cSMAC<sup>(6)</sup>.

La supresión de Inverted Formin 2 (INF2) reduce la fisión mitocondrial, produciendo un aumento de la longitud mitocondrial, mientras que la sobreexpresión de INF2 constitutivamente activo resulta en un aumento de la constricción en los sitios mitocondria-Retículo endoplasmático produciendo así un aumento de la fisión y la consecuente reducción de la longitud mitocondrial<sup>(7)</sup>. Sin embargo, se ha visto que la proteína Drp1 aumenta aún más la fisión mitocondrial que INF2 y esto puede ser debido a dos motivos: que INF2 actúe puntualmente en algunos eventos de la fisión o que INF2 facilite el proceso, pero no sea esencial<sup>(7)</sup>. Se cree que el proceso podría ocurrir de la siguiente forma: el sitio de interacción del complejo Mitocondria-RE activa a INF2 que produce la polimerización de la Actina entre las mitocondrias y el RE, lo que permite la formación del anillo de constricción por parte de Drp1 que constriñe las mitocondrias produciendo su fisión<sup>(7)</sup>. Estudios previos, basados en microscopía de fluorescencia, han evidenciado que en linfocitos T Jurkat activados mediante el reconocimiento del superantígeno SEE presentado por células presentadoras de antígeno (APC), las mitocondrias se redistribuyen hacia el centro de la sinapsis inmunitaria (SI), coincidiendo con la localización del MTOC. Al silenciar la expresión de la proteína Drp1, esta translocación mitocondrial hacia la SI se ve significativamente reducida, mientras que la polarización del MTOC permanece inalterada. Además, la inhibición de Drp1 impide la formación del complejo supramolecular central de activación (cSMAC) y altera la organización de los microclusters de CD3 en la sinapsis. Cabe destacar que esta alteración también conlleva un aumento en la producción de IL-2, lo cual

impacta directamente en la activación mediada por el receptor de células T (TCR). Estos hallazgos indican que Drp1 no solo es crucial para la redistribución mitocondrial hacia la SI, sino también para la formación del anillo de actina contráctil que rodea al cSMAC<sup>(6)</sup>.

En paralelo, se ha demostrado que la supresión de la formina INF2 reduce la fisión mitocondrial, provocando un alargamiento de las mitocondrias. Por el contrario, la sobreexpresión de un mutante constitutivamente activo de INF2 incrementa los eventos de constricción mitocondrial en los puntos de contacto con el retículo endoplasmático (RE), favoreciendo la fisión y reduciendo la longitud mitocondrial<sup>(7)</sup>. No obstante, Drp1 parece tener un papel aún más determinante en este proceso. Se ha propuesto que INF2 actúa facilitando la polimerización de filamentos de actina en la interfaz mitocondria-RE, favoreciendo la constricción inicial que permite a Drp1 ensamblar el anillo constrictor que lleva a cabo la fisión mitocondrial de forma efectiva. Así, INF2 podría desempeñar una función reguladora aguas arriba de drp1 o de apoyo en eventos específicos de fisión<sup>(7)</sup>.

### **Forminas y polarización del MTOC durante la sinapsis inmunitaria**

Las forminas constituyen una familia de proteínas efectoras directas de las GTPasas de la familia Rho, que desempeñan un papel esencial en la nucleación y elongación de filamentos lineales de actina<sup>(8)</sup>. A diferencia del complejo Arp2/3, que genera redes ramificadas de actina, las forminas participan en la formación de estructuras más estables y organizadas, relevantes para múltiples procesos celulares como la polarización, migración y reorganización citoesquelética<sup>(6)</sup>.

En el contexto de los linfocitos T, las forminas Adhesion Domain Interaction (DIA1), INF2 y Formin like-1 (FMNL1) han demostrado ser fundamentales para la reorientación del MTOC hacia la SI, tanto en células Jurkat como en linfocitos T primarios<sup>(8)</sup>. La activación del TCR induce la rápida formación de microtúbulos estables destirosinados (Glu-MT), cuya organización depende de la presencia de DIA1 y FMNL1. Estas estructuras son esenciales para la transducción de señales mediadas por fosforilación en residuos de tirosina, proceso clave en la activación inmunitaria<sup>(8)</sup>.

FMNL1 y DIA1 se localizan en la región pericentrosómica, y su inhibición simultánea interfiere severamente con la reorientación del MTOC hacia la sinapsis inmunológica. Este fenómeno parece estar mediado por mecanismos aguas abajo del TCR, implicados en la reorganización del citoesqueleto en torno al centrosoma<sup>(5)</sup>. Esta función de las forminas es independiente del complejo Arp2/3, ya que la inhibición de este último no afecta el reposicionamiento del MTOC durante la SI<sup>(5)</sup>. Además, la alteración de la actividad de FMNL1 ó de DIA1 repercute directamente en la funcionalidad de los linfocitos T citotóxicos (Tc), comprometiendo su capacidad efectora<sup>(5)</sup>.

La actividad de FMNL1, en particular, está regulada por fosforilación mediada por la proteína quinasa C delta (PKC $\delta$ ). Cuando se inhibe esta quinasa, se impide la fosforilación de FMNL1, lo que altera su localización subcelular en relación con la F-actina y el MTOC<sup>(9)</sup>. Esta regulación es específica de FMNL1, ya que no afecta a DIA1. En células Jurkat se han identificado tres isoformas de FMNL1:  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . Se ha demostrado que la interferencia génica de cualquiera de ellas reduce la eficiencia de polarización del MTOC. No obstante, al silenciar únicamente las isoformas  $\alpha$  y  $\gamma$  —rescatando la expresión de la isoforma  $\beta$ — se restablece la polarización del MTOC y se observan niveles elevados de F-actina en el centrosoma<sup>(9)</sup>. En cambio, al interferir exclusivamente la isoforma  $\beta$ , se pierde la capacidad de polarización, incluso si las otras dos isoformas están activas. Sin embargo, si se interfieren con todas las isoformas y se rescata la isoforma  $\alpha$  ó  $\gamma$  solamente, no se restablece la polarización del MTOC<sup>(9)</sup>. Estos resultados indican que la isoforma FMNL1 $\beta$  es crítica para la reorientación del MTOC, y que su activación mediante fosforilación representa un evento clave en la regulación del citoesqueleto durante la sinapsis inmunológica<sup>(9)</sup>.

### **Objetivos**

Este trabajo tiene como finalidad investigar el papel funcional de la forma FMNL1 en la reorganización intracelular de los linfocitos T Jurkat durante la formación de la sinapsis inmunitaria. Se busca comprender cómo la interferencia de esta proteína influye en dos procesos: la polarización del centro organizador de microtúbulos (MTOC) y la dinámica mitocondrial.

Con este fin, se analizará el efecto de la interferencia de FMNL1 sobre la capacidad de los linfocitos T para reorientar el MTOC hacia la sinapsis inmunitaria, evento fundamental para el direccionamiento de vesículas, gránulos citotóxicos y orgánulos hacia el punto de contacto con la célula presentadora de antígenos (APC).<sup>(10)</sup>

De forma paralela, se estudiará la distribución espacial y la funcionalidad mitocondrial en células transfectadas con vectores interferentes, midiendo parámetros como la morfología mitocondrial, el grado de energización en dos y tres dimensiones, la polarización mitocondrial y su dispersión intracelular. A partir de estos datos, se pretende establecer correlaciones funcionales entre la presencia de FMNL1 y la organización subcelular asociada a la sinapsis inmunitaria.

Como hipótesis del trabajo, se plantea que FMNL1 podría ser una proteína clave en la correcta orientación del MTOC como en la redistribución y funcionalidad de las mitocondrias de los linfocitos T durante su activación. De ser así, estos procesos resultarían afectados, afectando así a la función de la sinapsis inmunitaria.

Este análisis se justifica en base a evidencias acumuladas que demuestran la participación de otras forminas, como INF2, en la inducción de constricciones en los sitios de contacto mitocondria–retículo endoplasmático que preceden y originan la fisión de las mitocondrias, así como el papel central de Drp1 en la ejecución de dicha fisión y en la relocalización mitocondrial hacia la sinapsis<sup>(6)</sup>. Además, la implicación de FMNL1 en este proceso ha sido sugerida por estudios previos que identifican su localización pericentrosómica y su participación, junto con otras forminas como DIA1, en la reorganización del citoesqueleto de actina requerido para la correcta orientación del MTOC en células T activadas<sup>(5)</sup>. Dado que FMNL1 comparte propiedades estructurales y funcionales con otras forminas implicadas en la reorganización del citoesqueleto y la dinámica organelar, se plantea la hipótesis de que esta formina podría desempeñar un papel dual en la reorientación del MTOC y la redistribución y funcionalidad mitocondrial en linfocitos T activados. Los resultados derivados de este estudio contribuirán a ampliar el conocimiento sobre los mecanismos moleculares que regulan la arquitectura intracelular durante la activación inmunitaria y podrían ayudar a identificar nuevas dianas terapéuticas en enfermedades donde estos procesos estén alterados.

## CAPÍTULO II: MATERIAL Y MÉTODOS

### Células

Se ha trabajado con Linfocitos Th CD4+ JURKAT, clon C3 previamente descrito <sup>(1)</sup> y Linfocitos B RAJI de la ATCC. Ambos tipos celulares proceden de pacientes pediátricos con leucemia T y B, respectivamente. Las células se cultivaron a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5%. El medio utilizado es RPMI que está formado por Suero Fetal Bovino (FCS, 5%), L-glutamina (2mM) y tampón HEPES. En el caso las células JURKAT, el medio lleva Puomicina 1 µg/ml como forma de selección de aquellas células que llevan el plásmido Shcontrol (scramble, Santa Cruz).

### Transfección y plásmidos

Los Linfocitos Th CD4+ JURKAT durante su fase de crecimiento exponencial, se transfectan con un electroporador, de esta manera se introduce el plásmido en el interior de las células (10-15x10<sup>6</sup> células/ 0,65 ml/ 30 µgr plásmido), a cada cubeta con las células y los plásmidos, se le dan 2 pulsos eléctricos, cada uno de ellos de 290V.

Para evaluar el efecto de la proteína Formina FMNL1 en la dinámica mitocondrial durante la sinapsis inmunitaria se utilizan 2 plásmidos (Figura 1): shControl-YFP (permite evaluar la dinámica mitocondrial en condiciones control, es decir, sin interferir en nada y expresando YFP) y shFMNL1-YFP (es un RNA interferente que silencia todas las isoformas de FMNL1 y expresa YFP, permitiéndonos así diferenciar las células transfectadas de las no transfectadas a partir de la fluorescencia amarilla que emiten las primeras)<sup>(11)</sup>.



**Figura 1: Construcciones utilizadas para transfectar los Linfocitos T JURKAT.** Imagen que representa el plásmido ShControl-YFP (superior) y el plásmido ShFMNL1-YFP (inferior) que es el que va a interferir todas las isoformas de FMNL1.

A las 24-48 horas post-transfección se hace un seguimiento con el microscopio de epifluorescencia para visualizar la expresión de YFP.

### **Gradiente de Ficoll**

El día antes del protocolo de formación sinapsis se hace un gradiente con Ficoll, con el fin de eliminar células muertas y restos celulares producidos por la electroporación, para lo cual se añaden 6 ml de Ficoll en un tubo de 30 ml y tras esto se depositan sobre ella 20 ml de la suspensión celular, con cuidado de que las células en el medio de cultivo no se mezclen con el Ficoll. Posteriormente, se centrifuga a 1800 rpm durante 20 minutos. Una vez centrifugado, extraemos 2-3 ml de la banda intermedia que es donde se encuentran las células vivas. Lo obtenido lo diluimos con medio de cultivo 5 veces su volumen y se centrifuga a 1500 rpm durante 5 minutos, se extrae el pellet y se resuspende en 4 ml de medio, ajustando a 1-2 millones de células/ml y las cultivamos en placas de 24 pocillos.

### **Formación de la sinapsis inmunitaria**

Para formar la sinapsis inmunitaria entre las células Jurkat y Raji, se han usado placas de 8 micropocillos (IBIDI) que pueden con fondo de plástico o de vidrio, en caso de usar el primer tipo, las células se adherirán al fondo de la placa con Fibronectina, sin embargo, si se usan las del segundo tipo, se utilizará Polilisina para la adhesión.

Tras la incubación se aspira el factor de adhesión utilizado, se realizan un par de lavados con PBS y se añaden 200  $\mu$ l de Raji ( $1 \times 10^6$  células/ml) por pocillo y se comprueba mediante microscopio óptico que las células se han adherido al fondo de la placa. Posteriormente, se tiñen las células con cell tracker blue (CMAC, 10  $\mu$ M) se añade a partir de una solución madre compuesta de 1,6 ml de medio RPMI (0,2 ml por pocillo) con 1,6  $\mu$ l CMAC 10 mM (0,2  $\mu$ L por pocillo). Tras la tinción se comprueba en el microscopio de fluorescencia que las células se han teñido de azul. En el siguiente paso, se lava el CMAC dos veces con medio RPMI y se añade superantígeno enterotoxina E de Staphylococcus (SEE, 1  $\mu$ gr/ml) que será presentado por el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC-II). Por último, se añaden las células Jurkat transfectadas que han sido seleccionadas mediante el Ficoll, se añaden  $0,2 \times 10^6$  células en 0,2 ml por pocillo. El TCR de las Jurkat reconoce el SEE que es presentado por el MHC-II de las Raji, por lo que se produce el reconocimiento antigénico y después la unión entre ambas células formándose así la sinapsis inmunitaria. Se comprueba la formación de la sinapsis en el microscopio de epifluorescencia y/o se usan las placas para tomar imágenes de microscopía de epifluorescencia a tiempo real o se fijan las células usando Formaldehído 4% (placas con fondo de plástico) o Formaldehído 4% y después Acetona (placas con fondo de vidrio).

## **Inmunofluorescencia**

Como el objetivo es el estudio de estructuras subcelulares tales como mitocondrias, actina y MTOC, se va a proceder al marcaje con sondas fluorescentes y diversos anticuerpos primarios y secundarios para así poder distinguir los distintos tipos de estructuras. Los anticuerpos primarios utilizados se representan en la tabla 1.

**Tabla 1. Anticuerpos primarios utilizados para la inmunofluorescencia.** Se incluyen los anticuerpos utilizados, el componente celular marcado, la dilución utilizada y la especie en la que han sido producidos.

<b>Anticuerpos</b>	<b>Marcaje</b>	<b>Dilución</b>	<b>Especie</b>
Anti-FMNL1	FMNL1	1:100	Ratón
Anti-Pericentrina	MTOC	1:2000	Conejo
TOM20	TOM20 en la membrana externa mitocondrial	1:2000	Conejo

Las sondas fluorescentes utilizadas se encuentran en la tabla 2.

**Tabla 2. Sondas fluorescentes utilizados para Actina y mitocondrias.** Incluye los nombres de las sondas, el componente celular que marcan y las concentraciones

<b>Sondas</b>	<b>Marcaje</b>	<b>Concentración</b>
Mitotracker Red CMXRos	Potencial de membrana de las mitocondrias (energización)	100 nM
Faloidina AF647	F-Actina	1,65 $\mu$ M
CMAC	Raji	10 $\mu$ M

El procedimiento comienza con la incubación de la placa de micropocillos durante 1 hora a temperatura ambiente utilizando un tampón de bloqueo (Blocking Solution) (BS) compuesto por 5% PBS-BSA y 0.1% Saponina, el PBS contribuye a diluir, BSA bloquea los sitios de unión no específica y la Saponina permeabiliza la membrana. Una vez finalizado el tiempo de incubación, se retira el BS y se añaden los anticuerpos primarios en PS, formado por PBSx1, 5% BSA, 0.1% Saponina y 10mM HEPES, se incuba 1 hora a temperatura ambiente. Tras la incubación, se realizan 2 lavados con PS y se añaden los anticuerpos secundarios diluidos en PS y se vuelve a incubar durante 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos secundarios utilizados se representan en la tabla 3.

**Tabla 3. Anticuerpos secundarios utilizados para la inmunofluorescencia.** Incluye el componente celular que marca, la especie en la que se han producido, el fluoróforo utilizado y la  $\lambda$  de emisión

Anticuerpos	Marcaje	Especie	Fluoróforo	$\lambda$ Emisión (nm)
Anti-Ig	TOM20	Anti-conejo	AF647	650-700
Anti-Ig	FMNL1	Anti-ratón	AF647	650-700
Anti-Ig	MTOC	Anti-conejo	AF647	650-700

Por último, al terminar la incubación, se realiza un lavado primero con PBS, posteriormente con agua para lavar las sales y se pone la solución de montaje y el cubreobjetos. Importante guardar la placa a  $-20^{\circ}\text{C}$  y en oscuridad para evitar el “Photobleaching”.

### **Microscopía de epifluorescencia**

Se utiliza un microscopio de epifluorescencia Nikon TiE, equipado con control de ambientación celular (temperatura, humedad,  $\text{CO}_2$ ) con 2 objetivos: comprobar que la transfección se ha producido correctamente y para adquirir imágenes con las que posteriormente se analizará la polarización del MTOC.

Para la adquisición de imágenes se utiliza el objetivo 60x 1.4 NA usando aceite de inmersión, también usaremos el programa Nis Element AR (NIKON). El microscopio cuenta con diversos canales de fluorescencia que nos permiten distinguir entre los distintos marcajes utilizados (en algunos casos aparecen 2 componentes celulares, esto se debe a que dependiendo de lo que se fuera a estudiar en cada experimento, se marcó uno u otro). (Tabla 4).

**Tabla 4. Parámetros de excitación y emisión en microscopía de epifluorescencia.** Se incluye el color del marcaje, el elemento celular marcado y la longitud de onda tanto de excitación como de emisión

Canal	Color	Componente celular	$\lambda$ de excitación (nm)	$\lambda$ de emisión (nm)
YFP	Amarillo	Jurkat transfectadas	490-510	520-550
UV-2A	Azul	Raji (CMAC)	340-380	420-550
TRITC	Rojo cercano	F-Actina ó CMXRos	540-580	600-660
Cy5HQ	Rojo lejano	MTOC ó TOM20	610-660	660-710
TRANS	Escala de grises	Todas las células	-	-

## **Microscopía confocal**

Se utiliza un microscopio confocal Leica (Stellaris 8 Tau STED), la adquisición de imágenes se hizo utilizando “stacks” de entre 30-40 secciones ópticas con un paso de Z de 0,3  $\mu\text{m}$ , con objetivo aceite 63x 1,45 NA, con el programa de adquisición y análisis Leica LAS X.

La toma de imágenes en el microscopio confocal son de mayor calidad que las de epifluorescencia, al eliminar la contaminación de la fluorescencia fuera de foco y nos permiten el estudio tridimensional de las estructuras subcelulares como mitocondrias, pudiendo así obtener más información. Todos los detalles de las imágenes adquiridas se encuentran en la tabla 5.

**Tabla 5. Canales de fluorescencia utilizados para el análisis de imagen por microscopía confocal.** Se incluye el color del marcaje, la longitud de onda tanto de excitación como de emisión y la intensidad de láser utilizada.

<b>Canal</b>	<b>Color</b>	<b><math>\lambda</math> de excitación (nm)</b>	<b><math>\lambda</math> de emisión (nm)</b>
YFP	Amarillo	494	512-546
CMAC	Azul	405	420-521
AF-546	Rojo cercano	557	566-598
AF647	Rojo lejano	653	662-740
TRANS	Escala de grises	486	-

## **Análisis de Imagen**

### **1. Análisis de interferencia de FMNL1 con ImageJ**

Primero se realiza una selección de las imágenes que son válidas para el análisis con LAS X, para la selección se estableció el siguiente criterio: Jurkat formando una sinapsis clara con una única célula presentadora. Las imágenes usadas para este paso del análisis se realizan sobre imágenes tomadas en microscopía confocal con un zoom de x1.

Después, se extraen todos los canales de las células seleccionadas para poder analizarlos en ImageJ. Se abre el canal YFP y se crea una proyección de intensidad máxima, se hará una región de interés (ROI) sobre cada célula YFP<sup>+</sup> (representa la célula Jurkat transfectada) y se hace también un ROI sobre una región en la que no haya ningún tipo de células al que llamamos fondo. Todos los ROIS se guardan una vez dibujados usando control+T. Una vez lo tenemos, medimos el valor de intensidad medio del canal de FMNL1 de cada ROI y le restamos el valor del fondo, obteniendo así el valor de intensidad de fluorescencia medio de FMNL1 de esa célula. Esto se hace para todas las células y es independiente del área celular. Creamos 2 tablas excel una para el grupo de células control (shControl-YFP) y otra para el grupo interferido en FMNL1

(shFMNL1-YFP, las potencialmente interferidas en FMNL1) para posteriormente poder comparar estadísticamente los resultados.

También se hará una proyección máxima de la intensidad de fluorescencia del canal del TOM20 para hacer ROIS sobre células que son Jurkat sin transfectar (YFP<sup>-</sup>), usándolas, así como control adicional (control interno de cada imagen). Para hacer esto abriremos las proyecciones máximas de los canales: YFP, CMAC y TOM20, para así asegurarnos de que estamos cogiendo células que sean Jurkat sin transfectar, es decir, que no sean ni YFP<sup>+</sup> ni azules. Tras elaborar el ROI, se abre la proyección máxima del canal de YFP y ponemos sobre ella los ROIS que se han realizado sobre las células del canal correspondiente a TOM20 y medimos la intensidad de fluorescencia que esas células tienen en el canal amarillo.

## **2. Análisis de mitocondrias con ImageJ**

Primero se realiza una selección de las imágenes que son válidas para el análisis con LAS X, para la selección se establecieron los siguientes criterios: Jurkat formando una sinapsis clara con una única célula presentadora y que se hayan marcado correctamente todos los canales que van a utilizarse para el análisis. Los parámetros que van a ser analizados mediante el uso de ImageJ son: morfología mitocondrial, energización 2D y 3D, polarización hacia la sinapsis y dispersión de las mitocondrias. Primero se extraen todos los canales conteniendo el Z-stack de las células seleccionadas para poder analizarlos en ImageJ, posteriormente de todos los canales de todas las células realizan:

- **“Crops”**: para ello localizamos las células Jurkat transfectadas que se encuentra formando sinapsis con la Raji y sobre el canal original de Mitotracker Red (CMXRos) dibujamos un cuadrado que englobe la célula Jurkat, es importante que no englobe ninguna otra célula para asegurarnos de estar analizando solo las mitocondrias de la que nos interesa. Estos “crops” deben ser del mismo tamaño en todas las células, excepto en aquellas en las que para evitar coger mitocondrias de una que esté muy próxima haya que reducirlo levemente. Tras la creación y guardado de los “crops”, abriremos el Z-“stack cropeado” en el plugin “Mitochondria Analyzer” y haremos un “threshold 3D” con los siguientes valores: “Rolling” = 1.1, “Max Slope” = 1.4, “Block Size” = 1 y “C-Value” = 11. Además, como algoritmo utilizamos el “Weighted Mean”. Guardamos una copia de este “crop thresholdado”.

Serán utilizados para el análisis de morfología mitocondrial, la energización 3D y la dispersión, todo ello se explicará más adelante.

- **Creación de ROIs para región sináptica y mitad no sináptica**: primero se realiza un ROI rodeando la célula Jurkat transfectada (YFP<sup>+</sup>) que hace sinapsis con la presentadora y

lo guardaremos como “célula”, tras esto se calcula y representa el centro geométrico de la célula. Se dibuja una línea paralela al contacto sináptico entre ambas células (línea SI), tras esto sobre esa línea se dibuja otra exactamente igual que se moverá hasta pasar por la esquina superior del cuadrado que representa el centro celular (línea centro). En este punto ya tenemos la célula dividida en 2 mitades, por lo que haremos una selección de cada mitad por separado y las guardaremos como “mitad sináptica” y “mitad no sináptica”. Se guardan esos 3 ROIs usando Control + T.

Los ROIs guardados: célula, mitad sináptica y mitad no sináptica los usaremos a continuación para la energización 2D y para la polarización.

### **Morfología Mitocondrial:**

Sobre el “crop thresholdado” en formato TIF de cada célula, utilizaremos el plugin Mitochondria Analyzer y su herramienta 3D “análisis per cell”. Haremos esto en todas las células y generaremos en Excel 2 tablas una con los resultados para el grupo control (shControl-YFP) y otro para el interferido (shFMNL1-YFP).

### **Energización 2D:**

Usaremos los ROIs de las mitades celulares, para cada célula sobre el canal del Mitotracker RED (CMXRos) previamente “thresholdado” mediremos la Intensidad Media fluorescencia (IMF) de CMXRos en los 3 ROIs guardados: célula, mitad sináptica y mitad no sináptica. Además, calcularemos las siguientes ratios: IMF Mitad sináptica/IMF célula y IMF Mitad Sináptica/IMF Mitad no Sináptica.

Apuntaremos todos los datos en 2 tablas Excel, 1 para el grupo control (Sh-Control-YFP) y otra para el grupo interferido en FMNL1 (ShFMNL1-YFP) para al finalizar poder compararlos.

### **Energización 3D:**

Sobre los “crops thresholdados” en formato TIF, utilizaremos el plugin “Mitochondria Analyzer” y de ahí en el “Analyzer Manager” seleccionaremos “Display 3D Mito ROIs” para generar ROIs tridimensionales que rodearán en 3D todas las mitocondrias del “crop”. Una vez obtenidos, abrimos el “crop sin thresholdear” y de la interfaz que nos sale tras usar el “Display 3D Mito ROIs” usamos el “select all” y “Quantif 3D”, de todos los datos obtenidos nos quedamos con la columna Mean que representa la Intensidad Media de Fluorescencia de CMXRos en cada ROI. Como obtenemos una columna de datos para cada célula, vamos a hacer la media de esos datos, trabajando así con la media de los datos de cada célula.

Hacemos una tabla para el grupo control y otra para el grupo interferido en FMNL1 con las medias de cada célula para posteriormente comparar los resultados obtenidos en una y en otra condición.

#### **Polarización:**

Abrimos para cada célula sobre el canal del TOM20 sobre el que haremos una proyección máxima y usaremos los 3 ROIs: “célula”, “mitad sináptica” y “mitad no sináptica”. Además, calcularemos las siguientes ratios para medir la polarización de las mitocondrias: IMF Mitad sináptica/ IMF célula y IMF Mitad Sináptica/ IMF Mitad no Sináptica. Apuntaremos todos los datos en 2 tablas Excel, una para el grupo control y otra para el grupo interferido en FMNL1 y al finalizar compararemos ambas.

#### **Dispersión:**

Sobre los “crops thresholdados” del canal de Mitotracker Red CMXRos utilizaremos el plugin “Mitochondria Analyzer” y de ahí en el “Analyzer Manager” seleccionaremos “Display 3D Mito ROIs” para generar ROIs tridimensionales para todas las mitocondrias de la imagen. Una vez obtenidos, abrimos el “crop sin thresholdear” y de la interfaz que nos sale tras usar el “Display 3D Mito ROIs” usamos el “select all” y daremos a la opción de “Distances”. Como resultado obtendremos una tabla con las distancias calculadas entre cada mitocondria para todas las mitocondrias de cada célula, nos quedaremos con la columna “cen-cen” que es la que representa la distancia entre los centros de cada uno de los ROIs detectados.

Apuntaremos todos los datos en 2 tablas excel, una para el grupo control y otra para el interferido en FMNL1 así al finalizar podremos comparar. Tras esto, para cada célula de ambas condiciones, calcularemos los parámetros estadísticos: media, desviación estándar y coeficiente de variación.

#### **Análisis de polarización del MTOC con NisAR**

Con el programa NisAR se analizan las imágenes que han sido adquiridas con el microscopio de epifluorescencia. Primero se buscan las sinapsis existentes entre las células Jurkat sin transfectar (YFP<sup>-</sup>), transfectadas (ShControl-YFP, ShFMNL1-YFP) y las Raji (CMAC<sup>+</sup>, azules), haremos un ROI que rodee a la célula Jurkat y una línea desde el centro de esa célula hacia la sinapsis (línea B) y nos apuntaremos esa distancia, después cambiaremos al canal del MTOC y haremos una línea desde la mitad del MTOC hasta el centro de la célula (línea A), paralela a la línea B, esa distancia se apuntará en positivo si el MTOC está hacia la sinapsis inmunitaria y en negativo si está en

dirección contraria a la sinapsis. Hacemos esto con todas las células de los 3 grupos (ShControl-YFP, ShFMNL1-YFP, e YFP<sup>-/-</sup>) y después calculamos la ratio A/B para cada grupo celular.

### **Análisis estadístico**

Todos los análisis estadísticos del trabajo se realizaron utilizando Test de la T de Student para varianzas desiguales de Excel, considerando diferencias estadísticamente significativas aquellas con un valor-p < 0,05.

### **Elaboración de figuras y gráficos**

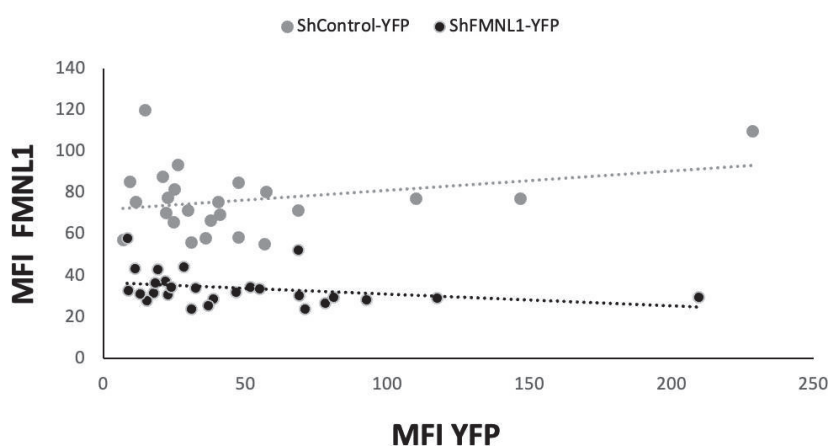
Se realizaron los gráficos en Excel y después se editaron en Adobe Illustrator.

Todas las figuras que contienen imágenes se han realizado con Adobe Illustrator.

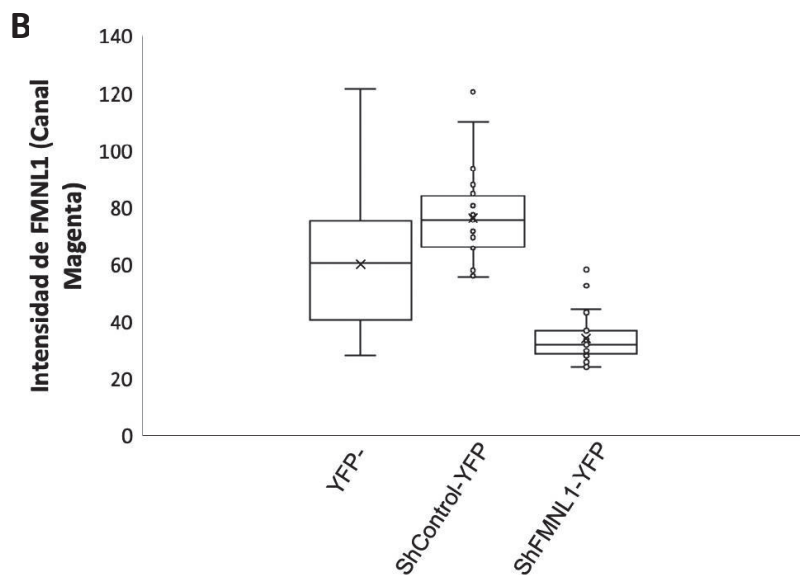
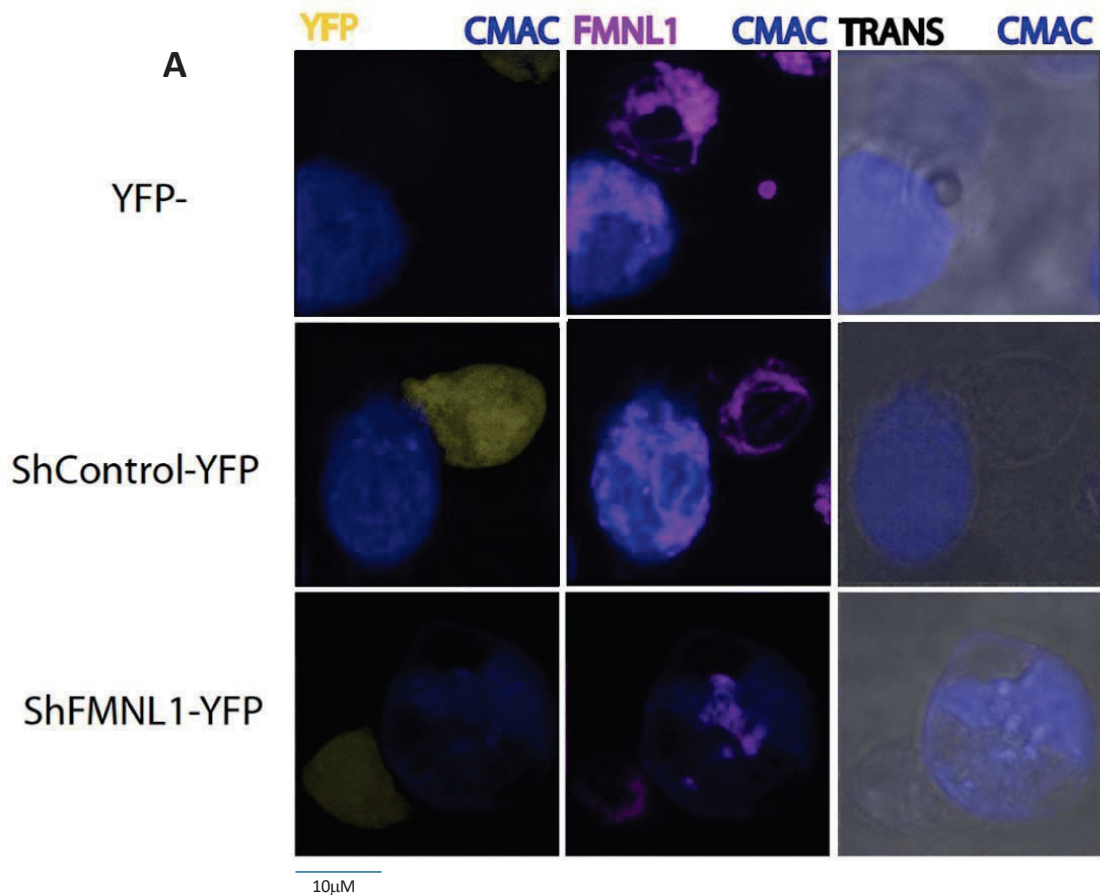
## CAPÍTULO III: RESULTADOS

### Interferencia de FMNL1 endógeno

Se realizó la transfección de las células Jurkat C3 con el plásmido ShFMNL1-YFP que nos permite saber que las células que emitan fluorescencia amarilla (YFP<sup>+</sup>) se han transfectado correctamente. Los linfocitos T transfectados se ponen en contacto con Linfocitos B recubiertos por SEE para que se produzca la sinapsis entre ambos. Se analizó el éxito de la interferencia midiendo la intensidad media de fluorescencia (IMF) en condiciones control y en condiciones interferidas para los canales YFP (canal amarillo) y FMNL1 (canal magenta), para ello se realizó un ROI alrededor de las células YFP<sup>+</sup> que aparecían en cada condición. Los resultados obtenidos del IMF para la condición control fue de 74 (n = 24) para el canal de FMNL1 y de 42 (n = 24) para el de YFP y para la interferida en el canal de FMNL1 fue de 34.1 (n = 27) y para el de YFP de 47.7 (n = 27). Se puede observar cómo en ambos casos la fluorescencia de YFP es similar, significando esto que ambas tienen una cantidad de plásmido similar (al tener una cantidad de YFP similar) y que en la condición control la cantidad de FMNL1 es significativamente superior a la de la condición interferida, con un valor de significancia de 3.02E-13. Observándose que la transfección ha ocurrido correctamente y se ha producido la interferencia de FMNL1 (Figura 3). Además, con los datos obtenidos, se aprecia una tendencia en la que al aumentar la cantidad de YFP (cantidad de plásmido interferente, ShFMNL1-YFP) disminuye la intensidad de FMNL1, corroborando que, a mayor cantidad de plásmido, mayor es la interferencia, por el contrario, en el caso de la condición control, se observa una tendencia a aumentar (Figura 2). Además, se utilizó la medición de YFP<sup>-</sup> (células no transfectadas) como control interno de cada pocillo, obteniéndose para el canal de FMNL1 un MFI = 56,5 con una n = 39.



**Figura 2.** Representación gráfica de la relación entre la MFI de FMNL1 y la MFI de YFP para las células Jurkat transfectadas con los plásmidos ShControl-YFP (n=24) y ShFMNL1-YFP (n=27).

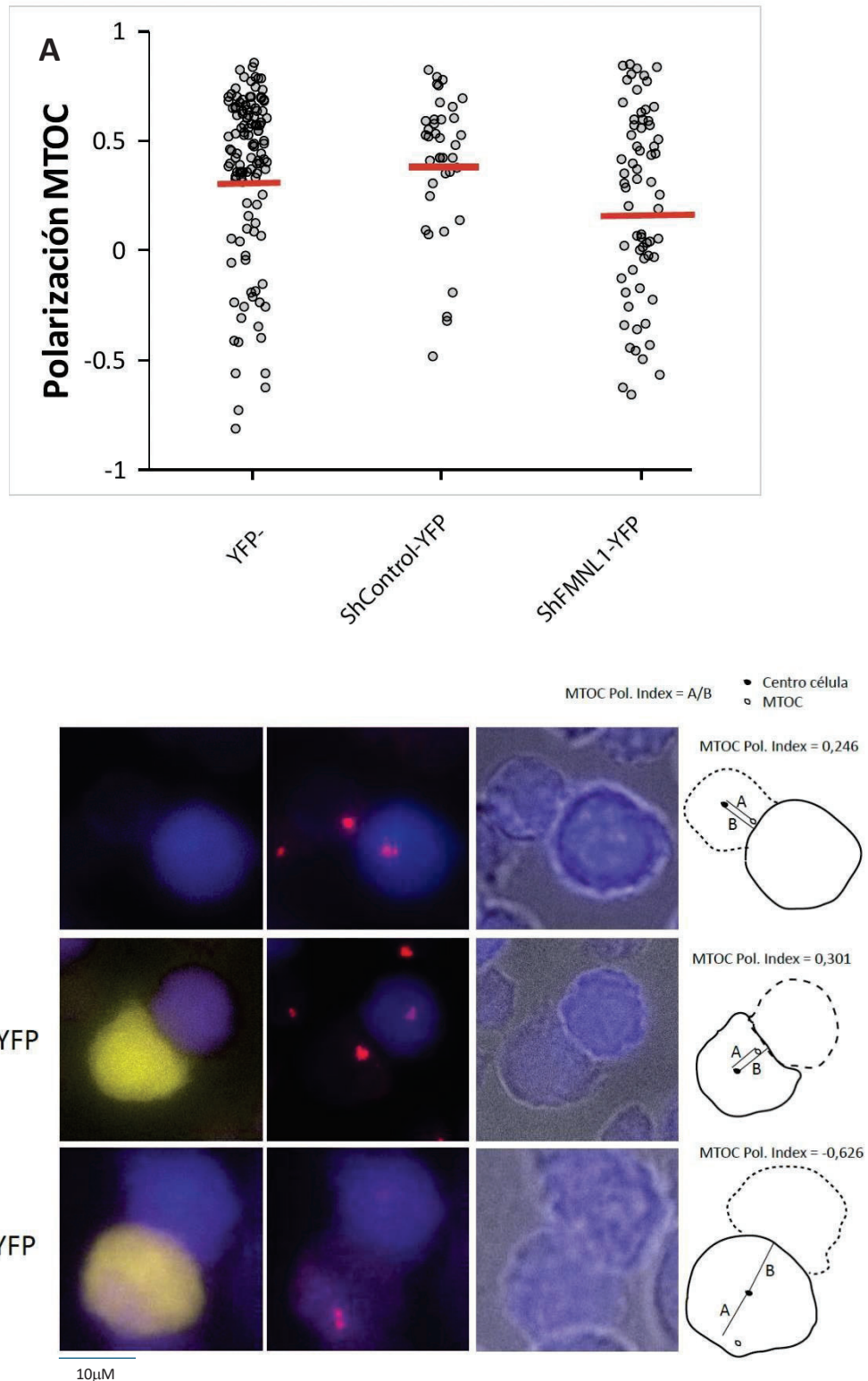


**Figura 3: Análisis de la expresión de FMNL1 en células Jurkat transfectadas con plásmido ShFMNL1-YFP y ShControl-YFP. A)** Imagen que representa la señal de fluorescencia de FMNL1 las células transfectadas Jurkat con ShControl-YFP y SHFMNL1-YFP formando sinapsis con células Raji. Las células Jurkat están transfectadas con YFP (amarillo), marcadas en FMNL1 (magenta) y la transmitancia (TRANS) y las células Raji acivadas con SEE y marcadas con CMAC (azul). **B)** Representación de MFI para FMNL1 para las células Jurkat sin transfectar (YFP-) y para las transfectadas con ShControl-YFP y ShFMNL1-YFP. La línea horizontal representa la mediana y la cruz la media. \*\*\*Diferencia significativa con un p-valor = 3.02E-13\*\*\*.

## **Papel de FMNL1 en la polarización del MTOC hacia la sinapsis inmunitaria en células**

### **Jurkat**

Una vez que comprobamos en el apartado anterior que la interferencia en FMNL1 se producía, se ha evaluado si la interferencia de FMNL1 afecta a la posición del MTOC respecto a la sinapsis inmunitaria, para ello, se usaron 2 plásmidos, ShControl-YFP y ShFMNL1-YFP, tras realizar los experimentos detallados en el apartado de material y métodos, durante la fase de estudio de imagen, se observó, gracias al marcaje del MTOC (rojo) que en la condición de FMNL1 interferido (grupo ShFMNL1-YFP), la polarización del MTOC no era hacia la SI, y que en muchos casos era hacia el lado opuesto a donde se producía la SI, esto se visualizó gracias al marcaje del MTOC (rojo). Para cuantificar los resultados, se calculó el índice de polarización (IP), obteniendo un IP = 0,362 (n =117) para la condición YFP<sup>-</sup> que se utiliza como control interno, un IP = 0,404 (n = 38) para la condición ShControl-YFP y para las transfectadas con ShFMNL1-YFP un IP = 0,224 (n = 65). Los resultados de IP obtenidos para los grupos ShControl-YFP e YFP<sup>-</sup>, son muy similares, ya que ninguno de ellos presenta FMNL1 interferido y en ambos casos se produce la polarización del MTOC hacia la SI con buena eficiencia (valores IP altos) y de manera similar. Sin embargo, el IP para la condición interferida, es significativamente inferior a ambas condiciones control, lo que refleja una menor eficiencia la polarización del MTOC hacia la SI, se realizó un T-test para varianzas desiguales para evaluar si existía significancia estadística, obteniéndose que es significativo con un p-valor=0,0166 al comparar ShControl-YFP y ShFMNL1-YFP, también es significativo con un p-valor=0,03 al comparar ShFMNL1-YFP e YFP<sup>-</sup> y no significativo con un p-valor=0,51 al comparar ShControl-YFP e YFP<sup>-</sup> (Figura 4) . Esto permite corroborar que la formina FMNL1 es necesaria para la polarización del MTOC durante la SI. Estos resultados se corresponden con la necesidad de la formina FMNL1 para la polarización eficiente del MTOC durante la formación de la sinapsis inmunitaria, probablemente debido a su papel en la regulación del citoesqueleto y el tráfico intracelular en linfocitos T activados<sup>(5)</sup>.



**Figura 4. Análisis del índice de polarización del MTOC en células Jurkat sin transfectar (YFP-) y transfectadas con los plásmidos ShControl-YFP y ShFMNL1-YFP. A)** Representación gráfica del IP en YFP- (n = 117) y en células transfectadas con Shcontrol-YFP (n = 38) y ShFMNL1-YFP (n= 65). La línea roja representa la media, existe diferencias \*\*\*estadísticamente significativas (T-test con varianzas desiguales) entre el grupo ShControl-YFP y ShFMNL1-YFP (p-valor < 0,05) \*\*\*. **B)** Imagen que representa la polarización del MTOC en células Jurkat YFP- y en transfectadas, Shcontrol-YFP y ShFMNL1-YFP, en las tres condiciones formando SI con células Raji. Las células Raji están marcadas con CMAC (azul) y las células Jurkat transfectadas con YFP (amarillas), el MTOC (rojo) marcado con Pericentrina y la transmitancia (TRANS). A la derecha se esquematiza el proceso de medición del IP del MTOC, la línea continua representa la célula Jurkat y la discontinua la célula Raji.

### **Papel de FMNL1 en la morfología mitocondrial durante la sinapsis inmunitaria**

Tras comprobar que la interferencia en FMNL1 afecta la polarización del MTOC hacia la sinapsis inmunitaria, se evaluó si FMNL1 también influye en la morfología mitocondrial. Se analizaron múltiples parámetros: “count”, “total volumen”, “mean volumen”, “total surface área”, “mean surface área”, “sphericity (weighted)”, “branches”, “branches/mito”, “total branch length”, “total branch length/mito”, “mean branch length”, “branch junctions”, “branch junctions/mito”, “branch end points”, “branch end points/mito” y “mean branch diameter”. Cada parámetro fue comparado entre control (shControl-YFP) e interferidos en FMNL1 (shFMNL1-YFP) mediante un T-test para varianzas desiguales obteniéndose en todos los parámetros medidos un p-valor > 0,05. No se identificó una diferencia significativa en ningún parámetro, pero se observaron algunos resultados con tendencias diferentes entre control e interferidas, como “Branch Junctions”, en lo que se obtuvieron: 48,15 (n = 48) en el control frente a 53,69 (n = 61) en la condición interferida, siendo el p-valor = 0,34. En los “branches” se obtuvieron 120,3 (n = 48) en el control frente a 136,15 (n = 61) en la condición interferida, siendo el p-valor 0,19. Lo mismo pasa para los “branches length”, siendo de 131 (n = 48) para el control y de 146,7 (n = 61) para la interferida, siendo el p-valor = 0,24. En las “Branch end points” se observa para el control un valor de 85,6 (n = 48) y para la interferida de 96,1 (n = 61), siendo el p-valor = 0,13 (Figura 5). Este incremento en los parámetros relacionados con los “branches” en las células interferidas en FMNL1, indica una mayor ramificación de la red mitocondrial, probablemente debida a una disminución en los eventos de fisión o un aumento de la fusión. FMNL1, es una forma implicada en la nucleación y elongación de los filamentos de actina asociados a mitocondrias y regula la fisión mitocondrial mediante ondas de actina en interfase. Su depleción reduce la polarización mitocondrial y altera el balance fusión-fisión y favoreciendo redes más interconectadas<sup>(3)</sup>.

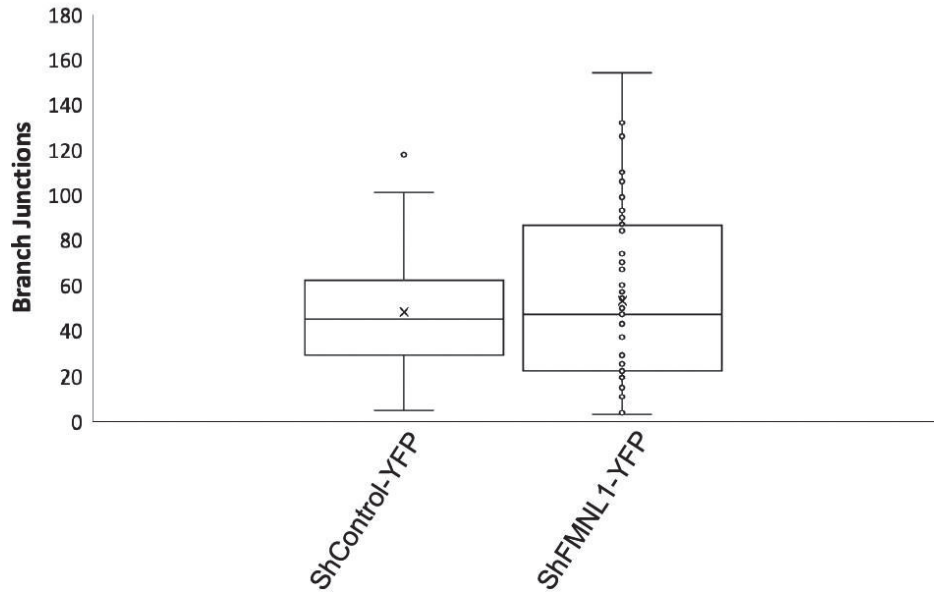
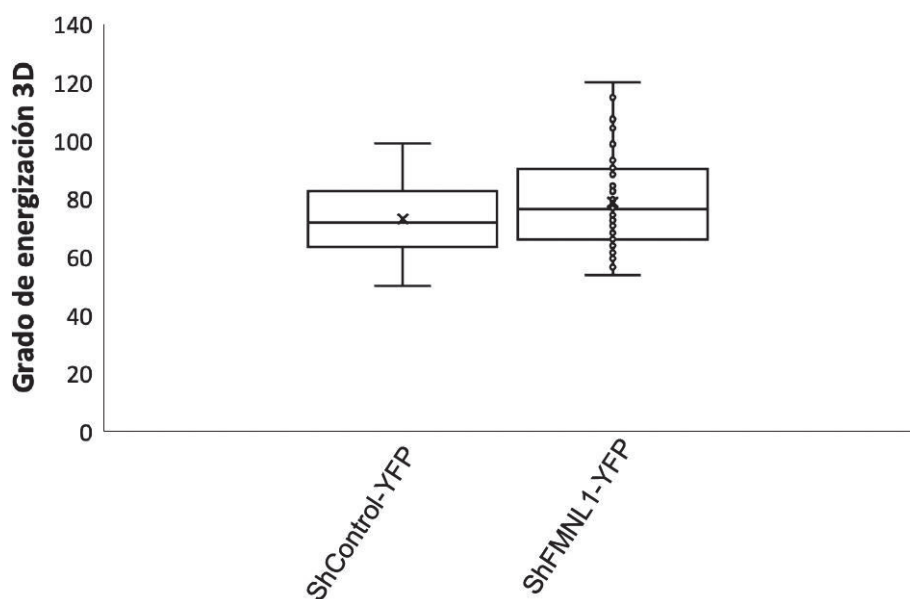


Figura 5. Representación gráfica del parámetro “Branch Junctions” para las células Jurkat transfetadas con los plásmidos ShControl-YFP y ShFMNL1-YFP. La línea horizontal representa la mediana y la “x” representa la media de los datos. No se obtuvieron diferencias significativas al realizar un T-Test para varianzas desiguales, siendo el p-value obtenido de 0,34.

### **Papel de FMNL1 en la energización mitocondrial durante la SI**

Además de evaluar la morfología mitocondrial, se analizó el papel de FMNL1 en la energización mitocondrial mediante dos enfoques experimentales: por un lado, la cuantificación de la energización en un sistema bidimensional (2D), y por otro, en un sistema tridimensional (3D). La energización mitocondrial en sistemas 3D, en la matriz extracelular y en orgánulos como las mitocondrias, reproduce de forma más fiel la compleja organización espacial y mecánica de los tejidos, en comparación con los sistemas 2D, que no representan adecuadamente la forma celular, el transporte intracelular ni la señalización celular compleja. En el caso de células inmunes, estas condiciones estructurales son fundamentales, ya que la migración, la polarización y la formación de sinapsis dependen directamente de la organización tridimensional del entorno<sup>(12)</sup>. Debido a esto se analizaron ambos parámetros para ver si se comportaban de la misma manera o no.

En ambos casos, los datos fueron analizados mediante un test t de Student para muestras con varianzas desiguales, comparando el grupo control (shControl-YFP) con el interferido en FMNL1 (shFMNL1-YFP). El análisis estadístico no reveló diferencias significativas en la energización mitocondrial en 2D. Sin embargo, en el sistema 3D si hubo diferencia significativa en la condición interferida (p-valor = 0,037), con una media de energización de 73,136 para la condición control y de 78,845 para la condición shFMNL1-YFP (Figura 6).



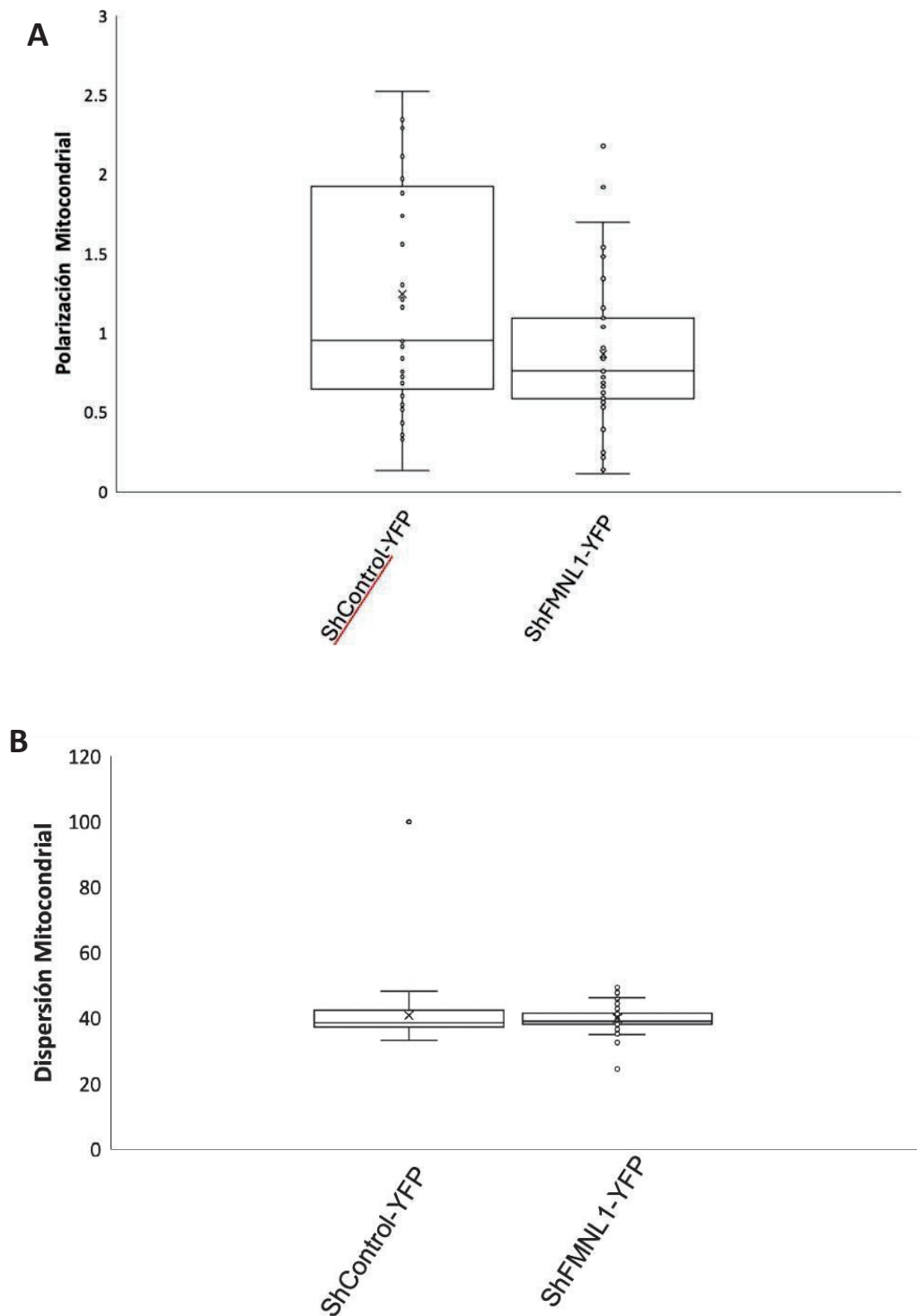
**Figura 6. Representación gráfica del grado de energización en células Jurkat C3 transfectadas con los plásmidos ShControl-YFP y ShFMNL1-YFP.** Se representan el rango de valores que tiene la energización mitocondrial para cada condición. La línea horizontal representa la mediana y la "x" representa la media. Se hizo un T-Test para varianzas desiguales, obteniendo una \*\*\*diferencia significativa, con un p-valor = 0,037\*\*\*.

### **Papel de FMNL1 en la polarización y dispersión mitocondriales durante la SI**

Una vez analizado que la interferencia en FMNL1 parecía afectar algunos parámetros mitocondriales, se observó que la interferencia en FMNL1 produjo cambios significativos en la polarización de las mitocondrias hacia la sinapsis: el Índice de Polarización mitocondrial fue 1,335 (n = 48) en el control y de 0,9 (n = 59) en la condición interferida en FMNL1 (Figura 7A). La significación estadística es de 0,00066.

En cuanto a la dispersión mitocondrial, no se encuentran diferencias significativas, sin embargo, observamos un índice ligeramente más elevado en la condición control (41 con una n = 46) que en la interferida (40 con una n = 62), lo que sugiere que la red mitocondrial es más uniforme y concentrada sin interferencia de FMNL1 (Figura 7 B). Esto respalda la función de FMNL1 como un nucleador y elongador de actina que modula la motilidad y reubicación de las mitocondrias mediante ondas de actina; su ausencia reduciría la capacidad de las mitocondrias para dispersarse apropiadamente<sup>(3)</sup>.

Finalmente, ya que se ha comprobado anteriormente que FMNL1 interviene en la reorganización espacial del citoesqueleto, contribuyendo a la formación de polaridad intracelular, y se podría especular que favorece la distribución heterogénea de mitocondrias; su interferencia conduce, por tanto, a una red mitocondrial más compacta y menos distribuida<sup>(9)</sup>.



**Figura 7. Representación gráfica de las diferencias existentes entre el índice de polarización de las mitocondrias y la dispersión mitocondrial entre el grupo de células Jurkat transfectadas con el plásmido ShControl-YFP y con ShFMNL1-YFP. A)** Se representa el índice de polarización mitocondrial para ambas condiciones. La línea horizontal representa la mediana y la “x” la media. Al realizar un T-Test para varianzas desiguales muestra \*\*\*diferencias significativas, obteniéndose un p-valor=0,00066\*\*\*. **B)** Se representa el rango de valores de dispersión mitocondrial para ambas condiciones. La línea horizontal representa la mediana y la “x” la media. Al realizar un T-test para varianzas desiguales no se obtuvieron diferencias significativas entre ambas condiciones.

## **CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN**

Durante este trabajo se realizó en primer lugar la confirmación de la transfección de las células C3 Jurkat tanto con los plásmidos ShControl-YFP y el ShFMNL1-YFP, para esto se observó mediante microscopía de fluorescencia visualizándose células YFP<sup>+</sup> en ambas condiciones, confirmando así una correcta transfección. Tras esto, se analizaron las células obtenidas YFP<sup>+</sup> midiendo la IMF de FMNL1 y de YFP en ambos grupos, obteniéndose mucha mayor cantidad de FMNL1 en el control que en las interferidas (Figura 2), confirmándose así una transfección e interferencia eficientes, lo que refleja que los plásmidos transfectan correctamente las células Jurkat y la proporción de células transfectadas es similar en ambas condiciones, pudiéndose descartar que las diferencias obtenidas en los siguientes análisis se deban a diferencias en la tasa de transfección entre ambos grupos.

Como siguiente paso, se estudió el efecto de la interferencia de la forma de FMNL1 en la polarización del MTOC, lo que se observó es que en las células que tienen FMNL1 interferido, hay una menor tendencia en la polarización del MTOC hacia la sinapsis inmunitaria que en las células de la condición control y en las YFP<sup>-</sup> no transfectadas). Esto se explica en base a que las forminas como FMNL1 se encargan de la reorganización del citoesqueleto de F-actina, para esto eliminan la actina que se encuentra en el centro de la SI, que es lo que permite la interacción de los microtúbulos del MTOC con la F-actina cortical, permitiendo la polarización de este hacia la sinapsis inmunitaria y su acoplamiento a la membrana<sup>(3)</sup>.

Posteriormente, se ha estudiado el efecto que tiene esta interferencia en FMNL1 sobre distintos aspectos de la dinámica y morfología mitocondrial. En primer lugar, se estudió la afectación a la morfología mitocondrial, al analizar los resultados se observa que los parámetros relacionados con el “branching” y con la ramificación mitocondrial son en los que se producen mayores diferencias entre los grupos (Shcontrol-YFP y ShFMNL1-YFP) y estos son: “branches” (120,3 para el control y 136,1 para las interferidas), “branches length” (131 para el control y 146,7 para las interferidas), “Branch junctions” (48,4 para el control y 53,7 para las interferidas) y “Branch junctions/mito” (para el control 85,6 y 96,1 para las interferidas). En ninguno de ellos la diferencia es significativa, pero sí que hay una tendencia en todos ellos hacia un aumento de los en los linfocitos Jurkat interferidos en FMNL1 respecto a las del grupo control. Estos resultados, se explicarían debido a que FMNL1 está implicado en la formación de la onda de F-actina interfásica que está implicada en el posicionamiento y reorganización de orgánulos como las mitocondrias<sup>(3)</sup>. Además, hay estudios en los que se ha visto que la interferencia de FMNL1 con

siRNA elimina la formación de esa onda, afectando a los efectos de fusión y fisión mitocondrial que son esenciales para el correcto funcionamiento de las mitocondrias, por lo que esta interferencia produce una disminución de los procesos de fusión y fisión mitocondrial<sup>(3)</sup> y esto es lo que produciría los cambios en el incremento en el número de ramas, mayor longitud de las ramificaciones y mayor número de uniones o "junctions", que son variaciones consistentes con las que se han caracterizado en este estudio. Lo observado en mis resultados concuerda con que la pérdida de FMNL1 produzca la pérdida de la guía responsable de la localización, forma y organización mitocondrial<sup>(6)</sup>. La dinámica de fusión-fisión mitocondrial está regulada por proteínas GTPasas como Drp1, MFN1/2 y OPA1, y la F-actina desempeña un rol clave en la fisión al propiciar la constricción mediante contactos ER-mitocondria, favoreciendo el reclutamiento de Drp1<sup>(7)</sup>. Debido a la tendencia de aumento que se observa en todos los parámetros relacionados de los "branches" y a los estudios previos que corroboran una relación entre la interferencia de FMNL1 y el aumento en esos parámetros<sup>(7)</sup>, considero importante realizar más experimentos en las mismas condiciones, debido a que estos resultados están basados en dos experimentos, saliendo con los datos de ambos no significativos, pero dentro de uno de ellos sí que era significativo, mientras que en el otro se obtenía lo contrario a lo esperado, lo más correcto sería repetir el experimento para asegurar que esos resultados inesperados no se deban a algún fallo durante el procedimiento.

El siguiente parámetro estudiado fue la energización mitocondrial, este parámetro fue evaluado en su forma 2D y en su forma 3D, no encontrándose diferencias significativas entre ambas condiciones (control e interferidas) en la primera, pero sí en la segunda. En la energización 3D se obtuvo un aumento significativo de la energización 3D en la condición interferida en FMNL1 respecto al control. En estudios previos, se ha demostrado que en los modelos 3D se refleja con mayor precisión la fisiología celular real que en los 2D, ya que estos están limitados respecto a señalización, transporte intracelular, polarización y organización celular. Esto hace pensar que interferir FMNL1 afecta a la energización mitocondrial solo en aquellas situaciones en las que la estructura tridimensional es especialmente importante, como ocurre durante la formación de una SI, debido a que esta influye en gran medida a los linfocitos T a nivel de metabolismo, polarización y función<sup>(6)</sup>. Además, hay estudios en los que se ha interferido FMNL1 con siRNA y se observa una reducción del potencial de membrana y del consumo de oxígeno, pero un aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS), evidenciando que FMNL1 es importante en la bioenergética mitocondrial<sup>(12)</sup>. Mis resultados no se corresponden con los obtenidos en ese último artículo, esto puede deberse a que las células utilizadas en el artículo eran HeLa<sup>(3)</sup> y no

células inmunes estimuladas en un contexto de sinapsis, siendo células muy diferentes entre sí y pudiendo diferir, dependiendo del tipo celular, el efecto de la interferencia de FMNL1 en los efectos que esta tenga sobre la energización mitocondrial.

Para finalizar se estudió la influencia de la interferencia de FMNL1 en la polarización y la dispersión de las mitocondrias durante la SI. En cuanto a la polarización, se obtiene una disminución significativa entre la condición interferida en FMNL1 y el grupo control, esto se podría explicar debido a que FMNL1 está implicada en la reorganización de la actina cortical necesaria para que las mitocondrias se sitúen en el centro de la SI<sup>(3)</sup>. Además, esta polarización mitocondrial es importante para el suministro de ATP y la regulación del calcio durante la activación de los linfocitos T<sup>(13)</sup>, por lo que puede causar problemas en el funcionamiento de la sinapsis. Respecto a la dispersión mitocondrial, no hay diferencias significativas entre ambos grupos celulares (interferidas y control), sin embargo, sí que se aprecia un mayor coeficiente de dispersión en la condición control que en la interferida. Por lo que FMNL1 parece influir ligeramente en que la red mitocondrial sea menos uniforme porque la organización correcta del citoesqueleto promueve la cohesión. Debido a esto la interferencia de FMNL1 puede provocar una menor capacidad para mantener una organización mitocondrial provocando así una menor dispersión en la red<sup>(3)</sup>. Sin embargo, el grado de afectación a nivel de dispersión es mínimo, esto podría deberse a que la influencia de FMNL1 sobre este parámetro es menor que sobre los demás estudiados en este trabajo o a que hay otras formas o proteínas que son más importantes que FMNL1 en este proceso o que son capaces de mantener la dispersión incluso en ausencia de FMNL1. La dispersión mitocondrial podría relacionarse con el grado de fisión mitocondrial que se produzca, debido a que, a mayor fisión, las mitocondrias son más pequeñas y móviles, pudiendo así desplazarse y distribuirse más heterogéneamente, mientras que, si disminuyen los procesos de fisión, las mitocondrias serán más grandes y alargadas permaneciendo más estáticas y produciendo una distribución menos heterogénea. Está estudiado que la proteína Drp1 es clave en el proceso de fisión y fusión mitocondrial, tanto que su silenciamiento bloquea la fisión mitocondrial y la polarización de estas hacia la SI<sup>(6)</sup>. Esto explicaría que, aunque se interfiera FMNL1, si Drp1 se encuentra en estado nativo y se activa, los procesos de fisión seguirán produciéndose correctamente y no se vería alterada la dispersión mitocondrial. La pequeña variación que se ve en mis resultados podría indicar una ligera influencia de FMNL1 los procesos de fisión, sería interesante en un futuro estudiar si hay interacción entre Drp1 y FMNL1 y la localización de FMNL1 en los sitios de fisión mitocondria-RE.

## **CAPÍTULO V: CONCLUSIONES**

- FMNL1, cuando es interferida, genera alteraciones morfológicas y funcionales en las mitocondrias que reflejan su implicación en la organización del citoesqueleto de actina.
- La bioenergética mitocondrial se ve afectada cuando FMNL1 está interferida, se requieren estudios adicionales para conocer los mecanismos responsables, en particular de la función drp1 en ello.
- La polarización del MTOC hacia la SI se ve comprometida tras la interferencia de FMNL1, lo que sugiere que esta forma es esencial para la formación de estructuras que guían su reposicionamiento y anclaje.
- La redistribución mitocondrial hacia la SI se ve notablemente reducida en células con FMNL1, observándose en cambio una acumulación mitocondrial en el polo opuesto.
- La dispersión mitocondrial durante la SI no parece verse significativamente modificada cuando FMNL1 es interferida.

## **CAPÍTULO VI: BIBLIOGRAFÍA**

1. Herranz G, Aguilera P, Dávila S, Sánchez A, Stancu B, Gómez J, et al. Protein Kinase C  $\delta$  Regulates the Depletion of Actin at the Immunological Synapse Required for Polarized Exosome Secretion by T Cells. *Front Immunol* [Internet]. 26 de abril de 2019 [citado 1 de julio de 2025];10. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2019.00851/full>
2. Reyes Martín E, Prieto Martín A, Monserrat Sanz J, Álvarez-Mon Soto M. La sinapsis inmunológica. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*. 1 de marzo de 2013;11(28):1737-41.
3. Coscia SM, Moore AS, Thompson CP, Tirrito CF, Ostap EM, Holzbaur ELF. An interphase actin wave promotes mitochondrial content mixing and organelle homeostasis. *Nat Commun*. 7 de mayo de 2024;15(1):3793.
4. Moore AS, Wong YC, Simpson CL, Holzbaur ELF. Dynamic actin cycling through mitochondrial subpopulations locally regulates the fission–fusion balance within mitochondrial networks. *Nat Commun*. 30 de septiembre de 2016;7(1):12886.
5. Gomez TS, Kumar K, Medeiros RB, Shimizu Y, Leibson PJ, Billadeau DD. Formins Regulate the Actin-Related Protein 2/3 Complex-Independent Polarization of the Centrosome to the Immunological Synapse. *Immunity*. 23 de febrero de 2007;26(2):177-90.
6. Baixauli F, Martín-Cófreces NB, Morlino G, Carrasco YR, Calabia-Linares C, Veiga E, et al. The mitochondrial fission factor dynamin-related protein 1 modulates T-cell receptor signalling at the immune synapse. *The EMBO Journal*. 6 de abril de 2011;30(7):1238-50.
7. Korobova F, Ramabhadran V, Higgs HN. An Actin-Dependent Step in Mitochondrial Fission Mediated by the ER-Associated Formin INF2. *Science*. 25 de enero de 2013;339(6118):464-7.
8. Andrés-Delgado L, Antón OM, Alonso MA. Centrosome Polarization in T Cells: A Task for Formins. *Front Immunol* [Internet]. 11 de julio de 2013 [citado 1 de julio de 2025];4. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2013.00191/full>
9. Bello-Gamboa A, Velasco M, Moreno S, Herranz G, Ilie R, Huetos S, et al. Actin reorganization at the centrosomal area and the immune synapse regulates polarized secretory traffic of multivesicular bodies in T lymphocytes. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2020;9(1):1759926.
10. Ruiz-Navarro J, Fernández-Hermira S, Sanz-Fernández I, Barbeito P, Navarro-Zapata A, Pérez-Martínez A, et al. Formin-like  $1\beta$  phosphorylation at S1086 is necessary for secretory polarized traffic of exosomes at the immune synapse in Jurkat T lymphocytes. Campelo F, editor. *eLife*. 31 de octubre de 2024;13:RP96942.
11. Colón-Franco JM, Gomez TS, Billadeau DD. Dynamic remodeling of the actin cytoskeleton by FMNL1y is required for structural maintenance of the Golgi complex. *Journal of Cell Science*. 15 de septiembre de 2011;124(18):3118-26.

12. Vianello C, Dal Bello F, Shin SH, Schiavon S, Bean C, Magalhães Rebelo AP, et al. High-Throughput Microscopy Analysis of Mitochondrial Membrane Potential in 2D and 3D Models. *Cells*. enero de 2023;12(7):1089.
13. Quintana A, Schwindling C, Wenning AS, Becherer U, Rettig J, Schwarz EC, et al. T cell activation requires mitochondrial translocation to the immunological synapse. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 4 de septiembre de 2007;104(36):14418-23.