



# Expressió diferencial i funció de les isoformes de l'immunoreceptor de la família SLAM CD84 en malalties autoimmunes

M<sup>a</sup>Carme Díaz-Ramos

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE BARCELONA



**Unitat d'Immunologia**

**Departament de Biologia Cel·lular, Immunologia i Neurociències**

**Doctorat en Biomedicina**

**Facultat de Medicina**

**Expressió diferencial i funció de les isoformes de l'immunoreceptor  
de la família SLAM CD84 en malalties autoimmunes**

Memòria presentada per M<sup>a</sup>Carme Díaz-Ramos per optar al títol de doctor per  
la Universitat de Barcelona

Directors de la Tesi:

**Pablo Engel**

**Ricardo Bastos**

Doctorant:

**M<sup>a</sup>Carme Díaz-Ramos**

**SETEMBRE 2014**



*Cada pas recorregut enriqueix al pelegrí i  
l'apropa una mica més a fer realitat els seus somnis*  
*(Paulo Coelho)*



**AGRAÏMENTS**





Qui hagi pujat una muntanya coneixerà la satisfacció de fer el cim. De la mateixa manera, arribar a aquest punt em produeix la sensació de que l'esforç ha valgut la pena. Les persones properes a mi saben que no ha estat un camí fàcil: hi ha hagut pedres i esvorancs que a punt van estar de fer que el cim no s'acabés aconseguint. És per això que darrera d'aquesta tesi avui hi ha molts altres sentiments que intentaré quedin reflectits en aquestes quatre ratlles. El més important és el sentiment d'agraïment a tots els que heu format part d'ella. Gràcies als meus directors de tesi, al Pablo Engel i al Ricard Bastos per confiar en mi i per tots els coneixements que m'heu ensenyat durant aquest temps. Gràcies a la meua família, ja que mai us podré agrair tot el que m'heu donat. Vosaltres sou els responsables de que jo avui sigui el que sóc i estigui on estic. Gràcies papa i mama pel vostre incalculable recolzament, pel vostre esforç per donar-me tot el que tinc i per estar sempre al meu costat. I també gràcies *nena*, per ser un exemple de constància, treball, perseverança i lluita. A la meua madrina per interessar-se des del primer moment per les meves investigacions i per creure en mi; segur que el padrí està molt content també 😊.

Aquest doctorat m'ha donat moltíssims coneixements d'immunologia i de biologia que la meua formació en química no em va donar, però si m'he de quedar amb alguna cosa d'aquests anys és amb les relacions personals inoblidables que he anat fent. Gràcies a tots els meus companys, els que queden i als que han passat; a la Laia per ensenyar-me com era una cèl·lula al microscopi, i per posar-me a fenotipar a l'endemà d'entrar...jeje. A la Jessica, per acompanyar-me en els primers mesos de doctorat; al Nel, (te veo flácido ;)); a l'Adri, sempre al peu del canó, ja sigui per fer unes rises a cultius com per fer 4 fusions (pim pam!). Al Jordi, enciclopèdia amb potes, portador del *bonrotllisme* i buffer del grup. A la Marteta, sempre a punt per donar un cop de mà, ens veiem a la pista de ball ;). Als Angulos: Natàlia, molts ànims que ja ho tens!, Pablo...no te preocupes que cuando seamos independientes podrás seguir trabajando aquí... i a l'Angela, gracias por las extracciones!

El trasllat al CEK ens va portar moltes coses positives; una d'elles va ser que de cop vam tenir molts nous companys. Gràcies als "Pacos" per ser uns veïns tan divertits: al Màrius per delectar-nos amb la seva música; a la Marta pel contraban d'anticossos; a l'Escoda i la Miró pels concerts a cultius (com els trobo a faltar...), a la Esther Carrasco per la seva complicitat; a la Noe per la seva disponibilitat i saber fer. A Marina, Inés, Marc y Vanesa, gracias por los mediodías compartidos (Inés, *keep in touch gonnafitter* ;)). Gràcies a les noies de Micro per aglutinar la banda pati de la planta: esos partiditos de voley, a ver si los retomamos ;). Heu sigut tots uns companys envejables, us trobaré molt a faltar. Gràcies a tots els voluntaris sans que heu format part de l'estudi clínic, a tots els que m'heu donat uns mil·lilitres de la vostra sang quan em passejava "cual vampiresa" per



la planta recaptant voluntaris. Gràcies a la Cristina Canaleta per la paciència (tranqui, ja no imprimiré més :P). Gràcies també als Dr. Juan Cañete i Dr. Gerard Espinosa per passar-nos les mostres dels pacients.

Gràcies també a tots els meus amics que han viscut aquest camí des del primer dia. Als meus compis de la uni: la Noe, la Glo, l'Angi i el Jordi; per la continuïtat de les Concòrdies! Al Miquel i la Montse, que tot i estar lluny sempre hi són. A les meves amigues de l'escola, en especial a la Montsi que estant a l'altra punta del món aconseguix que la sentim molt propera. Al Sera, per estar sempre que cal. I també gràcies als que tot i no fer molts anys que ens coneixem, han sigut el meu tub d'escapament. A les NeNeS: la Mireia, la Laura, la Maria i la Rosa, per fer pinya en els moments importants; als chimposos, per estar sempre disponibles per fer uns bailoteos; als *aventureros*, tot-terrenys per fer una paella o una ferrata... i a tots els que en major o en menor mida heu format part d'aquesta etapa de la meua vida. A tots els que heu tingut unes paraules d'ànims quan les forces flaquejaven; al Dani, super artista i autor de la il·lustració de la portada d'aquesta tesi, gràcies crack!

Per últim però no menys important, gràcies als meus nous companys de feina: a la Núria i al Ramon per confiar en mi; al Jordi per la seva paciència i empatia; a l'Ester (pajaritoooo!!), a la Joana, al Ricard i al Guitart (quan fem un pàdel? ;)), i a tots els meus nous companys que des del primer dia m'han acollit com una més. Moltes gràcies.

**CONTINGUT**





<b>I. ABREVIATURES .....</b>	<b>1</b>
<b>II. INTRODUCCIÓ.....</b>	<b>7</b>
1. ELS RECEPTORS DE MEMBRANA DELS LEUCÒCITS .....	9
1.1. LES MOLÈCULES CD .....	11
1.2. LA SUPERFAMÍLIA DE LES IMMUNOGLOBULINES .....	12
1.2.1. LA FAMÍLIA SLAM .....	14
1.2.1.1. Localització genòmica.....	15
1.2.1.2. Estructura i lligands .....	15
1.2.1.3. Motius ITSM.....	16
1.2.1.4. Expressió.....	18
1.2.1.5. Funció .....	18
1.2.1.6. La malaltia limfoproliferativa lligada al cromosoma X (XLP) .....	22
1.2.2. LA PROTEÏNA CD84 .....	22
1.2.2.1. El gen .....	23
1.2.2.2. Estructura i lligand.....	24
1.2.2.3. Expressió.....	26
1.2.2.4. Funció .....	27
2. AUTOIMMUNITAT .....	29
2.1- MECANISMES DE CONTROL DE LA TOLERÀNCIA.....	29
2.2. LUPUS ERITEMATÓS SISTÈMIC .....	33
2.2.1- EL LES.....	33
2.2.2- FISIOPATOLOGIA DEL LES .....	34
2.3 ARTRITIS REUMATOIDE .....	40
2.3.1. FISIOPATOLOGIA DE L'AR .....	41
2.3.2. PATOGÈNESI DE L'AR.....	41
2.3.3. GENÈTICA DE L'AR .....	43
3. <i>SPLICING</i> ALTERNATIU .....	44
3.1- <i>SPLICING</i> DEL PRE-ARN.....	45

3.1.1-MECANISMES D' <i>SPLICING</i> ALTERNATIU .....	46
4. <i>SPLICING</i> I PATOLOGIA .....	47
4.1- <i>SPLICING</i> I AUTOIMMUNITAT .....	48
4.1.1- . <i>SPLICING</i> ALTERNATIU ALS RECEPTORS DE MEMBRANA DEL SISTEMA IMMUNE.....	48
4.1.2- <i>SPLICING</i> EN ELS RECEPTORS SLAM I AUTOIMMUNITAT.....	53
<b>III. HIPÒTESI DE TREBALL.....</b>	<b>57</b>
<b>IV. OBJECTIUS .....</b>	<b>61</b>
<b>V. MATERIALS I MÈTODES .....</b>	<b>65</b>
<b>1. CÈL·LULES .....</b>	<b>67</b>
1.1-CÈL·LULES B .....	67
1.2-CÈL·LULES T .....	67
1.3-CÈL·LULES D'ORIGEN MIELOIDE .....	67
1.4-CÈL·LULES NK.....	67
1.5-ALTRES.....	68
1.6-AÏLLAMENT DE PBMCs DE SANG PERIFÈRICA .....	68
<b>2. ANÀLISI D'EXPRESSIÓ GÈNICA .....</b>	<b>68</b>
2.1- AÏLLAMENT DE L'ARN TOTAL .....	68
2.2- ANÀLISI DE LA QUALITAT DE L'ARN.....	69
2.3- RETRORANSCRIPCIÓ.....	69
2.4- AMPLIFICACIÓ PER PCR.....	70
<b>3. ELECTROFORESI D'ÀCIDS NUCLEICS .....</b>	<b>71</b>
3.1- GEL D'AGAROSA PER ADN.....	71
3.2- GEL DESNATURALITZANT PER ARN .....	72
<b>4. CONSTRUCCIÓ DE PLÀSMIDS.....</b>	<b>72</b>
4.1- CLONATGE DE LES ISOFORMES EN EL VECTOR pGEMT .....	72
4.1.1- L·LIGACIÓ DEL FRAGMENT AMPLIFICAT AMB EL PLÀSMID pGEMT .....	73
4.1.2- SELECCIÓ DE CLONES POSITIVES MITJANÇANT PLAQUES TRACTADES AMB IPTG I XGAL ..	73
4.1.3- TRANSFORMACIÓ DE CÈL·LULES DH5 $\alpha$ AMB EL PRODUCTE DE L·LIGACIÓ.....	74

4.1.4- MINI-PREP DE LES COLÒNIES .....	74
4.1.5- PCR DE SEQÜENCIACIÓ AMB EL PLÀSMID pGEMT.....	75
4.2- LLIGACIÓ DE L'INSERT D'INTERÈS AMB EL PLÀSMID pDISPLAY .....	76
<b>5. PRODUCCIÓ D'ANTICOSSOS MONOCLONALS.....</b>	<b>77</b>
5.1- IMMUNITZACIÓ.....	77
5.2- FUSIÓ CEL·LULAR.....	78
5.2.1. OBTENCIÓ DELS ESPLENÒCITS.....	78
5.2.2. PREPARACIÓ DE LES CÈL·LULES DE MIELOMA DE RATOLÍ NS-1 .....	79
5.2.3. FUSIÓ DE LES CÈL·LULES NS-1 AMB ELS ESPLENÒCITS.....	79
5.3. CULTIU DE LES CÈL·LULES FUSIONADES EN MEDI SELECTIU .....	79
5.4- SELECCIÓ DELS HIBRIDOMES D'INTERÈS.....	80
5.4.1- ELISA INDIRECTE.....	80
5.5. CULTIU SECUNDARI .....	81
5.6- SUBCLONATGE DELS HIBRIDOMES PER DILUCIÓ LÍMIT .....	81
5.7- EXPANSIÓ DELS HIBRIDOMES .....	81
5.8- PURIFICACIÓ D'ANTICOSSOS MITJANÇANT COLUMNA D'AFINITAT .....	82
5.9- BIOTINITZACIÓ D'ANTICOSSOS .....	83
<b>6. IMMUNOPRECIPITACIÓ.....</b>	<b>83</b>
6.1- BIOTINITZACIÓ I LLISAT DE LES CÈL·LULES .....	84
6.1.1. BIOTINITZACIÓ I LLISAT DE CÈL·LULES EN SUSPENSIÓ .....	84
6.1.2. BIOTINITZACIÓ I LLISAT DE CÈL·LULES ADHERIDES .....	85
6.2- PREPARACIÓ DE LES BOLES D'AFINITAT I PRE-CLEARINGS .....	85
6.3- IMMUNOPRECIPITACIÓ DE LES PROTEÏNES D'INTERÈS .....	86
6.4- ELECTROFORESI DE PROTEÏNES (SDS-PAGE) .....	86
<b>7. IMMUNOFLUORESCÈNCIA.....</b>	<b>87</b>
7.1. IMMUNOFLUORESCÈNCIA DE CÈL·LULES ADHERENTS .....	87
7.2. IMMUNOFLUORESCÈNCIA DE CÈL·LULES EN SUSPENSIÓ .....	88
<b>8. WESTERN-BLOT.....</b>	<b>88</b>

<b>9. SISTEMES DE TRANSFECCIÓ .....</b>	<b>89</b>
9.1- TRANSFECCIONS TRANSITÒRIES.....	89
9.2- TRANSFECCIONS ESTABLES .....	89
<b>10. ASSAJOS FUNCIONALS.....</b>	<b>90</b>
10.1. ASSAJOS D'ACTIVACIÓ EN LÍNIES CEL·LULARS.....	90
10.1.1. EXPRESSIÓ DEL mRNA DE CD84 EN LÍNIES CEL·LULARS JURKAT, RAMOS I YT ACTIVADES	90
10.1.2. EXPRESSIÓ DE LA PROTEÏNA CD84 EN LA LÍNIA CEL·LULAR JURKAT COM A MODEL DE CÈL·LULA T.....	90
10.2. ASSAJOS D'ACTIVACIÓ EN CULTIU PRIMARI.....	91
<b>11. CITOMETRIA DE FLUX .....</b>	<b>91</b>
11.1. ESTUDI DE L'EXPRESSIÓ DE CD84 I DE LA SEVA ISOFORMA CD84_Δ5,6 EN LES DIFERENTS SUBPOBLACIONS DE MELSA.....	92
11.2. ESTUDI DE LES DIFERENTS SUBPOBLACIONS EN LIMFÒCITS DE SANG PERIFÈRICA.....	93
11.2.1. ESTUDI DE LES DIFERENTS SUBPOBLACIONS EN LIMFÒCITS DE SANG PERIFÈRICA EN PACIENTS DE LES I AR.....	93
11.3. PERMEABILITZACIÓ CEL·LULAR .....	94
11.4. ESTUDI DE LA INTERNALITZACIÓ AMB EL CITÒMETRE IMAGESTREAM .....	94
<b>VI. RESULTATS .....</b>	<b>97</b>
<b>1. EXPRESSIÓ DE LES ISOFORMES DE CD84 .....</b>	<b>99</b>
1.1. CD84 TÉ ALMENYS QUATRE ARN MISSATGERS DIFERENTS .....	99
1.1.1. Totes les línies cel·lulars testades expressen almenys una variant.....	101
1.1.2. El transcrit CD84_Δ2,5 té una expressió molt feble en les línies cel·lulars testades .....	102
1.1.3. Les cèl·lules primàries testades expressen els transcrits CD84 FL, CD84_Δ5 CD84_Δ2,5 i CD84_Δ5,6.....	103
1.2. ESTUDI DE LA ISOFORMA CD84_Δ2,5 .....	104
1.2.1. LA ISOFORMA CD84_Δ2,5 NO S'EXPRESSA A LA MEMBRANA .....	104
1.3. ESTUDI DE LA ISOFORMA CD84_Δ5,6 .....	105
1.3.1. L'anticòs 688.1 contra la cua citoplasmàtica de CD84_Δ5,6 reconeix específicament aquesta isoforma.....	105

1.3.2. La isoforma CD84_Δ5,6 s'expressa diferencialment en les línies cel·lulars testades .....	108
1.3.3. La isoforma CD84 Δ5,6 es detecta en les diferents subpoblacions de cèl·lules mononucleades de sang perifèrica estudiades.....	110
1.3.4. Expressió de la isoforma CD84 Δ5,6 en melsa.....	112
<b>2. EXPRESSIÓ DE CD84 EN CÈL·LULES ACTIVADES.....</b>	<b>114</b>
2.1. Les isoformes de CD84 s'expressen de manera diferent amb l'activació en les línies cel·lulars testades .....	114
2.2. Les isoformes de CD84 s'expressen de manera diferent en PBMCS activades.....	115
2.3. Les isoformes de CD84 s'expressen de manera diferent en cèl·lules B d'amígdala activades ..	116
<b>3. ASSAJOS FUNCIONALS.....</b>	<b>114</b>
3.1. La isoforma CD84_Δ5,6 té una senyalització deficient cap a l'interior de la cèl·lula .....	114
3.2. La isoforma CD84_Δ5,6 s'internalitza de manera deficient respecte CD84.....	114
<b>4. ESTUDI DE L'EXPRESSIÓ DE CD84 I DE LA ISOFORMA CD84_Δ5,6 EN MALALTIES AUTOIMMUNES.....</b>	<b>122</b>
4.1. Cèl·lules B .....	123
4.2. Cèl·lules NK.....	124
4.3. Cèl·lules T CD4+ .....	126
4.4. Cèl·lules T reguladores .....	128
4.5. Cèl·lules T CD8+ .....	129
4.6. Monòcits.....	133
<b>VII. DISCUSSIÓ .....</b>	<b>135</b>
<b>VIII. CONCLUSIONS .....</b>	<b>151</b>
<b>IX. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>155</b>
<b>X. ANNEX.....</b>	<b>155</b>





**I. ABREVIATURES**





<b>Å</b>	Angström
<b>aa</b>	Aminoàcids
<b>ABC</b>	<i>ATP binding cassette</i>
<b>ADN</b>	Àcid desoxirribonucleic
<b>ADNc</b>	ADN complementari
<b>ANA</b>	Anticossos antinuclears
<b>AP-2</b>	Proteïna adaptadora 2
<b>AR</b>	Artritis reumatoide
<b>ARN</b>	Àcid ribonucleic
<b>ARNm</b>	ARN missatger
<b>ATP</b>	Adenosin trifosfat
<b>BCR</b>	Receptor dels limfòcits B
<b>BSA</b>	<i>Bovine serum albumine</i>
<b>CD</b>	<i>Cluster of differentiation</i>
<b>CDs</b>	Cèl·lules dendrítiques
<b><i>Cd84-/-</i></b>	Ratolí deficient per CD84
<b>CPA</b>	Cèl·lula presentadora d'antigen
<b>CTLA-4</b>	Antigen citotòxic 4 associat al limfòcit T
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfòxid
<b>DTT</b>	<i>Dithiothreitol</i>
<b>EAT-2</b>	<i>EWS/FLI activated transcript 2</i>
<b>EBV</b>	Virus Epstein Barr
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
<b>EM</b>	<i>Esclerosi múltiple</i>
<b>ERT</b>	<i>EAT-2 related transduced</i>
<b>EST</b>	<i>Expressed Sequence Tag</i>
<b>FcR</b>	Receptor de les regions Fc
<b>FL</b>	<i>Full length</i>
<b>FR</b>	Factor reumatoide
<b>FSC</b>	<i>Forward scatter</i>
<b>FW</b>	<i>Forward</i>
<b>GPI</b>	Glicosilfosfatidilinositol

<b>Grb2</b>	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
<b>GWAS</b>	<i>Genome-wide association studies</i>
<b>HFCS</b>	<i>Hybridoma Fusion and Cloning Supplement</i>
<b>HLA</b>	Antigen leucocitari humà
<b>hnRNP</b>	Ribonucleoproteïna heterogènia nuclear
<b>HRP</b>	<i>Horse red peroxidase</i>
<b>HSC</b>	Cèl·lules mare hematopoiètiques
<b>ICOS</b>	Inducible T-cell Costimulator
<b>IFN</b>	Interferó
<b>Ig</b>	Immunoglobulina
<b>IgC</b>	Immunoglobulina de tipus constant
<b>IgE</b>	Immunoglobulina de tipus E
<b>IgM</b>	Immunoglobulina de tipus M
<b>IgV</b>	Immunoglobulina de tipus variable
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IPTG</b>	Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside
<b>ISE/ESE</b>	<i>Intronic/exonic splicing enhancer</i>
<b>ISS/ESS</b>	<i>Intronic/exonic splicing silencer</i>
<b>ITAM</b>	<i>Immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
<b>ITGAM</b>	<i>Integrin alpha M</i>
<b>ITIM</b>	<i>Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif</i>
<b>ITSM</b>	<i>Immunoreceptor tyrosine-based switch motif</i>
<b>Kb</b>	Kilobase
<b>Kd</b>	Constant de dissociació
<b>KDa</b>	Kilodalton
<b>KLH</b>	<i>Keyhole Limpet Hemocyanin</i>
<b>LB</b>	<i>Lysogeny Broth</i>
<b>LES</b>	Lupus eritematós sistèmic
<b>M<math>\phi</math></b>	Macròfag
<b>MHC</b>	Complex d'immunohistocompatibilitat
<b>MII</b>	Malaltia crònica intestinal
<b>MOPS</b>	Àcid 3-(N-morpholino)propanesulfònic
<b>NAPDH</b>	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

<b>ND</b>	No definit
<b>NOX-2</b>	NAPDH oxidasa 2
<b>NTB-A</b>	Antigen de cèl·lules NK, T i B
<b>NK</b>	<i>Natural killer</i>
<b>OmpC</b>	<i>Outer membrane protein C</i>
<b>OmpF</b>	<i>Outer membrane protein F</i>
<b>OPD</b>	Ortofenilendiamina
<b>pb</b>	Parells de bases
<b>PBL</b>	Leucòcits de sang perifèrica
<b>PBS</b>	Tampó salí de fosfat
<b>PCR</b>	<i>Polymerase chain reaction</i>
<b>PEG</b>	Polietilenglicol
<b>PKC</b>	Proteïna quinasa C
<b>PTP</b>	Proteïna tirosinfosfatasa
<b>PMA</b>	Phorbol 12-myristate 13-acetate
<b>PVDF</b>	<i>Polininylidene Fluoride</i>
<b>rpm</b>	Revol·lucions per minut
<b>RT</b>	Retrotranscripció
<b>RV</b>	<i>Reverse</i>
<b>SAP</b>	<i>SLAM associated protein</i>
<b>SDS</b>	<i>Sodium dodecylsulphate</i>
<b>SLAM</b>	Molècules d'activació de la senyalització limfocitària
<b>SLAMF</b>	Família SLAM
<b>SLEDAI</b>	Índex d'activació del LES
<b>SNP</b>	Polimorfisme d'un únic nucleòtid
<b>snRNA</b>	<i>Small nuclear RNA</i>
<b>SSC</b>	<i>Side scatter</i>
<b>TAE</b>	Tris base, àcid acètic i EDTA
<b>TBST</b>	<i>Tris buffered saline tween buffer</i>
<b>TCR</b>	Receptor de cèl·lules T
<b>Thf</b>	<i>Cèl·lules T helper fol·liculars</i>
<b>Th</b>	<i>Cèl·lules T helper</i>

<b>TK</b>	Timidina cinasa
<b>TLR</b>	<i>Toll like receptor</i>
<b>TMB</b>	3, 3', 5, 5' tetrametilbenzidina
<b>TNE</b>	Tris base, clorur de sodi i EDTA
<b>TNF</b>	Factor de necrosi tumoral
<b>XLP</b>	Malaltia limfoproliferativa lligada al cromosoma X

## II. INTRODUCCIÓ







## **1. ELS RECEPTORS DE MEMBRANA DELS LEUCÒCITS**

La resposta immune innata i adaptativa està controlada per les interaccions dinàmiques entre les proteïnes de diversos tipus cel·lulars. Un correcte funcionament del sistema immune requereix la coordinació de centenars de gens i proteïnes. Diversos autors han anomenat a aquest conjunt de proteïnes com a “immunoma”, entenent com immunoma el conjunt de gens i proteïnes la funció de les quals està majoritàriament relacionada amb la resposta immune (Ortutay and Vihinen, 2006), (Ortutay and Vihinen, 2009). Entre aquestes proteïnes, les expressades a la membrana dels leucòcits juguen un paper molt important en la xarxa d'interaccions que regulen la resposta innata i adaptativa (Bock et al., 2012). Un esdeveniment clau va ser el descobriment del receptor d'antigen de les cèl·lules T (TCR) (Yanagi et al., 1984), (Hedrick et al., 1984), el qual va permetre explicar l'especificitat i la diversitat de les respostes per part de les cèl·lules T. També es va demostrar que l'antigen no era capaç per ell mateix d'activar les cèl·lules T verges (Lafferty et al., 1980) i que l'activació eficient de la cèl·lula T requereix almenys un segon estímul independent de l'antigen proporcionat per les molècules coestimuladores (Sharpe, 2009). Aquestes molècules no només afavoreixen la interacció cèl·lula-cèl·lula, sinó que també són les responsables del desencadenament de senyals intracel·lulars específics que regulen diversos processos com ara l'activació, la diferenciació, l'apoptosi, la proliferació, l'adquisició de funcions efectores i/o la inducció de la tolerància (Barclay, 2003). Algunes d'aquestes proteïnes juguen un paper important en l'activació dels limfòcits i d'altres leucòcits, mentre que d'altres són les encarregades d'inhibir la resposta immune, procés clau en el manteniment de l'homeòstasi del sistema immune. A més, les proteïnes de membrana són importants també com a potencials eines diagnòstiques i dianes terapèutiques de determinades malalties (Zola, 2006).

Un estudi exhaustiu de diferents bases de dades recull els receptors de membrana expressats a la superfície de les cèl·lules hematopoètiques, agrupant-los per famílies (veure annex). Fins el moment hi ha descrits 1015 gens, dels quals s'ha vist que la família majoritària és la superfamília de les immunoglobulines, que amb 195 membres representa un 20% del total dels gens trobats (Diaz-Ramos et al., 2011). La seva rellevància en diversos aspectes fisiopatològics fa que alguna de les proteïnes d'aquesta família esdevinguin diana terapèutica de determinades patologies com ara en la immunoteràpia tumoral (Peggs et al., 2006). Una altra família important a la membrana dels leucòcits és la família dels receptors de proteïna G,

amb un 14% del total de les proteïnes de membrana leucocitàries (Diaz-Ramos et al., 2011), caracteritzades per contenir set dominis transmembrana i la funció de les quals és transformar

<b>Nom de la família</b>	<b>Nombre de membres</b>	<b>Percentatge (%)</b>
<b>Superfamília de les Ig</b>	195	19
<b>Superfamília del receptor de proteïna G</b>	147	14
<b>Família de les lectines de tipus C</b>	49	5
<b>Família dels receptors de citocines</b>	44	4
<b>Superfamília de les proteincinases</b>	34	3
<b>Família del MHC</b>	30	3
<b>Família dels transportadors de soluts</b>	29	3
<b>Superfamília del receptor del TNF</b>	26	3
<b>Família de les integrines</b>	23	2
<b>Família de les tetraspanines</b>	20	2
<b>Superfamília dels facilitadors de transport</b>	20	2
<b>Superfamília dels transportadors ABC</b>	18	2
<b>Superfamília del TNF</b>	17	2
<b>Família de les peptidases</b>	16	2
<b>Família dels receptors transitoris</b>	14	1
<b>Família de les cadherines</b>	13	1
<b>Família dels canals de potassi</b>	13	1
<b>Família dels TLR</b>	12	1
<b>Família de les sialomucines</b>	12	1
<b>Família de proteïnes riques en leucines</b>	11	1

**TAULA 1:** Principals famílies de proteïnes de membrana expressades al sistema immune (Diaz-Ramos et al., 2011)

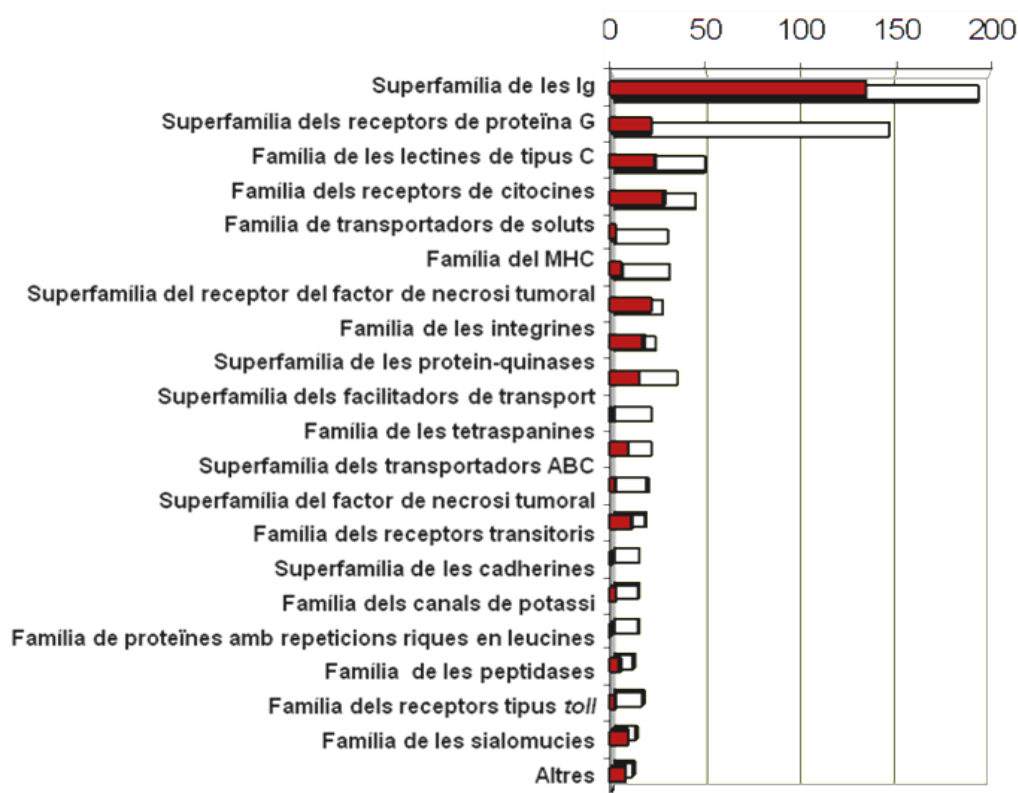
un estímul extracel·lular en un senyal intracel·lular. La diversitat d'aquestes proteïnes ve marcada d'una banda, per la varietat de lligands, i estímuls que reben i per l'altra, per la varietat de senyals que transmeten cap a l'interior de la cèl·lula (Kroeze et al., 2003). Això fa que aquest grup compti amb una altra heterogeneïtat funcional, amb proteïnes que actuen com neurotransmissors, com a receptors olfactivs, receptors de quimiocines o com a molècules d'adhesió, entre d'altres. Altres famílies importants presents a la membrana leucocitària són la família de les lectines tipus C, amb un 5% del total i la família dels receptors de citocines, amb un 4%, tal i com es mostra a la taula 1 (Diaz-Ramos et al., 2011).

### 1.1. LES MOLÈCULES CD

Els CD (*Cluster of differentiation*) formen part d'una nomenclatura emprada per a la identificació de proteïnes de membrana cel·lular establerta per la organització *Human Cell Differentiation Molecules* (HCDM) dins els *Human Leukocyte Differentiation Antigens* (HLDA) *workshops*, nascuts l'any 1982 amb la finalitat d'anomenar, identificar i caracteritzar l'estructura d'aquestes proteïnes, estudiar la seva funció i distribució a la membrana de les cèl·lules del sistema immunitari (Zola and Swart, 2005); (Zola et al., 2007) i validar nous anticossos monoclonals contra elles; a més de proveir a la comunitat científica d'un espai per facilitar la comunicació. Funcionalment, aquestes molècules poden actuar com a receptors, lligands, com a proteïnes d'adhesió o de senyalització. La combinació de diverses molècules CD és útil per definir una determinada població cel·lular (Zucchetto et al., 2011); (De Salort et al., 2011). Actualment els anticossos monoclonals contra algunes de les molècules CD són l'eina terapèutica contra diverses malalties autoimmunes (Townsend et al., 2010) i càncers (Weiner et al., 2012).

Les molècules amb nomenclatura CD formen part de diferents famílies de proteïnes, com la proteïna CD4, que forma part de la superfamília de les immunoglobulines, o la proteïna CD23, que pertany a la família de les lectines de tipus C. El fet que una proteïna tingui o no nomenclatura CD depèn de l'existència d'un anticòs monoclonal contra aquesta. A la figura 1 es mostra en vermell, la proporció de membres de cada família que compten amb nomenclatura CD sobre el total de membres de la família (en blanc). La superfamília de les immunoglobulines, amb un 69% del total, és la que té un nombre més elevat de membres amb

nomenclatura CD. La segueixen la família dels receptors de citocines, amb un 64%; i la família de les lectines de tipus C, amb un 47%. Com es mostra a la figura 1, en termes relatius, la família de les integrines és la que presenta un percentatge més alt de membres amb nomenclatura CD, amb un 74% del total (Diaz-Ramos et al., 2011).



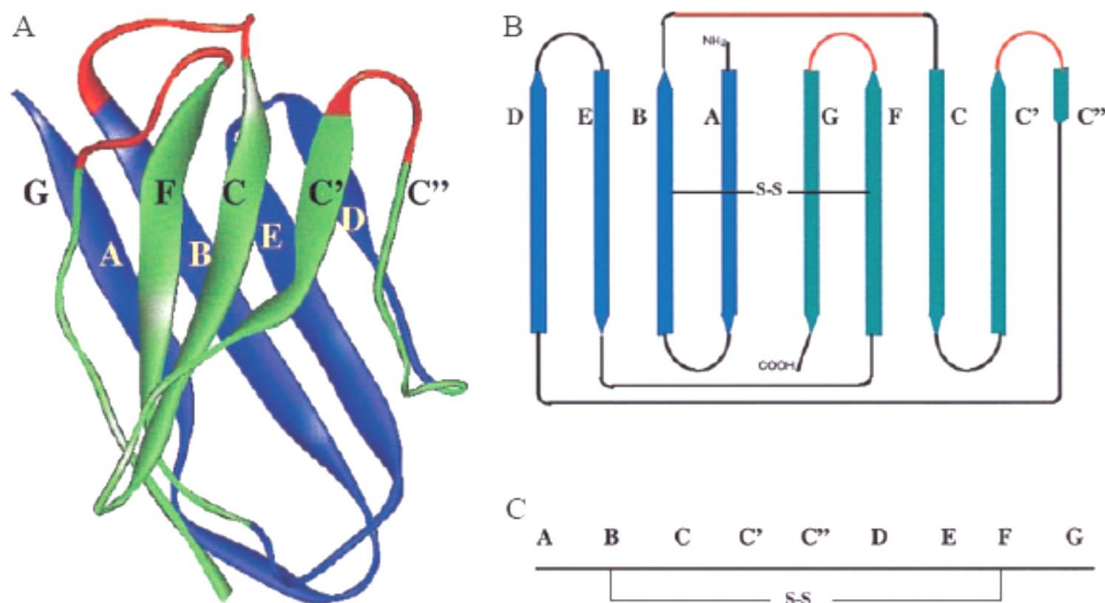
**FIGURA 1:** Principals famílies de proteïnes de membrana del sistema immune. Es mostra el total de proteïnes de cada família (gris) en front del nombre de proteïnes de cada família amb nomenclatura CD (grana) (Diaz-Ramos et al., 2011).

## 1.2. LA SUPERFAMÍLIA DE LES IMMUNOGLOBULINES

La superfamília de les immunoglobulines va ser una de les primeres que es van identificar, representant actualment una de les més abundants del genoma humà i especialment del sistema immune (Peggs and Allison, 2005). És un ampli grup de proteïnes de membrana i solubles amb participació en una gran diversitat de funcions biològiques (Halaby and Mornon, 1998), (Halaby et al., 1999). Tenen característiques estructurals comunes, ja que generalment són proteïnes de membrana de tipus I amb una única regió transmembrana amb un nombre variable de dominis de tipus immunoglobulina formats per uns 70-110 aa, amb només un 10%

de les molècules ancorades a la membrana mitjançant un grup glicosilfosfatidilinositol. Les regions citoplasmàtiques varien significativament en quant a llargada, la majoria tenen diversos motius de senyalització, com ara ITAMs i ITIMs, que interaccionen amb tirosincinases i tirosinfosfatases respectivament. Funcionalment actuen com a receptors per l'antigen (TCR i BCR), com a co-receptors i molècules coestimuladores, com a receptors de citocines o com a molècules involucrades en la presentació antigènica als limfòcits i en l'adhesió cel·lular (Barclay, 2003).

Els membres de la família de les immunoglobulines consten de dos tipus de dominis ben diferenciats d'uns 100 aminoàcids cadascun: els dominis variables (IgV), i els dominis constants (IgC), (Smith and Xue, 1997). Ambdós tenen un plegament que consisteix en set làmines  $\beta$  antiparal·leles de tipus *sandvitx* de 5-10 aa amb un pont disulfur conservat, però es diferencien en el fet que els dominis IgV, a més de presentar una gran variabilitat associada al reconeixement de l'antigen, conté dues làmines addicionals en el centre del domini (veure figura 2).



**FIGURA 2:** Plegament d'un domini IgV. **A)** Representació d'un domini Ig variable (Protein database 7ab) **B)** Esquema representatiu de les cadenes que formen les dues fulles  $\beta$  del plegament. Tant en A com en B les dues fulles  $\beta$  es representen amb colors diferents, (Modificat de (Barclay, 1999)

La presència d'aquesta família de proteïnes s'ha vist afavorida al llarg de l'evolució, degut entre d'altres motius, a que aquest domini forma un plegament molt estable en front a la proteòlisi i pot interaccionar homofílica i heterofílicament. Gran part de les proteïnes amb

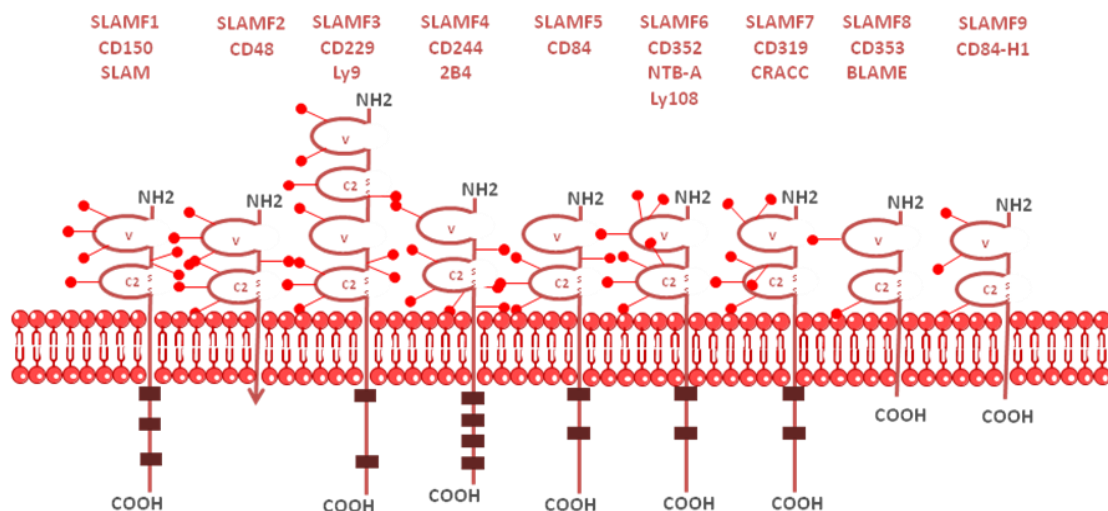
dominis immunoglobulina es troben molt glicosilades. Es creu que la funció dels carbohidrats és impedir el moviment de la glicoproteïna i d'aquesta manera optimitzar la interacció amb el lligand. També es creu que el paper dels carbohidrats en diverses glicoproteïnes de membrana, especialment en les del sistema immune, és protegir-les d'interaccions no desitjades amb d'altres proteïnes de la membrana o amb proteïnes solubles.

Hi ha d'altres dominis de famílies de proteïnes de membrana que presenten importants similituds amb els dominis immunoglobulina, com ara els dominis fibronectina de tipus III, els dominis cadherina o els dominis citocina (Barclay, 2003).

Alguns membres de la família de les immunoglobulines, com s'explicarà més endavant, modulen la seva funció a través del procés d'*splicing* alternatiu. Quan aquest mecanisme falla pot donar lloc a un trencament de la tolerància i a l'aparició de diverses malalties autoimmunes. Un exemple és la proteïna CTLA-4, polimorfismes de la qual s'associen a una alta susceptibilitat a patir malalties autoimmunes com ara la diabetis tipus I, la malaltia de Graves o la tiroiditis de Hashimoto (Peggs et al., 2006).

### 1.2.1. La família SLAM

La família SLAM (*Signaling Lymphocytic Activation Molecule*), també anomenada família del CD150, és un dels grups de proteïnes de membrana que estan directament relacionats amb

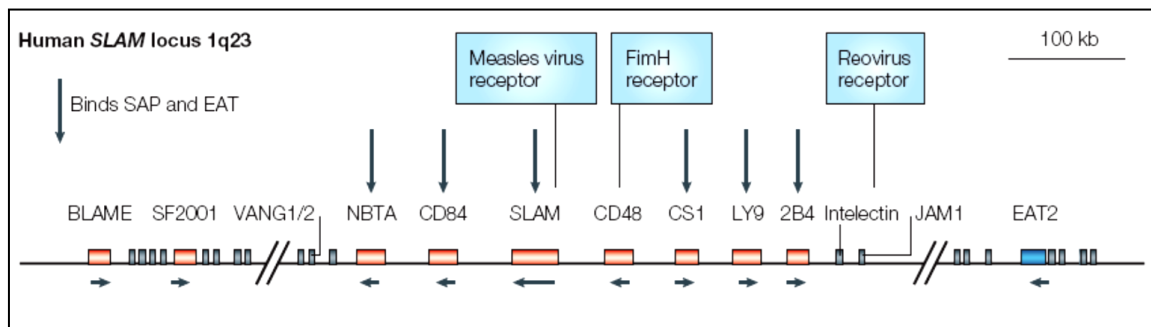


**FIGURA 3:** Membres de la família SLAM. Als dominis immunoglobulina es mostren els llocs de N-glicosilació en vermell. Els requadres en grana mostren els motius ITSM d'interacció dels membres que en tenen. La fletxa de la cua de CD48 indica el motiu GPI.

processos coestimulatoris i en la diferenciació d'una gran varietat de tipus cel·lulars involucrats en la resposta immune innata i adaptativa (Calpe et al., 2008); (Detre et al., 2010); (Schwartzberg et al., 2009); (Vinuesa et al., 2010) Consta de nou glicoproteïnes de membrana que pertanyen a la superfamília de les immunoglobulines: SLAMF1 (CD150 o SLAM), SLAMF2 (CD48), SLAMF3 (CD229 o Ly9), SLAMF4 (CD244 o 2B4), SLAMF5 (CD84), SLAMF6 (CD352, NTB-A o Ly108), SLAMF7 (CD319 o CRACC), SLAMF8 (CD353 o BLAME) i SLAMF9 (CD84-H1) (veure figura 3).

### 1.2.1.1. Localització genòmica

Set dels gens de proteïnes de la família SLAM s'agrupen en una regió de 400-500 kilobases del cromosoma 1q23 en humans i 1H3 en ratolí (Calpe et al., 2008); (Engel et al., 2003) (veure figura 4), mentre que els gens de les proteïnes SLAMF8 i SLAMF9 es troben situats en una regió molt propera a aquest locus, probablement degut a que totes aquestes proteïnes provenen d'un únic gen antecessor comú.



**FIGURA 4:** Organització genètica del locus SLAM en humà. Els gens que codifiquen els membres de la família SLAM estan en el cromosoma 1q23, set dels quals es troben en una regió de 359 kb. SLAMF8 i SLAMF9 també se situen en el mateix cromosoma, però fora del locus SLAM. La orientació dels gens difereix en humà i ratolí. Els gens de les proteïnes adaptadores EAT-2 també es troben properes a aquest locus (Engel et al., 2003).

### 1.2.1.2. Estructura i lligands

Els membres de la família SLAM són glicoproteïnes de tipus I estructuralment molt similars entre sí, ja que estan formats per una part extracel·lular, que consta d'un domini Ig variable (IgV) amb els ponts disulfur truncats en l'extrem N-terminal, i d'un domini Ig constant



(IgC2) amb les cisteïnes conservades (Tovar et al., 2000). L'excepció és la proteïna CD229 (SLAMF3), que conté una repetició IgV-IgC2 en la seva part extracel·lular. Contenen una cua citoplasmàtica, la majoria d'ells amb motius ITSM (*immunoreceptor tyrosine-based switch motif*), exceptuant la proteïna CD48 (SLAMF2), que es troba ancorada a la membrana per un glicosilfosfatidilinositol (GPI); i les proteïnes SLAMF8 i SLAMF9 que no contenen cap motiu ITSM.

A excepció de CD244 (SLAMF4), que s'uneix heterofilicament a CD48, els membres de la família SLAM es caracteritzen per actuar com a lligands propis, interaccionant homofilicament a través el seu domini IgV (Brown et al., 1998). No s'han descrit interaccions amb altres proteïnes de la membrana cel·lular, però CD150 ha estat descrit com un dels receptors més importants del virus del sarampió (Tatsuo et al., 2000). A més, la proteïna esmentada actua com a un regulador en la defensa innata contra bacteris Gramnegatius en macròfags, regulant dos processos clau de manera independent, com són la maduració dels fagosomes i la producció de radicals mitjançant el complex NADPH oxidasa (NOX2) (Berger et al., 2010). Està descrit que la proteïna CD150 és un receptor per a les porines OmpC i OmpF de les parets bacterianes (Berger et al., 2010). També s'ha trobat que SLAMF6 reconeix *E. coli* però no *S. aureus*, el que suggereix que els receptors SLAM podrien ser una altra família de sensors microbials; així com que la proteïna CD48 de macròfags i mastòcits interacciona amb la lectina FimH dels bacteris Gramnegatius (Baorto et al., 1997). La funció d'altres membres de la família SLAM com a receptors de bacteris roman desconeguda.

### **1.2.1.3. Motius ITSM**

A diferència d'altres molècules coestimuladores, les proteïnes de la família SLAM no contenen motius ITAM ni ITIM a la seva cua citoplasmàtica, però sí contenen una o més còpies dels motius ITSM ja esmentats, amb la seqüència T-I/V-Y-x-x-V/I (on T és treonina, I és isoleucina, V és valina, Y és tirosina i x denota qualsevol aminoàcid) (Detre et al., 2010); (Engel et al., 2003). De la mateixa manera que els motius ITAM i ITIM es fosforilen en unir-se al seu lligand, la interacció homofílica dels membres de la família SLAM dona lloc a la fosforilació dels residus tirosina, creant un lloc d'ancoratge per a molècules adaptadores que contenen el domini SH2, com ara *SLAM-associated protein* (SAP), *EWS/FLI activated transcript-2* (EAT-2) i *EAT-2-related transducer* (ERT), SHP-2, SHP-1, Csk i SHIP-1 (Mikhalap et al., 1999); (Parolini et

al., 2000); (Tangye et al., 1999). Quan SAP s'uneix al motiu ITSM, es desencadena la transducció del senyal en un procés que recluta la cinasa FynT (Ma et al., 2007), la qual fosforila molècules com la proteínquinasa-C (PKC) o Vav-1 (Watzl et al., 2000); (Chen, 2004). El mecanisme de transducció de la molècula adaptadora EAT-2 encara no ha estat completament descrit. Les senyals que desencadenen els motius ITSM poden ser inhibidores o estimuladores, donant lloc a múltiples funcions efectores que depenen del tipus cel·lular i de l'estat d'activació (Engel et al., 2003); (Ma et al., 2007); (Morra et al., 2001); (Veillette, 2006).

SAP és una petita proteïna de 15kDa que conté un únic domini SH2 i una cua de 26 aminoàcids (Nichols et al., 1998); (Sayos et al., 1998). S'uneix a CD84 a través del motiu ITSM (Sayos et al., 2001), així com també ho fa a d'altres de les proteïnes de la família SLAM com ara CD150 (Sayos et al., 1998), 2B4 (CD244) (Lanier, 1998); (Tangye et al., 1999); (Parolini et al., 2000); (Sayos et al., 2000) i Ly-9 (CD229), entre d'altres. El gen SH2D1A humà i murí tenen un 87% d'homologia, el que fa que els dominis SH2 d'ambdues espècies siguin força similars. La proteïna SAP es troba expressada en un gran nombre de tipus cel·lulars del sistema immune com ara cèl·lules NK, cèl·lules T, cèl·lules NKT, eosinòfils i plaquetes (Engel et al., 2003). Aquesta proteïna s'uneix als receptors SLAM a través de l'arginina 32 (R32), del domini SH2, i de les tirosines fosforilades dels motius ITSM de les molècules SLAM. La forta avidesa amb la que SAP s'uneix als motius tirosina fosforilats explica la seva habilitat per bloquejar la unió d'altres molècules que contenen motius SH2 com SHIP1 i SHP-2, amb els receptors SLAM (Finerty et al., 2002); (Howie et al., 2002); (Lewis et al., 2001); (Poy et al., 1999); (Sayos et al., 1998). Els receptors de la família SLAM als que s'uneix SAP també s'expressen en les cèl·lules presentadores d'antigen, on SAP és absent. En canvi, aquests tipus cel·lulars, com els macròfags, expressen EAT-2, una proteïna de 399 aminoàcids amb un únic motiu SH2 equivalent a SAP amb el qual s'uneix a CD84, CD150, CD244 i CD229 (Morra et al., 2001). EAT-2 presenta una alta homologia amb SAP, tant en el gent humà com en el murí (47% i 40% respectivament).

De la mateixa manera que SAP, l'alta afinitat en la interacció entre EAT-2 i els membres de la família SLAM sembla indicar que EAT-2, podria bloquejar el reclutament d'altres molècules de senyalització, com ara la unió de la fosfatasa SHP-2, encara que aquest efecte seria més feble que en el cas de SAP. Els estudis demostren que tant SAP com EAT-2 podrien tenir un paper important en l'activació de les quinases Fyn i Src en els limfòcits B i els macròfags (Morra et al., 2001).

Ambdues molècules esmentades participen en la sinapsi immunològica a través dels receptors SLAM, contribuint d'aquesta manera en la unió entre el TCR i Ag-MHC, assegurant una fosforilació prolongada dels receptors durant el desencadenament de senyals del TCR (Morra et al., 2001).

#### **1.2.1.4. Expressió**

Els membres de la família SLAM tenen un patró d'expressió molt diferent en les diferents poblacions cel·lulars del sistema hematopoètic. Aquestes proteïnes es troben expressades en diversos tipus cel·lulars com ara cèl·lules T, B, monòcits, macròfags, NK, NKT, cèl·lules dendrítiques, cèl·lules dendrítiques plasmacitoides, plaquetes, granulòcits, i cèl·lules mare hematopoètiques i progenitores (Calpe et al., 2008); (Engel et al., 2003); (Ma et al., 2007). Estudis exhaustius descriuen l'expressió dels membres de la família SLAM en els diferents estats de maduració de les cèl·lules B, conclouent que la majoria d'aquestes proteïnes es troben expressades en totes les subpoblacions de cèl·lules B (De Salort et al., 2011); (Rodríguez-Bayona et al., 2011). D'altra banda, Kiel i col·laboradors van demostrar que els receptors SLAM són expressats a la medul·la òssia de progenitors primitius de ratolí tan específicament que és possible purificar cèl·lules mare de ratolí emprant una simple combinació d'anticossos monoclonals contra tres d'aquests receptors (CD150, CD48 i CD244) (Kiel et al., 2005). En el cas dels ratolins, l'estudi de l'expressió d'aquesta família de receptors no és tan exhaustiva, i existeixen discrepàncies entre ambdues espècies. Tal i com es mostra a la taula 3, l'heterogeneïtat del seu patró d'expressió en ratolí indica que aquests receptors juguen papers tant redundants com específics en la regulació de la resposta immune innata i adaptativa (Sintes et al., 2008).

#### **1.2.1.5. Funció**

Els membres de la família SLAM tenen un paper dual; d'una banda actuen com a molècules d'adhesió, i de l'altra controlen diverses respostes immunes innates i adaptatives. En interaccionar, els membres de la família SLAM no només regulen la proliferació i la producció de citocines dels limfòcits T sinó també l'activació de les cèl·lules B, la generació de memòria i l'agregació plaquetària. A la taula 2 es mostren algunes de les funcions d'aquestes molècules. En cèl·lules T, hi ha evidències que mostren que les proteïnes SLAMF1 i Ly108

modulen desenvolupament dels limfòcits T innats (Chung et al., 2005); (Pasquier et al., 2005); (Alonzo et al., 2010); (Kreslavsky et al., 2009); (Li et al., 2007); (Verykokakis et al., 2010); així com també aquestes dues molècules semblen cooperar en el desenvolupament de les cèl·lules NKT (Nichols et al., 2005). Griewank i col·laboradors van demostrar que la presència d'ambdós receptors i consegüentment el reclutament de SAP és essencial per a l'expansió i la diferenciació d'aquesta subpoblació (Griewank et al., 2007). A més, es creu que la proteïna CD48 podria estar regulant importants funcions en el control de la citotoxicitat de les cèl·lules T i NK (Assarsson et al., 2004). S'ha vist que la proteïna NTBA actua com a molècula coestimuladora durant l'activació dels limfòcits T (Valdez et al., 2004), així com que aquesta proteïna contribueix a la interacció entre les cèl·lules T i B de ratolí *in vitro* (Cannons et al., 2010). Altres proteïnes amb importants funcions en la regulació de la citotoxicitat en cèl·lules T i NK són CD244, NTBA/Ly108, i SLAMF1 (Nanda et al., 2005); (Bryceson et al., 2006); (Cannons et al., 2010); (Qi et al., 2008).

Recentment s'ha descrit l'important paper de diferents membres de la família SLAM en la interacció sostinguda entre cèl·lules T i B i en la formació dels centres germinals, com ara la proteïna CD150 i la seva senyalització depenent de SAP (Crotty et al., 2003), (Hron et al., 2004), procés clau en el desenvolupament de la immunitat humoral (Cannons et al., 2010); o, com s'explicarà més endavant, la proteïna CD84 (Cannons et al., 2010). En quant a CD150, també s'ha estudiat la seva implicació en la diferenciació de les cèl·lules Thf en els centres germinals. La seva expressió en els centres germinals suggereix que les cèl·lules inicien la senyalització a partir de la interacció homofílica d'aquesta molècula entre cèl·lules T i B (Yusuf et al., 2010).

Altres funcions importants dels membres d'aquesta família són la regulació de la producció de citocines per part de CD150, CD229, CD244, CD84 i Ly108 (Cocks et al., 1995); (Howie et al., 2002); (Aversa et al., 1997); (Cannons et al., 2004); (Dupre et al., 2005); (Graham et al., 2006); (Howie et al., 2005); (Martin et al., 2001); (Martin et al., 2005); (Wang et al., 2004); (Yusuf et al., 2010); (Bottino et al., 2001), la regulació en macròfags de l'atac dels bacteris per part de CD150 (Berger et al., 2010), així com diverses funcions als neutròfils (Howie et al., 2005), i macròfags (Wang et al., 2004); (Berger et al., 2010) per part de Ly108.

Receptor	Expressió	Lligands	Motius ITSM	Funció	Referències
<b>SLAMF1</b> (CD150, SLAM)	B, T, CD, plaquetes, HSC, Mφ	SLAMF1, virus sarampió, bacteris gramnegatius	2	T CD4 <sup>+</sup> : Regulació de la proliferació i la producció d'IFNγ induïda pel TCR. Redirecció de la resposta cap a Th1 T CD8 <sup>+</sup> : Regulació de la citotoxicitat i l'alliberament de grànuls induïda pel TCR. B: Regulació de la producció d'Ig, la proliferació i l'apoptosi Mφ i CD: Regulació de la producció de citocines Plaquetes: Estabilització dels agregats plaquetaris HSCs: Identificació i purificació de poblacions potencials de HSCs.	(Cocks et al., 1995), (Henning et al., 2001), (Kiel et al., 2005), (Kruse et al., 2001), (Mikhalap et al., 1999), (Munitz et al., 2005), (Nanda et al., 2005), (Tatsuo et al., 2000), (Romero et al., 2004), (Sayos et al., 2000), (Wang et al., 2004)
<b>SLAMF2</b> (CD48)	B, T, monòcits, NK, CD, CDp, granulòcits	SLAMF4, CD2, FimH	Cap	Confereix protecció en front l'autoimmunitat T: Modulació de la proliferació i la producció de citocines B, NK i CDs: Regulació de l'activació i la proliferació	(Assarsson et al., 2005), (Assarsson et al., 2004), (Brown et al., 1998), (Gonzalez-Cabrero et al., 1999), (Kambayashi et al., 2001), (Kubin et al., 1999), (Latchman and Reiser, 1998), (Messmer et al., 2006), (Valiante and Trinchieri, 1993), (Koh et al., 2011)
<b>SLAMF3</b> (CD229, Ly9)	B, T, CDp, Mφ	SLAMF3	H: 2 R: 1	T: Regulació de la producció d' IFNγ i reducció parcial de l'activació d'ERK induïdes pel TCR, Regula el desenvolupament de les cèl·lules CD8 <sup>+</sup> de tipus innat NKT: Regula el desenvolupament	(Tovar et al., 2000), (Del Valle et al., 2003), (Martin et al., 2005), (Romero et al., 2004), (Romero et al., 2005), (Sintes et al., 2013)
<b>SLAMF4</b> (CD244, 2B4)	NK, CD8 i T γδ, monòcits, basòfils, eosinòfils, mastòcits, PMP	SLAMF4	4	Confereix protecció en front l'autoimmunitat NK: Modulació de la citotoxicitat, la producció d' IFNγ , la secreció de grànuls i citocines. Participació en el desenvolupament de les funcions efectores, regulació de les respostes de cèl·lules T específiques de virus T CD8: Regulació de la citotoxicitat, la producció d' IFNγ T CD4: Polarització de la resposta cap a Th1	(Boles and Mathew, 2001), (Dupre et al., 2005), (Garni-Wagner et al., 1993), (Mathew et al., 1993), (Kubota et al., 1999), (Ma et al., 2007), (Munitz et al., 2005), (Nakajima et al., 1999), (Romero et al., 2004), (Saborit-Villarroya et al., 2005), (Saborit-Villarroya et al., 2008), (Sharifi et al., 2004), (Sintes et al., 2008), (Waggoner et al., 2010), (Meinke and Watzl, 2013), (Brown et al., 1998)

<b>SLAMF5</b> (CD84)	B, T, mastòcits, plaquetes, monòcits, granulòcits M $\phi$ , CD, CDp, PMP,	SLAMF5	2	Involucrat en la interacció T:B i la formació dels centres germinals T: Regulació de la proliferació i de la secreció d'IFN $\gamma$ Plaquetes: Modulació de l'agregació plaquetària	(de la Fuente et al., 1997), (Kruse et al., 2001), (Martin et al., 2001), (Nanda et al., 2005), (Romero et al., 2004), (Sintes et al., 2008), (Tangye et al., 2003), (Tangye et al., 2002) (Wang et al., 2010b)
<b>SLAMF6</b> (CD352, NTB-A (Ly108 en ratolí)	B, T, NK, neutròfils, CDp	SLAMF6	2	NK: Regulació de la citotoxicitat i de la secreció de citocines (IL-8, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) T CD8: Augment de la citotoxicitat, i de la producció d'IFN- $\gamma$ induïda pel TCR T CD4: Resposta Th1 polaritzada	(Bottino et al., 2001), (Falco et al., 2004), (Flaig et al., 2004), (Peck and Ruley, 2000), (Valdez et al., 2004)
<b>SLAMF7</b> (CD319 CRACC CS1)	B, T, NK, CD CDp	SLAMF7	H: 1 R: 0	B: Inducció de la proliferació NK: Inducció de la citotoxicitat	(Boles and Mathew, 2001), (Bouchon et al., 2001), (Kumaresan et al., 2002), (Lee et al., 2007a), (Stark and Watzl, 2006), (Tassi and Colonna, 2005)
<b>SLAMF8</b> (CD353, BLAME)	B, CD, monòcits, M $\phi$	ND	Cap	M $\phi$ : Regula la resposta inflamatòria	(Calpe et al., 2008), (Kingsbury et al., 2001), (Wang et al., 2012)
<b>SLAMF9</b> (CD84-H1)	B, T, monòcits, CD	ND	Cap	ND	(Calpe et al., 2008), (Fennelly et al., 2001), (Fraser et al., 2002), (Zhang et al., 2001)

**TAULA 2:** Taula on es mostren tots els membres de la família SLAM, amb els altres noms, l'expressió, els seus lligands, els motius ITSM i la funció de cadascun d'ells en les condicions indicades. B=Cèl·lula B, CD= Cèl·lula dendrítica, CDp= Cèl·lula dendrítica plasmacitoide, H=humà, HSC=Cèl·lula mare hematopoètica, IFN=interferó, IL=interleucina; ITSMs= motius *immunoreceptor tyrosine-based binding*, R=Ratolí, M $\phi$ =macròfags, PMP= progenitors multipotent hematopoètics, ND=no definit, NK=Cèl·lules *natural killer*, SLAMF= Família SLAM, T=Cèl·lules T, Th1= Cèl·lules T helper 1.

### **1.2.1.6. La malaltia limfoproliferativa lligada al cromosoma X (XLP)**

Una de les proteïnes amb motius SH2 que s'uneixen als receptors SLAM és, com ja s'ha comentat, la proteïna SAP. La deficiència del gen que codifica per la proteïna SAP dóna lloc a la malaltia limfoproliferativa lligada al cromosoma X (XLP) (Sayos et al., 1998). Aquesta malaltia, també anomenada malaltia de Duncan, és una immunodeficiència primària poc comú que només afecta a homes, amb una incidència d'un a tres individus per milió, i que va ser descrita per primera vegada l'any 1975 (Purtilo et al., 1975). El gen SH2D1A, que codifica per a la proteïna adaptadora SAP, es troba mutat en pacients amb aquesta malaltia i produeix una susceptibilitat severa al virus d'Epstein-Barr (EBV). Fins fa poc temps es creia que la única causa d'aquesta malaltia era una mutació en el gen que codifica per SAP, *SH2D1A* (Sayos et al., 1998), però actualment es coneix que aproximadament un 20% dels casos es deuen a mutacions que afecten a les proteïnes XIAP (codificada pel gen BIRC4) i ITK (Pachlopnik Schmid et al., 2011), (Huck et al., 2009). Els pacients amb XLP presenten defectes en la immunitat innata i adaptativa, com ara una proliferació excessiva de cèl·lules T CD8+, NK i macròfags, i una incapacitat per produir una resposta humoral correcta contra EBV (Seemayer et al., 1995). També presenten nivells baixos de citotoxicitat de cèl·lules T CD8+ i NK, alteracions en la funció de les cèl·lules CD4+ T *helper* fol·liculars i en la secreció de citocines per part de les cèl·lules Th2, així com una baixa producció d'anticossos (Filipovich et al., 2010); (Marsh et al., 2010), (Rezaei et al., 2011). Com a conseqüència, els limfòcits s'infiltraen en els òrgans del pacient, provocant necrosi hepàtica i la fallada del moll de l'os (Markin et al., 1987).

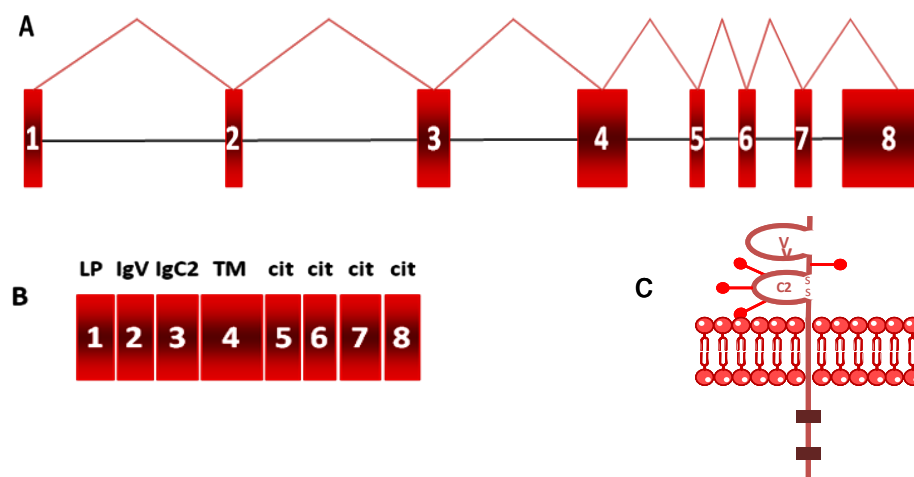
### **1.2.2. La proteïna CD84**

La proteïna CD84 és una glicoproteïna de tipus I, ja que conté la terminació COOH en el seu extrem intracel·lular i la terminació –NH<sub>2</sub> en l'extrem exterior de la cèl·lula. És membre de la família SLAM i per tant, reuneix les característiques principals d'aquest grup. Fou establerta com a molècula CD l'any 1994 en el 5è *Human Leukocyte Differentiation Antigens (HLDA) workshop* (Tedder T.F., 1995).

### 1.2.2.1. El gen

Els gens de CD84 humà i murí van ser clonats i caracteritzats per primera vegada pel nostre grup a finals dels 90 (de la Fuente et al., 1997); (de la Fuente et al., 1999). El ADNc murí va ser aïllat d'una línia cel·lular de macròfags, mentre que l'humà prové de la línia de cèl·lula B Raji. El gen humà se situa al cromosoma 1q23 entre els gens SLAMF6 i SLAMF1 (veure figura 4). El gen té 1040 pb i està format per vuit exons (veure figura 5); els tres primers corresponen a la part extracel·lular de la proteïna, formada per 199 aa i on hi ha quatre possibles llocs de N-glicosilació. El primer exó correspon al pèptid líder i consta de 16 aa, el segon correspon al domini Ig variable amb 116 aa i el tercer al domini Ig constant amb 83 aa. El quart exó codifica per a la regió transmembrana, amb 41 aa de naturalesa hidrofòbica. La cua citoplasmàtica la formen els exons 5, 6, 7 i 8 amb 11, 33, 20 i 21 aa respectivament.

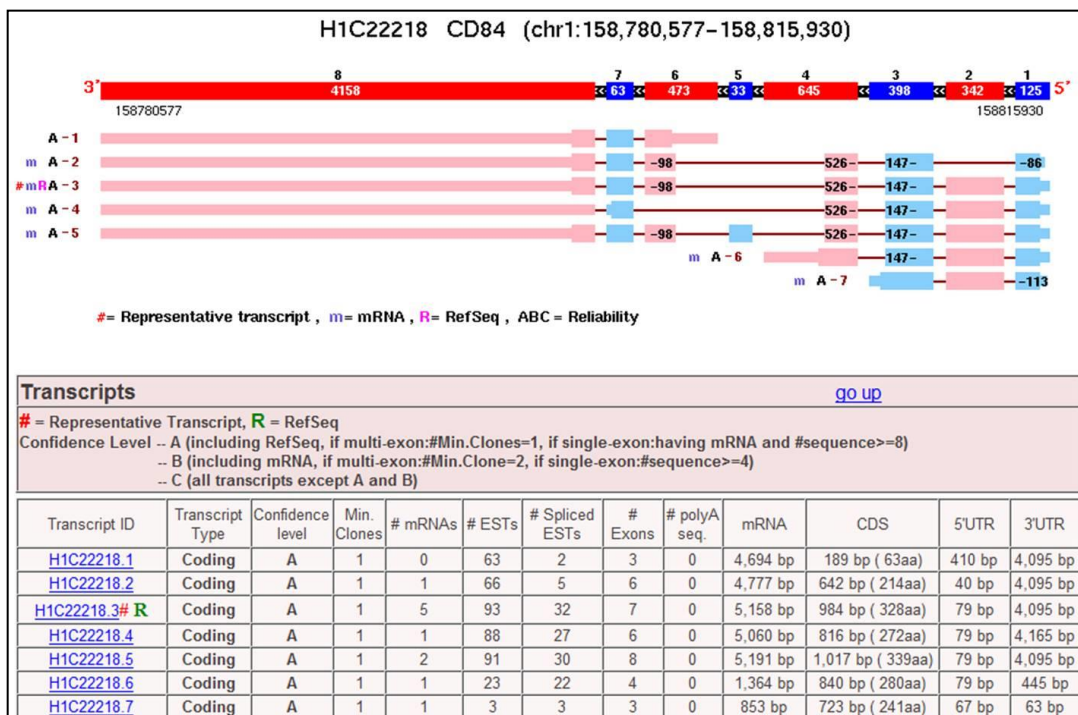
La base de dades d'anotació genòmica d'*splicing* alternatiu ECgene (Lee et al., 2007b) (<http://genome.ewha.ac.kr/ECgene/>) fou creada per proporcionar una anotació funcional als gens generats per *splicing* alternatiu. Aquesta base de dades es basa principalment en un algoritme de predicció (*Gene prediction by EST Clustering*) emprant ESTs (*Expressed Sequence Tags*). D'acord amb aquesta base de dades i amb d'altres (d'Ensemble, NCBI, FastDB), el gen CD84 genera 7 transcrits (variants) que potencialment codifiquen per 7 isoformes. A la figura 6 es mostra la informació de les isoformes de CD84 extreta de la web ECgene.



**FIGURA 5:** **A)** Esquema de l'organització exó/intró del gen CD84. **B)** Organització dels exons de la proteïna CD84. **C)** Esquema de la proteïna CD84



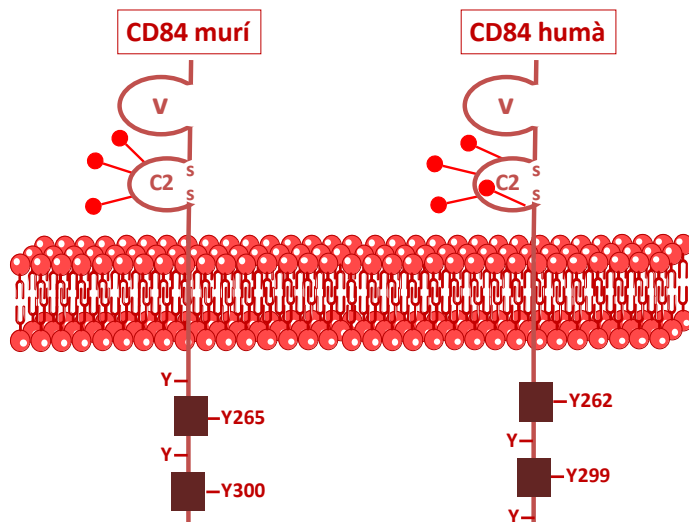
La bibliografia també descriu diversos transcrits (Palou et al., 2000), (Zaiss et al., 2003), les quals no han estat caracteritzats a nivell de proteïna. Totes les variants identificades difereixen principalment en la seva cua citoplasmàtica, la qual cosa, en el cas que s'expressin a nivell de proteïna, tindria evidents conseqüències funcionals, ja que podria provocar una alteració en la captació de les molècules adaptadores que s'uneixen als motius ITSM i, en conseqüència, de la senyalització cap a l'interior de la cèl·lula. En canvi, variacions en el segment extracel·lular de la proteïna donaria lloc a una disfunció en la interacció receptor:ligand (Yan et al., 2007). Fins ara no hi ha estudis que demostrin aquests fets.



**FIGURA 6:** Transcrits de CD84 descrits a la base de dades ECGene (<http://genome.ewha.ac.kr/ECgene/>). A la part superior es mostra un esquema de les (isoformes) transcrits, mentre que a la taula inferior es pot trobar informació sobre cada un d'ells.

### 1.2.2.2. Estructura i lligand

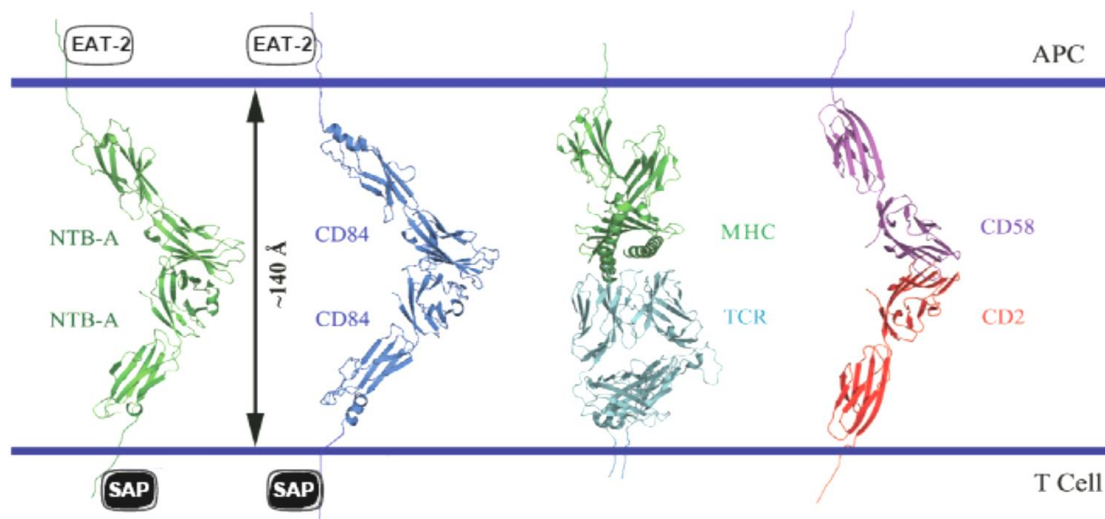
La proteïna té un pes molecular d'uns 72-86 kDa que varia en funció del seu grau de glicosilació (de la Fuente et al., 1999). La cua citoplasmàtica conté quatre tirosines, dos d'elles formant part de motius ITSM on s'uneixen molècules adaptadores amb motius SH2 com ara SAP i EAT2 (Veillette, 2010) (veure figura 7). Estudis comparatius mostren la similitud entre les seqüències d'aminoàcids dels dominis extracel·lulars de CD84 amb altres proteïnes de la família SLAM, especialment amb CD229, presentant una homologia del 34,6% i del 30,3% de la seqüència d'aminoàcids entre el domini IgV de CD84 i els dominis 1 i 3 de CD229, respectivament. El domini IgC2 mostra una homologia del 38,9%



amb el domini 2 i del 33,3% amb el domini 4 de CD229 (de la Fuente et al., 1999). CD84 s'uneix homofíllica i específicament a través del seu primer domini extracel·lular amb una forta associació de constant de dissociació ( $K_d$ ) en el rang micromolar (Yan et al., 2007).

**FIGURA 7:** Esquema de l'estructura de la proteïna CD84 murina i humana. La cua citoplasmàtica de CD84 conté dos residus de tirosina que formen part dels motius ITSM als que s'uneixen diferents proteïnes adaptadores. S'indica la posició de les tirosines relativa a l'extrem N-terminal. També s'indica el percentatge d'identitat entre la molècula humana i la murina.

El dímer format pel parell de proteïnes de CD84 és similar al descrit per a l'antigen NTB-A ja que ambdues proteïnes contenen una làmina que forma ponts d'hidrogen a la interfície, i un residu aromàtic (Y42 en el cas de CD84) en el centre de la unió entre les dues molècules. Tanmateix, hi ha certs detalls estructurals a la interfície d'ambdues interaccions que eviten les interaccions no específiques entre ells, com ara que la interfície del dímer en CD84 és de naturalesa hidrofílica, mentre que NTB-A conté un gran nombre d'aminoàcids hidrofòbics (veure figura 8). A més, la interfície de NTB-A és menys plana que la de CD84 (Yan et al., 2007).



**FIGURA 8:** Model d'interacció de CD84 entre una cèl·lula T i una cèl·lula APC. El diagrama evidencia la distància molecular d'interacció d'aquesta molècula amb NTB-A:NTB-A, MHC, TCR i CD58:CD2 (Chattopadhyay et al., 2009).

A la figura 8 es pot veure la distància entre les molècules en aquesta unió homofílica, que és d'uns 140 Å, i que coincideix amb la distància entre d'altres parells de molècules de la sinapsi immunològica (per exemple TCR:MHC, CD28:CD80, CD279:CD274 or CD152:CD80), (Chattopadhyay et al., 2009), el que permetria que aquesta proteïna formés part de la interacció entre la cèl·lula T i la cèl·lula presentadora d'antigen. A més, aquesta unió homofílica fa que CD84 actuï com a molècula d'adhesió, de la mateixa manera que està descrit per altres membres de la família SLAM (Cao et al., 2006); (Falco et al., 2004); (Kumaresan et al., 2002); (Mikhalap et al., 1999); (Romero et al., 2005).

### **1.2.2.3. Expressió**

Estudis de citometria de flux i d'expressió gènica duts a terme en el nostre laboratori i en d'altres demostren que CD84 s'expressa àmpliament en el sistema hematopoètic tant d'humà com de ratolí, essent el seu patró d'expressió força heterogeni i depenent del tipus cel·lular, l'estat de diferenciació o d'activació de la cèl·lula. CD84 es troba diferencialment expressat també en les subpoblacions de cèl·lules T i B, suggerint que pot tenir un paper funcional en el desenvolupament dels limfòcits (Chtanova et al., 2004); (De Salort et al., 2011). Aquesta proteïna es troba lleugerament expressada en cèl·lules progenitores derivades de medul·la (CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>) i de cordó umbilical tant en humà (Tangye et al., 2002), (Zaiss et al., 2003) com en ratolí (Sintes et al., 2010), fet que ha portat a alguns autors a considerar CD84 com un marcador de cèl·lules progenitores en estadis d'activació ja coneguts. En canvi, en cèl·lules B d'amígdala i melsa s'han observat alts nivells de CD84 (De Salort et al., 2011).

En cèl·lules B humanes es troba expressada en tots els estats de diferenciació, presentant una expressió moderada en cèl·lules pro-B i augmentant durant el desenvolupament (De Salort et al., 2011). En quant a les poblacions de cèl·lules B memòria (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>), aquestes presenten una expressió més elevada que les poblacions verges (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>) (Romero et al., 2004). CD84 també es troba expressada en la majoria de limfòcits T madurs i de timòcits. En aquest cas, CD84 s'expressa en les etapes més primerenques del desenvolupament com ara en timòcits doble negatiu (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>) i en simple positius (CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>) tot i que en un nivell més baix (Martin et al., 2001); (Romero et al., 2004). Les cèl·lules T citotòxiques presenten nivells més elevats d'aquesta proteïna (Romero et al., 2004), a diferència del que succeeix en ratolí, on els nivells de CD84 en cèl·lules CD4<sup>+</sup> són més elevats no només en sang perifèrica sinó també en esplenòcits (Sintes et al., 2010). Les cèl·lules T verges i memòria de sang perifèrica són també

positives per CD84, encara que amb un nivell més baix que les cèl·lules B (Romero et al., 2004). En ratolí, l'expressió de CD84 baixa durant el desenvolupament dels limfòcits del timus i medul·la òssia, trobant-se altament expressada en cèl·lules T i B madures (Sintes et al., 2010). Els majors nivells d'expressió per activació en humà es troben en les cèl·lules T CD45RO*high*. En canvi en ratolí s'ha observat que els limfòcits que expressen quantitats més elevades de CD84 són les cèl·lules NKT i les cèl·lules B de la zona marginal (Sintes et al., 2010), ambdues poblacions considerades com a limfòcits de tipus innat.

A més, com ja s'ha comentat, CD84 també es troba molt expressat en cèl·lules presentadores d'antigen, com ara els monòcits o les cèl·lules dendrítiques, i la seva expressió s'incrementa amb la diferenciació (Romero et al., 2004), contràriament al que succeeix en ratolí, on l'expressió de CD84 en cèl·lules dendrítiques immadures provinents de medul·la presenten una expressió més alta que les cèl·lules dendrítiques (Sintes et al., 2010). Recentment s'ha confirmat que CD84 es troba expressada en totes les poblacions de cèl·lules dendrítiques de sang perifèrica (Ding et al., 2011) i plasmacitoides (Cabezon et al., 2011).

També s'ha trobat que CD84 s'expressa a la membrana de la majoria dels granulòcits i mastòcits (Martin et al., 2001); (Romero et al., 2004) i en els blasts de la majoria de leucèmies mieloides i limfoblàstiques agudes (Zaiss et al., 2003). De tots els tipus cel·lulars, les plaquetes són les cèl·lules que expressen uns nivells més elevats de CD84, mentre que en cèl·lules NK i eritròcits es troba en proporcions poc importants o absent (Romero et al., 2004).

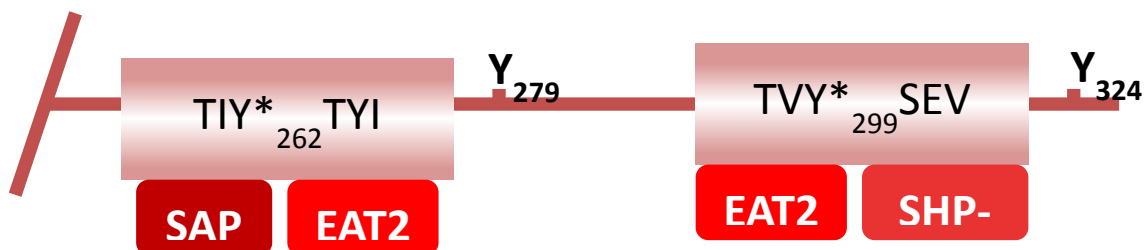
#### **1.2.2.4. Funció**

En unir-se homofilicament, CD84 dona lloc a la seva fosforilació a través de les tirosines presents a la cua citoplasmàtica i recluta les proteïnes adaptadores SAP, en el cas de les cèl·lules T, NK i NKT (Nagy et al., 2002), i EAT-2, en el cas de macròfags (Morra et al., 2001), procés en que participen també diferents cinases com ara Lck (Tangye et al., 2003) i Fyn (Sayos et al., 2001). S'ha comprovat que la fosforilació no requereix la unió de SAP en el cas de les cèl·lules T, ja que també es dona en línies cel·lulars deficientes per SAP i en pacients amb XLP (Tangye et al., 2002); (Tangye et al., 2003) (veure figura 9).

Estudis bioquímics demostren que la tirosina Y<sub>262</sub>, que forma part del primer motiu ITSM de CD84, és imprescindible pel reclutament de SAP, mentre que EAT-2 pot ser reclutat a més per Y<sub>298</sub> (Oliver-Vila et al., 2008); (Sayos et al., 2001); (Tangye et al., 2002); (Tangye et al., 2003).

També s'ha demostrat que SAP, SHP-2 i SHIP poden unir-se al residu no fosforilat de la tirosina 262, encara que aquesta unió és més eficient quan la proteïna està fosforilada (Li et al., 2003). S'ha demostrat *in vitro* que la unió homofílica de CD84 incrementa la secreció d'IFN- $\gamma$  en cèl·lules T estimulades amb un anticòs monoclonal  $\alpha$ -CD3, però no en cèl·lules no activades, suggerint que CD84 pot tenir algun paper co-estimulador en la senyalització mitjançada pel TCR (Martin et al., 2001); (Tangye et al., 2003). Recentment s'ha comprovat que la senyalització mitjançant el TCR és necessària per a una interacció prolongada entre cèl·lules T i B i per a un funcionament òptim de les cèl·lules T helper fol·liculars, així com per a una bona formació dels centres germinals.

Estudis amb el ratolí deficient per CD84,  $Cd84^{-/-}$ , mostren que la formació dels centres germinals es veu significativament reduïda, suggerint que CD84 és imprescindible per a una interacció cèl·lula T:cèl·lula B sostinguda. Aquesta interacció no es veu afectada amb altres cèl·lules presentadores d'antigen, com ara les cèl·lules dendrítiques (Cannons et al., 2010). CD84 també participa en l'activació de les cèl·lules B, ja que és fosforilat en produir-se la interacció amb un anticòs monoclonal  $\alpha$ -CD84, el que sembla que activaria les vies de senyalització en aquest tipus cel·lular i contribuiria a l'activació, proliferació i diferenciació (Tangye et al., 2002). Tanmateix, la funció de CD84 en cèl·lules B humanes així com la ruta de senyalització que aquesta segueix roman desconegut fins el moment.



**FIGURA 9:** Cua citoplasmàtica de CD84 on es mostren les tirosines i molècules adaptadores implicades en la senyalització

Darrers estudis del nostre grup demostren que CD84 modula la senyalització del TLR4 i regula les funcions efectores dels macròfags murins (Sintes et al., 2010). Estudis recents mostren que CD84 inhibeix la senyalització del receptor IgE d'alta afinitat en mastòcits humans, on la proteïna es troba en nivells alts. Aquesta senyalització implica tant la degranulació com la secreció de citocines, en les vies independents de SAP i EAT-2 com en les dependents de Fas i SHP-1 (Alvarez-Errico et al., 2011). D'altra banda, un estudi recent demostra que CD84 pot ser un marcador en el tractament amb milatuzumab en pacient amb leucèmia limfocítica crònica i

que la inhibició d'aquesta proteïna dona lloc a una reducció de Bcl-2 i conseqüentment a un augment de la mort de les cèl·lules leucèmiques (Binsky-Ehrenreich et al., 2013). Recentment també s'ha observat una correlació important entre els nivells d'ARN de CD84 i el tractament amb etanercept en pacients amb artritis reumatoide, indicant que els pacients amb una millor resposta al tractament presenten un nivell més elevat de CD84 en cèl·lules de sang perifèrica (Cui et al., 2013).

## **2. AUTOIMMUNITAT**

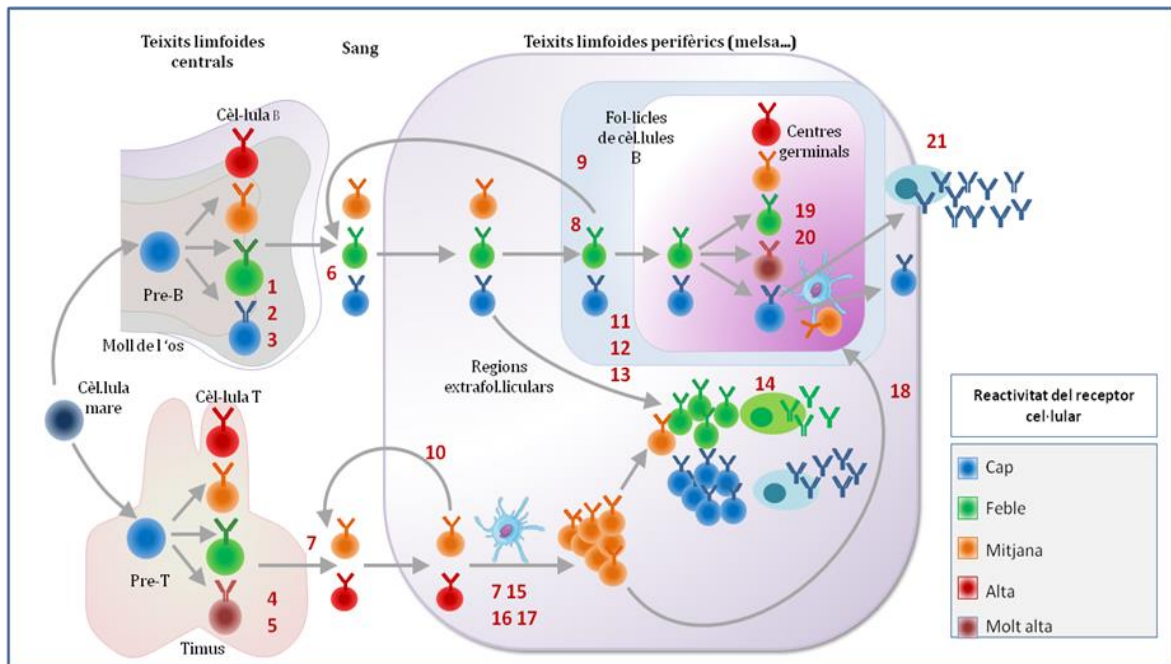
El sistema immune és el responsable de defensar l'organisme davant una gran diversitat de patògens, però sense respondre contra ell mateix. Nombroses evidències clíniques als anys 60 van demostrar l'existència de diverses malalties com a resultat d'una resposta aberrant del sistema immune en les quals, cèl·lules i teixits del propi organisme són atacades (Mak, 2011). Tots els individus sans presenten un cert grau d'autoimmunitat, degut a la presència de títols baixos d'autoanticossos al sèrum, els quals es veuen incrementats com a conseqüència a processos infecciosos i inflamatoris. És important però, diferenciar entre autoimmunitat i malaltia autoimmune, ja que aquesta només apareix quan hi ha un dany tissular. En una resposta autoimmune, la reacció contra l'autoantigen es prolonga en el temps degut a la presència continuada dels autoantígens, motiu pel qual les malalties autoimmunes són cròniques i prevalen durant tota la vida.

### **2.1- MECANISMES DE CONTROL DE LA TOLERÀNCIA**

Durant el desenvolupament dels limfòcits T al timus i dels limfòcits B al moll de l'os, s'inicien diversos mecanismes de tolerància central que vetllen per la correcta eliminació dels limfòcits autorreactius. Cal que aquests limfòcits reconeguin molècules MHC pròpies però que no s'activin en front d'antígens propis. En aquest cas, aquests limfòcits són seleccionats negativament per tal d'evitar la seva maduració i migració als teixits perifèrics, essent eliminats per apoptosi o entrant en estat d'anèrgia. Alguns limfòcits B poden modificar l'especificitat cap a l'antigen en induir-se un canvi a la cadena lleugera. Els limfòcits T CD4+ autorreactius poden diferenciar-se a limfòcits T reguladors, migrar cap a la perifèria i impedir reaccions en front d'antígens propis.

Malgrat el procés de selecció negativa, alguns limfòcits autorreactius aconsegueixen escapar d'aquesta selecció i anar cap a la perifèria, on es troben amb el segon mecanisme de tolerància. La tolerància perifèrica actua a diferents nivells, com ara ignorant als antígens propis per una accessibilitat deficient del sistema immune o bé per una càrrega antigènica insuficient. Si el limfòcit reconeix un antigen a la perifèria, s'indueix l'anèrgia mitjançant una activació deficient. Quan aquests mecanismes de tolerància fallen i hi ha una expansió clonal d'un limfòcit autorreactiu, es posa en marxa un canvi de fenotip, de manera que canvia la seva composició en receptors de quimiocines i en el tipus de citocines produïdes.

A la figura 10 es mostren alguns d'aquests mecanismes. Els diferents colors mostren l'avidesa dels diferents BCRs o TCRs pels antígens propis (veure llegenda). Cada mecanisme de tolerància cel·lular per part del BCR als òrgans limfoides centrals s'assenyala amb un nombre diferent. Aquests són: (1) Detenció de la maduració de les cèl·lules B; (2) Edició de la cadena lleugera del BCR per recombinació del V(D)J; (3) Mort i eliminació de les cèl·lules B immadures. Mecanismes de tolerància per part del TCR als òrgans limfoides centrals: (4) Edició de la cadena lleugera del TCR per recombinació del V(D)J; (5) Mort i eliminació de les cèl·lules T semimadures. Regulació intrínseca de receptors autorreactius per anèrgia i ajustament bioquímic: (6) Ajustament/anèrgia del BCR; (7) Ajustament/anèrgia del TCR. Regulació intrínseca de receptors autorreactius per limitació dels estímuls immunogènics: (11) Control de la disponibilitat de les cèl·lules T cooperadores extrafol·liculars; (12) Control dels lligands del TLR i de la senyalització; (12) Mort de les cèl·lules B induïda per FASL de les cèl·lules T; (14) Inhibició del BCR de la diferenciació de cèl·lules plasmàtiques; (15) Control dels lligands de B7 i altres molècules coestimuladores; (16) Mort de cèl·lules T induïda per FASL; (17) Supressió de cèl·lules T per part de les cèl·lules T reguladores; (18) Control d'ICOS i de la diferenciació de cèl·lules T cooperadores; (19) Mort cel·lular dels centres germinals induïda pel BCR; (20) Mort cel·lular de les cèl·lules B dels centres germinals per la competició per cèl·lules T cooperadores fol·liculars; (21) Control de la concentració d'anticossos i de la inflamació dels teixits (Goodnow et al., 2005).



**FIGURA 10:** Mapa dels punts de control de la regulació dels receptors autorreactius. Els diferents colors mostren l'avidesa dels diferents BCRs o TCRs pels antígens propis (veure llegenda) (Modificat de (Goodnow et al., 2005)).

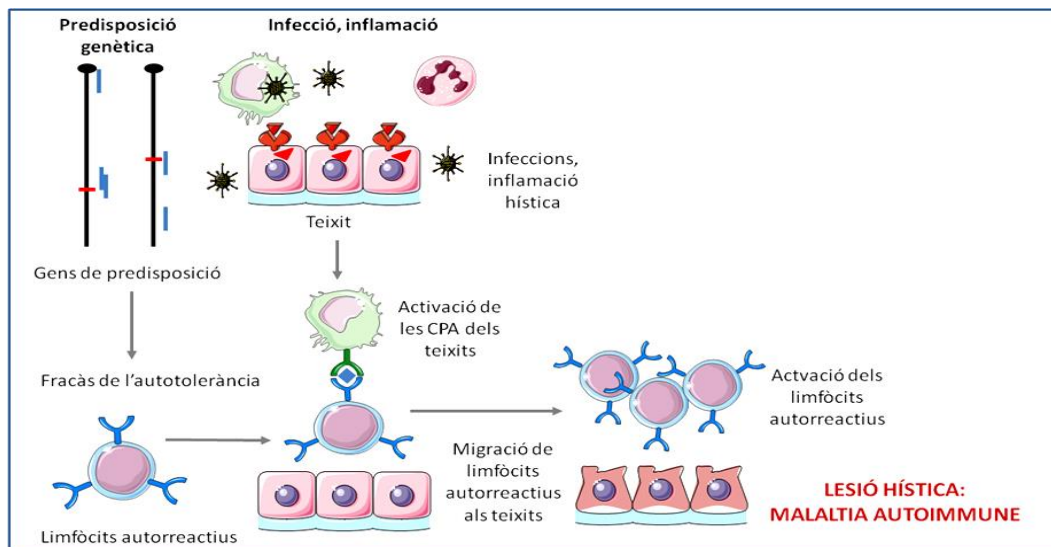
L'autoimmunitat és una causa important de malaltia en l'ésser humà i es calcula que afecta entre el 2% i el 5% de la població mundial (Jacobson et al., 1997). Malgrat que actualment la causa d'aquestes malalties no es coneix de manera completa, l'estudi de l'autoimmunitat ha permès extreure diversos conceptes generals. En primer lloc, l'autoimmunitat es deu a la insuficiència o pèrdua dels mecanismes que en condicions normals són els responsables del manteniment de la tolerància dels limfòcits T i/o B (veure figura 10). Tots els individus poden presentar autoimmunitat ja que durant el seu desenvolupament, els limfòcits poden expressar receptors específics per a autoantígens i molts d'aquests autoantígens són accessibles al sistema immunitari. Com ja s'ha mencionat, en condicions normals, la tolerància als autoantígens es manté gràcies als processos de selecció mostrats a la figura 10 que eviten la maduració d'alguns limfòcits específics per autoantígens i per mecanismes que inactiven o eliminen els limfòcits autorreactius que arriben a madurar. La pèrdua de l'autotolerància pot ser conseqüència d'una selecció o regulació anormal dels limfòcits autorreactius o d'alteracions de la presentació dels autoantígens al sistema immunitari. En l'actualitat es creu que la intervenció dels limfòcits T en l'autoimmunitat és important principalment per dues raons. En primer lloc, perquè els limfòcits T cooperadors són els reguladors clau de totes les respostes immunes a les proteïnes. En segon lloc, diverses malalties autoimmunes estan relacionades amb el complex HLA humà i la funció de les molècules d'aquest complex és presentar els antígens peptídics als limfòcits T. Per tant, la pèrdua de tolerància dels limfòcits T és un mecanisme important a les malalties autoimmunes. La pèrdua de l'autotolerància



d'aquests limfòcits pot causar malalties autoimmunes en les que les lesions es deuen a reaccions immunitàries de tipus cel·lular. Les anomalies dels limfòcits T cooperadors també poden donar lloc a la síntesi d'autoanticossos, ja que aquestes cèl·lules són necessàries per a la producció d'anticossos d'afinitat elevada contra els antígens de naturalesa proteica (Ohashi, 2002).

També se sap que els factors principals que contribueixen al desenvolupament de l'autoimmunitat són la predisposició genètica i els factors ambientals, com per exemple les infeccions (Bach, 2005) (veure figura 11). Tant la predisposició genètica com les infeccions contribueixen a la pèrdua de l'autotolerància, i a més les segones afavoreixen la migració als teixits i l'activació dels limfòcits T autorreactius, amb la subseqüent lesió hística. Les infeccions i les lesions dels teixits poden alterar també la presentació dels autoantígens al sistema immunitari, el que origina una pèrdua de l'autotolerància.

A més, les malalties autoimmunitàries poden ser sistèmiques, degut a la formació d'immunocomplexes circulants formats per autoantígens i anticossos específics, com en el cas del LES; o específiques d'òrgans, quan els autoanticossos o les respostes dels limfòcits T contra autoantígens de distribució restringida en els teixits produeixen malalties específiques d'òrgans, com ara l'esclerosi múltiple o la diabetis de tipus I.



**FIGURA 11:** Possibles mecanismes d'autoimmunitat. En aquest model de malaltia autoimmune duta a terme per limfòcits T específics d'òrgan, diversos locus gènics poden conferir propensió a l'autoimmunitat, en influir en part en el manteniment de l'autotolerància. Els desencadenants ambientals, com les infeccions i altres estímuls inflamatoris estimulen la migració dels limfòcits als teixits i l'activació dels limfòcits T autorreactius, com la conseqüent lesió hística. (Figura adaptada de (Abul K Abbas, 2011))

Diversos mecanismes efectors són els responsables de la lesió dels teixits en les diferents malalties autoimmunes, com ara els immunocomplexes, els autoanticossos circulants i els limfòcits T autorreactius, com ja s'ha comentat anteriorment.

## 2.2. LUPUS ERITEMATÓS SISTÈMIC

### 2.2.1- EL LES

El lupus eritematós sistèmic (LES) és una malaltia autoimmuna crònica que afecta principalment a dones i que s'inicia en el període fèrtil. La incidència varia molt entre poblacions, essent des de 40 casos de cada 100000 persones entre la població europea, fins a més de 200 casos de cada 100000 en la població afrocaribenya (Johnson et al., 1995). L'esperança de vida ha augmentat considerablement en els últims anys (Merrell and Shulman, 1955); (Rahman and Isenberg, 2008). Es creu que el fet que aquesta malaltia, com la majoria de les malalties autoimmunes (Almeida Gonzalez et al., 2010), afecti a 9 dones per cada home no només es deu a una contribució dels estrògens femenins, sinó que tant les hormones masculines com els gens del cromosoma Y poden estar jugant un paper protector. La característica principal del LES és la producció d'autoanticossos patogènics contra diversos d'antigens nuclears; que donen lloc a diferents lesions dels teixits com a conseqüència de la deposició d'immunocomplexes. Posteriorment un 50% dels malalts presenten altres complicacions severes, com ara nefritis, vasculitis que afecta al sistema nerviós central, hipertensió pulmonar i dany pulmonar intersticial, entre d'altres. Els pacients amb aquesta malaltia pateixen brots i remissions que afecten a diversos òrgans, així com els efectes secundaris que produeix el tractament amb immunosupressors emprats per controlar la malaltia i el dany tissular. Un dels motius pels quals és difícil avançar en el tractament del LES és la dificultat en l'avaluació dels resultats dels tractaments degut a la complexitat de la patologia i l'heterogeneïtat de les manifestacions clíniques. És per això que s'han proposat diversos mètodes per mesurar l'índex d'activitat de la malaltia, com ara el de l'*American College of Rheumatology*, que ha establert onze criteris fixos per diagnosticar aquesta malaltia amb l'índex SLEDAI (*Systemic Lupus Erythematosus Activity Index*). Aquest mètode és el que es va utilitzar des de l'inici als Estats Units, i consisteix en fer un seguiment al pacient durant deu dies controlant 24 paràmetres diferents, els quals es puntuen segons la intensitat del

síntoma (Bombardier et al., 1992), i dels quals el pacient ha de presentar almenys quatre (veure taula 3).

<b>Criteri</b>	<b>Definició</b>
<b>Eritema malar</b>	Erupció a les galtes
<b>Eritema discoide</b>	Erupció que apareix en forma de taques discoides vermelles
<b>Fotosensibilitat</b>	Reacció a la llum que produeix un augment de l'eritema cutani
<b>Úlceres bucals</b>	Úlceres a nas i boca, generalment indolores
<b>Artritis</b>	Artritis no erosiva que afecta dues o més articulacions perifèriques
<b>Serositis</b>	Pleuritis o pericarditis
<b>Afecció renal</b>	Excés de proteïnes a l'orina i/o cilindres cel·lulars
<b>Afecció neurològica</b>	Convulsions, trastorns neurològics i/o psicosis en absència de medicaments
<b>Afecció hematològica</b>	Anèmia hemolítica, leucopènia (glòbuls blancs per sota de 4000 cèl/mm <sup>3</sup> ), limfopènia (limfòcits per sota de 1500 cèl/mm <sup>3</sup> ) o trombocitopènia (plaquetes inferiors a 100000 cèl/mm <sup>3</sup> )
<b>Anticossos antinuclears</b>	Prova positiva pels anticossos antinuclears en absència dels fàrmacs coneguts per produir-los
<b>Afecció immunològica</b>	Examen de laboratori positiu per anti-ADN de doble cadena, anti-Sm positiu, anticoagulant lúpic o anticossos anticardiolípinas

TAULA 3: Índex d'activitat del LES (Modificat de <http://www.funclup.org>)

## 2.2.2- Fisiopatologia del LES

Actualment s'entén el LES com un grup heterogeni de disfuncions en el qual tant els factors ambientals com la susceptibilitat genètica donen lloc a l'activació del sistema immune innat i adaptatiu, i conseqüentment a una pèrdua de la tolerància als antígens propis.

S'han identificat tres causes principals que impliquen el sistema immune en el desenvolupament de la malaltia: en primer lloc, una eliminació deficient de les restes dels àcids nucleics i dels complexos antígen-anticòs; en segon lloc, una activació excessiva del sistema immune innat que implica els *toll-like receptors* (TLRs) i als interferons de tipus I (IFNs); i finalment, a una activació anormal dels limfòcits T i B (Liu and Davidson, 2012).

L'eliminació de les restes cel·lulars és una funció del sistema immune clau per al manteniment de l'autotolerància. Són moltes les vies que existeixen per tal d'eliminar aquestes restes generades diàriament, com ara l'eliminació de les cèl·lules apoptòtiques per part dels fagòcits, a través de receptors que reconeixen l'alteració dels components de la membrana, o els antígens propis, els quals són opsonitzats pels anticossos de tipus IgM presents al sèrum dels individus sans. A més, les nucleases són les encarregades d'eliminar els àcids nucleics circulants, la qual cosa evita el seu reconeixement per part dels receptors innats. Un mal funcionament dels mecanismes d'eliminació dona lloc a una necrosi secundària i a una concentració molt elevada d'autoantígens que, en comptes de ser eliminats pels fagòcits, interaccionen amb els receptors proinflamatoris com ara els receptors Fc (FcR) o els receptors tipus *toll* (TLR).

El sistema immune adaptatiu també juga un paper important en el desenvolupament d'aquesta malaltia, ja que inclou l'expansió clonal dels limfòcits i la generació de cèl·lules T i B efectores. Els limfòcits autorreactius es generen contínuament per recombinació somàtica, que és l'encarregada de la gran diversitat de receptors de cèl·lules T i B necessaris per a la protecció davant dels patògens. Malgrat que els anticossos IgM naturals de baixa afinitat produïts per subpoblacions específiques de cèl·lules B ajuden en la prevenció d'una possible resposta immune davant dels productes derivats de la mort cel·lular, la possible resposta dels limfòcits autorreactius potencialment patogènics s'evita mitjançant diversos mecanismes com ara la seva eliminació en punts de control específics, l'anèrgia, el reemplaçament dels seus receptors o l'eliminació per part de molècules reguladores o cèl·lules. En el LES, aquests mecanismes reguladors poden estar alterats genètica i/o ambientalment. Hi ha evidències que demostren que hi ha una afectació en l'expansió clonal dels limfòcits B autorreactius (Arbuckle et al., 2003), i molts estudis en ratolí que mostren una contribució de les cèl·lules T en l'inici de la malaltia (Perl et al., 2009); (Crispin et al., 2010b); (Harley et al., 2009).

El paper de les cèl·lules T helper fol·liculars (THF), recentment descobertes (Breitfeld et al., 2000), també sembla tenir importància en el desenvolupament del LES. Una regulació irregular d'aquestes cèl·lules dona lloc a una diferenciació de les cèl·lules B en els centres germinals, efecte que s'associa amb el LES en models animals (Linterman et al., 2009). També s'ha vist en els malalts de LES una expansió de la població circulant de cèl·lules THF (Simpson et al., 2010). En els models de LES, s'han vist nombroses cèl·lules tipus THF a l'exterior dels centres germinals, les quals contribueixen al desenvolupament de les cèl·lules B extrafol·liculars (Odegard et al., 2008).

Altres disfuncions en el LES descrites inclouen una disminució de les cèl·lules T reguladores i una expansió de la població CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> (Crispin et al., 2008), que produeix la secreció de la citocina IL-17 i probablement contribueixi a la inflamació dels ronyons. La manca de tolerància de les cèl·lules B també ajuda al desenvolupament de la malaltia. Els punts de control perifèrics i centrals encarregats d'eliminar les cèl·lules B autorreactives immadures són defectuosos en malalts de LES (Goodnow et al., 2010). Una sobre-senyalització del BCR dona lloc a una autorreactivitat, probablement com a resultat d'una excessiva activació de cèl·lules B després de l'últim estadi transicional, quan el BCR comença a activar les cèl·lules en comptes de tolerar-les. El trencament de la tolerància de les cèl·lules B també es pot donar durant l'activació antigènica. La regulació dels centres germinals és una de les àrees de més interès, ja que és on té lloc l'expansió clonal juntament amb la mutació somàtica, el canvi de classe i la diferenciació a cèl·lules efectores. La selecció dels centres germinals és defectuosa en el LES, cosa que permet als limfòcits B autorreactius diferenciar-se a cèl·lules memòria patogèniques (Cappione et al., 2005). Els limfòcits B autorreactius poden expandir-se fora dels centres germinals degut a un excés de senyals inflamatòries com ara la produïda per la citocina IL-12 (Ohl and Tenbrock, 2011), la lligació dels TLR (Herlands et al., 2007) o de CD40 (Erickson et al., 2002).

### **2.2.3- Genètica del LES**

Tot i que la comunitat científica ha centrat molts esforços des de fa anys a entendre les bases genètiques del LES, els estudis d'associació de amplitud genòmica (*genome-wide association studies*, GWAS) duts a terme darrerament, han permès la identificació de més de 30 gens associats a la malaltia, (veure taula 4). Des d'un punt de vista funcional, aquests gens que participen en una gran varietat de processos biològics com ara l'apoptosi, la resposta immune innata, la ubiquitinació o la fagocitosi (Guerra et al., 2012).

En l'apoptosi, o mort cel·lular programada, intervenen diversos gens i tipus cel·lulars. En individus sans, els macròfags són els encarregats d'eliminar les cèl·lules apoptòtiques o mortes. En pacients amb LES, l'apoptosi és defectuosa i és una de les principals responsables en la manifestació de la malaltia (Bannister et al., 1984), ja que els pacients presenten una eliminació deficient de les cèl·lules apoptòtiques. Uns dels gens encarregats d'una eliminació eficient són els que formen part del sistema del complement.

Es creu que una deficiència total o parcial dels gens que formen part de les fases primerenques de la cascada del complement (C1, C2 i C4) pot contribuir a una mala eliminació dels immunocomplexes i del material apoptòtic (Crispin et al., 2013). En no ser eliminades correctament, les cèl·lules passen al procés de necrosi secundària, alliberant autoantígens nuclears i activant la producció de citocines inflammatòries i interferó-alfa (IFN- $\alpha$ ), amb la qual cosa s'afavoreix que els limfòcits perdin la tolerància, i s'indueixi la producció d'autoanticossos i la deposició d'immunocomplexes. L'endocitosi d'aquests immunocomplexes activa diversos receptors cel·lulars i estimula la producció d'IFN per part de les cèl·lules dendrítiques plasmacitoides, el que propaga la pèrdua de tolerància i la inflamació crònica, trets característics de la malaltia. Alguns dels gens implicats en aquest procés són ITGAM i els gens FCGR. ITGAM codifica per a la cadena  $\alpha$  de la integrina  $\alpha M\beta 2$  (CD11b), la qual té un paper molt important en la fagocitosi i l'adhesió dels leucòcits. Mutacions d'aquesta proteïna produeixen modificacions de la seva estructura i fan variar la seva afinitat pel lligand, traduint-se en una fagocitosi i eliminació d'immunocomplexes deficients (Nath et al., 2008); (Hepburn et al., 2006). Els gens FCGR codifiquen pels receptors FC $\gamma$ , que reconeixen la porció Fc de les immunoglobulines G. Diversos polimorfismes de FCGR2A, FCGR2B i FCGR3A veuen alterada la seva afinitat per determinades subclasses d'IgG i s'associen al LES (Karassa et al., 2003); (Brown et al., 2007); (Floto et al., 2005). A la taula 4 es mostren alguns dels gens implicats en aquests processos.

	Cèl·lules	Vies de senyalització	Gens
Sistema immunitari innat	Cèl·lules dendrítiques Macròfags	Via TLR/IFN	IRF5 STAT4 SPP1 IRAK1 TREX1
		Via TNF/NF $\kappa$ B	TNFAIP3
Activació/Funció dels limfòcits	Cèl·lules T autorreactives Cèl·lules B autorreactives	Via cèl·lules T	HLA-DR PTPN22 STAT4 PDCD1 IRAK1 TNFSF4
		Via cèl·lules B	HLA-DR BLK BANK1 FCGR2B LYN
Eliminació dels complexos antígen-anticòs	Macròfags Neutròfils	Fagocitosi	FCGR3A FCGR3B CRP ITGAM
		Complement	C4A C4B C2 C1q
Altres		Apoptosi	ATG5 STAT4
		Ubiqüitinització	UBE2L3 TNFAIP3
		Metilació de l'ADN	MECP2
		Adhesió cel·lular	ITGAM
		Desconeguda	PXK ICA1 SCUBE1 NMNAT2 XKR6 KIAA1542

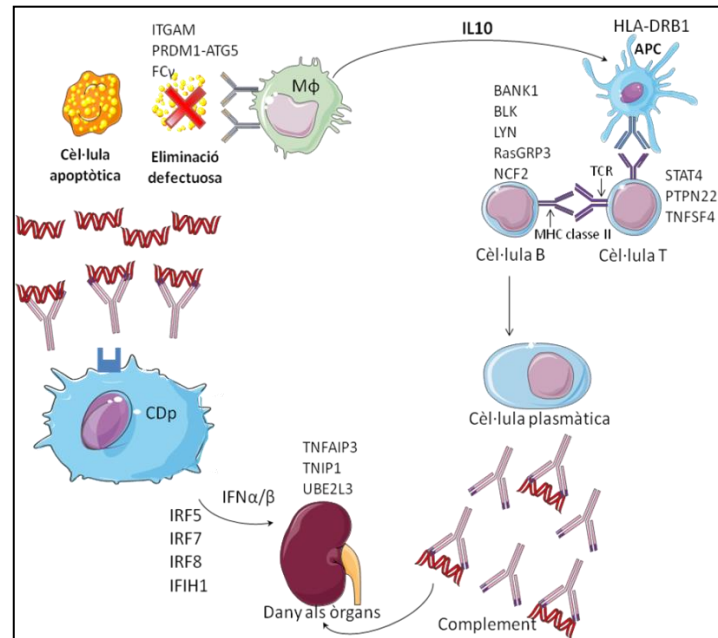
**TAULA 4:** Gens implicats en el desenvolupament del LES, pertanyents a diferents processos biològics i vies de senyalització (modificat de Moser et al., 2009).

L'ubiquitinació és un procés bioquímic pel qual les proteïnes són marcades per tal de ser degradades proteolíticament pel proteosoma. Els gens que codifiquen pels diferents components d'aquest procés també han estat relacionats amb el LES. Dos exemples són els gens TNFAIP3 i TNFIP1. El primer codifica per a l'enzim A20, el qual ha estat associat en molts casos amb diferents malalties autoimmunes, com ara artritis reumatoide i malaltia de Crohn (Moser et al., 2009). TNIP1 és una proteïna adaptadora induïda per NF- $\kappa$ B que s'uneix a A20. En el LES, aquest gen fa que la via de NF- $\kappa$ B sigui menys efectiva, el que propaga la resposta pro-inflamatòria i la inflamació crònica.

Una altra de les vies afectades en aquesta malaltia és la regulació de l'IFN. Més de la meitat dels malalts de LES mostren una alteració en els gens implicats en la via de senyalització de l'IFN. Els IFN de tipus I són potents citocines (IFN $\alpha$  i IFN $\beta$ ) que modulen la resposta Th<sub>1</sub>, mantenen l'activació de les cèl·lules T, afavoreixen la maduració de les cèl·lules dendrítiques i la producció de citocines entre d'altres. En el LES aquesta via contribueix també a la propagació de la resposta pro-inflamatòria i la inflamació crònica. Hi ha diversos gens involucrats en aquests processos que s'han relacionat amb el LES, com ara els gens IRF5, IRF7 i IRF8, IRAK, IFIH o STAT4. Els gens IRF5, IRF7 i IRF8 són factors de transcripció amb un paper important en la senyalització de l'IFN de tipus I i el desenvolupament cel·lular. Els estudis genòmics mostren variants d'aquests gens que incrementen el nombre de transcrits i l'expressió de les proteïnes, especialment de IRF5, la qual augmenta la producció d' IFN $\alpha$  (veure figura 12).

En aquests estudis genòmics també s'han identificat gens que participen en el desenvolupament dels limfòcits T i B. S'ha vist que en el LES, les cèl·lules T mostren una deficient redistribució cap al teixit (*tissue homing*), un increment de la secreció de les citocines i una activació de les cèl·lules B i dendrítiques. Alguns dels gens implicats són ETS1 i IKZF1, que són factors de transcripció que regulen la diferenciació i el desenvolupament dels limfòcits. Els pacients amb LES mostren una reducció de l'expressió del gen ETS1, que dóna lloc a una diferenciació incorrecta de les cèl·lules B a cèl·lules plasmàtiques i a un nombre elevat de cèl·lules Th<sub>17</sub>. També s'han observat nivells més baixos de IKZF1 a les cèl·lules de sang perifèrica (Yang et al., 2010), el que produeix una regulació errònia de la diferenciació cel·lular i en conseqüència de l'autotolerància a través de la senyalització del BCR (Wojcik et al., 2007). La hiperactivació de les cèl·lules B juguen un paper important en la patogènesi del LES. Amb la producció d'autoanticossos i una prolongació de la vida cel·lular, la regulació d'aquestes cèl·lules és important per assegurar un bon funcionament del sistema immune. S'ha vist que els pacients amb LES presenten una inducció de les cèl·lules T helper CD4<sup>+</sup> (Th<sub>1</sub>/Th<sub>2</sub>), inhibeixen

les cèl·lules T reguladores i secreten citocines pro-inflamatòries (Sanz and Lee, 2010). Alguns dels gens implicats en aquests processos són BANK1, BLK i LYN, que participen en la via de senyalització del BCR.



**FIGURA 12:** Esquema del funcionament deficient del sistema immunitari en malalts de LES (Modificat de Guerra et al 2012)

Els pacients amb LES mostren també un nombre elevat de cèl·lules T  $CD3^+CD4^+CD8^-$  i  $Th_{17}$  i un mal funcionament de les cèl·lules T reguladores, el que fa que augmenti la inflamació, la interacció amb les cèl·lules B i el dany tissular (Zhou et al., 2009). És en aquesta malaltia on les cèl·lules T desencadenen la via del CD3 i TCR més ràpid, donant lloc a una hiperactivació de les cèl·lules T. S'ha vist també que alguns tipus de cèl·lules T, com ara les  $CD4^+CD25^+$ , són defectuoses. També s'ha vist que en aquesta malaltia, les cèl·lules T presenten més apoptosi. Alguns gens que contribueixen a aquests efectes són STAT4, PTPN22 i TNFSF4. STAT4 és un factor de transcripció de les cèl·lules  $Th_1$  encarregat de modular la resposta i la secreció de citocines d'aquest tipus cel·lular, així com d'intervenir en la senyalització d'IL-12, IL-23 i IFN $\gamma$ . S'ha vist que algunes mutacions en aquest gen estan implicades en diverses malalties autoimmunes com ara l'artritis reumatoide (Remmers et al., 2007), el síndrome de Sjögren (Korman et al., 2008) o la diabetis de tipus I (Martinez et al., 2008). PTPN22 codifica per la fosfatasa LYP, que està involucrada en la regulació de l'activació de les cèl·lules T a partir de la interacció amb la proteïna CSK i la supressió de les cèl·lules T reguladores. S'ha vist que en pacients amb LES aquesta interacció és menys efectiva, la qual cosa redueix la senyalització del TCR (Vang et al., 2005). TNFSF4 és una proteïna que s'expressa a la membrana de les cèl·lules



presentadores d'antigen i que s'uneix únicament al seu lligand OX40, expressat en cèl·lules T CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> activades. Aquesta proteïna es troba sobreexpressada en malalts de LES, el que produeix un augment del senyal entre les cèl·lules T i les cèl·lules presentadores d'antigen, afavorint la supervivència de les cèl·lules T i l'autoimmunitat (Guerra et al., 2012).

Malgrat se sap que el LES és una malaltia en el que cada gen té una contribució petita, el complex d'histocompatibilitat (MHC) és la regió gènica que mostra una associació més forta amb el LES. Els gens del MHC són els responsables de la resposta immune en front un patogen, i són els que determinen l'efectivitat d'aquesta resposta. Així doncs, els gens del MHC també són els responsables de la producció d'anticossos específics en el LES. S'ha vist que una de les regions amb més rellevància és una zona de 180 kb del HLA de classe II, que inclou HLA-DRB1, HLA-DQA1 i HLA-DQB. Recentment s'ha trobat que la regió III pot tenir una contribució molt important a la susceptibilitat al LES (Guerra et al., 2012).

### 2.3 ARTRITIS REUMATOIDE



**FIGURA 13:** Imatge de rajos X de les mans d'un malalt d'artritis reumatoide

L'artritis reumatoide és una malaltia articular inflamatòria crònica multisistèmica d'etiologia desconeguda. Afecta de forma simètrica les articulacions sinovials, tot i que també afecta altres òrgans, per la qual cosa és considerada com una malaltia sistèmica. La inflamació sinovial persistent destrueix el cartílag articular, provoca erosions a l'epífisi i en fases avançades

deforma les articulacions i provoca incapacitat funcional (veure figura 13). Tot i això, l'evolució de la malaltia és molt variable. La malaltia es distribueix equitativament entre la població mundial, amb una incidència més elevada en dones que en homes (3:1). La prevalença oscil·la entre el 0.3% i el 1.2%. Es presenta a qualsevol edat, essent més comú entre els 40 i els 60 anys.

A la majoria dels casos, a l'inici de la malaltia predominen les manifestacions articulars, a les que s'associen altres símptomes com ara astènia, anorèxia o pèrdua de pes. Inicialment es

presenta com una hiperplasia i hipertròfia de la capa sinovial, juntament amb la lesió microvascular. Amb el temps, el teixit sinovial edematós protueix a la cavitat sinovial. L'artritis afecta a una o diverses articulacions simultàniament a les quals es van sumant més articulacions que les afectades al primer estadi. Pot romandre en una articulació durant setmanes, mesos i fins i tot anys fins a generalitzar-se. La distribució inicial acostuma a ser per les petites articulacions de les mans, canells, peus i genolls (veure taula 5).

### **2.3.1. Fisiopatologia de l'AR**

A l'artritis, els vasos del sinovi són envoltats per un infiltrat mononuclear, format per limfòcits T, macròfags i limfòcits B. Totes aquestes cèl·lules rebel·len l'afectació activa en el procés inflamatori crònic, a través de l'expressió de marcadors d'activació i diferenciació. Entre els limfòcits T, el nombre de cèl·lules CD4 és molt superior al de CD8, i també el de limfòcits T que expressen el receptor de l'antigen  $\gamma\delta$  i que forma un component diferenciat de l'infiltrat (Abbas AK, 2011). En un context patogènic, les molècules de classe II presentarien un autoantigen peptídic aritrogènic als limfòcits T CD4, que estan especialment ben representats i en un estat d'activació dins el sinovi reumàtic. Aquests limfòcits T col·laboradors activarien, al seu torn, els limfòcits T citotòxics CD8, els macròfags i els limfòcits B. L'augment dels nivells de citocines derivades dels monòcits, com ara TNF- $\alpha$  i IL-1 al sinovi, al líquid sinovial i a la circulació posa en evidència l'activació dels macròfags (Carmona et al., 2010).

### **2.3.2. Patogènesi de l'AR**

La causa de l'artritis reumatoide és desconeguda. Es creu que sobre una base genètica, que constitueix aproximadament un 60% del risc a patir la malaltia, actuarien un o diferents antigens ambientals que desencadenarien la malaltia a través d'una reacció inflamatòria perpetuada per mecanismes autoimmunes. No està clar quin es l'antigen que causaria la malaltia, els agents bacterians i vírics com micoplasma, virus d'Epstein-Barr (Balandraud et al., 2004) o citomegalovirus són alguns dels agents amb els que s'ha especulat. També hi ha controvèrsia entre els mecanismes que desencadenen la reacció inflamatòria crònica articular

a partir d'una infecció. Es creu que una infecció persistent de les estructures articulars així com una retenció dels productes microbians a la membrana sinovial podrien ser les causes.

Una de les teories més acceptades és la descrita per Zvaifler l'any 1973 (Zvaifler, 1973). Aquesta teoria sosté que el factor reumatoide, això és, l'autoanticòs contra la porció Fc de les IgG que es produeix en aquesta malaltia, forma immunocomplexes que fixen el complement donant lloc a l'alliberament de factors quimiotàctics com ara C5a. Aquest autoanticòs és produït pels limfòcits B sinovials i poden pertànyer a qualsevol de les tres classes principals d'Ig (G, A i M), però el factor reumatoide clàssic és una IgM pentamèrica. Conseqüentment, les

<b>Criteri</b>	<b>Definició</b>
<b>Rigidesa matutina</b>	Rigidesa a les articulacions i periarticular que persisteix durant una hora
<b>Artritis de tres o més àrees articulars</b>	Com a mínim tres àrees articulars, observades per un metge, presenten simultàniament inflamació/tumefacció dels teixits tous o vessaments articulars i no només proliferació òssia; les 14 possibles àrees articulars afectades són les articulacions interfalàngiques proximals esquerra i dreta, les metacarpofalàngiques, el canell, el colze, el genoll, el turmell i les metatarsofalàngiques
<b>Artritis de les articulacions de les mans</b>	Artritis de l'articulació del canell, les metacarpofalàngiques o les interfalàngiques proximals
<b>Artritis simètrica</b>	Afectació simultània de les mateixes àrees articulars en ambdues parts del cos
<b>Nòduls reumatoïdes</b>	Nòduls subcutanis sobre les prominències òssies, superfícies extensores o regions juxtaarticulars, observades per un metge
<b>Factor reumatoïde sèric</b>	Demostració de quantitats anòmales del factor reumatoïde sèric mitjançant qualsevol mètode per al qual el resultat ha estat positiu en menys del 5% dels individus control sans
<b>Canvis radiològics</b>	Canvis típics d'artritis reumatoïde a la regió posteroanterior de les radiografies de mà i canell, que han d'incloure erosions o una descalcificació òssia clara (osteoporosi), localitzada a l'articulació afectada

**TAULA 5:** Guies per a la classificació de l'artritis reumatoïde. Per a que la malaltia sigui detectada el pacient ha de patir almenys quatre dels set criteris mostrats a la taula (Adaptat de *Inmunología Básica y Clínica* 2ª Ed. (Peakman and Vergani)

cèl·lules inflamatòries migren cap a aquesta articulació i destrueixen el teixit. En particular els neutròfils s'acumulen en el fluid sinovial, on fagociten els complexos immunes i alliberen enzims proteolítics.

Però tot i que moltes característiques de la malaltia podrien explicar-se amb aquesta teoria, existeixen nombroses malalties inflamatòries cròniques que produeixen un valor alt del factor reumatoide a la sang, sense donar lloc a una resposta inflamatòria. A més, moltes malalties inflamatòries estan caracteritzades per la presència de complexos immunes, per la qual cosa aquesta teoria no explicaria algunes de les característiques úniques de l'artritis reumatoide.

### **2.3.3. Genètica de l'AR**

L'any 1969 alguns experiments fets amb cultius de limfòcits mixtes van demostrar que aquests no eren reactius en front a cèl·lules d'altres pacients amb AR (Astorga, 1969). Aquest fet posà en evidència que aquests pacients compartien els mateixos gens HLA (Stastny, 1976), el que explicaria la manca de reactivitat en aquests cultius mixtes. Es va identificar l'epítot de susceptibilitat, present en diversos gens DR, com ara DR1, DR4 i DR14. Més tard, es va veure que els al·lels de risc es troben bàsicament a HLA-DRB1 (Stastny, 1978), i que aquest epítot s'ha vist relacionat amb el desenvolupament d'anticossos anticitrulina (ACPA), que en la majoria dels casos són presents en el sèrum de pacients amb AR.

Fora de la regió MHC, s'han identificat alguns locus de susceptibilitat a aquesta malaltia. El desenvolupament d'estudis associatius del genoma (GWAS) ha fet possible interrogar un gran nombre de SNP, assegurant la cobertura de tot el genoma. Alguns dels SNPs trobats corresponen a diferents gens agrupats en un mateix locus de susceptibilitat. Una de les primeres aproximacions va ser interrogar al·lels amb un risc ja conegut per altres malalties autoimmunes, com ara CTLA4, relacionat amb la diabetis de tipus I, o la regió del gen PTPN22, relacionada amb diabetis tipus I, LES i d'altres malalties autoimmunes. Els resultats obtinguts van permetre demostrar el fet que un mateix SNP pot predisposar a l'individu a desenvolupar l'autoimmunitat en general. D'aquesta manera, dues regions han estat associades amb l'AR. Remmers et al (Remmers et al., 2007), demostraren una relació entre un SNP al tercer intró del gen STAT4 i un increment a patir AR així com LES, el que suggeria una possible via de desencadenament de la malaltia compartida per ambdues malalties. Un any després, Suzuki et al (Suzuki et al., 2008) identificaren una associació important entre la població japonesa, a la

regió del cromosoma 1 on es troben els membres de la família SLAM. En aquest treball, es van estudiar 830 casos i es van trobar dos SNPs localitzats als introns del gen CD244. Recentment un estudi d'associació del genoma (GWAS) en pacients d'AR tractats amb etanercept (Cui et al., 2013), mostra que un al·lel de CD84 es relaciona amb una millor resposta al tractament, augmentant així l'expressió d'aquest gen únicament en pacients tractats amb aquest fàrmac.

### **3. SPLICING ALTERNATIU**

Literalment, l'*splicing* és el procés postranscripcional pel qual els introns d'un gen són eliminats donant lloc a la unió directa de dos exons. És juntament amb el *capping* 5' i la poliadenització, la modificació postranscripcional més important en el processament del pre-ARNm. Sovint aquesta unió és alternativa, que vol dir que els exons poden unir-se seguint diferents patrons, generant múltiples ARNm diferents. L'*splicing* alternatiu del precursor d'ARN missatger (pre-ARNm) va ser descrit per primer cop fa una trentena d'anys, quan es va descobrir que tant els anticossos units a la membrana de les cèl·lules B com els secretats, estaven codificats pel mateix gen  $\kappa$  (Alt et al., 1980). Més tard es van trobar altres exemples d'aquest fenomen (Rosenfeld et al., 1982). Actualment se sap que gairebé la totalitat dels gens que codifiquen per a una proteïna contenen introns que són eliminats al nucli per *splicing* de l'ARN durant el processament d'aquest.

Estudis recents emprant la tècnica de seqüenciació d'alt rendiment HTS (*high-throughput sequencing*) indiquen que un 95%-100% del pre-ARNm humà amb gens multiexònics són empalmats alternativament (Pan et al., 2008); (Wang et al., 2008). Així doncs, l'*splicing* alternatiu és un elaborat procés de regulació gènica i un potent generador de diversitat proteica, ja que un únic pre-ARN missatger pot donar lloc a diversos ARN missatgers degut a la combinació dels diferents patrons d'*splicing*, que poden ser regulats per diverses vies. Aquestes vies inclouen les específiques de cada teixit, les que són específiques de l'estadi de desenvolupament o les que depenen dels estímuls. Les diferents isoformes generades d'una mateixa proteïna poden diferir en les seves propietats biològiques com ara en la interacció proteïna:proteïna, en la localització cel·lular o en la funció biològica (Evsyukova et al., 2010).

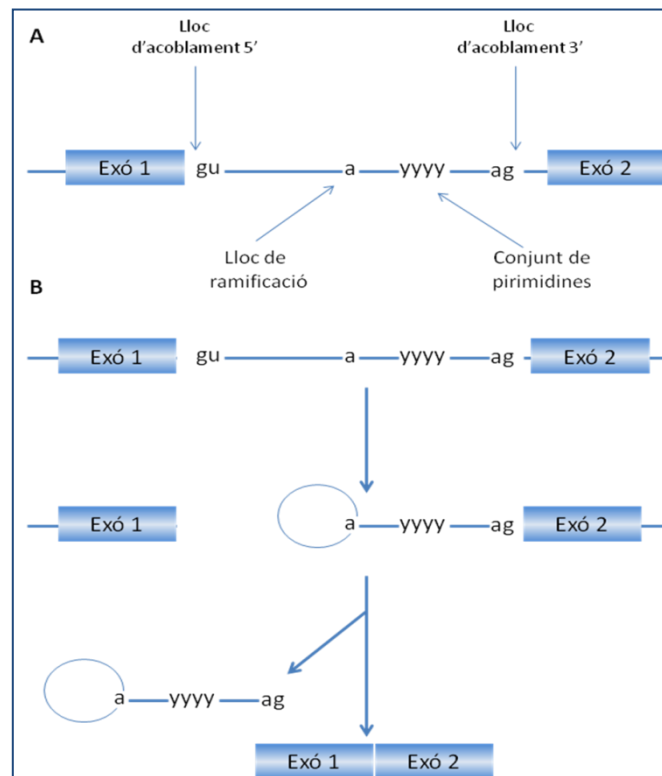
A més de l'*splicing* alternatiu, hi han dos mecanismes principals pels quals es poden generar diferents ARNm a partir del mateix gen: els promotors múltiples i múltiples llocs de poliadenilació. L'ús de promotors múltiples es descriu més aviat com un mecanisme de regulació transcripcional que no d'acoblament alternatiu, ja que al començar la transcripció en

diferents promotors, es poden generar la majoria dels exons (transcripcions amb diferents extrems 5'). D'altra banda, els diversos llocs de poliadenilació permeten obtenir diferents punts 3' finals per a la transcripció. Aquests dos mecanismes es troben combinats amb l'*splicing* alternatiu i proporcionen encara més varietat als ARNm derivats d'un gen.

### 3.1- *SPLICING* DEL PRE-ARN

Com s'ha comentat anteriorment, una de les modificacions més importants en el procés de maduració del pre-ARNm és l'eliminació dels introns i l'empalmament dels exons. Tal i com es mostra a la figura 14, durant el procés d'*splicing* es determina quins exons es mantenen a l'ARNm, mitjançant la regulació i la selecció dels llocs d'acoblament. La maquinària encarregada de les reaccions de *splicing* es l'*spliceosoma*, un complex format per centenars de proteïnes i petits ARNs nuclears (snRNAs) (Wahl et al., 2009). La regulació d'aquest procés es duu a terme per elements d'acció *cis*, que són seqüències contingudes en els exons i/o introns i que poden ser tant repressores com activadores, i proteïnes d'acció *trans*, les quals vetllen per una correcta inclusió dels exons i pel reconeixement del lloc d'acoblament. Les seqüències *cis* poden ser potenciadores (*intronic/exonic splicing enhancer*, ISE/ESE o silenciadores (*intronic/exonic splicing silencer*, ISS/ESS), com les riboproteïnes heterogènies nuclears (hnRNP) (Ward and Cooper, 2010). L'intró típic d'una cèl·lula eucariota té seqüències de consens que defineixen regions importants: Cada intró té les bases nitrogenades GU (guanina-uracil) al seu extrem 5', mentre que a prop de l'extrem 3' hi ha un lloc de ramificació que sempre s'inicia amb adenina (Gao et al., 2007). Seguidament, es troben una sèrie de pirimidines, i després els nucleòtids AG (adenina-guanina) a l'extrem 3' (Matlin et al., 2005). La reacció d'*splicing* per sí mateixa està regulada per un conjunt d'interaccions controlades entre ribonucleoproteïnes nuclears petites (snRNPs), anomenades U1, U2, U4, U5 i U6, proteïnes i el transcrit de pre-ARN (Ward and Cooper, 2010); (Tazi et al., 2009). La riboproteïna U1 s'uneix als nucleòtids GU de l'extrem 5' i U2 s'uneix al lloc de ramificació. La formació d'aquest complex determina els extrems de l'intró per on es tallarà i els extrems de l'exó que s'han de mantenir. Els complexos U4, U5, U6 s'uneixen i a continuació, el complex que queda realitza dues reaccions de transesterificació. U4 deixa el complex permetent que U6 sigui reemplaçat per U1 al lloc d'acoblament 5'. A la primera transesterificació, U6 interacciona amb U2 i l'extrem 5' de l'intró s'escindeix de l'exó anterior unint-se al lloc de ramificació a través d'un enllaç 2',5'-fosfodièster. A la segona transesterificació participa la snRNP U5 i l'extrem 3' de

l'intró s'escindeix de l'exó posterior, fent que els dos exons s'uneixen mitjançant un enllaç fosfodièster. L'intró s'allibera en forma de llaç i es degrada (Black, 2003).

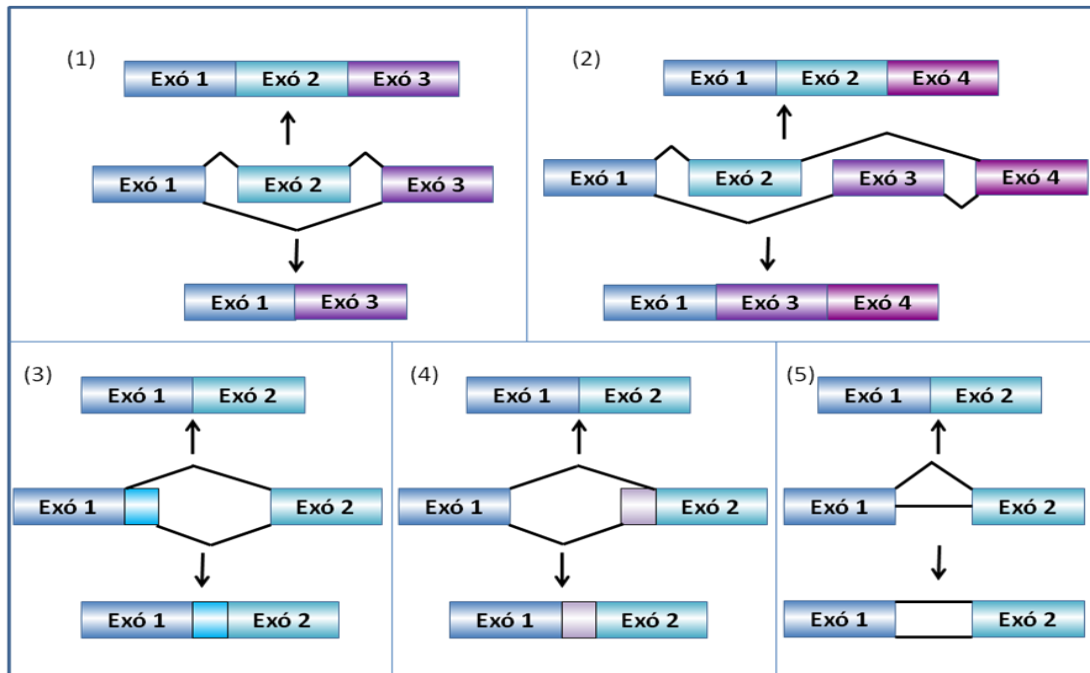


**FIGURA 14:** Procés d'*splicing*. **A)** Els exons es representen per caixes i els introns per línies. Es mostren els llocs d'acoblaments invariants 5' i 3', així com el lloc A de ramificació i el conjunt de pirimidines. **B)** Reaccions de transesferència i unió dels exons (Adaptat de (Douglas and Wood, 2011)).

### 3.1.1-Mecanismes d'*splicing* alternatiu

Generalment es reconeixen cinc formes diferents d'*splicing* alternatiu, les quals es mostren a la figura 15 (Tazi et al., 2009); (Evsyukova et al., 2010) (1) L'omissió d'exó o exons *cassette*, en el que un exó pot ser tallat de l'ARN original o retingut a la cadena. Aquesta és la manera més comú d'*splicing* als pre-ARNm dels mamífers. (2) Exons mútuament excloents; només un dels dos exons es manté en l'ARNm després de l'empalmament, però mai els dos a l'hora. (3) Lloc donant alternatiu; s'utilitza una unió 5' (lloc donant) diferent, canviant l'extrem 3' de l'exó contigu. (4) Lloc acceptor alternatiu: s'utilitza una unió 3' (lloc acceptor) diferent, canviant l'extrem 5' de l'exó que el precedeix. (5) Retenció d'intró: una seqüència pot ser tallada com un intró o simplement retinguda. Això es distingeix de l'omissió d'exó perquè la seqüència

retinguda no es troba flanquejada per introns. Si l'intró retingut està a la zona de codificació, ha de codificar els aminoàcids amb els exons veïns, existint la possibilitat de que un codó de parada o un canvi a la pauta de lectura faci que la proteïna no sigui funcional. Aquesta és la manera més poc freqüent d'*splicing* en els mamífers (Evsyukova et al., 2010).



**FIGURA 15:** Esquema de les cinc formes diferents d'*splicing* alternatiu: (1) L'omissió d'exó o exons *cassette*, (2) Exons mútuament excloents, (3) Lloc donant alternatiu, (4) Lloc acceptor alternatiu i (5) Retenció d'intró (Adaptat de (Evsyukova et al., 2010).

#### 4. *SPLICING* I PATOLOGIA

L'*splicing* alternatiu és un procés clau que contribueix a la gran complexitat fenotípica incrementant la diversitat proteòmica. La seva importància es veu reflectida per la seva prevalença al llarg de l'evolució i per les nombroses malalties provocades per defectes en elements involucrats en la regulació d'aquest procés. El seu paper en el desenvolupament de diferents malalties i càncers pot manifestar-se de diferent manera, ja sigui com a causa primària, com a responsable en la modificació de la severitat d'aquesta o com a determinant en la seva susceptibilitat (Orengo and Cooper, 2007). Els mecanismes que alteren la regulació de l'*splicing* poden involucrar els elements reguladors ja esmentats *cis* o *trans*, amb conseqüències molt diferents. Els efectes en *cis* tenen un impacte directe sobre l'expressió d'un únic gen, com ara l'*splicing* que es produeix en el gen KLF6, un supressor tumoral



(Benzeno et al., 2004). En canvi, els efectes en *trans* afecten a l'expressió de diversos gens degut a que les mutacions es produeixen en elements regulatoris de l'*splicing*. Un exemple és la proteïna SF2/ASF, la qual recentment ha estat relacionada amb càncer d'ovari (Fischer et al., 2004) i d'altres tipus de càncers (Ezponda et al., 2010); (Karni et al., 2007). Altres alteracions poden modificar la proporció d'isoformes d'una proteïna, com ara la que afecta el gen FDTP-17, relacionat amb demència frontotemporal i Parkinson (D'Souza et al., 1999). Hi ha nombrosos exemples de mutacions en factors *cis* i *trans* relacionats amb el desenvolupament de malalties (Ward and Cooper 2010).

#### **4.1-SPLICING I AUTOIMMUNITAT**

La mutació d'una proteïna clau en la regulació d'un procés del sistema immune pot donar lloc a diferents situacions com ara ser la causa directa de la malaltia, modificar la severitat d'aquesta o conferir susceptibilitat (Evsyukova et al., 2010). És possible que alguns dels defectes generats no siguin compatibles amb la vida, mentre que els canvis siguin tolerats pels organismes, encara que puguin donar lloc al desencadenament d'una malaltia (Tazi et al., 2009). Hi ha molts exemples de malalties autoimmunes en les que el procés d'*splicing* patit per una proteïna té un paper clau (veure taula 6).

##### **4.1.1- . Splicing alternatiu als receptors de membrana del sistema immune**

Com ja s'ha comentat, es creu que aproximadament un 95-100% dels gens pateixen el procés d'*splicing* alternatiu i les proteïnes del sistema immune, juntament amb les del sistema nerviós, són les que presenten més diversitat generada per aquest procés. Això es deu a que un sistema immune funcional necessita d'una banda, un alt grau de diversitat, i de l'altra, l'habilitat per part de les cèl·lules d'adaptar-se ràpidament als canvis de l'entorn. Tècniques de cribatge d'alt rendiment en els que hi ha involucrats gens que participen en l'activació de les cèl·lules T i B, mostren que hi ha tres tipus de gens: els que estan diferencialment expressats i pateixen el procés d'*splicing*, els constitutivament expressats que pateixen l'*splicing* i els diferencialment expressats que no presenten aquest procés (Grigoryev et al., 2009). Així doncs, està demostrat que el procés d'*splicing* alternatiu afecta a funcions tan importants del

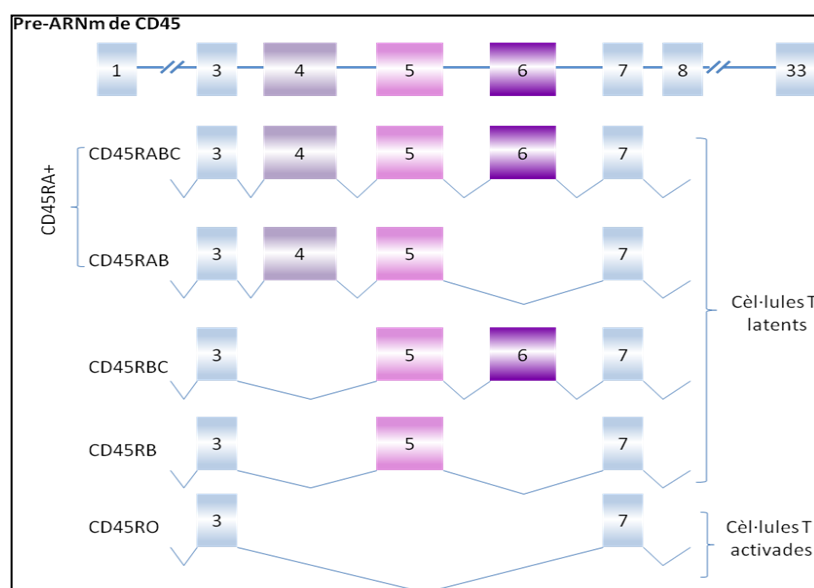
sistema immune com ara l'activació de cèl·lules T i B (Lynch, 2004). Hi ha diversos exemples ben documentats, com ara el de la proteïna CD45, el de CTLA-4 o el d'un dels seus lligands, CD86, CD44 o BANK1, els quals s'expliquen a continuació.

Malaltia autoimmune	Pre-ARNm afectat	Conseqüència
Esclerosi múltiple	IL17R	Més producció d'IL7R soluble
	MOG	Múltiples isoformes
	PLP	Dues isoformes
Lupus eritematós sistèmic	LILRA2	Nova isoforma
	TCR $\zeta$	Diferents isoformes
	RasGRP1	Aparició d'isoformes aberrant
	CD72	Nova isoforma
	IL20R	Receptor soluble
	CR2	Disminució de l'eficiència d'splicing de l'exó 11
Artritis reumatoide	TNFR2	Nou receptor soluble
	CD1d	Isoforma soluble
	CD44	Noves isoformes
	Fibronectina	Isoforma que conté una regió EDA
	CD137	Receptor soluble
	IL6R	Dues isoformes

**TAULA 6 :** *Splicing* alternatiu d'alguns gens implicats en malalties autoimmunes (Modificat de Evsyukova et al 2010)

La proteïna CD45 és una proteïna transmembrana de tipus I membre de la família de les tirosinfosfatasas (PTP), les quals participen en processos de senyalització que regulen una gran varietat d'activitats cel·lulars com el creixement cel·lular, la diferenciació o la mitosi. És l'antigen leucocitari comú implicat en la transmissió de senyals intercel·lulars entre cèl·lules T i B i és essencial per a l'activació de les cèl·lules T (Lynch, 2004). Es troba present en tots els

tipus cel·lulars hematopoètics madurs excepte en els eritròcits i les cèl·lules plasmàtiques. Aquesta proteïna juga un paper clau en la regulació de les senyals que provenen del receptor de la cèl·lula T (TCR). Tal i com es veu a la figura 16, existeixen diferents isoformes de CD45: CD45RA, CD45RB, CD45RC, CD45RAB, CD45RAC, CD45RBC, CD45R0, CD45R (ABC); l'expressió de les quals a la superfície dels limfòcits varia durant la diferenciació cel·lular. Les isoformes de CD45 són generades per un conjunt de tres exons (A, B i C) del gen independentment regulats, donant lloc a cinc isoformes de CD45 que difereixen en els dominis extracel·lulars (Lynch, 2004). L'*splicing* d'aquesta proteïna es veu significativament alterat en resposta a una activació prolongada de les cèl·lules T (Trowbridge and Thomas, 1994), (Lynch, 2004).



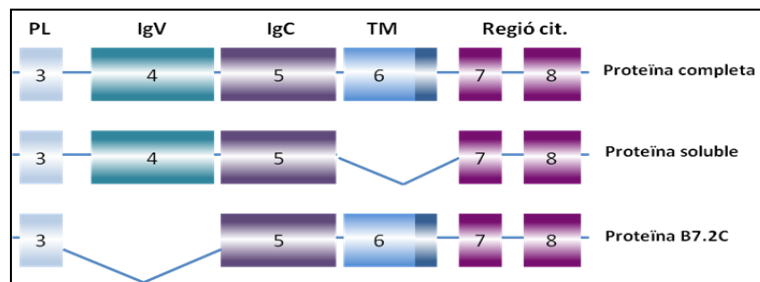
**FIGURA 16:** Isoformes de CD45 (Adaptat de Lynch 2004. La designació com a RA o RO es refereix a isoformes que contenen l'exó A o que perden tots tres exons respectivament (Streuli et al., 1987).

Bàsicament, les cèl·lules verges pertanyen a la subpoblació que expressa la isoforma CD45RA, mentre que la isoforma CD45RO està expressada en cèl·lules T memòria (Alexander et al., 1992). CD45R és la proteïna completa i s'expressa en cèl·lules T i en cèl·lules presentadores d'antigen; entre d'elles una població de cèl·lules B que no expressen el marcador de memòria CD27 (Rodig et al., 2005). La proteïna CD45 té tendència a dimeritzar, inhibint d'aquesta manera la seva activitat fosfatasa i conseqüentment, augmentant el llindar d'activació de les cèl·lules T. Alguns SNP s'han relacionat amb l'esclerosi múltiple. Per exemple, hi ha un SNP que dona lloc a una producció més elevada de les isoformes més llargues, les quals tenen una

senyalització del TCR més eficient. Una activació continuada del TCR pot contribuir a la resposta inflamatòria responsable de l'esclerosi múltiple (Jacobsen et al., 2000).

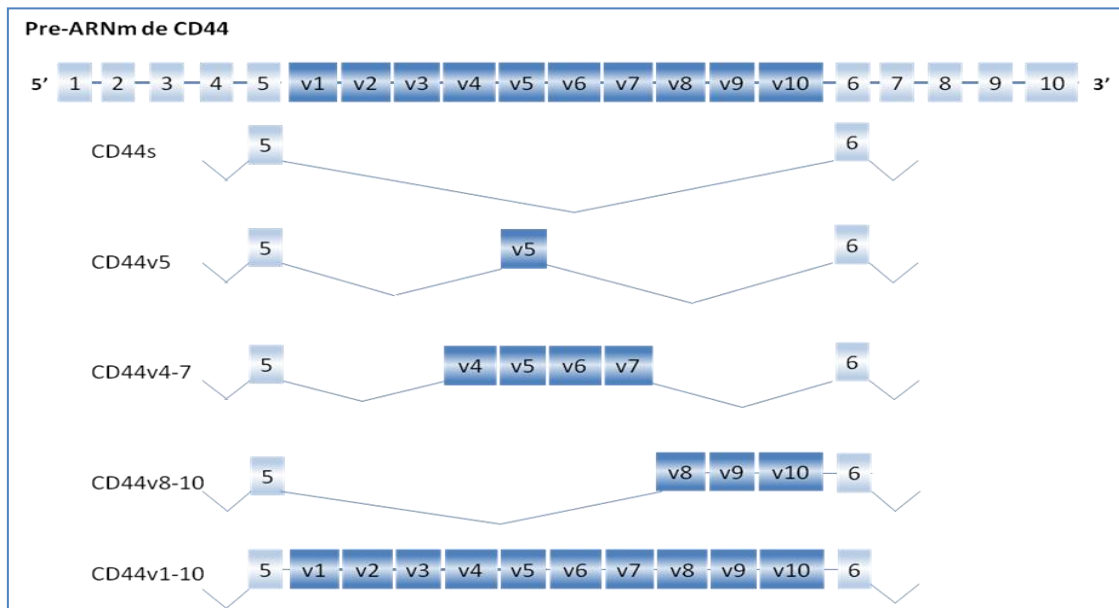
Un altre exemple és la proteïna CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4), també coneguda com a CD152, un receptor regulador del sistema immune. Està expressat a les cèl·lules T i competeix amb CD28 per unir-se a CD80 i CD86, inhibint d'aquesta manera la senyal de CD28 necessària per a l'activació de les cèl·lules T verges (van der Merwe et al., 1997), (Krummel and Allison, 1995). S'expressa a la membrana dels limfòcits després de la seva activació (Perkins et al., 1996). Aquest increment en l'expressió és degut en part a un canvi en el procés d'*splicing* alternatiu. Està format per quatre exons. L'exó de la proteïna CTLA-4 que codifica per a la regió transmembrana funciona com un exó *cassette*, i és exclòs de la majoria de trànscrips d'ARN missatger de les cèl·lules T latents, fent que la major part de la proteïna s'expressi com a forma soluble. En canvi quan les cèl·lules T són activades, el procés d'*splicing* s'altera i l'exó *cassette* és inclòs, donant lloc a la proteïna amb domini transmembrana (Magistrelli et al., 1999), (Oaks et al., 2000). S'ha comprovat que una alteració de les proporcions d'aquestes isoformes dóna lloc a una funció immune alterada i a l'aparició de diverses malalties autoimmunes, com ara l'hipotiroidisme autoimmune, malaltia de Graves, diabetis de tipus I o *Myasthenia gravis*, entre d'altres (Evsyukova et al., 2010). Sembla ser que en LES també podria tenir un paper important ja que un estudi demostra que una de les isoformes d'aquesta proteïna en les cèl·lules T, agreuja els símptomes d'aquesta malaltia en models murins de LES (Ichinose et al., 2013).

El lligand de CD28, B7-2 (CD86) també compta amb dues isoformes generades per *splicing* alternatiu. B7-2 és una glicoproteïna de tipus I formada per una regió extracel·lular que consisteix en dos dominis immunoglobulina. El primer és un domini immunoglobulina de tipus variable, a través del qual es produeix la interacció amb el seu lligand; i el segon és un domini immunoglobulina de tipus constant. A diferència de B7-1, que s'uneix preferentment a CTLA4, B7-2 té una interacció més forta amb CD28, jugant un paper molt important en la iniciació de la resposta immune i l'autoimmunitat. Actualment hi ha descrits tres transcrits d'aquesta proteïna: la proteïna completa, una isoforma soluble a la que li manca l'exó 6 que codifica per la regió transmembrana; i una isoforma de membrana anomenada B7-2C (veure figura 17). Aquesta isoforma està caracteritzada per la deleció de l'exó 4, que codifica pel primer domini immunoglobulina, i la seva expressió es troba reduïda durant l'activació (Kapsogeorgou et al., 2008).



**FIGURA 17:** Isoformes de CD86 (Modificat de (Kapsogeorgou et al., 2008))

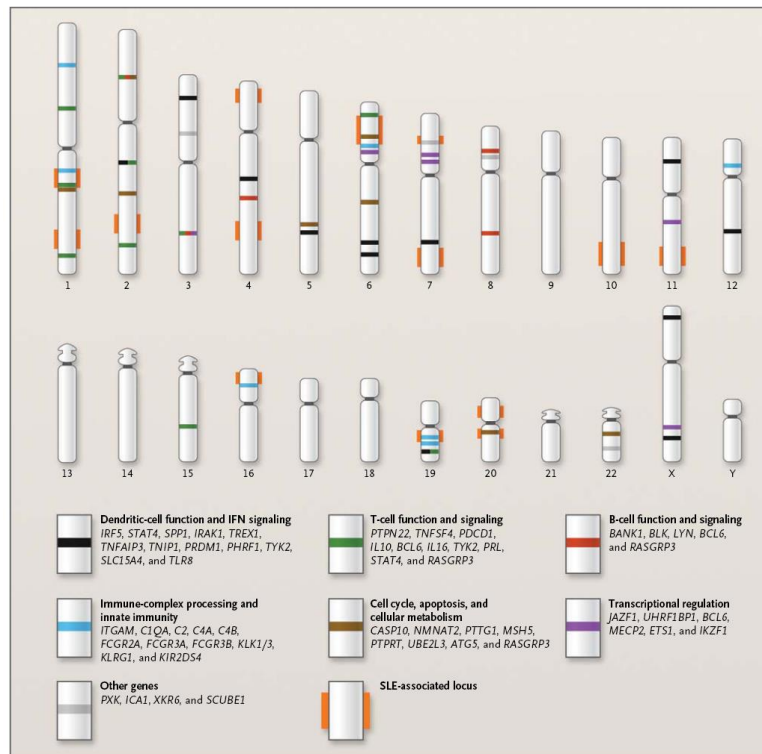
Per últim CD44 és una glicoproteïna transmembrana d'adhesió que participa en processos de transducció de senyals així com en el creixement, la supervivència i la diferenciació cel·lulars (Ponta et al., 2003). Està codificada per un gen capaç de generar almenys vint transcrits diferents d'ARN per *splicing* alternatiu (Fox et al., 1994), dels quals sis s'han confirmat a nivell de proteïna. Tal com mostra la figura 18, aquest gen conté deu exons *cassette* variables, els quals poden ser omesos en el transcrit final o inclosos en diferents combinacions. Aquests deu *cassettes* codifiquen per regions extracel·lulars pròximes a la membrana i s'ha demostrat que la presència d'alguns d'aquests exons, com v3, v6 i v7, afavoreixen l'associació de CD44 amb l'àcid hialurònic de la matriu extracel·lular (Ponta et al., 2003); (Crispin et al., 2010a). A més, s'ha observat una gran correlació entre la severitat de determinats tumors i l'expressió d'isoformes de CD44 que contenen els exons v4-v7, v3 o v9 (Gunthert et al., 1991); (Eisterer et al., 2001); (Bartolazzi et al., 1995). També s'ha observat que les cèl·lules T verges expressen principalment la isoforma de CD44 a la que li manquen tots els exons variables, mentre que les cèl·lules T activades expressen múltiples isoformes que contenen diferents exons variables com ara v1, v3, v4, v5, v7 o v10 (Arch et al., 1992); (Konig et al., 1996), demostrant que l'*splicing* alternatiu de CD44 es un procés clau en la regulació de la funció de les cèl·lules T. L'expressió de dos de les isoformes més importants, CD44v3 i CD44v6, està incrementada a les cèl·lules T de pacients de LES. Aquest fet està relacionat amb l'agreujament de la malaltia, la presència de dany renal i la presència d'anticossos contra l'ADN de doble cadena (Crispin et al., 2010b).



**FIGURA 18:** Isoformes de CD44, el qual conté una regió amb deu exons *cassette* variables que generen sis transcrits diferents que s'han identificat com a proteïna (Lynch, 2004).

#### 4.1.2- *Splicing* en els receptors SLAM i autoimmunitat

Hi ha molts estudis que suggereixen que les malalties autoimmunes són degudes a la contribució de diversos factors genètics. L'avaluació d'un gran nombre de gens mitjançant d'*arrays* genòmics assenyalen determinats gens com uns dels causants de la susceptibilitat a les malalties autoimmunes (Vyse and Todd, 1996); (Wandstrat and Wakeland, 2001). Sorprenentment, les vies de senyalització funcionals afectades tant en humans com en ratolins acostumen a coincidir (Krishnan et al., 2006); (Morel, 2010). Diversos dels gens amb polimorfismes associats a diverses malalties autoimmunes com ara l'esclerosi múltiple (EM), la malaltia crònica intestinal (MII), l'artritis reumatoide (AR) o el LES, es troben situats al cromosoma 1, de la mateixa manera que els membres de la família SLAM (veure figura 19).



**FIGURA 19:** Locus cromosòmic associats al LES. Els gens es divideixen en sis categories segons la funció principal del gen. La regió assenyalada en taronja representa una alta associació amb el LES (Tsokos, 2011).

Donada la importància de la família SLAM en diferents funcions immunoreguladores, en els últims anys ha crescut l'evidència de que aquesta família pot estar involucrada en l'augment de la susceptibilitat a partir de determinades malalties autoimmunes, principalment LES (Chatterjee et al., 2012), (Koh et al., 2011). Està demostrat que una senyalització defectuosa de diversos membres de la família SLAM està relacionada en anomalies en les cèl·lules T, B i NK i amb una producció d'anticossos defectuosa (Detre et al., 2010). Recents estudis demostren que els malalts de LES presenten una expressió incrementada de dos membres de la família SLAM, *SLAMF3* i *SLAMF6*, la qual cosa incrementa la secreció de IL-17, promovent la diferenciació dels limfòcits T cap a Th17 (Chatterjee et al., 2012). La contribució d'aquesta família de receptors al desenvolupament de l'autoimmunitat pren més força pel fet que un locus de susceptibilitat d'aquesta malaltia, *Sle1b*, es troba a la mateixa regió cromosòmica on es troben gran part dels membres de la família SLAM (Wang et al., 2010a). Les anàlisis genòmiques i genètiques d'aquest locus mostren l'elevat polimorfisme d'aquests gens tant en humans com en ratolins.

Aquest polimorfisme dels membres de la família SLAM dona lloc a l'expressió diferencial d'isoformes generades per *splicing* alternatiu, les quals tenen conseqüències funcionals

(Evsyukova et al., 2010); (Gillett et al., 2009). Un dels exemples més clars de polimorfismes lligats a la susceptibilitat al LES en ratolí és el gen SLAMF6 (Ly108). El polimorfisme d'aquest gen dóna lloc a dues isoformes generades per *splicing* alternatiu que difereixen en la seva cua citoplasmàtica. Mentre Ly108-1, que conté dos dominis ITSM a la seva cua citoplasmàtica, s'expressa majoritàriament en ratolins susceptibles al LES, la isoforma Ly108-2, amb tres dominis ITSM, ho fa en cèl·lules de ratolins normals (Wandstrat et al., 2004); (Kumar et al., 2006). Es creu que l'expressió més elevada de Ly108-1 en limfòcits de ratolins susceptibles al LES està relacionada amb un increment de la taxa de supervivència i una eliminació defectuosa dels limfòcits B autorreactius, donant lloc a un augment de la producció d'autoanticòs. Recentment s'ha trobat una altra isoforma, Ly108-H1, a la que li falten els exons 7 i 8. El ratolí transgènic que expressa Ly108-H1 mostra una important reducció de l'autoimmunitat deguda a cèl·lules T CD4<sup>+</sup> dependents, demostrant que aquesta isoforma podria tenir un paper de supressió de la resposta immune i regular d'aquesta manera el lupus (Keszei et al., 2011).

Un estudi basat en l'anàlisi genètic de diferents famílies amb LES de Canadà i Regne Unit, evidencia la presència de múltiples polimorfismes (SNPs) en el promotor i en la regió codificant de dos membres de la família SLAM, SLAMF3 i SLAMF7 (Cunningham Graham et al., 2008). En aquest estudi es revela que l'associació més evident és la d'un SNP a l'exó 8 de la proteïna SLAMF3, el qual produeix un canvi en la cua citoplasmàtica compromentent la seva unió amb SAP i conseqüentment la seva senyalització cap a l'interior de la cèl·lula. També s'han trobat polimorfismes a la proteïna SLAMF4 associats amb AR i LES (Suzuki et al., 2008).

L'estudi de les isoformes dels membres de la família SLAM també relaciona aquesta família de proteïnes amb el desenvolupament d'autoimmunitat. Kim *et al.* demostren que existeix una alteració en l'expressió de SLAMF4 i SLAMF7 i de les seves isoformes en PBMCs de pacients amb lupus (Kim et al., 2010). La proteïna SLAMF4 (2B4) dóna lloc a dues isoformes, h2B4-A i h2B4-B, les quals difereixen en que la segona té cinc aminoàcids més entre el primer i el segon domini Ig. Aquestes dues proteïnes tenen papers ben diferenciats en les cèl·lules NK (Mathew et al., 2009). La regió extracel·lular de les dues isoformes descrites de la proteïna SLAMF7 (CS1-L i CS1-S), en canvi, és idèntica però difereixen en la seva cua citoplasmàtica. Mentre a CS1-S li manquen els dos motius ITSM necessaris per a la senyalització intracel·lular i no sembla tenir cap paper funcional en la senyalització, CS1-L actua com a activador i es troba molt més expressada que CS1-S en pacients sans. En pacients amb LES però, aquesta proporció varia.



Recentment s'ha demostrat que els nivells de CD84, juntament amb altres gens com SAP i IL10, es troben alterats en les cèl·lules T CD4+ de pacients de LES, donant lloc a una hiperactivació d'aquestes i a una resposta exacerbada de les cèl·lules B (Ding et al., 2012).

En treballs recentment publicats, Hagberg i col·laboradors demostren que els immunocomplexes que es formen durant el LES regulen alguns receptors de la família SLAM en cèl·lules dendrítiques plasmacitoides i cèl·lules NK ja que s'observa una expressió incrementada de CD319 i CD229 en aquests tipus cel·lulars. A més, també s'ha observat una expressió més baixa de CD229 en cèl·lules NK CD56<sup>dim</sup> i més alta de CD319 i CD48 en cèl·lules NK CD56<sup>bright</sup>, indicant un cop més que la família SLAM està implicada en el desenvolupament de l'autoimmunitat (Hagberg et al., 2013).

### III. HIPÒTESI DE TREBALL





La família de molècules de senyalització de l'activació limfocitària (SLAM) es troba a un locus genètic que ha estat identificat com una de les regions gèniques de susceptibilitat al lupus eritematós sistèmic (LES), la regió *Sle1b*. Nombrosos estudis indiquen que els membres de la família SLAM estan implicats en l'autoimmunitat. Molts treballs a més relacionen la presència de diferents variants polimòrfiques amb el desenvolupament de la malaltia del LES, malaltia multifactorial en la que intervenen diferents factors com ara una regulació deficient de la interacció entre cèl·lula T i B, així com una funció defectuosa de cèl·lules dendrítiques i macròfags.

Aquestes evidències són les que fan pensar que una expressió diferencial d'algunes isoformes de CD84 poden estar implicades en el desenvolupament d'aquesta malaltia, la qual podria venir donada per la presència d'isoformes, que tindrien una relació directa amb el trencament de la tolerància, un pas important en el desenvolupament de l'autoimmunitat. Hi ha alguns treballs que identifiquen diferents isoformes de CD84 però fins ara no hi ha evidències que aquestes isoformes estiguin implicades en autoimmunitat.

Tot i això, es pensa que la presència de variants polimòrfiques de la cua citoplasmàtica dels membres de CD84 i en general, de qualsevol membre de la família SLAM afectarien la transducció del senyal, ja que estarien alterats els motius ITSM d'unió a proteïnes adaptadores importants per dur a terme aquest procés, com ara SAP o EAT-2. A més, si SAP i els receptors SLAM són crucials per generar una resposta humoral dependent de cèl·lules T, l'alteració en la seva funció podria afectar la generació d'una resposta immune amb un component humoral.

En aquest estudi es treballa amb la hipòtesi que CD84 o alguna de les seves isoformes podria trobar-se alterat en pacients amb LES i AR, per la qual cosa podria emprar-se com a marcador de la malaltia o com a possible diana terapèutica.



## IV. OBJECTIUS





L'objectiu principal d'aquest projecte és caracteritzar les diferents isoformes de CD84. Els objectius específics d'aquest estudi són tres:

- Caracteritzar l'expressió diferencial d'isoformes de CD84 en línies de limfòcits T, B, NK i mielomonocítiques; cèl·lules de sang perifèrica i teixits limfoides
  
- Estudiar la funció de les isoformes de CD84 utilitzant models *in vitro* de cèl·lules B i T
  
- Determinar i caracteritzar l'expressió d'isoformes de CD84 en mostres de sang perifèrica de pacients amb malaltia de lupus eritematós sistèmic i artritis reumatoide.





## V. MATERIALS I MÈTODES





## **1. CÈL·LULES**

### **1.1- CÈL·LULES B**

Les línies cel·lulars emprades Ramos, Namalwa, Raji i Daudi són cèl·lules B humanes provinents de limfoma de Burkitt. La línia cel·lular Cess és una línia de cèl·lula B transformada amb el virus d'Epstein Barr. Les cèl·lules van ser cultivades en medi RPMI complet (RPMI-1640 (Lonza) complementat amb un 10% de sèrum boví fetal (Biological Industries) inactivat per calor, 100 U/ml penicilina, 100 mg/ml estreptomicina (Lonza) i glutamina 2 mM (Lonza)).

### **1.2- CÈL·LULES T**

Les línies cel·lulars emprades Jurkat, HSB2 i MOLT4 són cèl·lules T humanes provinents d'una leucèmia aguda de cèl·lules T. Les cèl·lules van ser cultivades en medi RPMI complet.

### **1.3- CÈL·LULES D'ORIGEN MIELOIDE**

Les línies cel·lulars d'origen mieloide HL60 (cèl·lules humanes provinents de leucèmia promielocítica aguda), U937 (cèl·lules humanes provinents de limfoma histiocític. Condicions de cultiu), K562 (cèl·lules humanes provinents de leucèmia crònica mielogènica) van ser cultivades en medi RPMI complet. La línia mieloide THP1, que provenen d'una leucèmia monocítica aguda, va ser cultivada en medi RPMI complet i 50 µM de 2-βmercaptoetanol (Gibco).

### **1.4- CÈL·LULES NK**

Les cèl·lules YT, cèl·lules leucèmiques *natural killer* humanes provinents d'un limfoma limfoblàstic i timoma van ser cultivades en medi RPMI complet i 25 mM de HEPES (Gibco). Les

cèl·lules NKL, cèl·lules leucèmiques *natural killer* humanes provinents d'una leucèmia granular van ser cultivades en medi RPMI complet + 100 IU/ml hrIL-2.

### **1.5- ALTRES**

La línia cel·lular COS-7, fibroblasts de mico verd africà (*Cercopithecus aethiops*), van ser cultivades en medi DMEM complet (Medi DMEM (Lonza) complementat amb un 10% de sèrum boví fetal inactivat per calor, 100 U/ml penicilina, 100 mg/ml estreptomina (Lonza) i glutamina 2 mM (Lonza)).

Les cèl·lules NS1 són cèl·lules de mieloma de ratolí. Van ser cultivades amb medi RPMI complementat amb un 10% de sèrum boví fetal inactivat per calor, 1% de L-Glutamina, 1% de Penicil·lina/Streptomina.

### **1.6- AÏLLAMENT DE PBMCs DE SANG PERIFÈRICA**

Per a la obtenció de les cèl·lules mononucleades de sang perifèrica (PBMCs) es van prendre 20 ml de sang humana i es van diluir en PBS a parts iguals. Es va dividir la mescla en 4 parts de 10 ml i es van afegir en un tub amb 3 ml d'Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich). Aquest es va centrifugar durant 30 min a 2000 rpm. L'histopaque-1077 és un medi de separació cel·lular per gradient de polisucrosa i ditrizoat de sodi que permet l'aïllament de limfòcits i d'altres cèl·lules mononucleades d'una manera eficient. Un cop centrifugades, les PBMCs i els monòcits van quedar a la interfase, es van recollir i es van rentar amb PBS.

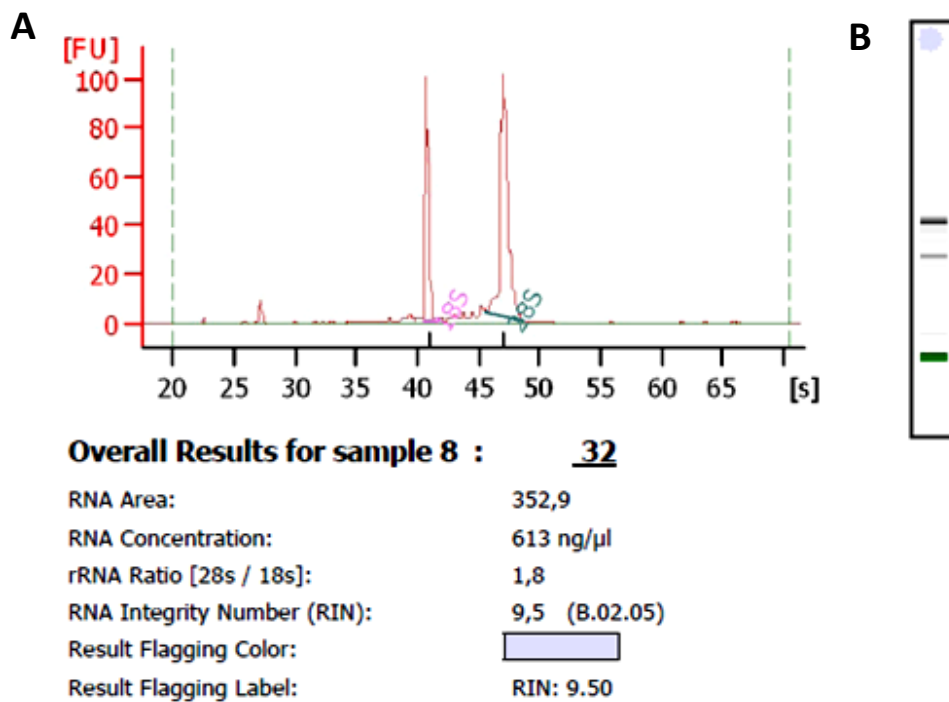
## **2. ANÀLISI D'EXPRESSION GÈNICA**

### **2.1- AÏLLAMENT DE L'ARN TOTAL**

Per a l'extracció d'ARN de línies cel·lulars, es van utilitzar uns  $5 \cdot 10^6$  cèl·lules per mostra. Per a l'extracció d'ARN de cèl·lules de sang perifèrica, es van emprar uns  $1 \cdot 10^7$  cèl·lules per mostra. Es va quantificar l'ARN obtingut amb l'aparell Epoch (Biotek).

## 2.2- ANÀLISI DE LA QUALITAT DE L'ARN

Per tal de comprovar la integritat de l'ARN aïllat es va utilitzar l'aparell 2100 BioAnalyzer (Agilent Technologies), un aparell basat en una plataforma microfluidica que analitza la mida, la quantitat i la qualitat de l'àcid nucleic.



**FIGURA 20:** Anàlisi de les mostres d'ARN pel BioAnalyzer. A) Electroferograma del RNA analitzat. El valor del rRNA ratio indica la proporció entre el RNA ribosomal 28S i 18S, que ha d'estar al voltant d'1,9. El valor del RIN (*RNA Integrity Number*) estima la integritat de l'ARN analitzat en una escala del 1 al 10, tenint en compte la presència/absència de components que degraden l'ARN

## 2.3- RETRORANSCRIPCIÓ

Per dur-la a terme es va utilitzar el Kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems). Tenint en compte el nombre de mostres que s'han de retrotranscriure, es van mesclar en un tub, els reactius del kit en la següent proporció:

Mescla	µl/tub
Buffer RT	2
Nucleòtids 25x	0,8
Random Primers	2
Enzim RT	1
H <sub>2</sub> O	4,2

Es va afegir 1 µg d'ARN i la quantitat necessària d'H<sub>2</sub>O per tal d'arribar a 10 µl i posteriorment es van afegir 10 µl de la mescla dels reactius.

Es van introduir les mostres en el termociclador i es van mantenir a 25°C durant 10 minuts, 37°C durant 2 hores i 85°C durant 5 minuts. Finalment es va mantenir a 4°C durant almenys 15 minuts.

## 2.4- AMPLIFICACIÓ PER PCR

L'expressió del gen d'interès i de les seves variants, es va determinar per amplificació per PCR de l'ADN complementari obtingut de la retrotranscripció de la línia cel·lular i l'ús d'uns oligonucleòtids específics, els quals són els encarregats d'amplificar únicament el fragment d'interès.

Pel disseny dels oligonucleòtids es va emprar el programa Amplify (MacOS X), un programa de simulació de PCRs. Aquests van estar dissenyats a les unions dels exons per tal d'aconseguir una major especificitat a l'hora d'amplificar el fragment d'interès. Per detectar la isoforma CD84\_Δ2,5 es va utilitzar la combinació de primers 1-3, 7-8; per detectar les isoformes CD84\_FL, CD84\_Δ5 i CD84\_Δ5,6 es va utilitzar la combinació de primers 3-4, 7-8.

<u>Oligonucleòtid</u>	<u>Seqüència</u>	<u>Longitud</u>	<u>T<sub>m</sub></u>	<u>% AT</u>
1-2	CAAACCTGGCCGGAAGCAG	19	66.3	36.8
1-3	CTGCAAACCTGGCGCCTTG	19	67.4	36.8
7-8	TGGCTTTCCCATCTTATCAGC	22	64.6	64.6
5-6	CTTTGAGGCAGCATAAGGGTTC	22	62.3	62.3

De la mateixa manera que per preparar la mescla de reactius per a la retrotranscripció, tenint en compte el nombre de mostres que s'han d'amplificar, es van mesclar en un tub els reactius del kit en la següent proporció:

Mescla	µl/tub
5x Green Buffer	5
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	2,5
PCR dNTPs	0,5
Primer FW	0,25
Primer RV	0,25
GoTaq Polymerase	0,125
H <sub>2</sub> O	13,875
Template	2,5

Es van emprar 2,5 µl del producte de retrotranscripció en un volum final de 25 µl. El programa d'amplificació és el següent:

- 1) 95°C durant 5 minuts
- 2) 95°C durant 30 segons
- 3) X°C durant 30 segons
- 4) 72°C durant 1 minut
- 5) Repetir des del pas 2 durant 39 cicles
- 6) 72°C durant 5 minuts
- 7) Mantenir a 4°C

On X és la temperatura de lligació i depèn de cada PCR.

### **3. ELECTROFORESI D'ÀCIDS NUCLEICS**

#### **3.1- GEL D'AGAROSA PER ADN**

El percentatge del gel a preparar varia en funció de la mida dels fragments a separar. El volum del gel dependrà del nombre de mostres a carregar. Generalment es va treballar amb gels del 1% d'agarosa per a fragments de 100 pb fins a 1000 pb, i es va augmentar el



percentatge d'agarosa fins al 3% en els casos en que els fragments a separar diferien en menys de 100 pb. El gel es va córrer emprant TAE 1x com a tampó (TAE 50x: 242 g de Tris·Base, 54,1 ml àcid acètic glacial, 100 ml EDTA 0,5 M pH 8 en aigua). Per visualitzar les bandes es va afegir *SyBR-Safe DNA* (Invitrogen Cat No. S33102) a l'hora de fer el gel. Les imatges van ser captades amb l'aparell GBOX.

### 3.2- GEL DESNATURALITZANT PER ARN

Per tal de comprovar la integritat de l'ARN també es van utilitzar els gels desnaturalitzants d'ARN. Aquests gels difereixen dels gels d'agarosa per ADN en la seva composició, ja que l'ARN pot donar lloc a estructures secundàries si no es tracta amb reactius desnaturalitzants com el formaldehid. L'agarosa es va dissoldre en tampó MOPS 1x (Ambion) i un 7% de formaldehid al 37%. Per visualitzar les bandes, el gel va ser tractat amb *SyBR-Safe RNA* (Invitrogen, Cat No. S7564), i les mostres amb Tampó de càrrega RNA Loading Buffer (Promega; Cat No. G3191). La imatge va ser captada amb l'aparell GBOX (Syngene).

## 4. CONSTRUCCIÓ DE PLÀSMIDS

Per als diferents estudis funcionals, es van generar construccions de plàsmids de cadascuna de les isoformes de CD84. La integritat de tots els plàsmids obtinguts es va confirmar amb el kit de seqüenciació *ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit*.

### 4.1- CLONATGE DE LES ISOFORMES EN EL VECTOR pGEMT

Els oligonucleòtids a emprar per fer el clonatge són els següents:

<u>Oligonucleòtid</u>	<u>Seqüència</u>	<u>Longitud</u>	<u>Tm</u>	<u>% AT</u>
CLONING FW	CGCAGATCTAAAGACTCAGAAATC	24	62,1	58,4
CLONING D5,6 RV	CTGCAGCATAGCTTGAAGTCCC	22	67,1	45,5
CLONING D5 RV	CTGCAGCTAGATCACAATTTTCATAG	25	62,8	60

On Tm és la temperatura de desnaturalització de l'oligonucleòtid i % AT és el percentatge de bases adenina-timina.

Pel clonatge de les isoformes CD84\_FL i CD84\_Δ5 es van utilitzar els oligonucleòtids CLONING FW i CLONING D5 RV; per al clonatge de la isoforma CD84\_Δ5,6 es van utilitzar els oligonucleòtids CLONING FW i CLONING D5,6 RV. Els plàsmids es van obtenir comercialment a Genscript.

Inicialment es va fer una PCR dels plàsmids comercials seguint el protocol abans descrit. Es va córrer un gel del 1% d'agarosa per comprovar la qualitat dels fragments d'interès. Posteriorment es va córrer un gel quantitatiu del 1% d'agarosa per tal d'aïllar la banda d'interès. A continuació, es va tallar la banda amb l'ajuda d'una làmpara ultraviolada i s'aïllà l'ADN amb el kit *Nucleic Acid and Protein Purification* (Macherey-Nagel), seguint el protocol que indica el fabricant. Es va quantificar l'ADN obtingut amb l'aparell Epoch.

#### **4.1.1- Lligació del fragment amplificat amb el plàsmid pGEMT**

Per dur a terme la lligació entre el plàsmid i l'insert, es va seguir el protocol del kit pGEMT Easy Vector Systems (Promega Cat No A-1360). La proporció òptima plàsmid:insert va ser 1:1.

#### **4.1.2- Selecció de clones positives mitjançant plaques tractades amb IPTG i XGal**

La selecció es va dur a terme pel mètode de la X-Gal i el IPTG. La X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosid (Sigma-Aldrich Cat No. B425) s'utilitza una solució 20 mg/ml diluint el reactiu en dimetilsulfòxid (DMSO). L'isopropil β-D-1-tiogalactopiranosid (IPTG; Sigma-Aldrich, Cat No. I5502) s'utilitza a una dilució 0.1 M. El component X-Gal és hidrolitzat per la β-galactosidasa a galactosa i 5-bromo-4-cloro-3-hidroindol. Aquest últim és oxidat a 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índic, un compost blau insoluble. D'aquesta manera, si X-Gal i un inductor de la β-galactosidasa (en aquest cas IPTG) han estat incorporats a la placa de cultiu on se sembra el producte de lligació, les colònies crescudes a la placa que tinguin el gen *lacZ* funcional podran ser clarament distingides per la seva coloració blava i seran rebutjades, seleccionant només aquelles colònies que siguin blanques, és a dir, que no tinguin el gen *lacZ* funcional.

Així doncs, es va afegir a cada placa de LB-agar (afegir 15 g d'agar a 1 l de LB. Autoclavar. Un cop lleugerament atemperat s'afegeix 1 ml d'ampicilina 1000x) 40 µl d'IPTG i 40 µl de X-Gal impregnant bé tota la placa, deixant que el reactiu fos absorbit completament.

#### **4.1.3- Transformació de cèl·lules DH5α amb el producte de lligació**

Per a cada transformació a realitzar es van utilitzar 100 µl de cèl·lules supercompetents DH5α. Es van afegir 10 µl del producte de lligació i es va mantenir la mescla a 4°C durant 20 minuts. Passat aquest temps, es va procedir a fer el xoc tèrmic en un bany d'aigua a 42°C, submergint els tubs i mantenint-los en agitació manual durant 45 segons. Després d'això, es van mantenir en gel durant 2 minuts i passat aquest temps es van afegir 500 µl de medi SOC (Per 1 l d'H<sub>2</sub>O: 20 g de bactotripton, 5 g d'extracte de llevat, 0.5 g NaCl, 0.186 g KCl. Filtrar i autoclavar. Un cop fred, afegir 20 ml de glucosa 1 M filtrada i autoclavada).

Es van deixar a 37°C i agitació constant durant almenys 1 hora. Passat aquest temps el cultiu es va sembrar en plaques tractades amb IPTG i X-Gal. Es van deixar en una estufa a 37°C durant tota la nit.

#### **4.1.4- Mini-prep de les colònies**

A l'endemà es va posar un cultiu de 3 ml de medi LB (Per 1 l d'H<sub>2</sub>O: 10 g de bactotripton, 5 g d'extracte de llevat, 10 g NaCl. Ajustar a pH 7,5. Autoclavar) amb ampicil·lina 1x com a antibiòtic d'aquelles colònies blanques que havien crescut i es va deixar el cultiu en agitació constant durant tota la nit a 37°C. Al dia següent es va procedir al processament dels cultius per tal d'extreure l'ADN i comprovar que aquest correspon a la seqüència desitjada.

Es va passar cadascun dels cultius bacterians on havien crescut les colònies, a un tub de 1.5 ml. Es van centrifugar durant 2 minuts a 13200 rpm i temperatura ambient. Un cop les cèl·lules estan en forma de pèl·let, es va afegir 100 µl de la solució 1 (Per 100 ml: 0.9 g de glucosa, 0.4 g de Tris·HCl pH 8, 0.37 g Na<sub>2</sub>EDTA en aigua. Autoclavar i emmagatzemar a 4°C) a cada tub. En dissoldre's, es van afegir 200 µl de la solució 2 (Es prepara la quantitat necessària al moment. NaOH 0.2 M, 1% SDS). Després de mesclar i incubar durant 5 minuts en gel, es va afegir la

solució 3 (Per 100 ml: 60 ml acetat sòdic 5M, 11.5 ml àcid acètic en aigua. No autoclavar. Emmagatzemar a 4°C) i es va mesclar i deixar en gel durant 5 minuts. La centrifugació a 13200 rpm i 4°C durant 5 minuts va permetre la separació de la fase aquosa. Aquesta va ser transferida a un tub nou al qual es van afegir 450 µl de fenol:cloroform:alcohol isoamílic (Sigma-Aldrich) per procedir amb l'extracció d'ADN. Després de centrifugar a 13200 rpm durant 5 minuts es va transferir la fase aquosa a un tub nou i es van afegir 450 µl de fenol:cloroform (Sigma-Aldrich). La centrifugació va permetre separar la fase aquosa. Per procedir a la precipitació de l'ADN, es van afegir 800 µl d'etanol 100% fred, i es va mantenir durant almenys 1 hora a -70°C. Passat aquest temps, es van centrifugar els tubs a 13200 rpm durant 5 minuts a 4°C. Es va descartar el sobrenedant i es va afegir 1 ml d'etanol al 70%. Un cop centrifugades les mostres, es va resuspendre el pèl·let en 50 µl d'aigua amb 0.5 µl de ARNasa. Es va quantificar l'ADN obtingut a l'aparell Epoch i es va córrer un gel d'agarosa al 1% amb diferents enzims de restricció per tal de comprovar que l'ADN aïllat era el d'interès.

#### **4.1.5- PCR de seqüenciació amb el plàsmid pGEMT**

Per tal de comprovar la identitat i la integritat de l'ADN obtingut, es va seqüenciar el fragment d'ADN d'interès. El primer pas es basa en una PCR, seguint el protocol descrit anteriorment. El producte de PCR es va córrer en un gel d'agarosa del 1% i es tallà la banda d'interès amb l'ajuda d'una làmpara ultraviolada per tal d'aïllar l'ADN amb el kit de Macherey-Nagel *Nucleic Acid and Protein Purification*, seguint el protocol que indica el fabricant. Es va quantificar l'ADN obtingut amb l'aparell Epoch. Amb l'ADN obtingut es va procedir a fer la PCR de seqüenciació amb el kit de seqüenciació *ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit*, seguint el protocol que indica el fabricant.

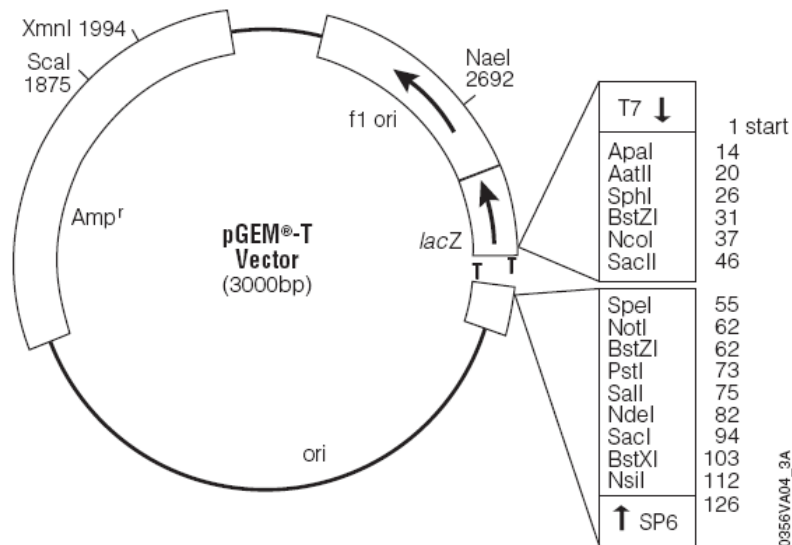


FIGURA 21: Mapa del plàsmid pGEMT

#### 4.2- LLIGACIÓ DE L'INSERT D'INTERÈS AMB EL PLÀSMID pDISPLAY

L'objectiu d'aquest pas és insertar el gen que codifica en la proteïna d'interès al plàsmid pDisplay (Invitrogen), que conté el tag HA en l'extrem 5'.

En primer lloc, es va tallar l'insert d'interès del plàsmid pGEMT mitjançant els enzims de restricció adequats. Per fer-ho, es va deixar a 37°C durant 2 hores. Passat aquest temps, es va córrer un gel per tallar la banda d'interès i poder extreure l'ADN que corresponia a l'insert. Es va quantificar l'ADN amb l'aparell Epoch.

D'altra banda, calia obrir el plàsmid pDisplay amb els mateixos enzims de restricció amb els que s'havia tallat l'insert per a què la lligació entre insert i plàsmid fos possible. Es va procedir de la mateixa manera que per l'insert, deixant el plàsmid a 37°C durant 2 hores, i es va córrer un gel per comprovar que la digestió havia anat bé.

Amb l'insert aïllat i el plàsmid linealitzat, es va procedir a fer la lligació mantenint una relació insert:plàsmid 10:1. Es van afegir al tubs les quantitats recomanades pel fabricant d'enzim T4 lligasa (Promega Cat No. M1801) i es va deixar a 16°C durant tota la nit.

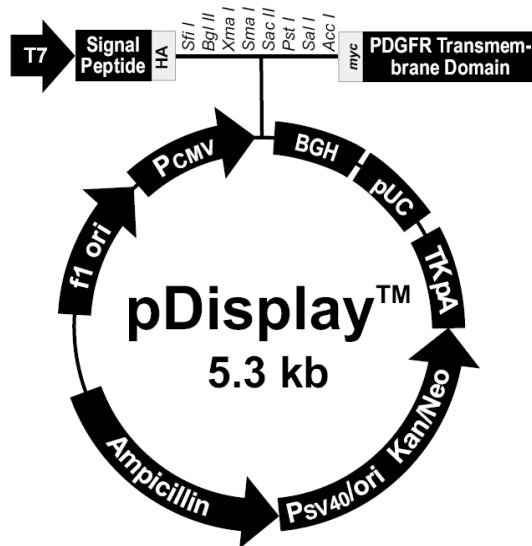


FIGURA 22: Mapa del plàsmid pDisplay. L'insert es va incloure entre els enzims Bgl II i Pst I

Al dia següent, es va procedir a fer la transformació seguint el protocol explicat anteriorment. Amb les clones que havien crescut, es va procedir a processar el cultiu tal com s'explica a l'apartat 4.1.4. L'ADN obtingut de les clones va ser analitzat i es va córrer en un gel d'agarosa al 1% per tal de comprovar si la lligació havia estat efectiva. Amb la mostra que va presentar un resultat més òptim, es va procedir a fer una extracció a escala més gran. Per fer-ho, es va preparar un cultiu en un erlenmeyer s'afegeixen 25 ml de LB amb ampil·lina 1x i 25 µl del cultiu de Mini-Prep. Es va deixar amb agitació constant durant tota la nit a 37°C. A l'endemà, es va processar el cultiu emprant el kit *Qiagen Plasmid Midi kit* (Qiagen Cat No. 12143), seguint les instruccions del fabricant. L'ADN extret es va quantificar amb l'Epoch. Aquests transfectants finalment no van ésser emprats pels estudis funcionals

## 5. PRODUCCIÓ D'ANTICOSSOS MONOCLONALS

### 5.1- IMMUNITZACIÓ

Femelles de ratolins de la soca Balb/c van estar immunitzades amb el pèptid corresponent a la seqüència contra la què es vol generar l'anticòs. En cas que la regió d'interès fos molt extensa, s'ha fet prèviament un estudi d'immunogenicitat per determinar la seqüència peptídica òptima. El pèptid esmentat portava conjugat una proteïna transportadora, que podia ser KLH o

BSA en funció de la seva naturalesa hidrofòbica, per tal d'augmentar la resposta immune de l'animal. A la primera immunització es van inocular 30 µg de pèptid en PBS amb adjuvant de Freund complet. A les dues immunitzacions següents, fetes en un interval d'una setmana cadascuna, es va inocular la mateixa quantitat de pèptid amb adjuvant de Freund incomplet. Una setmana després de cada immunització i abans de procedir a la següent, es va testar el títol d'anticòs en el sèrum dels ratolins. La última immunització, feta tres dies abans de la fusió, es van inocular 30 µg de pèptid en PBS sense adjuvant .

## **5.2- FUSIÓ CEL·LULAR**

Aquesta tècnica es basa en el fet que cada limfòcit B genera anticossos d'una especificitat única. Degut a que els limfòcits B no poden créixer de manera indefinida, és necessari immortalitzar aquells que produeixen un anticòs específic. Això s'aconsegueix mitjançant la fusió cel·lular entre un limfòcit B normal productor d'anticossos i una cèl·lula de mieloma. El resultat de la fusió és un hibridoma, una cèl·lula que adquireix la característica d'immortalitat de la cèl·lula cancerígena i la capacitat que li confereixen els limfòcits B per a produir l'anticòs d'interès. La fusió cel·lular té lloc tres dies després de la última immunització, emprant una modificació de la tècnica original de Köhler i Milstein (Kohler et al., 1977). Els esplenòcits es fusionen amb les cèl·lules de mieloma murí NS1 en una proporció 4:1, utilitzant polietilenglicol al 50% (Sigma-Aldrich Cat No. P-7181)

### **5.2.1. Obtenció dels esplenòcits**

En primer lloc, es va extreure la melsa del ratolí immunitzat i es va col·locar en una placa de Petri amb 10 ml de medi RPMI complet. Amb l'ajuda de dues agulles torçades de 25G, es van extreure els esplenòcits i es van recollir en un tub de 15 ml. Després d'haver esperat a que sedimentessin els agregats al fons del tub, es va transferir el contingut a un tub nou, evitant l'arrossegament dels agregats. Es van rentar els esplenòcits tres vegades amb medi RPMI sense sèrum fetal, amb centrifugacions a 1500 rpm durant 5 minuts a temperatura ambient.

### **5.2.2. Preparació de les cèl·lules de mieloma de ratolí NS-1**

Es van descongelar les cèl·lules una setmana abans de la fusió i es van mantenir en medi RPMI complet. El dia abans de la fusió es va afegir el doble de medi per tal que a l'endemà es trobin en fase exponencial i la fusió sigui més efectiva. Es necessita una proporció de cèl·lules per a la fusió de l'ordre de 4:1 respecte els esplenòcits. El dia de la fusió, es van prendre els mil·lilitres corresponents al nombre de cèl·lules que es necessiten i es van rentar dues vegades en medi RPMI sense sèrum fetal, amb centrifugacions a 1500 rpm durant 5 minuts a temperatura ambient.

### **5.2.3. Fusió de les cèl·lules NS-1 amb els esplenòcits**

Es van resuspendre en un tub de 50 ml els esplenòcits i les cèl·lules de mieloma de ratolí i es van centrifugar en condicions suaus. Passat aquest temps, es va treure tot el sobrenedant, es va col·locar el tub en un bany a 37°C en condicions estèrils i es va addicionar polietilenglicol (PEG) al 50% gota a gota i amb agitació constant. Gota a gota es va omplir el tub amb medi RPMI. Es van centrifugar les cèl·lules fusionades a 1000 rpm durant 10 min a temperatura ambient. Es van resuspendre les cèl·lules en el volum corresponent de medi per 100 µl/pou en unes 15-20 plaques, depenent del nombre de cèl·lules. El medi que es va utilitzar és medi RPMI suplementat amb HAT, que fa que el medi sigui selectiu, i amb *Hybridoma Fusion and Cloning Supplement 50x* (HFCS; Cat No 1136375001, Roche).

## **5.3. CULTIU DE LES CÈL·LULES FUSIONADES EN MEDI SELECTIU**

La tècnica de producció d'hibridomes necessita línies cel·lulars de mieloma cultivades que creixen en un medi de cultiu normal, però no en un medi de "selecció" definit, ja que no posseeixen determinats gens funcionals que es necessiten per a la síntesi d'ADN en aquest medi de selecció. La fusió de cèl·lules normals, com són els esplenòcits, amb cèl·lules de mieloma, com són les NS-1, proporciona a les cèl·lules fusionades els gens necessaris per poder sobreviure en medi selectiu. A més, la propietat de creixement descontrolat que tenen les cèl·lules de mieloma fa que aquests híbrids siguin immortals.



Les línies cel·lulars de mieloma que es poden utilitzar com a parelles de fusió, es creen mitjançant la inducció de defectes en la síntesi de nucleòtids.

Hi ha dues vies de síntesi:

- La via *de novo*, on se sintetitzen els nucleòtids de purina i timidilat a partir de tetrahidrofolat activat. Fàrmacs com l'aminopterina bloquegen l'activació del tetrahidrofolat, inhibint per tant la síntesi de nucleòtids per aquesta via.
- La via de salvament, la qual és utilitzada per les cèl·lules tractades amb aminopterina, on les purines són sintetitzades a partir d'hipoxantina, adicionada exògenament, per l'enzim HGPRT (Hipoxantina-guanosina fosforribosiltransferasa). El timidilat en canvi és sintetitzat per l'enzim TK (timidina-quinasa) a partir de timidina. Així doncs, les cèl·lules poden créixer en presència d'aminopterina si el medi de cultiu està suplementat amb hipoxantina i timidina (medi HAT).

## 5.4- SELECCIÓ DELS HIBRIDOMES D'INTERÈS

La selecció d'hibridomes secretors d'anticossos reactius en front a la seqüència peptídica de CD84 d'interès es va testar en primer lloc per la tècnica d'ELISA indirecte. Les clones positives es van testar per citometria de flux en transfectants transitoris de cèl·lules COS (veure apartat 11).

### 5.4.1- ELISA indirecte

La detecció d'hibridomes que secretessin anticossos específics contra el pèptid d'interès es va dur a terme mitjançant la tècnica ELISA indirecte. Es van sensibilitzar plaques de 96 pous (Corning Costar) amb el pèptid d'interès a 3 µg/ml durant 24 h a 4°C. Les plaques es van bloquejar durant 1 h amb PBS al 2 % de BSA (Albúmina de sèrum boví) a 37°C i posteriorment es van incubar els sobrenedants diluïts un quart durant 1 h a temperatura ambient. Posteriorment, es va emprar un anticòs policlonal de cabra dirigit contra IgG de ratolí conjugat amb HRP (*Horse red peroxidase*, Sigma-Aldrich Cat No. A-3673) per tal de detectar els anticossos positius. L'anticòs de detecció es va deixar 30 minuts a temperatura ambient i finalment es va emprar SIGMAFAST™ OPD (*Orthophenylenediamine*, Sigma-Aldrich Cat No. P-9187) o TMB Substrate Reagent (*3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine*, BDBiosciences Cat No. 80

---

555214) com a substrat de la peroxidasa, el qual en reaccionar amb la peroxidasa dóna lloc a un color detectable per densitometria òptica a 405 nm.

## **5.5. CULTIU SECUNDARI**

Les clones positives per ELISA van ser transferides a plaques de 24 pous en medi HT menys restrictiu, suplementat amb HFCS.

## **5.6- SUBCLONATGE DELS HIBRIDOMES PER DILUCIÓ LÍMIT**

Les clones positives per citometria de flux van ser subclonades per la tècnica de dilució límit amb l'objectiu d'obtenir anticossos que provinguessin d'una única clona. Les cèl·lules dels hibridomes a subclonar es van repartir en plaques de 96 pous de fons pla. Les cèl·lules es van sembrar a cada placa a una concentració de 1, 2, 4 i 8 cèl·lules per pou (100 µl/pou) respectivament.

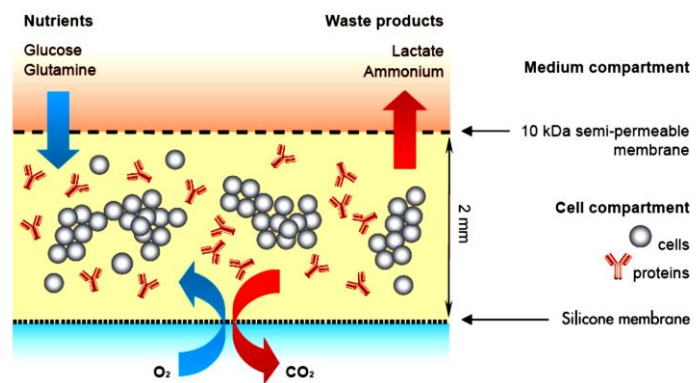
Deu dies després es van testar els sobrenedants dels pous on hi ha hagut creixement cel·lular. En el cas en que hi hagi creixement a totes les concentracions estudiades, es van testar aquelles clones que corresponguessin a la concentració on hi havia aproximadament una clona cada 4 pous. El criteri per acceptar com a bo un subclonatge és que tots els hibridomes testats provinents d'aquell hibridoma siguin positius. En cas que no sigui així, es realitza un altre subclonatge a partir d'una de les clones positives.

## **5.7- EXPANSIÓ DELS HIBRIDOMES**

Un cop subclonat l'hibridoma d'interès, es va procedir a la seva expansió. Inicialment es va passar a placa de 24, on es van adaptar les cèl·lules a medi sense HT i complementat amb un 20% de sèrum fetal per a hibridomes. Quan els hibridomes mostraven un bon creixement, es van passar a flascó de 25 cm<sup>2</sup>, per posteriorment passar-ho a flascó de 75cm<sup>2</sup> i de 150 cm<sup>2</sup>. En cada punt es van congelar els hibridomes d'interès, ja que en cas que hi hagués qualsevol problema això ens permetia recuperar-lo.

Un cop els hibridomes creixien bé en flascó de 150 cm<sup>2</sup>, el cultiu es va passar a un flascó de cultiu d'alt rendiment (INTEGRA CELLline-1000, Cultek Cat No. 90005), on la concentració aproximada d'anticòs present en el sobrenedant és de 1 mg/ml. Els flascons d'alt rendiment Integra CELLline tenen dos compartiments separats per una membrana semipermeable amb un tamany de porus de 10 kDa, la qual permet la difusió contínua dels nutrients dins el compartiment cel·lular i la introducció de medi fresc sense interferir en el cultiu. Una membrana de silicona assegura la transferència d'oxigen i controla els nivells de diòxid de carboni a l'interior del flascó.

El cultiu en aquest flascó es manté durant uns tres mesos, i cal recollir sobrenedant un cop a la setmana, aspirant amb una pipeta per la obertura de la part superior del flascó. El sobrenedant recollit també contindrà restes cel·lulars, les quals són eliminades per centrifugació. El sobrenedant es va guardar a 4°C a l'espera de reunir tot el volum final. Un cop a la setmana es van afegir cèl·lules noves al flascó d'alt rendiment provinents del cultiu del flascó de 150 cm<sup>2</sup>.



**FIGURA 23:** Funcionament dels flascons d'alt rendiment (Fotografia extreta de la web <http://www.integra-biosciences.com>)

## 5.8- PURIFICACIÓ D'ANTICOSSOS MITJANÇANT COLUMNA D'AFINITAT

El sobrenedant provinent dels flascons de cultiu d'alt rendiment es va purificar mitjançant cromatografia d'afinitat amb el kit de purificació d'anticossos monoclonals Affi-Gel Protein-A MAPS II (*Monoclonal Antibody Purification System, Biorad Cat No 153-6159*), que es basa en l'afinitat que presenta la proteïna A aïllada de *Staphylococcus A* per la regió Fc dels anticossos, amb la qual s'uneix de manera no covalent. El grau d'afinitat de la proteïna A per l'anticòs depèn del seu isotip i de l'espècie en que hagi estat produït.

En primer lloc es va purificar l'anticòs seguint les instruccions del kit de BioRad. Seguidament, es va dialitzar amb l'objectiu d'eliminar les sals que puguin interferir o malmetre l'anticòs. Per fer-ho, es va col·locar l'anticòs purificat en una membrana de diàlisi *Slide-A-Lyzer Gamma*

*Irradiated Dialysis Cassette Extra-Strength 10.000 MWCO* (Pierce Cat No. 66383), i aquest es va submergir en 1 l de PBS 1x a 4°C en constant agitació. Es van fer tres canvis de PBS cada 12 hores. Es va concentrar l'anticòs amb els filtres *Amicon Ultra Centrifugal Filters 50 K* (Amicon Cat No. UFC905024) i es va quantificar mitjançant el kit *BCA Protein Assay kit* (Thermo Scientific Cat No. 23225). Es va portar a una concentració de 2 mg/ml i s'analitzà per electroforesi en condicions reductores i no reductores (veure apartat 6.4).

## 5.9- BIOTINITZACIÓ D'ANTICOSSOS

La biotinització d'anticossos permet la utilització d'avidines conjugades a enzims o fluorocroms per a la detecció de la proteïna d'interès. Per fer-ho s'utilitza una solució 1M de  $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$  a pH = 9.5 (per 100 ml: 8,4 g de  $\text{NaHCO}_3$  + 5,3 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) i biotina (Stock: 2,5 mg/ml en DMSO) (Sigma-Aldrich Cat No. B-2643).

Per a cada mil·ligram d'anticòs a biotinar, es va afegir 50 µl de tampó carbonat i 30 µl de la solució de biotina en DMSO. Es va portar a un volum final d'1 ml amb PBS. Es va mantenir en rotació, tapat de la llum a 4°C durant 4 hores. Passat aquest temps, es va dialitzar amb PBS autoclavat, seguint el procés explicat anteriorment.

## 6. IMMUNOPRECIPITACIÓ

Aquesta tècnica permet identificar associacions entre proteïnes. Consisteix en precipitar la proteïna d'interès en condicions natives amb un anticòs específic. Durant tot el procés, és molt important mantenir les mostres i tots els reactius a 4°C.

Les solucions de rentat emprades són:

### 10x Solució RIPA

	500 ml	[ ] final
Tris·HCl 1M pH=8	50 ml	100 mM
EDTA	1,86 g	10 mM
EGTA	1,90 g	10 mM
NaF	0,21 g	10 mM

“High salt RIPA”

	<b>100 ml</b>	<b>[ ] final</b>
NaCl	2,93 g	0,5 M
Tritó	1 ml	1 %
BSA	100 mg	1 mg/ml
Solució RIPA 10x	10 ml	1x

“Low salt RIPA”

	<b>100 ml</b>	<b>[ ] final</b>
NaCl	0,87 g	0,15 M
DOC	0,2 g	0,2 %
BSA	100 mg	1 mg/ml
SDS 10 %	0,5 ml	0,05 %
Solució RIPA 10x	10 ml	1x

TNE

	<b>500 ml</b>	<b>[ ] final</b>
Tris·HCl 1M pH=8	25 ml	50 mM
NaCl 5M	15 ml	150 mM
EDTA 0,5 M	5 ml	5 mM

**6.1- BIOTINITZACIÓ I LLISAT DE LES CÈL·LULES****6.1.1. Biotinització i llisat de cèl·lules en suspensió**

Es van rentar amb PBS tres vegades  $50 \cdot 10^6$  cèl·lules per mostra. Es van afegir 2 mg de biotina (Biotin 3-sulfo-N-hydroxy-succinimide ester) (Sigma-Aldrich Cat No. B-5161) per cada  $50 \cdot 10^6$  de cèl·lules, diluïts en 4 ml de PBS. Es van mantenir en agitació circular durant 30 minuts a 4°C tapat de la llum. Passat aquest temps, es va centrifugar a 1500 rpm i 4°C durant 5 minuts. El pèl·let es va bloquejar amb 10 ml de RPMI sense sèrum durant 10 minuts en gel per tal d'evitar unions inespecífiques. Passat aquest temps, es va centrifugar a 1500 rpm i 4°C durant 5 minuts, es va extreure el sobrenedant i es va passar la mostra a un tub de 50 ml, on es van rentar les cèl·lules amb PBS. Amb les cèl·lules a un eppendorf, es van afegir 1 ml de tampó de llisi (1 % de Tritó-X 100, 50 mM de Tris·Base (pH 7.4), 150 mM de NaCl, 10 µl EDTA, 10 µl Halt Protease Inhibitor Cocktail (Pierce Scientific, Cat No. 78430)) i es va deixar en agitació circular

durant 20' a 4°C. Passat aquest temps, es va centrifugar a 13200 rpm i 4°C durant 20 minuts i es va recollir el sobrenedant.

### **6.1.2. Biotinització i llistat de cèl·lules adherides**

Es van rentar amb PBS tres vegades un flascó de 75 cm<sup>2</sup> amb cèl·lules en una confluència del 90-95%. Es van afegir 4 mg de biotina diluïts en 12 ml de PBS. Es van mantenir en agitació circular durant 30 minuts a 4°C tapat de la llum. Passat aquest temps, es va bloquejar amb una solució de glicina 50mM durant 10 minuts a 4°C per tal d'evitar unions inespecífiques. Passat aquest temps, es van rentar les cèl·lules amb tres rentats de 15 ml de la solució de glicina. Es va afegir 1 ml de tampó de llisi (1 % de Tritó-X 100, 50 mM de Tris·Base (pH 7.4), 150 mM de NaCl, 10 µl EDTA, 10 µl Halt Protease Inhibitor Cocktail (Pierce Scientific, Cat No. 78430)) i es va deixar en agitació circular durant 20' a 4°C. Passat aquest temps, es van recollir les cèl·lules amb un *scraper* i es van centrifugar a 13200 rpm i 4°C durant 20 minuts i es va recollir el sobrenedant.

### **6.2- PREPARACIÓ DE LES BOLES D'AFINITAT I PRE-CLEARINGS**

Es van rentar les *beads* de proteïna G necessàries (Proteïna G Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare)) amb TNE dues vegades a 4°C amb un pols de centrífuga. Es van fer dos tipus de pre-clearings:

a) Pre-clearing per evitar unions inespecífiques: Amb aquest primer pre-clearing es pretén eliminar totes les inespecificitats que poden interferir en l'experiment. Al llistat s'afegeixen 60 µl de *beads*, es manté en agitació circular durant 30 minuts a 4°C. Passat aquest temps es passa el llistat a un altre tub. Aquest rentat es fa tres cops.

b) Pre-clearings amb un mAb d'igual isotip: Al llistat s'afegeixen 60 µl de *beads* i 5 µg d'anticòs d'igual isotip que no reconegui cap proteïna del llistat i es manté en agitació circular durant 30 minuts a 4°C. Passat aquest temps es passa el llistat a un altre tub. Aquest rentat es fa tres cops.

### 6.3-IMMUNOPRECIPITACIÓ DE LES PROTEÏNES D'INTERÈS

Es van separar els llisats per a cadascuna de les mostres i es van afegir 5 µg de l'anticòs específic per a cada immunoprecipitació. Es va deixar a la nòria a 4°C durant tota la nit. A lendemà, es van afegir 40 µl de boles/mostra i es van deixar 1 hora amb agitació circular a 4°C. Per fer els rentats es van fer tres sèries de la seqüència RIPA HIGH, RIPA LOW, afegint 1 ml del tampó corresponent i fent un pols de centrífuga. Finalment es va rentar dues vegades amb TNE.

Per últim, es van afegir 30 µl de tampó reductor (2.5 ml Tris·HCl 0.5 M pH=6.8, 2 ml Glicerol 87%, 4 ml SDS 10%, 0.5 ml bromofenol 0.1%, 1 ml DTT 1 M afegit al moment, en 10 ml H<sub>2</sub>O) per mostra. Es van bullir les mostres durant 6 minuts a 100 °C i es va córrer un gel d'acrilamida del 12%.

### 6.4- ELECTROFORESI DE PROTEÏNES (SDS-PAGE)

Com el seu nom indica, la tècnica SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*), consisteix en l'electroforesi de proteïnes en un gel de poliacrilamida. Amb aquesta tècnica s'aconsegueix que les proteïnes migrin en funció de la seva mida, ja que gràcies a l'acció del detergent SDS, les proteïnes queden embolcallades adquirint totes la mateixa càrrega, de manera que la migració depèn només de la relació càrrega/massa, és a dir, de la llargada de la cadena peptídica.

Aquesta tècnica requereix la preparació de dues fases en el gel d'acrilamida: el gel apilador i el gel separador. Ambdues fases varien en el percentatge d'acrilamida, el pH, i la molaritat dels components. La finalitat del gel apilador és aconseguir un empaquetament correcte de les mostres per tal que entrin de manera correcta al gel separador. En el gel separador té lloc la fase resolutiva, on les proteïnes se separen segons el seu pes molecular. El percentatge d'acrilamida del gel pot variar depenent de la mida de les proteïnes que es vulguin separar; per a proteïnes de baix pes molecular s'empraran altes concentracions d'acrilamida (15%), mentre que per proteïnes d'alt pes molecular es treballarà amb baixes concentracions d'acrilamida (8%).

Les quantitats de cada reactiu per a un gel d'acrilamida del 12% són:

	<b>Gel separador</b>	<b>Gel apilador</b>
<b>Poliacrilamida 30%</b>	3,3 ml	750 µl
<b>Tris base (pH=8,8) BioRad</b>	3,7 ml	-
<b>Tris base (pH=6,8) BioRad</b>	-	625 µl
<b>H<sub>2</sub>O</b>	2,9 ml	3,5 ml
<b>SDS 10% Sigma</b>	100 µl	50 µl
<b>APS 20% GEHealthcare</b>	150µl	70 µl
<b>TEMED Applichem</b>	20 µl	10 µl

En primer lloc es va fer el gel separador. Un cop solidificat es va procedir a a fer el gel apilador. Quan aquest estava solidificat, es va posar a la cubeta d'electroforesi amb tampó (10x: 30 g Tris·Base, 144 g Glicina, 10 g SDS en 1 l d'aigua a pH 8,4. Es treballa a 1x) i s'aplicà un voltatge d'uns 100 V fins que el front del gel va arribar al final.

## **7. IMMUNOFLUORESCÈNCIA**

La immunofluorescència permet detectar antígens en cèl·lules aïllades o teixits mitjançant anticossos els quals tenen unida una molècula fluorescent.

### **7.1. IMMUNOFLUORESCÈNCIA DE CÈL·LULES ADHERENTS**

A cada pou d'una placa de 24, dins dels quals hi havia cubre-objectes de 12 mm de diàmetre prèviament rentats amb etanol i assecats completament, van ser transferides 100 000 cèl·lules COS. 24 hores després, es van rentar amb 3xPBS i es van tractar amb formaldehid al 1,5% durant 10 minuts en gel per tal de fixar-les. Després de rentar-les, es va procedir a la seva permeabilització amb PBS-Tritó 0.01% durant 5 minuts en gel. Posteriorment, es van bloquejar amb PBS amb un 5% de BSA i un 20% de sèrum de conill durant 1 hora. Es va afegir l'anticòs primari  $\alpha$ -CD84 1.21 purificat a un dilució 1/50 i es va incubar durant 1 hora. Passat aquest temps, es va rentar amb 3xPBS i es va incubar amb  $\alpha$ -mouse-A555 a una dilució 1/1000 durant 3' minuts. Es va rentar amb 3xPBS i es va incubar amb DAPI a una dilució 1/1000000 durant 10 minuts. Després de rentar 3xPBS, es va submergir un moment el cubre-objectes en aigua per



tal d'eliminar l'excés de sals. Els cubre-objectes es van posar sobre els porta-objectes amb medi de muntatge i les mostres van ser llegides amb el Microscopi Nykon Eclipse E600 .

## **7.2. IMMUNOFLUORESCÈNCIA DE CÈL·LULES EN SUSPENSÍO**

Per a la immunofluorescència de cèl·lules en suspensió, aquestes van ser prèviament adherides a un porta-objectes mitjançant una citocentrífuga i centrifugant a 500 rpm durant 5 minuts. Immediatament després de les centrifugacions, les cèl·lules van ser submergides durant uns segons amb acetona freda per tal de fixar i permeabilitzar les cèl·lules. Passat aquest temps, es van deixar assecar els porta-objectes i es va procedir al bloqueig de les cèl·lules seguint el protocol descrit a l'apartat anterior.

## **8. WESTERN-BLOT**

La tècnica del Western-Blot consisteix en la transferència del gel d'electroforesi a una membrana, que pot ser de diferents materials, com ara la nitrocel·lulosa i el PVDF (*Polivinylidene Fluoride*). La membrana permet la incubació amb els anticossos d'interès.

En aquest cas s'utilitza la transferència en semi-sec emprant l'aparell *TransBlot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell* (Biorad, Cat No. 170-3940) i una membrana de PVDF. El gel i la membrana es van posar entre dues espongetes de transferència (BioRad) impregnades amb tampó de transferència (25 mM Tris·Base, 129 mM Glicina, 20 % Metanol. Cal mantenir-lo a 4°C). S'aplicà un amperatge que no excedia els 20 V i per a minigels i es va mantenir constant durant 20 minuts.

Un cop finalitzada la transferència es va bloquejar la membrana amb solució de bloqueig (llet en pols *Sveltesse* al 5% en PBS). Es va incubar amb l'anticòs primari i secundari o amb l'estreptavidina segons convingués, a la dilució adequada, fent rentats amb TBST entre incubacions (*Tris Buffered Saline Tween-20*, 10x, 1 l: 24 g Tris·Base, 80 g NaCl, 20 ml Tween 20%). Es treballa a 1x) i es va revelar la membrana, emprant com a substrat, el reactiu més adient segons la sensibilitat que es volgués aconseguir (*Supersignal West Pico Chemiluminescence Substrate* (Pierce Cat No. 34077), *ECL Prime Western Blotting Detection*

Reagent (Amersham, Cat No. RPN2232 o ECL Plus (Amersham, Cat No. RPN2132)), i com aparell de detecció el LAS4000 (GE Healthcare).

## **9. SISTEMES DE TRANSFECCIÓ**

Les diferents construccions de plàsmids es van utilitzar per transfectar cèl·lules de manera transitòria i/o de manera estable.

### **9.1- TRANSFECCIONS TRANSITÒRIES**

L'objectiu de transfectar una línia cel·lular de manera transitòria és que pugui incorporar el plàsmid d'interès durant unes 24-72 hores, moment en que es realitzen els experiments desitjats. L'interès rau en el fet que les cèl·lules transfectades no expressen la proteïna a estudiar de manera intrínseca, per la qual cosa es poden avaluar els efectes d'aquesta d'una manera neta. Per obtenir aquests transfectants transitoris, s'ha utilitzat el sistema d'electroporació d'Amara.

### **9.2- TRANSFECCIONS ESTABLES**

Per poder comptar amb un transfectant que incorpori el plàsmid permanentment, s'han generat transfectants estables. Per a que això sigui possible, cal utilitzar mecanismes de selecció per a les cèl·lules transfectades, com ara la resistència a fàrmacs.

Cèl·lules Jurkat van ser transfectades establement amb diferents construccions, emprant el sistema d'electroporació *BioRad Gene Pulser*, seguint les instruccions indicades pel fabricant. Deu milions de cèl·lules es resuspenen en 800 µl de RPMI complet i s'introdueixen a una cubeta estèril de 0.4 cm (Biorad, Cat No.165-2088). Es mantenen en gel durant 10 min. Passat aquest temps, es procedeix a la descarrega elèctrica seguint els paràmetres indicats pel fabricant. Es deixen en gel 10 minuts i es sembren en un flascó de 75 cm<sup>2</sup>. Passades 24 hores, s'afegeix el fàrmac selectiu G418 (Invivogen, Cat No 108321-42-2), a la concentració adequada per a cada tipus cel·lular, ja que el plàsmid insertat li ha aportat el gen de resistència a aquest

fàrmac. Dues setmanes després, es testa l'expressió de les cèl·lules transfectades per citometria de flux.

## **10. ASSAJOS FUNCIONALS**

### **10.1. ASSAJOS D'ACTIVACIÓ EN LÍNIES CEL·LULARS**

#### **10.1.1. Expressió del ARNm de CD84 en línies cel·lulars Jurkat, Ramos i YT activades**

Cèl·lules Jurkat, Ramos i YT van ser tractades amb diferents estímuls durant 2, 6 i 24 hores per tal de veure l'expressió de CD84 i de la isoforma CD84\_Δ5,6 a nivell gènic passat aquest temps. Per fer-ho, 200 000 cèl·lules de cada tipus es van sembrar en pous de placa de 24, amb el seu control i per duplicat. Les cèl·lules Jurkat van ser activades amb α-CD3 a una concentració de 0.5 µg/ml i α-CD28 a una concentració de 2 µg/ml. Les cèl·lules Ramos van ser activades amb α-IgM a una concentració 0.5 µg/ml. Per últim, les cèl·lules YT van ser activades amb IL-2 a una concentració de 100 U/ml.

Passat el temps corresponent, les cèl·lules van ser recollides i es va procedir a l'extracció del RNA i la posterior reacció de PCR, tal com es descriu a l'apartat 2.

#### **10.1.2. Expressió de la proteïna cd84 en la línia cel·lular jurkat com a model de cèl·lula T**

Cèl·lules Jurkat transfectades amb el plàsmid de la proteïna íntegre de CD84 i amb el de la isoforma CD84\_Δ5,6, van ser activades amb α-CD3 a una concentració de 0.5 µg/ml i α-CD28 a una concentració de 2 µg/ml durant 6 i 24 hores. Passat aquest temps, les cèl·lules van ser marcades amb els anticossos α-CD69-PE (Biolegend, Cat No. 310905), α-CD25-V450 (BD Pharmingen Cat No. 560355) i α-CD84 1.21 Biot durant 45 minuts. Les cèl·lules van ser incubades un segon cop amb estreptavidina-PECy5 (Cat No. 405205) i llegides als citòmetres indicats a l'apartat 11.

Els sobrenedants de les cèl·lules incubades 24 hores van ser testats per comprovar la concentració d'IL-2 mitjançant el kit d'ELISA Human IL-2 DuoSet (R&D Systems), seguint les instruccions que indica el fabricant.

## 10.2. ASSAJOS D'ACTIVACIÓ EN CULTIU PRIMARI

Cèl·lules mononucleades de sang perifèrica provinents de *Buffy Coat* de voluntaris sans i cèl·lules d'amígdala de donant van ser activades amb diferents estímuls. Concretament,  $20 \cdot 10^6$  PBMCs van ser estimulades amb  $\alpha$ -CD3 a una concentració de 0.5  $\mu$ g/ml, i amb PHA al 1% durant 72 hores. Quant a les cèl·lules d'amígdala,  $20 \cdot 10^6$  cèl·lules van ser activades amb proteïna G al 1%, i  $20 \cdot 10^6$  cèl·lules amb PMA a una concentració de 0.1 ng/ml durant el mateix temps. Pels controls es van utilitzar cèl·lules del mateix individu sense activar. Passades les 72 hores, les PBMCs van ser marcades amb  $\alpha$ -CD4-FITC (BD Pharmingen Cat No 550628),  $\alpha$ -CD8-A647 (BD Pharmingen Cat No. 557708),  $\alpha$ -CD25-APC (Immunotools, Cat No. 21270256) i  $\alpha$ -CD84 1.21 (Biolegend, Cat No 326007); mentre que les cèl·lules d'amígdala es van incubar amb  $\alpha$ -CD19-PB (Biolegend, Cat No H1B19),  $\alpha$ -CD25-V450 i  $\alpha$ -CD84 1.21.

## 11. CITOMETRIA DE FLUX

La citometria de flux és una tècnica d'anàlisi cel·lular que implica mesurar les característiques de dispersió de llum i fluorescència que tenen les cèl·lules fent-les passar per un feix de llum. Per la seva anàlisi amb citometria de flux cal que les cèl·lules es trobin individualment en suspensió en un fluid.

En travessar el feix de llum, les cèl·lules interaccionen causant la dispersió de la llum, basant-se en l'efecte de la difracció de la llum en sentit frontal, gràcies a la qual cosa es pot avaluar la mida de les cèl·lules que passen, paràmetre anomenat *Forward Scatter*, i en mesurar la reflexió de la llum es pot avaluar la granularitat o complexitat d'aquestes (*Side Scatter*). A més de la dispersió de la llum, si prèviament a la seva anàlisi es col·loquen les cèl·lules en presència d'anticossos monoclonals marcats amb molècules fluorescents, es pot avaluar quines cèl·lules tenen determinats antigens. L'ús de molècules fluorescents diferents permet analitzar la presència de diversos marcadors de manera simultània.

Si l'anàlisi inclou la detecció de fluorescència es parla estrictament de citofluorímetres de flux, els quals poden analitzar partícules en funció de la seva fluorescència i mida. Els citòmetres coneguts com a separadors o sorters, també poden purificar poblacions de característiques determinades en diferents fraccions finals.

En primer lloc es van comptar les cèl·lules i es van passar a un tub de FACS afegint unes 200000 cèl·lules per tub. Es van rentar amb tampó de rentat (2% FCS en PBS i 0.01% d'azida sòdica. S'utilitza per fer els rentats i la suspensió de les cèl·lules) centrifugant a 1500 rpm durant 5 minuts a 4°C. S'incubà l'anticòs primari diluït en tampó de fenotipat (Sèrum de conill inactivat en percentatge variable generalment entre el 1 i el 20% en PBS. S'inactiva per calor a 56°C durant 30 minuts. S'utilitza per fer les dilucions dels anticossos i de les cèl·lules) en un volum final de 100 ul, a la concentració òptima durant 45 minuts a 4°C. Passat aquest temps, es van rentar les cèl·lules. Si procedia, s'incubaven les cèl·lules amb l'anticòs secundari a la concentració òptima durant 20 minuts a 4°C. Passat aquest temps, es rentaven les cèl·lules. En el cas que l'anticòs secundari estigués biotinat, calia fer una tercera incubació amb estreptavidina unida a un fluorocrom a la concentració òptima, durant 20 minuts a 4°C. Passat aquest temps, es rentaven les cèl·lules i es llegien les mostres al citòmetre FACSCantoII (BD Pharmingen) i les dades van ser analitzades emprant el software FlowJo (Tree Star, San Carlos, CA), FACSDiva (BDBiosciences) o CellQuest (BDBiosciences).

### **11.1. ESTUDI DE L'EXPRESSIÓ DE CD84 I DE LA SEVA ISOFORMA CD84\_Δ5,6 EN LES DIFERENTS SUBPOBLACIONS DE MELSA**

Per a l'estudi de l'expressió de CD84 i de la isoforma CD84\_Δ5,6 en les subpoblacions de melsa de voluntaris sans, va ser necessària la combinació de diferents anticossos. Per diferenciar entre cèl·lules naïve, pre-centre germinal i centre germinal es van emprar els anticossos α-CD38-PECy7 (BDBiosciences Cat No. 555462), α-CD19-PB i α-IgD-FITC (BD Pharmingen Cat No. 562023). Els marcadors α-CD19-PB, α-CD27-APC (Cat No 302809) i α-IgD-FITC van permetre diferenciar entre cèl·lules que han fet el canvi de classe i les que no. Es va diferenciar entre plasmablasts i cèl·lules plasmàtiques amb els marcadors α-CD19-PB, α-CD27-APC, α-CD38-PECy7 i α-IgD-FITC. Per últim, les cèl·lules de la zona marginal i les fol·liculars van ser identificades amb els marcadors α-CD19-PB, α-CD21-FITC (Cat No. 315104) i α-CD23-APC (Cat No 558690).

## **11.2. ESTUDI DE LES DIFERENTS SUBPOBLACIONS EN LIMFÒCITS DE SANG PERIFÈRICA**

Per a l'estudi de les diferents subpoblacions de PBMCs en voluntaris sans i pacients amb LES per citometria de flux, va ser necessària la combinació de diferents anticossos. Per a les cèl·lules B, es van emprar els anticossos  $\alpha$ -IgM-FITC,  $\alpha$ -CD5-PerCPCy5.5 (Biolegend, Cat No B115140),  $\alpha$ -CD19-PB. Per a determinar la població de cèl·lules NK es van utilitzar els següents anticossos:  $\alpha$ -CD16-FITC (BD Pharmingen Cat No 555406),  $\alpha$ -CD56-PerCPCy5.5 (BD Pharmingen Cat No. 560842) i  $\alpha$ -CD3-VB (Miltenyi Biotech Cat No 130-094-363). Les diferents subpoblacions de cèl·lules T CD4+ van ser determinades amb els anticossos  $\alpha$ -CD3-VB,  $\alpha$ -CD4-FITC i  $\alpha$ -CD45RO-APC (Miltenyi Biotech Cat No 130-095-460). Les subpoblacions de cèl·lules T CD8+ es van determinar amb els anticossos  $\alpha$ -CD8-A647,  $\alpha$ -CD45RA-FITC (BD Pharmingen Cat No. HI100),  $\alpha$ -CCR7-PerCPCy5.5 (BD Pharmingen Cat No. 561144). Per últim, la subpoblació de cèl·lules T reguladores va ser determinada emprant els anticossos  $\alpha$ -CD4-FITC,  $\alpha$ -CD25-V450 i  $\alpha$ -FoxP3-A647 (Biolegend, Cat No 320013). L'expressió dels monòcits va ser determinada per FSC/SSC.

### **11.2.1. Estudi de les diferents subpoblacions en limfòcits de sang perifèrica en pacients de LES i AR**

Dotze voluntaris sans formats per onze dones i un home d'edats compreses entre els 24 i el 50 anys van participar en aquest estudi. Per l'estudi de LES es va establir una col·laboració amb el Servei de Malalties Autoimmunes de l'Hospital Clínic de Barcelona. Van participar deu pacients d'edats compreses entre els 24 i els 59, formats per un home i nou dones. Tots els pacients es trobaven en una etapa de la malaltia de remissió. Els criteris d'exclusió pels pacients de LES van ser:

- Edat inferior a 18 anys o superior a 70 anys
- Embaràs
- Neoplàsia activa
- Procés infecció sistèmic a l'últim mes
- Tractament amb immunosupressors als últims 3 mesos
- Tractament biològic als últims 12 mesos

- Malaltia activa moderada-greu als últims 3 mesos (definida com un brot de la malaltia amb una puntuació a l'escala SLEDAI > 12
- Tractament actual amb corticoides superior a 10 mg/dia
- Tractament amb corticoides superior a 30 mg/dia als últims 3 mesos.

Per l'estudi amb els pacients d'AR, es va establir una col·laboració amb el Servei de Reumatologia de l'Hospital Clínic de Barcelona. Els pacients estaven formats per deu dones i dos homes d'edats compreses entre els 25 i els 68 anys, amb una durada mitjana de la malaltia de 2,7 anys. Els criteris d'exclusió de la malaltia van ser:

- Edat inferior a 18 anys o superior a 70 anys
- Embaràs
- Neoplàsia activa
- Tractament biològic als últims 12 mesos
- Tractament actual amb corticoides superior a 10 mg/dia

Complint aquests criteris, dels dotze voluntaris, vuit estaven en un estadi de la malaltia no activa o poc activa, mentre que els quatre restant estaven en fase aguda. Un 80% dels pacients eren factor reumatoide (FR) i/o anticossos anticitrulina positius.

### **11.3. PERMEABILITZACIÓ CEL·LULAR**

La fixació i permeabilització cel·lular va ser necessària per detectar antígens intracel·lulars. Per fer-ho es va utilitzar el kit FoxP3 (eBiosciences, Cat No. 00-5523-00) seguint el protocol que indica el fabricant. Breument, es van incubar els anticossos de superfície durant 15 minuts a 4°C, i després es van fixar i permeabilitzar les cèl·lules. Un cop permeabilitzades, es van incubar amb els anticossos intracitoplasmàtics durant 1 hora a temperatura ambient.

### **11.4. ESTUDI DE LA INTERNALITZACIÓ AMB EL CITÒMETRE IMAGESTREAM**

El citòmetre ImageStream II (Amnis), que combina la citometria de flux amb la microscòpia, permet fer estudis de marcatge més acurats, fent possible per exemple, l'estudi de la

internalització d'una proteïna en l'interior d'una cèl·lula. El protocol difereix lleugerament de l'emprat en la citometria convencional, entre d'altres modificacions que cal fer és utilitzar els anticossos a una concentració més elevada, ja que l'excitació dels fluorocroms no té lloc a través de fotomultiplicadors com en un citòmetre convencional.

En primer lloc, es van plaquejar 200 000 cèl·lules en plaques de Petri de 10 mm en un volum final d'1 ml de RPMI complet i una concentració final d'anticòs de (1/50). Es va deixar 45 i passat aquest temps, es va sotmetre cadascuna de les mostres a les diferents condicions de temps (0 i 120 min) i temperatura (37°C) per afavorir la internalització de la proteïna d'interès.





## VI. RESULTATS





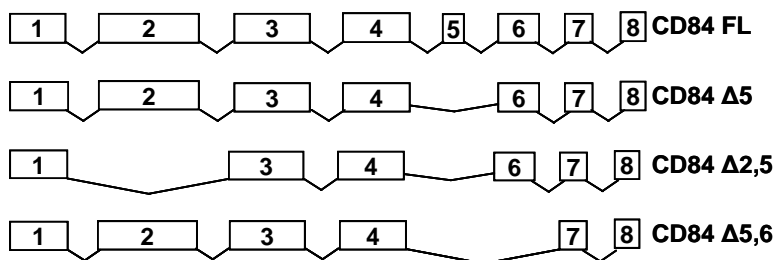
## 1. EXPRESSION DE LES ISOFORMES DE CD84

### 1.1. CD84 TÉ ALMENYS QUATRE ARN MISSATGERS DIFERENTS

L'anàlisi de diferents bases de dades va mostrar informació similar quant a les variants de CD84 (veure figura 24A), pel que es va prendre com a referència la base de dades ECGene, que com s'ha explicat anteriorment, recull totes les variants generades per *splicing alternatiu*, d'acord amb un algoritme de predicció basat en clústers d'ESTs. Aquesta base de dades descriu set transcrits del gen CD84 (veure figura 24B). Per quatre d'aquestes variants s'han descrit seqüències d'ARN missatger i d'ESTs, que juntament amb una estructura exó/intró compatible, farien possible que aquestes isoformes s'expressessin a nivell de proteïna i fossin potencialment funcionals.

Un estudi exhaustiu de la base de dades demostrà que el transcrit H1C22218.5, amb dues seqüències d'ARNm i 91 ESTs correspondria al gen íntegre o *full length* (CD84\_FL); amb una regió codificant de 1017 pb formada per vuit exons. El transcrit H1C22218.2, amb una seqüència d'ARNm i 66 ESTs té una regió codificant de 642 pb a la qual li falten els exons 2 i 5 (CD84\_Δ2,5). En canvi, el transcrit H1C22218.3, amb 5 seqüències d'ARNm i 93 ESTs està format per 984 pb i li falta l'exó 5 (CD84\_Δ5). Per últim, el transcrit H1C22218.4, amb una seqüència d'ARNm i 88 ESTs està format per 816 pb i li falten els exons 5 i 6 (CD84\_Δ5,6).

A



B

Transcript ID	Transcript Type	Confidence level	Min. Clones	# mRNAs	# ESTs	# Spliced ESTs	# Exons	# polyA seq.	mRNA	CDS	5'UTR	3'UTR
<a href="#">H1C22218.1</a>	Coding	A	1	0	63	2	3	0	4,694 bp	189 bp ( 63aa)	410 bp	4,095 bp
<a href="#">H1C22218.2</a>	Coding	A	1	1	66	5	6	0	4,777 bp	642 bp ( 214aa)	40 bp	4,095 bp
<a href="#">H1C22218.3# R</a>	Coding	A	1	5	93	32	7	0	5,158 bp	984 bp ( 328aa)	79 bp	4,095 bp
<a href="#">H1C22218.4</a>	Coding	A	1	1	88	27	6	0	5,060 bp	816 bp ( 272aa)	79 bp	4,165 bp
<a href="#">H1C22218.5</a>	Coding	A	1	2	91	30	8	0	5,191 bp	1,017 bp ( 339aa)	79 bp	4,095 bp
<a href="#">H1C22218.6</a>	Coding	A	1	1	23	22	4	0	1,364 bp	840 bp ( 280aa)	79 bp	445 bp
<a href="#">H1C22218.7</a>	Coding	A	1	1	3	3	3	0	853 bp	723 bp ( 241aa)	67 bp	63 bp

**FIGURA 24:** A) Esquema de l'estructura exó/intró del gen CD84. B) Taula extreta de la web ECGene (<http://genome.ewha.ac.kr/ECgene>) on s'indica el tipus de transcrit, el nivell de confiança, les mínimes clones trobades, els ARNm identificats, les seqüències EST, les seqüències ESTs amb *splicing*, el nombre d'exons de cada isoforma, les seqüències polyA, el nombre de pb que conté el ARNm, la longitud de les regions codificants (CDs), i la llargada de les regions 5'UTR i 3' UTR.

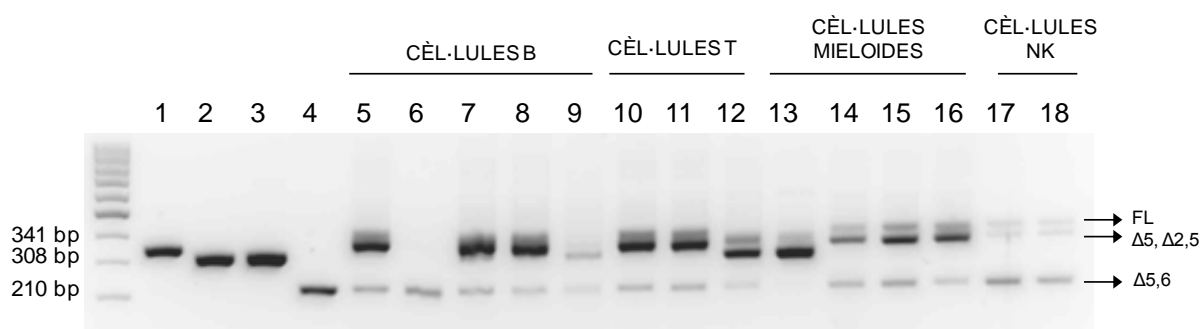
Estudis previs de citometria de flux realitzats pel nostre grup, demostraren que la proteïna CD84 s'expressa en diverses línies cel·lulars del sistema immune (Romero et al., 2004). Amb la intenció d'esbrinar si les variants descrites a les bases de dades estaven presents en aquestes línies, es van dur a terme en primer lloc un anàlisi de RT-PCR. En les diferents reaccions de PCR es van utilitzar oligonucleòtids específics dissenyats a les unions dels exons per tal d'aconseguir una major especificitat. La primera PCR correspon a una amplificació de la cua citoplasmàtica i dona lloc a tres bandes de 341 pb, 308 pb i 210 pb. La seqüenciació de les bandes obtingudes va demostrar que la banda de 341 pb corresponia al gen íntegre (CD84\_FL), mentre que la banda de 308 pb corresponia a una cua citoplasmàtica amb un exó menys, que coincidia amb les seqüències dels transcrits CD84\_Δ2,5 i CD84\_Δ5. Per últim, la banda de 272 pb va amplificar una seqüència coincident amb CD84\_Δ5,6.

### 1.1.1. Totes les línies cel·lulars testades expressen almenys una variant

L'amplificació de la cua citoplasmàtica en les diferents línies cel·lulars demostrà que almenys tres de les quatre variants esmentades s'expressen diferencialment en les diverses línies cel·lulars estudiades com ara cèl·lules B (Ramos, Namalwa, Raji, Daudi i CESS), cèl·lules T (Jurkat, HSB2 i MOLT4), cèl·lules mieloides (HL60, U937, K562 i THP-1) i NK (YT i NKL).

Tal i com es pot veure a la figura 25, els transcrits tenen una expressió molt diferent entre llinatges. Així doncs, mentre en la majoria de línies de cèl·lules B i T les variants predominants semblen ser CD84\_Δ5 i/o CD84\_Δ2,5, en les línies de cèl·lules NK testades destaca l'expressió de CD84\_Δ5,6. Quant a les línies mieloides, tot i que l'expressió de CD84\_Δ5 també és la més destacable, la variant CD84\_Δ5,6 també té una presència important.

Dins de cada llinatge també hi ha diferències. D'aquesta manera, en les línies de cèl·lules B, el patró d'expressió de la línia Ramos, Raji i Daudi és similar, mentre que Namalwa sembla que no tindria un nivell detectable d'ARNm per a les variants CD84 FL, CD84\_Δ5 i CD84\_Δ2,5. En cèl·lules T, les línies Jurkat i HSB2 tenen expressions similars, mentre que MOLT4 tindria una expressió més baixa de CD84\_Δ5,6. En llinatge mioide és on hi ha una diferència més important entre línies. Mentre K562 i THP-1 tindrien una expressió de CD84 FL, CD84\_Δ5 i CD84\_Δ2,5 similar, l'expressió de CD84\_Δ5,6 seria més baixa en el cas de THP-1. La línia U937 té una expressió global de CD84 més baixa que la resta del seu llinatge, mentre que en HL60 predominen els transcrits CD84\_Δ5 i/o CD84\_Δ2,5.

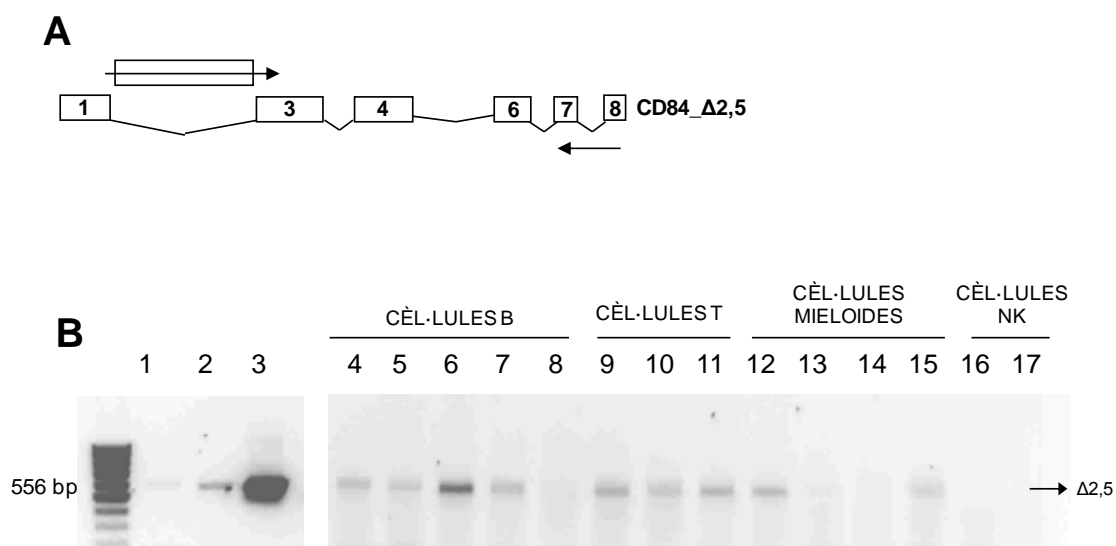


**FIGURA 25: Detecció d'ARNm de les variants del gen CD84.** Els productes d'amplificació de la cua citoplasmàtica amb oligonucleòtids en les unions dels exons 3-4 (*sense*) i 7-8 (*antisense*) van ser analitzats per electroforesi en gel d'agarosa del 3%. Les mostres són: 1) CTL FL, 2) CTL Δ5, 3) CTL Δ2,5, 4) CTL Δ5,6; 5) RAMOS; 6) NAMALWA; 7) RAJI; 8) DAUDI; 9) CESS; 10) JURKAT 11) HSB2; 12) MOLT4; 13) HL60; 14) U937; 15) K562; 16) THP-1; 17) YT 18) NKL; on CTL són els plàsmids control de cadascuna de les isoformes. La banda de 341 pb correspon a la proteïna íntegra (CD84 FL), mentre que la banda a 308 pb amplifica la cua citoplasmàtica de les isoformes CD84 Δ5 i CD84 Δ2,5. La banda de 210 pb correspon a la isoforma CD84 Δ5,6.

### 1.1.2. El transcrit CD84\_Δ2,5 té una expressió molt feble en les línies cel·lulars testades

Una segona PCR amb els oligonucleòtids dissenyats a la unió dels exons 1-3, unió present únicament en la possible isoforma CD84\_Δ2,5 (veure figura 26A), va permetre diferenciar entre aquest transcrit i el CD84\_Δ5. La seqüenciació de la banda obtinguda va confirmar que es corresponia amb el transcrit CD84\_Δ2,5.

La PCR específica pel transcrit CD84\_Δ2,5 en línies cel·lulars (veure figura 26B) va demostrar que aquesta isoforma es troba lleugerament expressada en la majoria de cèl·lules B testades amb una clara expressió en cèl·lules Raji, en totes les línies de cèl·lules T i en algunes línies mieloides, però no en les dues línies de cèl·lules NK testades.



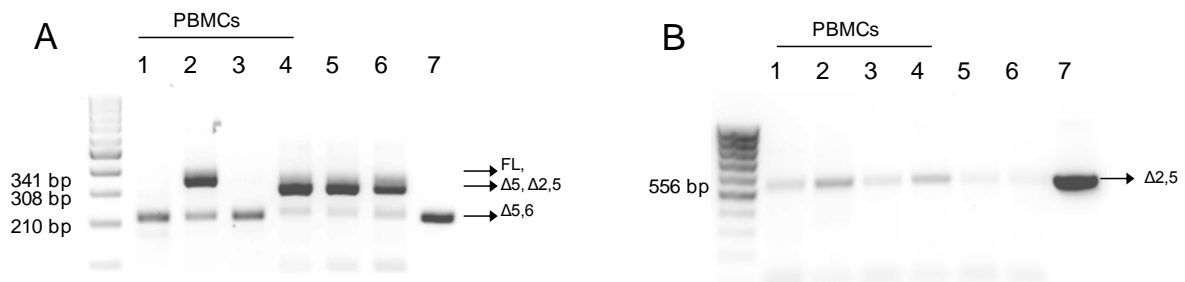
**FIGURA 26: Detecció d'ARNm de les variants del gen CD84.** Els productes d'amplificació per PCR del transcrit corresponent a la isoforma CD84\_Δ2,5 amb oligonucleòtids en les unions dels exons 1-3 (*sense*) i 7-8 (*antisense*) (**A**) van ser analitzats per electroforesi en gel d'agarosa del 1%. **B**) Les mostres són: 1) CTL FL, 2) CTL Δ5, 3) CTL Δ2,5, 4) CTL Δ5,6; 5) RAMOS; 6) NAMALWA; 7) RAJI; 8) DAUDI; 9) CESS; 10) JURKAT 11) HSB2; 12) MOLT4; 13) HL60; 14) U937; 15) K562; 16) THP-1; 17) YT 18) NKL; on CTL són els plàsmids control de cadascuna de les isoformes. La banda de 556 pb correspon a la isoforma CD84 Δ2,5

### 1.1.3. Les cèl·lules primàries testades expressen els transcrits CD84 FL, CD84\_Δ5, CD84\_Δ2,5 i CD84\_Δ5,6

Les mateixes reaccions PCR van ser utilitzades per analitzar l'expressió de les isoformes en diferents mostres de cèl·lules de sang perifèrica de voluntaris sans (PBMCs), en melsa i en amígdala.

Tal i com es veu a la figura 27A, les mostres de PBMCs tenen una expressió de les isoformes molt diferent segons l'individu. D'aquesta manera, a la mostra 2 predomina principalment la isoforma CD84 FL, tot i que la isoforma CD84\_Δ5,6 també té una expressió important. A les mostres 1 i 3 la isoforma principal és CD84\_Δ5,6, amb una expressió de la resta d'isoformes no detectable. A la mostra 4 en canvi, l'expressió més important es deu a les isoformes CD84\_Δ5 i/o CD84\_Δ2,5, amb una expressió de CD84\_Δ5,6 molt lleugera i similar a la observada a les mostres de melsa i amígdala, on també les isoformes predominants són CD84\_Δ5 i/o CD84\_Δ2,5.

A la figura 27B s'observa una expressió lleugera de la variant CD84\_Δ2,5 en les mostres de PBMCs. L'expressió més alta es troba en les mostres 2 i 4, mentre que en melsa i amígdala té una expressió molt minoritària.



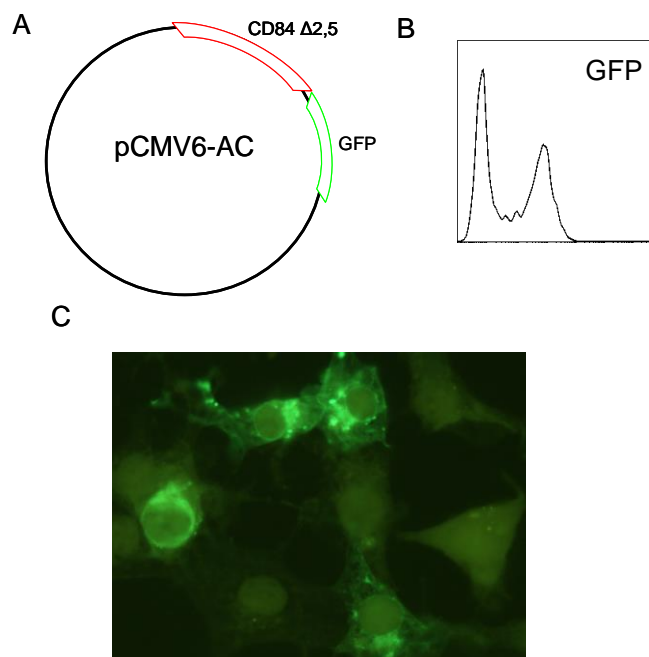
**FIGURA 27: A)** Amplificació de la cua citoplasmàtica de CD84 amb oligonucleòtids en les unions dels exons 3-4 (*sense*) i 7-8 (*antisense*). Les mostres són: 1-4) PBMCs, 5) Melsa 6) Amígdala 7) CTL Δ5,6; on CTL són els plàsmids control de cadascuna de les isoformes. La banda de 341 pb correspon a la proteïna íntegra (CD84 FL), mentre que la banda a 308 pb amplifica la cua citoplasmàtica de les isoformes CD84 Δ5 i CD84 Δ2,5. La banda de 210 pb correspon a la isoforma CD84 Δ5,6. **B)** : Amplificació per PCR del transcrit corresponent a la isoforma CD84\_Δ2,5 amb oligonucleòtids en les unions dels exons 1-3 (*sense*) i 7-8 (*antisense*). Les mostres són: 1-4) PBMCs, 5) Melsa 6) Amígdala 7) CTL Δ2,5; on CTL són els plàsmids control de cadascuna de les isoformes.; on CTL són els plàsmids control de cadascuna de les isoformes. La banda de 556 pb correspon a la isoforma CD84 Δ2,5.



## 1.2. ESTUDI DE LA ISOFORMA CD84\_Δ2,5

### 1.2.1. La isoforma CD84\_Δ2,5 no s'expressa a la membrana

Per tal de comprovar si el transcrit CD84\_Δ2,5 s'expressava a nivell de proteïna, es van dur a terme diversos assajos per FACS en cèl·lules COS-7 transfectades transitòriament amb la construcció pCDNA3.1 CD84\_Δ2,5 i amb l'anticòs  $\alpha$ -CD84 2.151, el qual reconeix el segon domini immunoglobulina de la proteïna. Aquests assajos no van permetre detectar la isoforma, malgrat la seqüenciació del cDNA va confirmar que la seqüència de nucleòtids es corresponia amb la descrita a les bases de dades. El marcatge intracel·lular per citometria per comprovar la presència de la isoforma al citoplasma, també va ser negatiu. Es va decidir doncs utilitzar una construcció de la isoforma que contingués el *tag* fluorescent GFP (veure figura 28A), per tal d'estudiar la localització de la proteïna. Es van transfectar transitòriament cèl·lules COS-7 i es va comprovar per citometria de flux que el transcrit s'expressava a nivell de proteïna de fusió (Veure figura 28B). No obstant, per microscòpia de fluorescència (veure figura 28C) es va observar que la proteïna no es troba localitzada a la superfície cel·lular.



**FIGURA 28:** A) Esquema del plàsmid comercial pCMV6-AC CD84\_Δ2,5, que conté el tag GFP en el seu extrem 5'. B) Expressió del *tag* GFP en cèl·lules COS-7 transfectades amb la construcció pCMV6-AC CD84\_Δ2,5 per citometria de flux. C) Imatge de microscopia de fluorescència de cèl·lules COS-7 transfectades amb la construcció pCMV6-AC CD84\_Δ2,5

El nostre interès per aquesta isoforma radicava en el possible rol funcional que podria tenir en mancar-li el domini responsable de l'adhesió. Degut a que els experiments realitzats indiquen que no es localitza a la membrana plasmàtica, tal i com es preveia, es va decidir no continuar aprofundint en l'estudi d'aquesta isoforma.

### **1.3. ESTUDI DE LA ISOFORMA CD84\_Δ5,6**

#### **1.3.1. L'anticòs 688.1 contra la cua citoplasmàtica de CD84\_Δ5,6 reconeix específicament aquesta isoforma**

Per estudiar i caracteritzar la isoforma CD84\_Δ5,6 es va generar un anticòs monoclonal que la reconeix específicament (veure figura 29). Aprofitant que la isoforma CD84\_Δ5,6 té en la seqüència de nucleòtids de la seva cua citoplasmàtica un canvi en la pauta de lectura que genera una seqüència d'aminoàcids única, es va sintetitzar un pèptid amb aquesta seqüència. Es van fusionar esplenòcits de ratolí immunitzat amb aquest pèptid unit a BSA amb cèl·lules NS1. Les cèl·lules van créixer en medi selectiu durant 15 dies, afavorint el creixement únicament d'aquelles que s'havien fusionat. Es van obtenir unes 800 clones, els sobrenedents de les quals va ser testat. Deu d'aquestes clones van ser positives per ELISA, i d'aquestes, sis van donar positives per citometria de flux amb transfectants de cèl·lules Jurkat CD84\_Δ5,6. Les clones 111.1, 368.2 i 688.1 es van cultivar en flascons d'alt rendiment, obtenint una quantitat final d'anticòs de 40 mg, 25 mg i 30 mg respectivament. L'isotip dels tres anticòs va ser IgG2b.

A

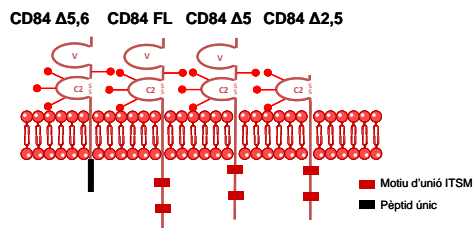
CD84 FL

MAQHHLWILLLLCLQTWPEAAGKDSEIFTVNGILGE  
 SVTFPVNIQEPRQVKIIAWTSKTSVAYVTPGDSET  
 APVVTVTHRNYERIHALGPNYNLVI SDLRME DAG  
 DYKADINTQADPYTTTKRYNLQIYRRLGKPKITQS  
 LMASVNSTCNVTLTCSVEKEEKNVTYNWSP LGEEG  
 NVLQIFQPEDQELTYTCTAQN PVSNNSDSISARQL  
 CADIAMGFRTHHTGLLSV LAMFFLLVLILSSVFLF  
 RLFKRRQG **SCLNFTKNPYAASKKTIYTYIMASRN**  
**TQPAESRIYDEILQSKVLP SKEE PVNTVYSEVQFA**  
**DKMGKASTQDSKPPGTSSYEIVI**

CD84 Δ5,6

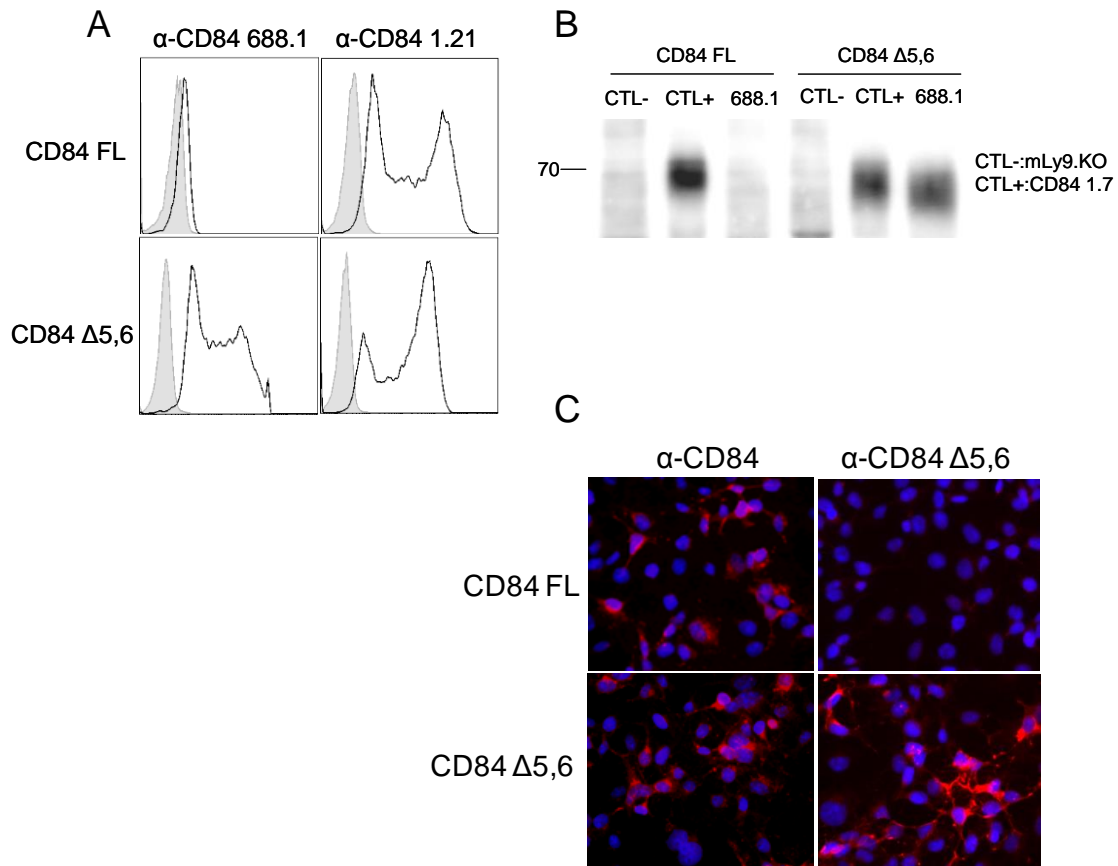
MAQHHLWILLLLCLQTWPEAAGKDSEIFTVNGILGE  
 SVTFPVNIQEPRQVKIIAWTSKTSVAYVTPGDSET  
 APVVTVTHRNYERIHALGPNYNLVI SDLRME DAG  
 DYKADINTQADPYTTTKRYNLQIYRRLGKPKITQS  
 LMASVNSTCNVTLTCSVEKEEKNVTYNWSP LGEEG  
 NVLQIFQTPEDQELTYTCTAQN PVSNNSDSISARQ  
 LCADIAMGFRTHHTGLLSV LAMFFLLVLILSSVFL  
 RLFKRRQG **ASLQGRASEHSLFRSAVC**

B



**FIGURA 29:** A) Seqüència d'aminoàcids de les isoformes CD84 FL i CD84 Δ5,6, on s'indiquen cadascun dels exons amb colors diferents. En vermell s'assenyala el pèptid líder, en blau el domini immunoglobulina variable, en taronja el domini immunoglobulina constant de tipus 2 i en grana el domini transmembrana. La cua citoplasmàtica, la qual difereix en ambdues isoformes, està subratllada. La cua citoplasmàtica de la isoforma CD84\_Δ5,6 conté el pèptid únic generat pel canvi en la pauta de lectura que crea la manca del exons 5 i 6. B) Estructura proteica de les isoformes de CD84. La isoforma CD84\_Δ5,6 no té motius de fosforilació en la seva cua citoplasmàtica, mentre que la resta d'isoformes en conserven els dos que formen part dels motius ITSM i les dues tirosines.

Els experiments duts a terme per a la validació de l'anticòs, en transfectants transitoris de cèl·lules COS-7 analitzats per FACS, demostraren que aquest reconeix la isoforma d'interès (veure figura 30A) però no la resta d'isoformes de CD84. També s'ha demostrat que l'anticòs 688.1 immunoprecipita específicament la isoforma CD84\_Δ5,6 en transfectants estables de cèl·lules Jurkat (veure figura 30B). Els estudis d'immunofluorescència en cèl·lules adherents transfectades transitòriament també mostra l'especificitat d'aquest anticòs en front a la proteïna íntegra (veure figura 30C).

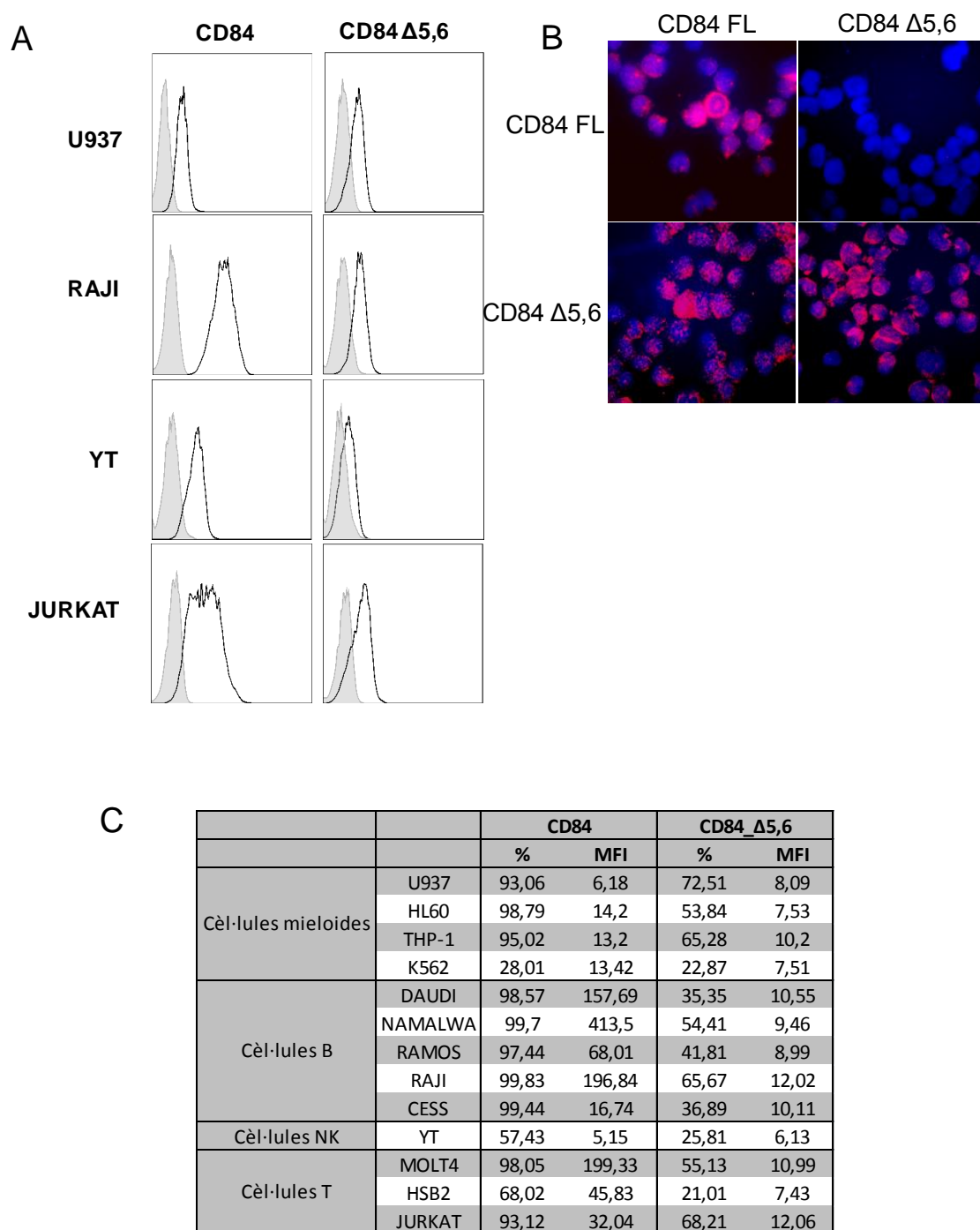


**FIGURA 30: Caracterització de l'anticòs contra la isoforma CD84\_Δ5,6.** A) Especificitat de l'anticòs α-CD84\_Δ5,6 688.1 generat contra la cua citoplasmàtica de la isoforma CD84\_Δ5,6. A la columna de l'esquerra es mostra la reactivitat de l'anticòs generat en front a COS-7 transfectades amb CD84\_Δ5, CD84 FL i CD84\_Δ5,6, respectivament. A la columna de la dreta es mostra com a control l'expressió de la proteïna total CD84. B) Immunoprecipitació en cèl·lules Jurkat transfectades amb CD84 FL i CD84\_Δ5,6. Com a control negatiu es va utilitzar un anticòs del mateix isotip que el que es volia testar (IgG2a), contra la proteïna Ly9 murina. Com a control positiu es va utilitzar un anticòs que reconeixia el primer domini de la proteïna CD84. En la imatge es veu com l'anticòs generat (688.1) no reconeix cap proteïna en el transfectant CD84 FL, mentre que en el transfectant CD84\_Δ5,6 apareix una banda del tamany esperat. C) Immunofluorescència en cèl·lules COS-7 transfectades amb CD84 FL (imatges part superior) i CD84\_Δ5,6 (imatges part inferior). A la columna de l'esquerra es mostra la reactivitat de l'anticòs generat A la columna de la dreta es mostra com a control l'expressió de la proteïna total CD84. El marcatge en blau tenyeix els nuclis cel·lulars amb DAPI, mentre que el marcatge en vermell correspon a l'anticòs α-CD84 1.21 o α-CD84\_Δ5,6 688.1 segons s'indica.

### **1.3.2. La isoforma CD84\_Δ5,6 s'expressa diferencialment en les línies cel·lulars testades**

Un cop analitzat el transcrit CD84\_Δ5,6 i caracteritzada l'expressió de la isoforma, l'anticòs generat va permetre analitzar l'expressió de la isoforma CD84\_Δ5,6 (veure figura 31). Els estudis per FACS demostraren que aquesta és present en totes les línies cel·lulars testades, i els nivells d'expressió es correlacionen amb els resultats obtinguts a nivell gènic, indicant que l'anticòs és sensible a l'expressió diferencial en cadascuna de les línies.

Els nivells més alts d'expressió de la isoforma es troben a les línies de llinatge mieloide, on l'expressió de CD84 total també és alt. Tal i com es veu a la figura 29 B, en aquest llinatge destaquen les cèl·lules THP-1, amb un percentatge de 65.28 i una MFI de 10.2; i les cèl·lules U937 amb un percentatge de 72.51 i una MFI de 8.09. Mentre que la proteïna CD84 total té una expressió alta en les línies de cèl·lules B [(De Salort et al., 2011), veure figura 31B], els nivells d'isoforma CD84\_Δ5,6 són baixos en aquest tipus cel·lular. En el cas de les línies de cèl·lules NK una part significativa del CD84 trobat correspon a la isoforma. En canvi, en línies de cèl·lules T, on generalment CD84 es troba expressada en un nivell més baix, la isoforma CD84\_Δ5,6 té una expressió relativa més elevada, destacant les cèl·lules Jurkat amb un percentatge de 68.21 i una MFI de 12.06.



**FIGURA 31:** A) Anàlisi per FACS de l'expressió de CD84\_Δ5,6 i de CD84 en una línia cel·lular de cada llinatge. A la columna de l'esquerra es mostren els gràfics de l'anticòs  $\alpha$ -CD84\_Δ5,6 688.1. A la columna de la dreta es mostra l'expressió de proteïna total. B) Valors de l'expressió de CD84\_Δ5,6 i de CD84 en les línies cel·lulars dels diferents llinatges. Els valors corresponen al percentatge de cèl·lules positives (%) i a la intensitat de fluorescència mitjana de la població positiva (MFI)

### **1.3.3. La isoforma CD84 $\Delta$ 5,6 es detecta en les diferents subpoblacions de cèl·lules mononucleades de sang perifèrica estudiades**

L'anàlisi per citometria de flux en les diferents subpoblacions de PBMCs va permetre conèixer l'expressió diferencial de CD84\_ $\Delta$ 5,6 en individus sans (veure figura 32).

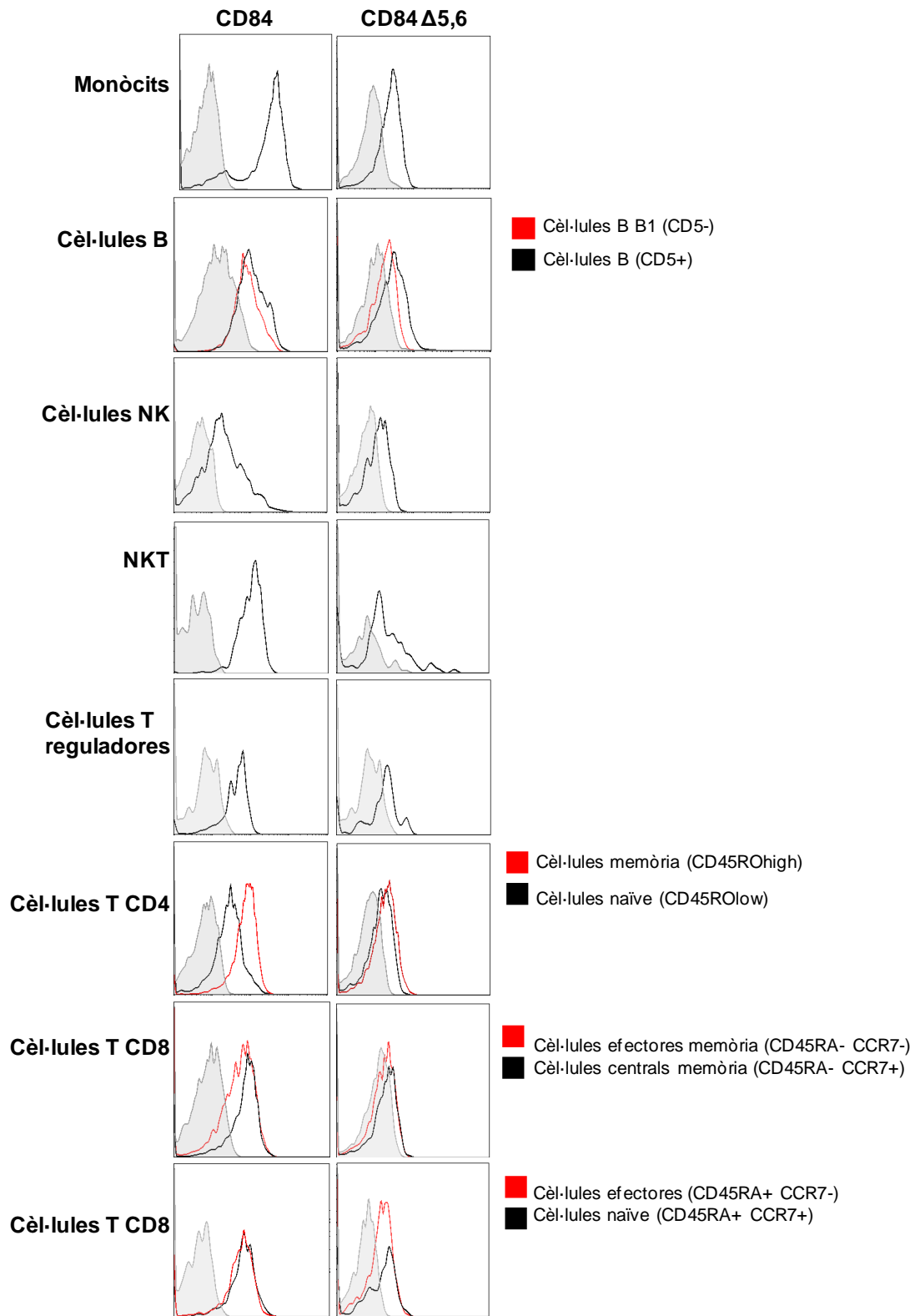
Els monòcits són les cèl·lules que tenen una expressió més alta tant de CD84 com de CD84\_ $\Delta$ 5,6.

En cèl·lules B, les quals participen en la immunitat humoral, la subpoblació B1 (CD19<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>), té una expressió tant de CD84 com de la isoforma lleugerament més elevada que la resta de cèl·lules B (CD19<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>CD5<sup>-</sup>).

En cèl·lules NK (CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>), l'expressió de la isoforma és elevada en relació a l'expressió de CD84 total, essent gairebé la totalitat del CD84 expressat a la membrana; de la mateixa manera que succeeix amb les línies de NK testades. Les cèl·lules NKT (CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) tenen una expressió de CD84 global més elevada que les NK, però en canvi l'expressió de la isoforma és molt similar en ambdues poblacions de cèl·lules NK.

Quant a les cèl·lules T reguladores (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>), les quals han estat relacionades en autoimmunitat per diversos autors (Costantino et al., 2008), (Wraith et al., 2004), (Bacchetta et al., 2007), (Cvetanovich and Hafler, 2010), tant el nivell de CD84 total com el de la isoforma és elevat, existint molta variabilitat d'ambdós paràmetres entre individus. En les cèl·lules T CD4<sup>+</sup>, les cèl·lules memòria expressen més la proteïna total que les cèl·lules verges (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>low</sup>), mentre que la isoforma s'expressa de manera similar en ambdues poblacions. En les cèl·lules T CD8<sup>+</sup>, l'expressió de CD84 és considerablement més alta en cèl·lules efectores memòria (CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>) que en cèl·lules centrals memòria (CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup>), com també ho és l'expressió de la isoforma. En canvi, les cèl·lules verges (CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>), tot i tenir una expressió de CD84 total similar a les cèl·lules efectores (CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>), tenen una expressió de CD84\_ $\Delta$ 5,6 més elevada que aquesta.

De forma global, les subpoblacions amb una expressió de CD84 més elevada correspon a les cèl·lules de llinatge mieloide i a les cèl·lules NKT, mentre que la isoforma es troba més expressada a les cèl·lules NK en relació a la proteïna total.



**FIGURA 32:** Expressió de CD84 total i de CD84 $\Delta$ 5,6 en les diferents subpoblacions de PBMCs. A la columna de l'esquerra es mostra l'expressió de la isoforma CD84 $\Delta$ 5,6, mentre que els gràfics de la dreta mostren l'expressió de la proteïna total.



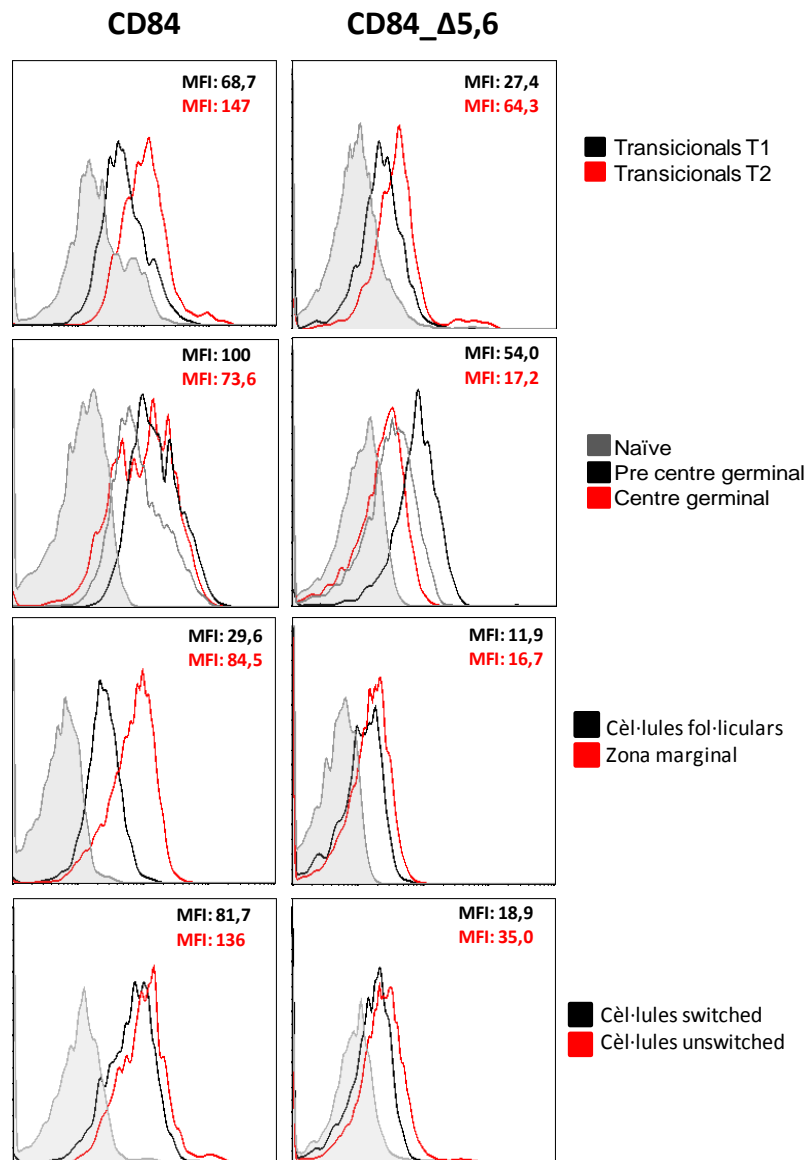
### 1.3.4. Expressió de la isoforma CD84 $\Delta$ 5,6 en melsa

En els diferents estadis del desenvolupament de les cèl·lules B de la melsa es troba una expressió diferencial tant de CD84 total com de la isoforma. Les cèl·lules transicionals T1 (CD19<sup>+</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD38<sup>++</sup>, CD21<sup>-</sup>), (Figura 33) és a dir, les cèl·lules B immadures que ja han adquirit la capacitat de recircular, difereixen de les cèl·lules transicionals T2 (CD19<sup>+</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD38<sup>++</sup>, CD21<sup>+</sup>), localitzades als fol·licles, en l'expressió de CD84 total. Aquestes últimes tenen una expressió més alta tant de la proteïna total com de la isoforma. Quant a la relació de l'expressió entre la proteïna total i la isoforma, el valor és similar en ambdues subpoblacions, sent pel cas de les cèl·lules T1 de 2,5; lleugerament superior al de les T2, que és de 2,3.

En les cèl·lules verges madures localitzades a la melsa (CD38<sup>-/low</sup>, CD19<sup>+</sup>, IgD<sup>+</sup>), es troba una expressió de proteïna total important en ambdós casos, incrementant-se en aquelles cèl·lules que evolucionen cap a cèl·lules pre-centre germinal. En aquest estadi (CD38<sup>++</sup>, CD19<sup>+</sup>, IgD<sup>+</sup>), tant el nivell de proteïna total com d'isoforma incrementen considerablement, essent l'augment de CD84  $\Delta$ 5,6 més important que el de CD84. Així doncs, la proporció de l'expressió varia de 2,7 en les cèl·lules naïve a 1,85 en les cèl·lules pre-centre germinal. Quan la cèl·lula esdevé cèl·lula de centre germinal (CD38<sup>-/low</sup>, CD19<sup>+</sup>, IgD<sup>-</sup>), l'expressió de CD84 es modera tornant a uns nivells similars als de la cèl·lula verge. La isoforma també disminueix la seva expressió, donant lloc a un augment de la proporció CD84/CD84  $\Delta$ 5,6 fins a 4,28.

En el cas de les cèl·lules de la zona marginal, aquestes mostren una expressió de la proteïna total notablement superior a les cèl·lules fol·liculars, mentre que en el cas de la isoforma, la diferència pràcticament no existeix, donant lloc a una variació en el ratio de 2,5 a 5.

Per últim, en el cas de les cèl·lules memòria "*switched*" (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>) en front les "*unswitched*" (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>), això és, les cèl·lules que ja han fet el canvi de classe respecte les que no l'han fet, tenen una expressió de CD84 total similar, amb una expressió lleugerament superior per part de les cèl·lules que han fet el canvi de classe. En el cas de la isoforma, la diferència entre ambdues subpoblacions és lleugerament superior, mantenint-se una expressió superior en les cèl·lules *unswitched*. Mentre que les cèl·lules *switched* tenen una proporció de 4,32, a les cèl·lules *unswitched* l'expressió de la isoforma és lleugerament superior, donant lloc a un valor proporcional de 3,88.

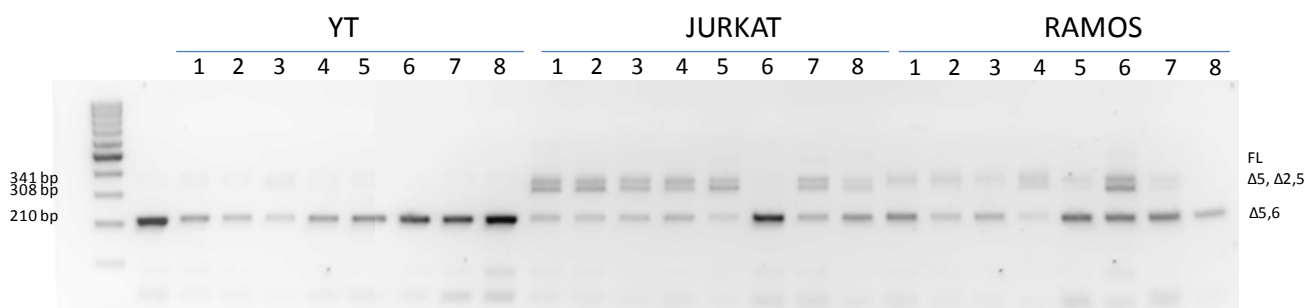


**FIGURA 33:** Expressió de CD84\_Δ5,6 i de CD84 total en les diferents subpoblacions de melsa estudiades. A la columna de l'esquerra es mostra l'expressió de la isoforma CD84\_Δ5,6, mentre que els gràfics de la dreta mostren l'expressió de la proteïna total.

## 2. EXPRESSIÓ DE CD84 EN CÈL·LULES ACTVADES

### 2.1. LES ISOFORMES DE CD84 S'EXPRESSEN DE MANERA DIFERENT AMB L'ACTIVACIÓ EN LES LÍNIES CEL·LULARS TESTADES

L'activació de diferents línies cel·lulars de cadascun dels llinatges estudiats a diferents temps amb els estímuls corresponents van mostrar que el nivell d'ARNm corresponent a diferents transcrits de CD84 varien de manera diferent amb l'activació en cadascuna de les línies (veure figura 34). La línia cel·lular YT, en la qual gairebé la totalitat del CD84 és CD84\_ $\Delta$ 5,6, augmenta el nivell d'ARNm del gen d'interès en ser activada amb IL-2. Aquest increment es fa més evident a temps d'activació més llargs. En les cèl·lules Jurkat, l'activació amb  $\alpha$ -CD3 i  $\alpha$ -CD28, fa que la quantitat d'ARNm corresponent a les variants CD84\_FL i CD84\_ $\Delta$ 5, disminueixin a favor de l'increment del de CD84\_ $\Delta$ 5,6.. En el model de cèl·lules B representat per les cèl·lules Ramos, l'activació amb  $\alpha$ -IgM fa que s'incrementi la quantitat d'ARNm de la isoforma CD84\_ $\Delta$ 5,6, mentre que el nivell d'ARNm corresponent a la resta d'isoformes es mantenen igual.



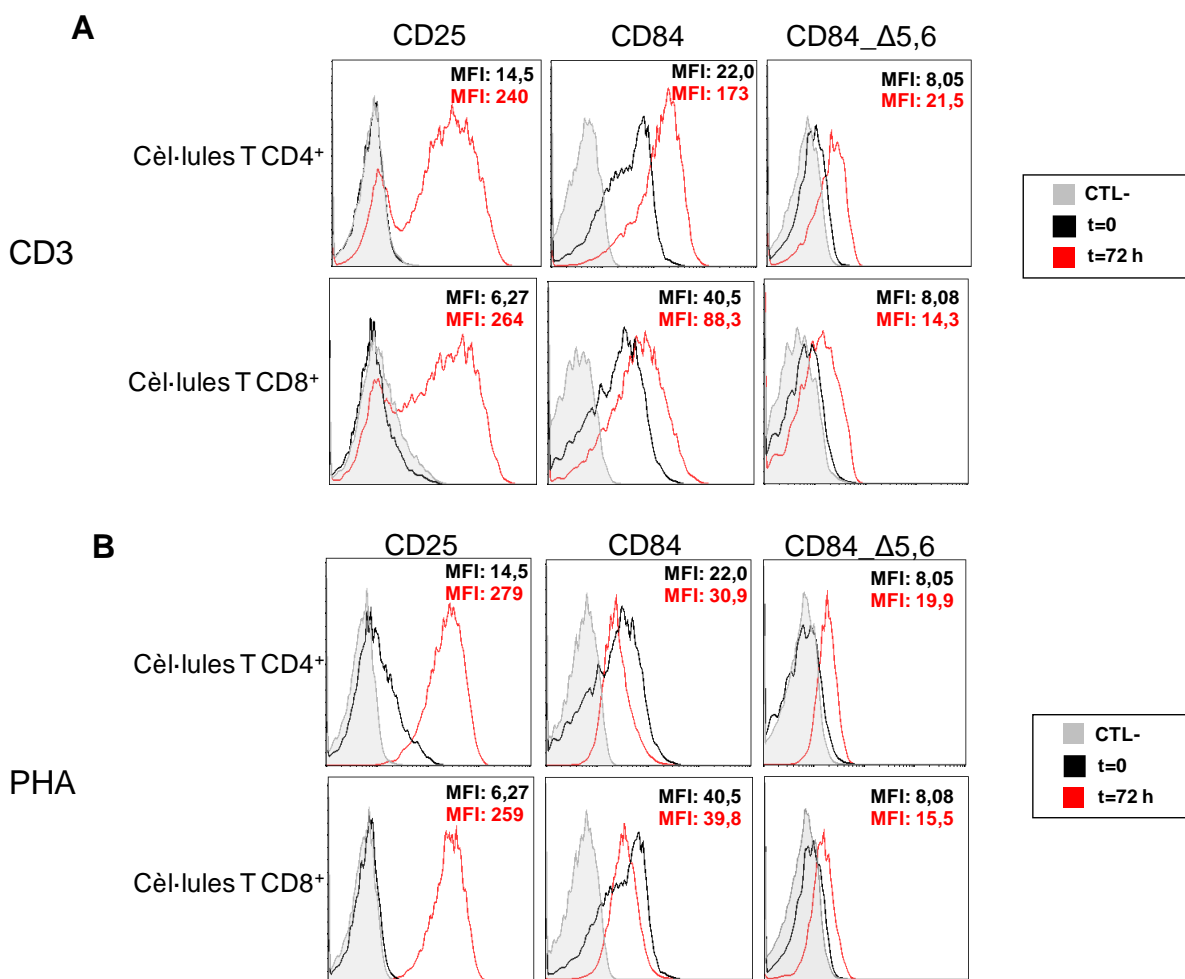
**FIGURA 34:** Activació de línies cel·lulars amb els estímuls corresponents a temps 0 (1,2) 2 (3,4), 6 (5,6) i 24 h (7,8). El primer pou correspon al plàsmid de la isoforma CD84\_ $\Delta$ 5,6. Els estímuls van ser IL-2 a una concentració de 100 U/ml per les cèl·lules YT,  $\alpha$ -CD3 a una concentració de 0.5  $\mu$ g/ml i  $\alpha$ -CD28 a una concentració de 2  $\mu$ g/ml per les cèl·lules Jurkat i  $\alpha$ -IgM a una concentració 0.5  $\mu$ g/ml per les cèl·lules Ramos.

## **2.2. LES ISOFORMES DE CD84 S'EXPRESSEN DE MANERA DIFERENT EN PBMCS ACTIVADES**

CD25 és la cadena  $\alpha$  del receptor de la IL-2. És un marcador de l'activació de cèl·lules T a temps llargs. En aïllar PBMCS de voluntaris sans i activar les cèl·lules T durant 72 hores amb  $\alpha$ -CD3 a la concentració indicada anteriorment o amb PHA al 1%, es van obtenir els següents resultats (veure figura 35).

Amb  $\alpha$ -CD3, es produeix una activació directa el TCR i per tant les cèl·lules són directament activades. Tant les cèl·lules CD4+ com les CD8+ mostren una expressió de CD25 similar a 72 hores, amb un patró d'expressió bimodal. L'expressió de CD84 augmenta més notablement en les cèl·lules T CD4+ que en les T CD8+ a les 72 hores, de la mateixa manera que ho fa la isoforma. D'aquesta manera, mentre que a  $t=0$  trobem una relació proteïna total/isoforma de 2,75 en les cèl·lules T CD4+ i de 5 en les cèl·lules T CD8+; en activar les cèl·lules amb  $\alpha$ -CD3, l'expressió de proteïna total puja en relació a la isoforma, donant un ratio de 8 a les cèl·lules T CD4+ i de 6 a les cèl·lules T CD8+.

Amb PHA, l'activació es produeix per una activació generalitzada del receptors cel·lulars. L'activació de les cèl·lules és més elevada quant a l'expressió de CD25 en cèl·lules T CD4+, però no en cèl·lules T CD8+. Sorprenentment, l'expressió de CD84 disminueix amb l'activació de PHA a les 72 hores en les dues subpoblacions de cèl·lules T estudiades, mentre que l'expressió de la isoforma augmenta en ambdós casos. D'aquesta manera, en activar les cèl·lules amb PHA, l'expressió de la isoforma puja en relació a la proteïna total, donant un ratio de 1,5 a les cèl·lules T CD4+ i de 2,5 a les cèl·lules T CD8+.

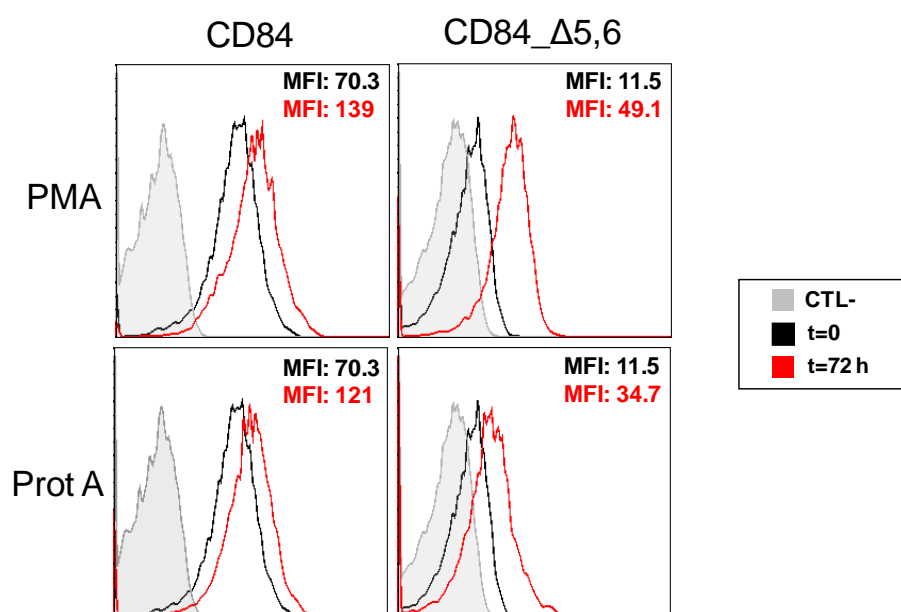


**FIGURA 35:** Activació de PBMCs de voluntaris sans a les 72 hores amb **A)**  $\alpha$ -CD3 a una concentració de 0,5  $\mu$ g/ml i **B)** PHA al 1%. Els histogrames mostren l'expressió de CD25, CD84 i CD84\_Δ5,6 en cèl·lules T CD4<sup>+</sup> i cèl·lules T CD8<sup>+</sup>. L'histograma en negre indica l'expressió del marcador corresponent a temps 0. A cada histograma es mostra el valor corresponent de la MFI per a temps 0 (en negre) i per les 72 hores (vermell).

### 2.3. LES ISOFORMES DE CD84 S'EXPRESSEN DE MANERA DIFERENT EN CÈL·LULES B D'AMÍGDALA ACTIVADES

En activar cèl·lules d'amígdala de voluntaris sans amb PMA i proteïna A a 72 hores, l'expressió de la proteïna total de CD84 i de la isoforma CD84\_Δ5,6 varia. Els resultats quant a l'expressió de les cèl·lules B, van ser els que es mostren a la figura 36. Amb PMA s'activa la via de les MAPK a través de la proteïncinasa C (PKC), el que incrementa l'activació i la proliferació de les

cèl·lules B. El que s'observa és que, mentre que la proteïna total dobla el valor de la seva MFI, la isoforma augmenta cinc vegades el valor de la seva intensitat mitjana de fluorescència, de manera que la proporció de proteïna total/isoforma passa de ser de 6,1 a 2,8. La proteïna A s'uneix amb una alta afinitat a les immunoglobulines presents a la membrana de les cèl·lules B, produint la seva activació. D'aquesta manera, es produeix un augment de l'expressió de CD84 total i de la isoforma d'interès més moderat que en l'activació anterior, essent la proporció proteïna total/isoforma de 3,5; valor que indica un increment menor de l'expressió de CD84\_Δ5,6.



**FIGURA 36:** Activació de les cèl·lules d'amígdala de voluntaris sans a 72 hores amb PMA a una concentració de 0,1 ng/ml i proteïna A al 1%. L'histograma en negre indica l'expressió del marcador corresponent a temps 0. A cada histograma es mostra el valor corresponent de la MFI per a temps 0 (en negre) i per les 72 hores (vermell).

### **3. ESTUDIS FUNCIONALS**

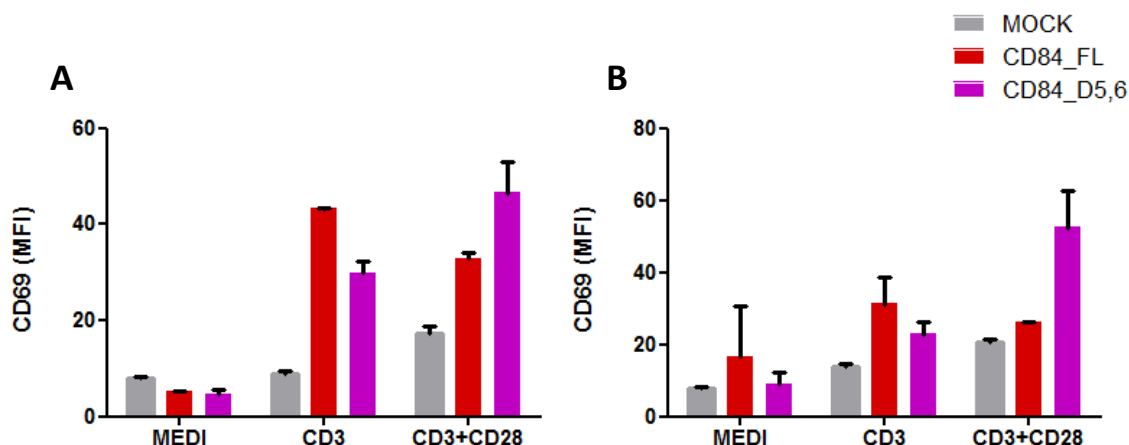
#### **3.1. LA ISOFORMA CD84\_Δ5,6 TÉ UNA SENYALITZACIÓ DEFICIENT CAP A L'INTERIOR DE LA CÈL·LULA**

Per tal d'estudiar si la senyalització de la isoforma CD84\_Δ5,6 estava afectada, es van transfectar cèl·lules Jurkat amb les isoformes CD84 FL i CD84\_Δ5,6, prenent com a control cèl·lules Jurkat sense transfectar (Mock), i emprant com a activadors α-CD3 i α-CD28 a les

concentracions òptimes. Els resultats quant a l'expressió de CD69 a 6h (37A) i a 24 h (37B), es veuen a la figura 35. L'expressió de CD25 com a marcador d'activació també es va testar, però no va oferir resultats significatius. Es va comprovar també la secreció de IL-2 a les 24 hores en els sobrenedants de les cèl·lules (veure figura 37C).

CD69 és un marcador de l'activació de cèl·lules T. El que s'observa a les 6 hores (veure figura 37A), és que sense activadors, ambdues isoformes es comporten de manera similar entre elles i igual que el control de transfecció. En afegir  $\alpha$ -CD3 a una concentració de 0.5  $\mu$ g/ml, s'observa que el transfectant CD84\_FL té una activació major que CD84\_ $\Delta$ 5,6. Amb la doble activació ( $\alpha$ -CD3 a la concentració indicada i  $\alpha$ -CD28 a 2  $\mu$ g/ml), l'expressió de CD69 de tots els transfectants es veu incrementada, essent més alta l'expressió de CD69 en CD84\_ $\Delta$ 5,6.

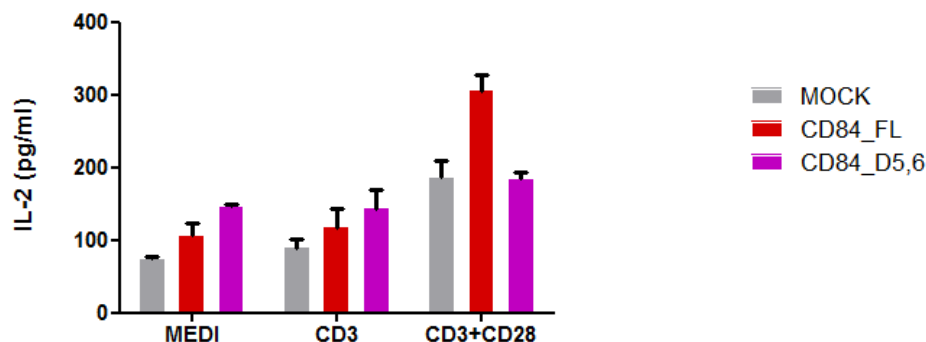
A les 24 hores (veure figura 37B) es veu una expressió similar en tots tres transfectants no activats, amb una activació lleugerament superior per part de CD84 FL. En activar els transfectants amb  $\alpha$ -CD3, s'observa una tendència idèntica dels tres transfectants, mentre que amb la doble activació l'expressió de CD69 en el transfectant CD84\_ $\Delta$ 5,6 és molt més alta que la de CD84 FL.



**FIGURA 37:** Estudis funcionals de les isoformes de CD84 en transfectants estables de cèl·lules Jurkat com a model de cèl·lula T. A la figura A es veu l'activació de les cèl·lules, expressada en termes de la MFI de CD69, en diferents condicions (sense activadors, amb  $\alpha$ -CD3 a 0,5  $\mu$ g/ml i amb  $\alpha$ -CD3 i  $\alpha$ -CD28 a 2  $\mu$ g/ml) a les 6 hores. A la figura B es veu l'activació de les cèl·lules en les mateixes condicions a 24 hores.

Quant a l'expressió de IL-2 (Veure figura 38) en els sobrenedants dels cultius 24 hores després de l'activació, els valors trobats en els tres transfectants són similars quan aquests no són activats, o quan són activats amb  $\alpha$ -CD3. Amb la doble activació, la secreció de IL-2 augmenta dramàticament en ambdues isoformes, essent molt més alt en el transfectant de CD84\_FL. En

el cas de CD84\_Δ5,6, la doble activació dóna lloc a una secreció de IL-2 molt similar a la de les cèl·lules sense transfectar.



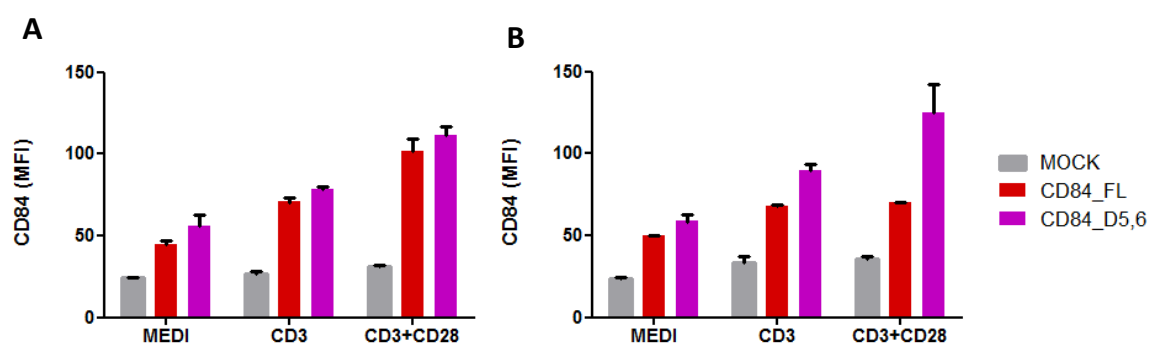
**FIGURA 38:** Representació de la concentració de IL-2 (en pg/ml) en cadascun dels transfectants activats a 24 hores en les condicions indicades anteriorment (sense activadors, amb  $\alpha$ -CD3 a 0,5  $\mu$ g/ml i amb  $\alpha$ -CD3 i  $\alpha$ -CD28 a 2  $\mu$ g/ml).

En els assajos d'activació amb transfectants de cèl·lules Jurkat per a les isoformes CD84\_FL i CD84\_Δ5,6, es va analitzar l'expressió de CD84 a les 6h (veure figura 39A) i a les 24 hores (veure figura 39B) en les diferents condicions d'activació descrites a l'apartat anterior.

Els resultats d'expressió a 6 hores demostren que inclús en condicions basals, l'expressió de CD84 en el transfectant CD84\_Δ5,6 és molt més elevada que la de CD84\_FL, i aquesta lleugerament superior a la del mock. En incubar les cèl·lules amb  $\alpha$ -CD3, l'expressió de CD84\_FL es manté al mateix nivell, mentre que la de CD84\_Δ5,6 augmenta considerablement. Aquest efecte s'incrementa en afegir  $\alpha$ -CD28, condicions en les que també augmenta de manera important l'expressió de CD84\_FL.

A les 24 hores l'expressió de CD84 augmenta dramàticament en totes les condicions d'activació pel transfectant CD84 Δ5,6 (veure canvi d'escala de la MFI), arribant a quadruplicar el seu valor amb l'activació de  $\alpha$ -CD3 i  $\alpha$ -CD28. En el cas del CD84 FL es manté amb valors similars dels de l'expressió a 6 hores i propers als valors del MOCK.





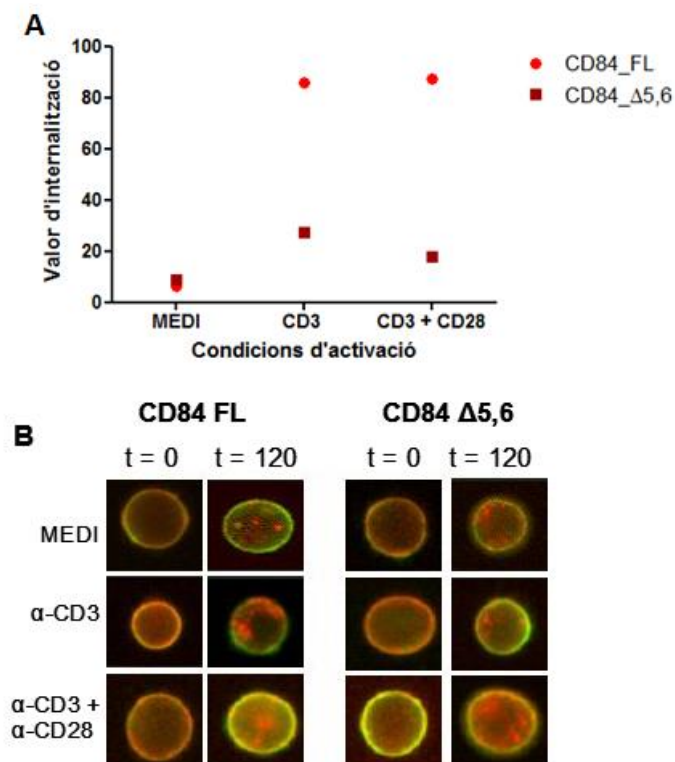
**FIGURA 39:** Estudis de l'expressió de CD84 (expressada en termes de MFI) en transfectants estables de cèl·lules Jurkat com a model de cèl·lula T per a les isoformes CD84 FL i CD84\_Δ5,6, emprant un transfectant mock com a control. A la figura A es veu l'expressió dels transfectants en diferents condicions (sense activadors, amb  $\alpha$ -CD3 a 0,5  $\mu$ g/ml i amb  $\alpha$ -CD3 i  $\alpha$ -CD28 a 2  $\mu$ g/ml) a les 6 hores. A la figura B es veu com l'expressió de CD84 augmenta de manera molt significativa en el cas del transfectant CD84\_Δ5,6.

Els efectes observats per citometria de flux de les cèl·lules activades 24 hores es corroboren també per immunofluorescència. A la figura 40 s'observa com els transfectants que només van ser incubats amb medi mostren una expressió similar, amb una intensitat de CD84 total lleugerament superior pel cas del transfectant CD84\_Δ5,6. En estimular les cèl·lules amb  $\alpha$ -CD3, s'observa que en el cas de CD84\_FL la proteïna està homogèniament repartida pel citoplasma i la membrana de totes la cèl·lula per igual, mentre que en el cas del transfectant CD84\_Δ5,6, es veu com la proteïna es concentra en petits *clústers* a la membrana cel·lular. En afegir el doble estímul, aquest efecte es fa més evident, donant lloc a un marcatge principalment citoplasmàtic en el cas del transfectant CD84\_FL i a un marcatge puntejat en el cas de CD84\_Δ5,6.

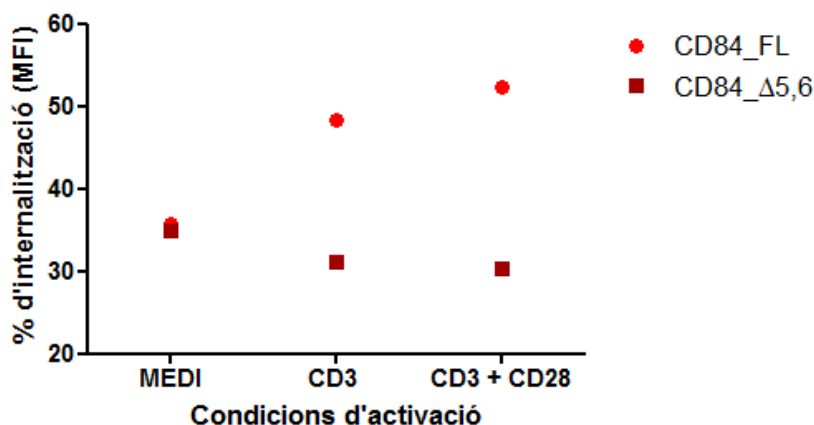
### 3.2. LA ISOFORMA CD84 Δ5,6 S'INTERNALITZA DE MANERA DEFICIENT RESPECTE CD84

Els estudis d'activació de cèl·lules Jurkat transfectades amb les diferents isoformes explicats als dos apartats anteriors, demostraren que la isoforma CD84\_Δ5,6 té una expressió més alta després de l'activació que la resta d'isoformes. Això va fer pensar que probablement el fet de mancar-li la cua citoplasmàtica amb les quatre tirosines, donaria lloc a un reciclatge deficient de la proteïna i en conseqüència, d'una acumulació a la membrana. Per tal de demostrar si

això era cert, es van fer diversos estudis d'internalització amb diferents procediments de citometria, com ara l'ús de l'aparell Amnis, que combina la citometria de flux amb la microscopia de fluorescència i permet veure la localització de la proteïna marcada en una cèl·lula. L'experiment consistia en activar les cèl·lules amb els mateixos estímuls que en els apartats anteriors durant 2 hores. El resultat obtingut demostrà que les cèl·lules Jurkat transfectades amb la isoforma CD84  $\Delta$ 5,6 tenen una internalització més baixa que les transfectades amb CD84 FL, en condicions normals, fet que s'incrementa amb l'activació (veure figura 40). El mateix resultat s'observà amb experiments de citometria convencional, on, assumint que a temps 0 no hi ha internalització, es calcula el percentatge de proteïna internalitzada en les diferents condicions d'activació (veure figura 41).



**FIGURA 40:** A) Gràfic on es mostra la internalització del transfectants estables de les isoformes CD84 FL i CD84\_Δ5,6 en cèl·lules Jurkat, en termes del valor d'internalització obtingut amb l'aparell Amnis. En condicions normals ambdues isoformes tenen el mateix grau d'internalització. En activar les cèl·lules amb  $\alpha$ -CD3, la internalització de la isoforma CD84 FL augmenta, mentre que la isoforma CD84  $\Delta$ 5,6 ho fa de manera molt tímida. Aquesta tendència es fa més evident en afegir el segon estímulo, on la isoforma CD84 FL s'internalitza amb un valor molt més alt que la isoforma CD84  $\Delta$ 5,6, que es manté amb uns valors propers a les condicions basals. B) Imatges obtingudes amb Amnis Image Stream on s'observa una cèl·lula Jurkat transfectades amb les isoformes CD84 FL i CD84\_Δ5,6, en la que s'ha marcat la membrana amb CD45 (verd) i la proteïna CD84 (vermell), a 0 i 120 min amb diferents condicions d'activació.



**FIGURA 41:** Experiment representatiu on s'expressa el percentatge de proteïna CD84 internalitzada en condicions basals, amb  $\alpha$ -CD3 i amb la doble activació de  $\alpha$ -CD3 i  $\alpha$ -CD28, en cèl·lules Jurkat transfectades establement amb les isoformes CD84\_FL i CD84\_Δ5,6. La proteïna internalitzada ha estat calculada com el valor de la MFI a temps 2 hores menys la MFI a temps 0 dividit entre el valor de la MFI a temps 2 hores. Es veu com el transfectant CD84\_FL té un percentatge de proteïna internalitzada notablement superior al de la isoforma CD84\_Δ5,6.

#### **4. ESTUDI DE L'EXPRESSIÓ DE CD84 I DE LA ISOFORMA CD84 Δ5,6 EN MALALTIES AUTOIMMUNES**

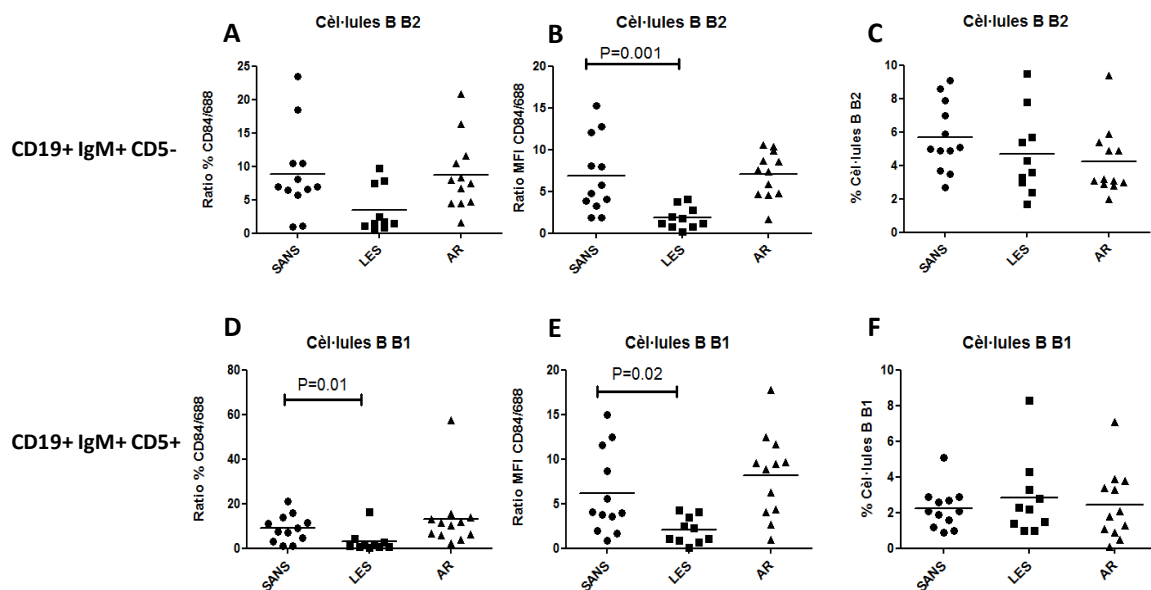
Deu pacients de LES i dotze d'AR van participar en l'estudi de l'expressió de CD84 i de la isoforma CD84\_Δ5,6 en les diferents subpoblacions de PBMCs analitzades a l'apartat 2.2. Els resultats obtinguts van ser comparats amb els valors d'expressió dels mateixos paràmetres de dotze voluntaris sans. Els resultats es mostren a continuació en termes de la relació entre l'expressió de la proteïna total de CD84 en front l'expressió de la isoforma, tant del percentatge com de MFI. També es representa el percentatge en termes absoluts de cadascuna de les poblacions estudiades.

D'altra banda, s'ha comparat l'expressió de CD84 amb un altre membre de la família SLAM, NTBA, el qual ha estat assenyalat com una proteïna implicada en algunes malalties autoimmunes. Aquests resultats es mostren també en termes de percentatge i MFI.

## 4.1. CÈL·LULES B

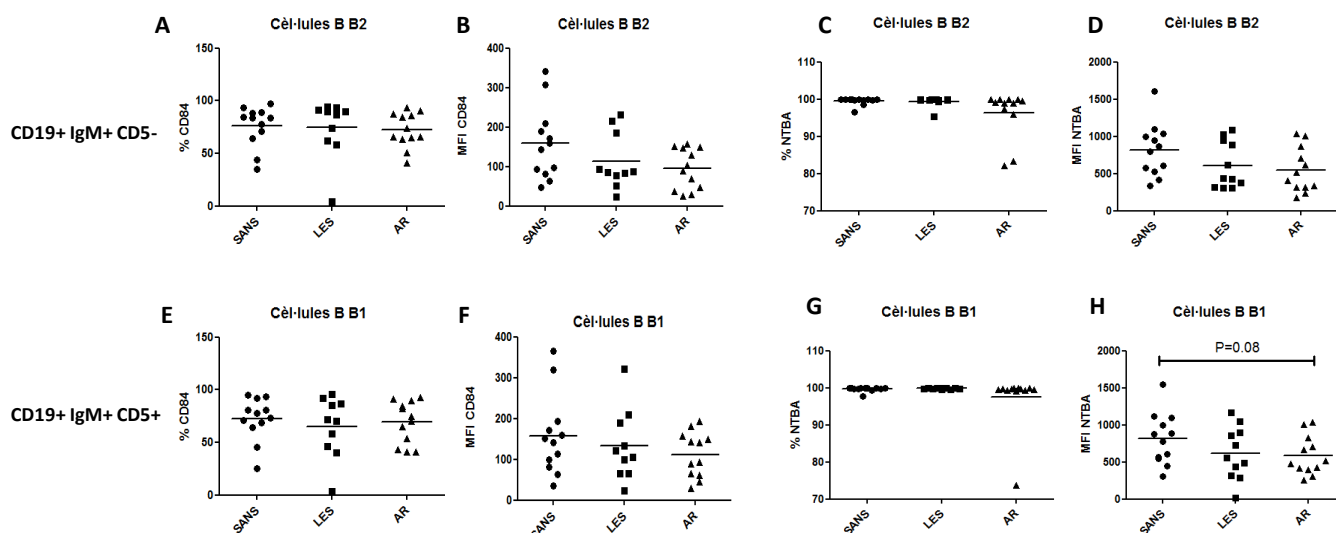
A les cèl·lules B2, la relació entre la proteïna total i la isoforma (veure figura 42A) és notablement més baix en els pacients de LES, el que indica una expressió relativa de la isoforma més alta. En termes de MFI (veure figura 42B), aquesta diferència es fa significativa. En canvi, en els malalts d'AR els valors tant en percentatge com en MFI són similars als dels voluntaris sans. Els percentatges de la subpoblació (veure figura 42C) mostren un patró heterogeni sense diferències significatives en cap de les dues malalties.

A les cèl·lules B1, el valor relatiu de l'expressió de la isoforma CD84\_Δ5,6, és significativament més elevat en els malalts de LES, el que dona lloc a un valor de la relació significativament més baix que el dels voluntaris sans, tant en percentatge (veure figura 42D) com en MFI (veure figura 42E). No s'observen diferències significatives en les mostres d'AR. Quant als percentatges absoluts de la subpoblació (veure figura 42F), els valors són similars entre voluntaris sans i malalts.



**FIGURA 42:** A) Relació entre el percentatge d'expressió de CD84 total i la isoforma en voluntaris sans, pacients de LES i pacients d'AR a les cèl·lules B2. B) Relació entre el valor de la MFI de CD84 total i la isoforma en voluntaris sans, pacients de LES i pacients d'AR a les cèl·lules B2. C) Percentatge absolut de cèl·lules B2 en voluntaris sans, pacients amb LES i pacients amb AR. D) Relació entre el percentatge d'expressió de CD84 total i la isoforma en voluntaris sans, pacients de LES i pacients d'AR a les cèl·lules B1. E) Relació entre el valor de la MFI de CD84 total i la isoforma en voluntaris sans, pacients de LES i pacients d'AR a les cèl·lules B1. F) Percentatge absolut de cèl·lules B1 en voluntaris sans, pacients amb LES i pacients amb AR. El valor de P indica les diferències significatives entre grups.

Quant a l'expressió de CD84, no s'observen diferències en els percentatges de les cèl·lules B2 (veure figura 43A). En els valors de MFI (veure figura 43B), s'observa una tendència d'expressió més baixa tant en els malalts de LES com en els d'AR, tot i que no és significativa. L'expressió de NTBA (veure figura 43C), és d'aproximadament el 100% pels tres grups de voluntaris estudiats, mentre que els valors de la MFI (veure figura 43D), segueixen la mateixa tendència que per CD84, sense arribar a diferències significatives en relació als voluntaris sans.



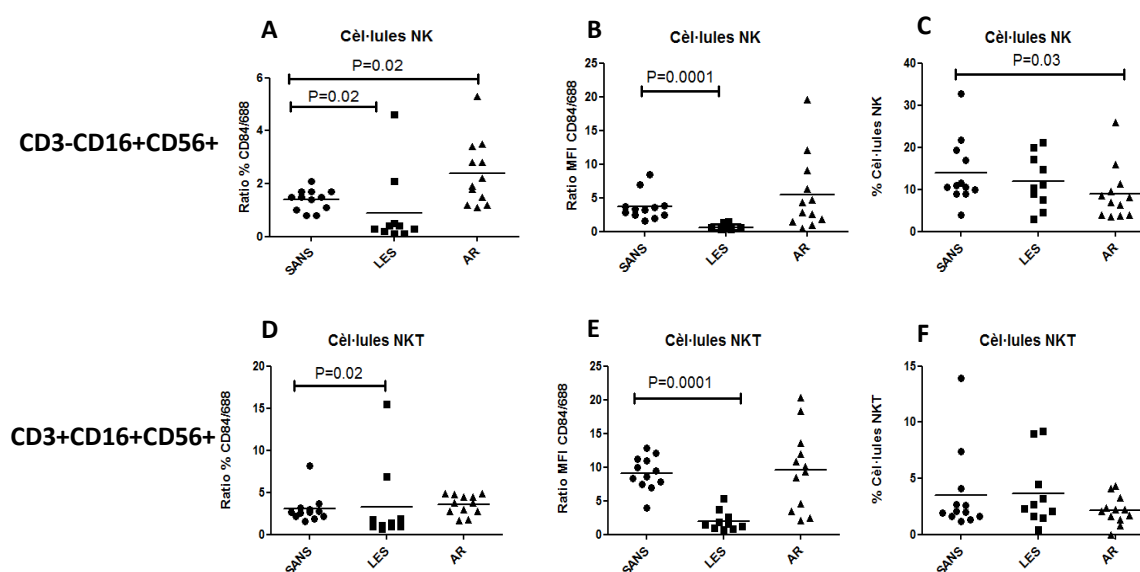
**FIGURA 43:** **A)** Valor del percentatge de l'expressió de CD84 en les cèl·lules B2 de pacients sans, pacients amb LES i pacients amb AR. **B)** Valor de la MFI de l'expressió de CD84 en les cèl·lules B2 de pacients sans, pacients amb LES i pacients amb AR. **C)** Valor del percentatge de l'expressió de NTBA en les cèl·lules B2 de pacients sans, pacients amb LES i pacients amb AR. **D)** Valor de la MFI de l'expressió de NTBA en les cèl·lules B2 de pacients sans, pacients amb LES i pacients amb AR. **E)** Valor del percentatge de l'expressió de CD84 en les cèl·lules B1 de pacients sans, pacients amb LES i pacients amb AR. **F)** Valor de la MFI de l'expressió de CD84 en les cèl·lules B1 de pacients sans, pacients amb LES i pacients amb AR. **G)** Valor del percentatge de l'expressió de NTBA en les cèl·lules B1 de pacients sans, pacients amb LES i pacients amb AR. **H)** Valor de la MFI de l'expressió de NTBA en les cèl·lules B1 de pacients sans, pacients amb LES i pacients amb AR. El valor de P indica les diferències significatives entre grups.

## 4.2. CÈL·LULES NK

Les cèl·lules NK presenten diferències interessants en les dues malalties estudiades. En termes de percentatge (veure figura 44A), les cèl·lules NK de malalts de LES tenen un valor de la proporció entre proteïna total i isoforma significativament més baix que el dels voluntaris sans, mentre que els malalts que pateixen AR tenen un percentatge relatiu més baix d'isoforma, i en conseqüència, un valor del ratio significativament més elevat. En termes de MFI (veure figura

44B), la tendència es manté en els valors de l'expressió d'ambdues patologies. Quant al percentatge absolut de la subpoblació de cèl·lules NK (veure figura 44C), existeixen diferències en la subpoblació de malalts d'AR, amb menys cèl·lules NK totals que els voluntaris sans.

Les cèl·lules NKT presenten diferències en els valors de la proporció dels percentatges en malalts de LES respecte voluntaris sans (veure figura 44D), mentre que en AR els valors són similars al grup de referència. Quant als valors de MFI (veure figura 44E), les diferències dels valors entre voluntaris sans i malalts de LES es fan més evidents, mentre es conserva la igualtat amb els malalts d'AR. Els valors dels percentatges de les subpoblacions són similars en els tres casos (veure figura 44F).

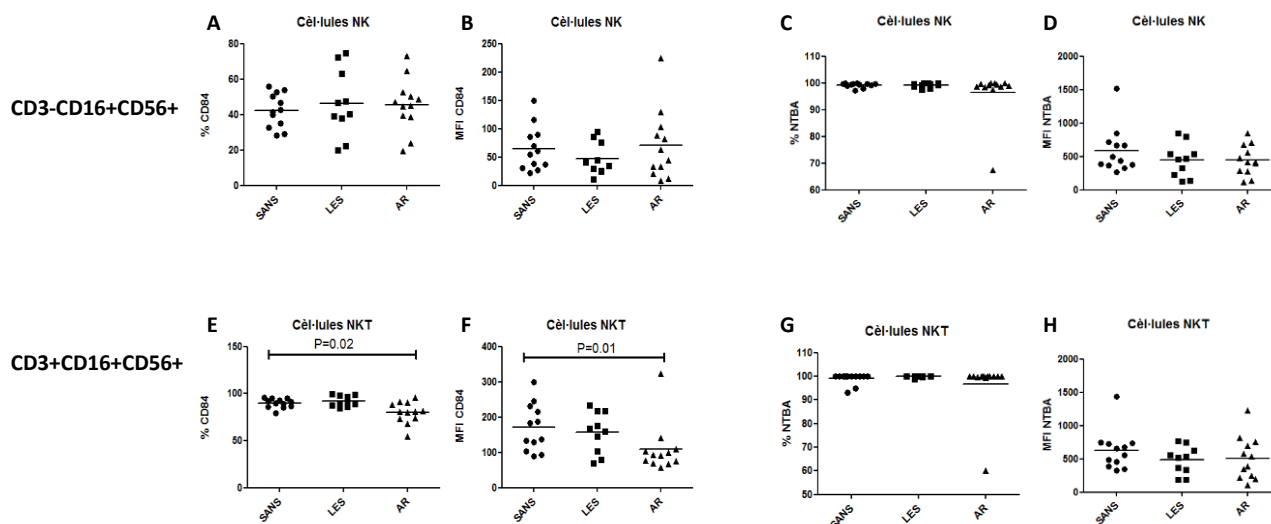


**FIGURA 44:** **A)** Relació entre el percentatge d'expressió de CD84 total i la isoforma en voluntaris sans, pacients de LES i pacients d'AR a les cèl·lules NK. **B)** Relació entre el valor de la MFI de CD84 total i la isoforma en voluntaris sans, pacients de LES i pacients d'AR a les cèl·lules NK. **C)** Percentatge absolut de cèl·lules NK en voluntaris sans, pacients amb LES i pacients amb AR. **D)** Relació entre el percentatge d'expressió de CD84 total i la isoforma en voluntaris sans, pacients de LES i pacients d'AR a les cèl·lules NKT. **E)** Relació entre el valor de la MFI de CD84 total i la isoforma en voluntaris sans, pacients de LES i pacients d'AR a les cèl·lules NKT. **F)** Percentatge absolut de cèl·lules NKT en voluntaris sans, pacients amb LES i pacients amb AR. El valor de P indica les diferències significatives entre grups.

En l'expressió de CD84 en cèl·lules NK no s'observen diferències significatives ni en el cas del percentatge (veure figura 45A) ni en la MFI (veure figura 45B), tot i que en aquesta última s'observa la mateixa tendència que es veu en el gràfic de la proporció entre la proteïna total i la isoforma (veure figura 45B). En el cas del receptor NTBA, el valor de l'expressió és en els tres

casos del 100% (veure figura 45C), mentre que no s'observen diferències significatives en els valors de MFI (veure figura 45D).

En cèl·lules NKT, el percentatge de CD84 de les cèl·lules dels malalts d'AR té un valor significativament més baix que els voluntaris sans (veure figura 45E), fet que es manté en el valor de la MFI (veure figura 45F). Quant a NTBA, no s'observen diferències significatives ni en percentatge (veure figura 45G) ni en MFI (veure figura 45H).



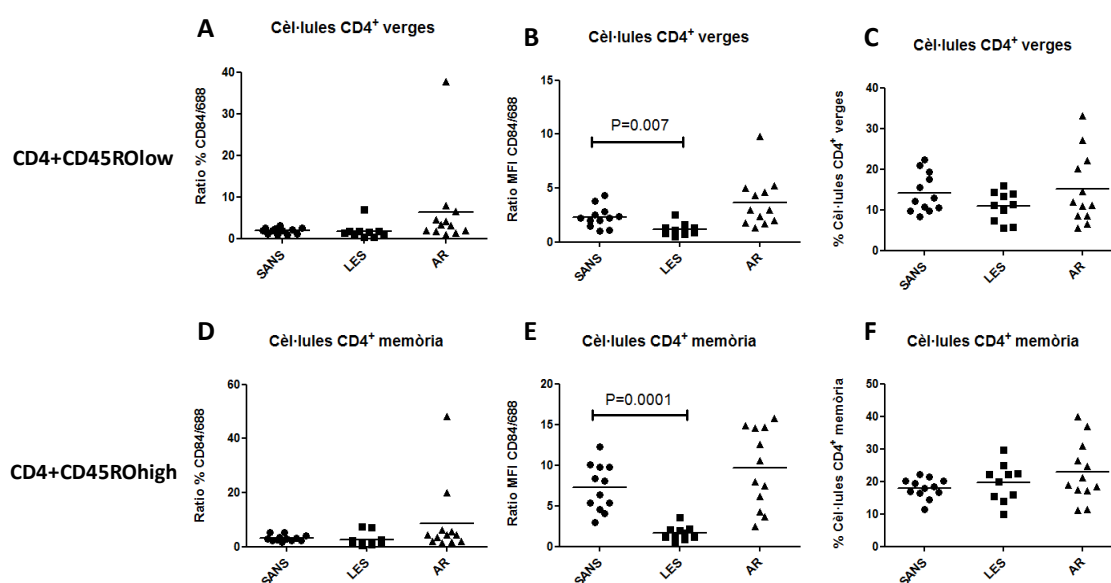
**FIGURA 45:** **A)** Valor del percentatge de l'expressió de CD84 en les cèl·lules NK de pacients sans, pacients amb LES i pacients amb AR. **B)** Valor de la MFI de l'expressió de CD84 en les cèl·lules NK de pacients sans, pacients amb LES i pacients amb AR. **C)** Valor del percentatge de l'expressió de NTBA en les cèl·lules NK de pacients sans, pacients amb LES i pacients amb AR. **D)** Valor de la MFI de l'expressió de NTBA en les cèl·lules NK de pacients sans, pacients amb LES i pacients amb AR. **E)** Valor del percentatge de l'expressió de CD84 en les cèl·lules NKT de pacients sans, pacients amb LES i pacients amb AR. **F)** Valor de la MFI de l'expressió de CD84 en les cèl·lules NKT de pacients sans, pacients amb LES i pacients amb AR. **G)** Valor del percentatge de l'expressió de NTBA en les cèl·lules NKT de pacients sans, pacients amb LES i pacients amb AR. **H)** Valor de la MFI de l'expressió de NTBA en les cèl·lules NKT de pacients sans, pacients amb LES i pacients amb AR. El valor de P indica les diferències significatives entre grups.

### 4.3. CÈL·LULES T CD4+

En les cèl·lules T col·laboradores, s'ha estudiat l'expressió de CD84 i de la isoforma tant en les cèl·lules verges com en les cèl·lules memòria. En cèl·lules verges no hi ha diferències en la relació dels percentatges de proteïna total i isoforma (veure figura 46A). En MFI en canvi (veure figura 46B), el valor en els malalts de LES és més baix que el dels voluntaris sans, mentre

que en malalts d'AR s'observa un valor similar que en el grup control. El percentatge del nombre de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> verges per als malalts de LES és lleugerament inferior, sense arribar a ser significatiu, mentre que els malalts d'AR presenten un nombre similar als voluntaris sans (veure figura 46C).

Les cèl·lules memòria no presenten diferències quant a la relació en percentatge (veure figura 46D), però sí en termes de MFI (veure figura 46E). En aquest cas, les cèl·lules dels malalts de LES tenen una relació de proteïna total/isoforma significativament més baixa que els individus sans. Quant al nombre de cèl·lules, el percentatge en malalts d'AR és lleugerament superior als dels individus sans, sense arribar a ser significatiu (veure figura 46F).

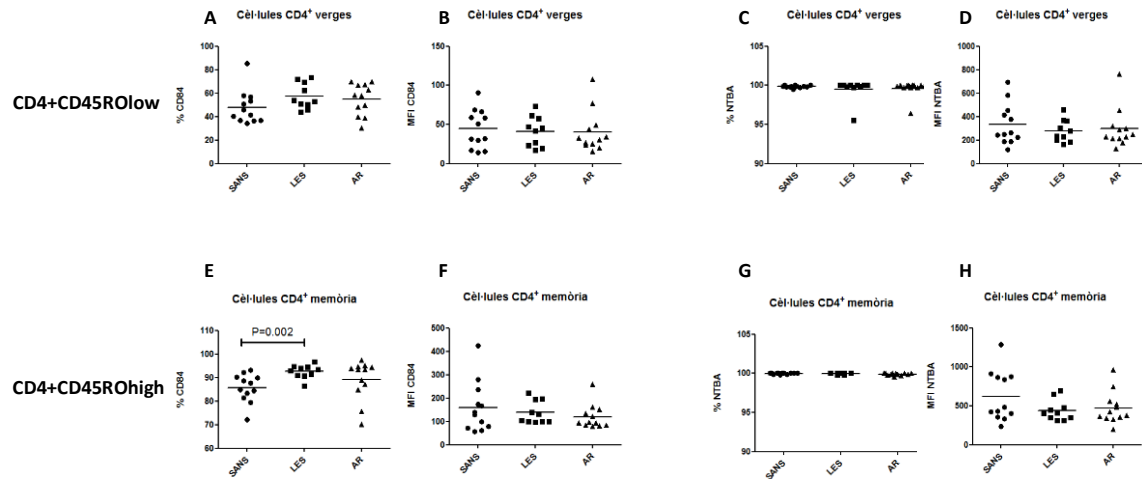


**FIGURA 46:** **A)** Relació entre el percentatge d'expressió de CD84 total i la isoforma en voluntaris sans, pacients de LES i pacients d'AR a les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> verges. **B)** Relació entre el valor de la MFI de CD84 total i la isoforma en voluntaris sans, pacients de LES i pacients d'AR a les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> verges. **C)** Percentatge absolut de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> verges en voluntaris sans, pacients amb LES i pacients amb AR. **D)** Relació entre el percentatge d'expressió de CD84 total i la isoforma en voluntaris sans, pacients de LES i pacients d'AR a les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> memòria. **E)** Relació entre el valor de la MFI de CD84 total i la isoforma en voluntaris sans, pacients de LES i pacients d'AR a les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> memòria. **F)** Percentatge absolut de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> memòria en voluntaris sans, pacients amb LES i pacients amb AR. El valor de P indica les diferències significatives entre grups.

El percentatge de cèl·lules positives per CD84 en cèl·lules verges no presenta diferències significatives en cap cas (veure figura 47A), com tampoc el valor de MFI (veure figura 47B). No existeixen diferències tampoc per NTBA, ni de percentatge (veure figura 47C), ni de valor de MFI (veure figura 47D). Les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> memòria dels pacients de LES tenen un valor de



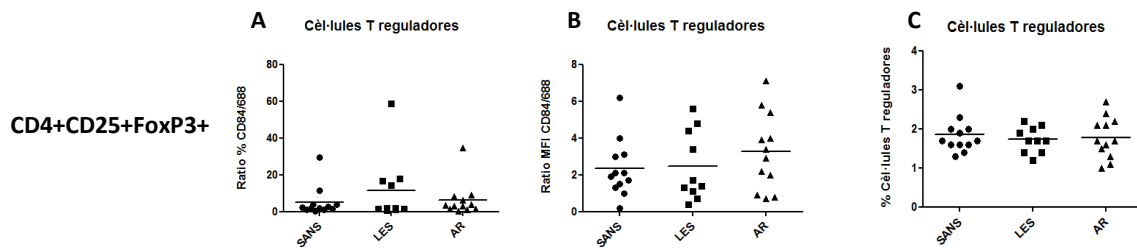
l'expressió de CD84 en quant a percentatge (veure figura 47E) significativament més elevat que els pacients sans, mentre que els pacients d'AR mantenen uns valors similars al grup control. En termes de MFI (veure figura 47F) no es veuen diferències entre els grups estudiats. L'expressió de NTBA no mostra diferències significatives ni en termes de percentatge (veure figura 47G) ni de MFI (veure figura 47H).



**FIGURA 47:** **A)** Valor del percentatge de l'expressió de CD84 en les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> verges de pacients sans, pacients amb LES i pacients amb AR. **B)** Valor de la MFI de l'expressió de CD84 en les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> verges de pacients sans, pacients amb LES i pacients amb AR. **C)** Valor del percentatge de l'expressió de NTBA en les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> verges de pacients sans, pacients amb LES i pacients amb AR. **D)** Valor de la MFI de l'expressió de NTBA en les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> verges de pacients sans, pacients amb LES i pacients amb AR. **E)** Valor del percentatge de l'expressió de CD84 en les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> memòria de pacients sans, pacients amb LES i pacients amb AR. **F)** Valor de la MFI de l'expressió de CD84 en les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> memòria de pacients sans, pacients amb LES i pacients amb AR. **G)** Valor del percentatge de l'expressió de NTBA en les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> memòria de pacients sans, pacients amb LES i pacients amb AR. **H)** Valor de la MFI de l'expressió de NTBA en les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> memòria de pacients sans, pacients amb LES i pacients amb AR.

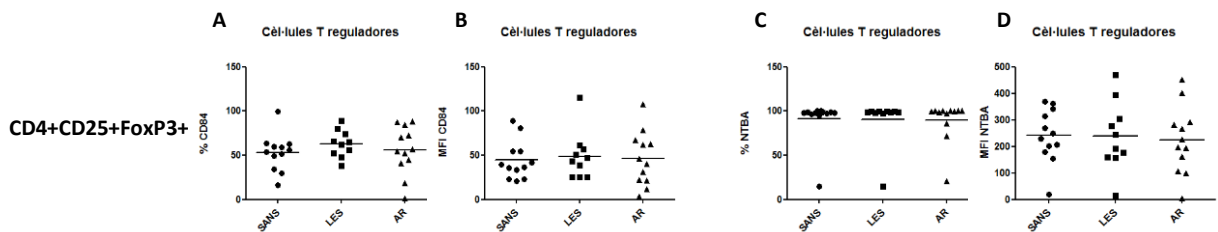
#### 4.4. CÈL·LULES T REGULADORES

En percentatge (veure figura 48A), a les cèl·lules T reguladores, es diferencien dos grups en els malalts de LES: un que té nivells d'isoforma molt baixos o pràcticament nuls, i un altre en el que pràcticament la totalitat del CD84 que s'expressa a la membrana pertany a la isoforma. Aquest fet no s'observa ni en individus sans ni en malalts d'AR. En MFI (veure figura 48B) també s'observa aquesta tendència. Tot i això en cap dels dos casos existeixen diferències significatives entre els grups estudiats. Tampoc s'observen diferències en el nombre de cèl·lules de cada sub població (veure figura 48C).



**FIGURA 48:** **A)** Relació entre el percentatge d'expressió de CD84 total i la isoforma en voluntaris sans , pacients de LES i pacients d'AR a les cèl·lules T reguladores. **B)** Relació entre el valor de la MFI de CD84 total i la isoforma en voluntaris sans, pacients de LES i pacients d'AR a les cèl·lules T reguladores. **C)** Percentatge absolut de cèl·lules T reguladores en voluntaris sans, pacients amb LES i pacients amb AR.

L'expressió tant de CD84 no presenta diferències significatives ni en percentatge (veure figura 49A) ni en MFI (veure figura 49B), com tampoc l'expressió de NTBA (veure figures 49C-D).



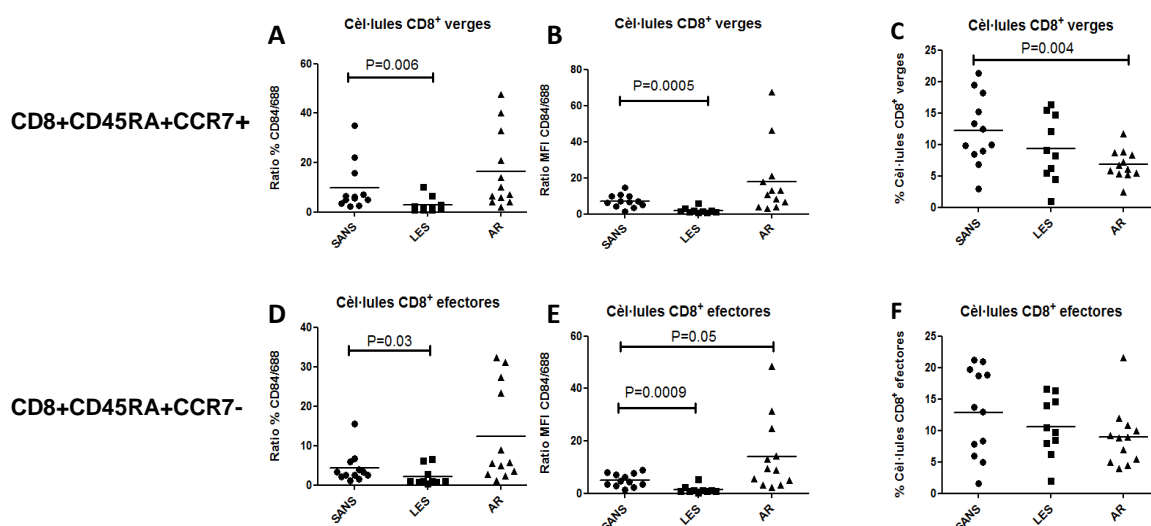
**FIGURA 49:** **A)** Valor del percentatge de l'expressió de CD84 en les cèl·lules T reguladores de pacients sans, pacients amb LES i pacients amb AR. **B)** Valor de la MFI de l'expressió de CD84 en les cèl·lules T reguladores de pacients sans, pacients amb LES i pacients amb AR. **C)** Valor del percentatge de l'expressió de NTBA en les cèl·lules T reguladores de pacients sans, pacients amb LES i pacients amb AR. **D)** Valor de la MFI de l'expressió de NTBA en les cèl·lules T reguladores de pacients sans, pacients amb LES i pacients amb AR.

#### 4.5. CÈL·LULES T CD8+

En les cèl·lules CD8+ s'han estudiat també diferents subpoblacions. Les cèl·lules que encara no han estat exposades a un antigen dels malalts de LES, o cèl·lules verges, mostren un valor de la relació proteïna total/isoforma en percentatge (veure figura 50A) significativament més baix que els voluntaris sans. En canvi, alguns subjectes del grup d'AR presenten uns nivells d'isoforma més baixos que la resta del grup, tot i que les diferències no són significatives. En el

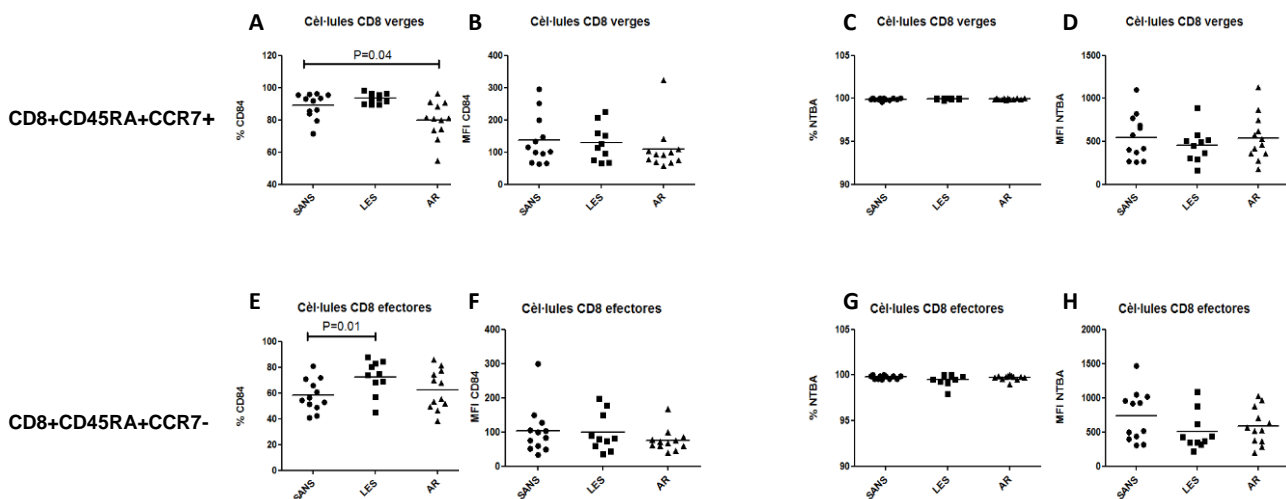
cas del valor de la MFI (veure figura 50B), s'observen les mateixes diferències que en el cas dels percentatges.

Quant al percentatge absolut de cèl·lules verges (veure figura 50C), en els malalts d'AR hi ha una disminució significativa d'aquesta subpoblació. Les cèl·lules efectores dels malalts de LES també mostren un valor més baix de la relació proteïna total/isoforma en percentatge (veure figura 50D). Els malalts d'AR en canvi es diferencien en dos grups segons l'expressió relativa de la isoforma en funció de la proteïna total. En termes de la MFI (veure figura 50E), els pacients de LES mostren el mateix resultat que en el cas dels percentatges; i el valor del ratio dels voluntaris d'AR és significativament més elevat que el del grup control. En termes absoluts, el percentatge de cèl·lules efectores no presenten diferències significatives vers els voluntaris sans, tot i que s'observa una tendència a la baixa en ambdues malalties (veure figura 50F).



**FIGURA 50:** **A)** Relació entre el percentatge d'expressió de CD84 total i la isoforma en voluntaris sans , pacients de LES i pacients d'AR a les cèl·lules T CD8<sup>+</sup> verges. **B)** Relació entre el valor de la MFI de CD84 total i la isoforma en voluntaris sans , pacients de LES i pacients d'AR a les cèl·lules T CD8<sup>+</sup> verges. **C)** Percentatge absolut de cèl·lules T CD8<sup>+</sup> verges en voluntaris sans, pacients amb LES i pacients amb AR. **D)** Relació entre el percentatge d'expressió de CD84 total i la isoforma en voluntaris sans, pacients de LES i pacients d'AR a les cèl·lules T CD8<sup>+</sup> efectores. **E)** Relació entre el valor de la MFI de CD84 total i la isoforma en voluntaris sans, pacients de LES i pacients d'AR a les cèl·lules T CD8<sup>+</sup> efectores. **F)** Percentatge absolut de cèl·lules T CD8<sup>+</sup> efectores en voluntaris sans, pacients amb LES i pacients amb AR. El valor de P indica les diferències significatives entre grups.

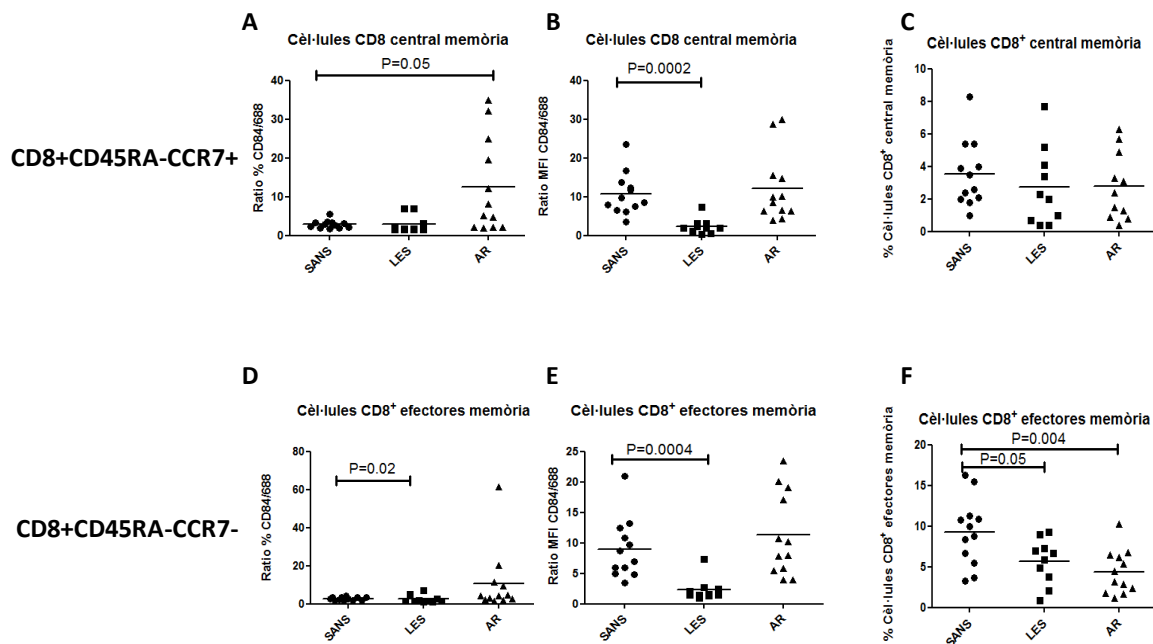
Quant al percentatge de CD84 (veure figura 51A), les diferències més significatives en les cèl·lules T CD8<sup>+</sup> verges es troben amb els malalts d'AR, els quals tenen una expressió més baixa que els voluntaris sans. No s'observen diferències destacables en els valors de MFI (veure figura 51B); ni tampoc en els percentatges (veure figura 51C) o MFI (veure figura 51D) de NTBA. A la subpoblació de cèl·lules efectores, el percentatge de CD84 és més elevat en malalts de LES (veure figura 51E), mentre que en els pacients d'AR no s'observen diferències significativament rellevants. Quant al valor de MFI (veure figura 51F), els valors dels tres grups estudiats són similars. El receptor NTBA mostra valors de percentatge molt propers a 100 en tots els casos (veure figura 51G), mentre que en el valor de MFI no s'observen diferències significatives (veure figura 51H).



**FIGURA 51:** **A)** Valor del percentatge de l'expressió de CD84 en les cèl·lules T CD8<sup>+</sup> verges de pacients sans, pacients amb LES i pacients amb AR. **B)** Valor de la MFI de l'expressió de CD84 en les cèl·lules T CD8<sup>+</sup> verges de pacients sans, pacients amb LES i pacients amb AR. **C)** Valor del percentatge de l'expressió de NTBA en les cèl·lules T CD8<sup>+</sup> verges de pacients sans, pacients amb LES i pacients amb AR. **D)** Valor de la MFI de l'expressió de NTBA en les cèl·lules T CD8<sup>+</sup> verges de pacients sans, pacients amb LES i pacients amb AR. **E)** Valor del percentatge de l'expressió de CD84 en les cèl·lules T CD8<sup>+</sup> efectores de pacients sans, pacients amb LES i pacients amb AR. **F)** Valor de la MFI de l'expressió de CD84 en les cèl·lules T CD8<sup>+</sup> efectores de pacients sans, pacients amb LES i pacients amb AR. **G)** Valor del percentatge de l'expressió de NTBA en les cèl·lules T CD8<sup>+</sup> efectores de pacients sans, pacients amb LES i pacients amb AR. **H)** Valor de la MFI de l'expressió de NTBA en les cèl·lules T CD8<sup>+</sup> efectores de pacients sans, pacients amb LES i pacients amb AR. El valor de P indica les diferències significatives entre grups.

Les cèl·lules central memòria també han estat avaluades en aquest estudi. La representació de la relació proteïna total/isoforma en percentatge (veure figura 52A), no mostra diferències significatives en els pacients de LES respecte als individus sans; però sí que ho fa el grup d'AR,

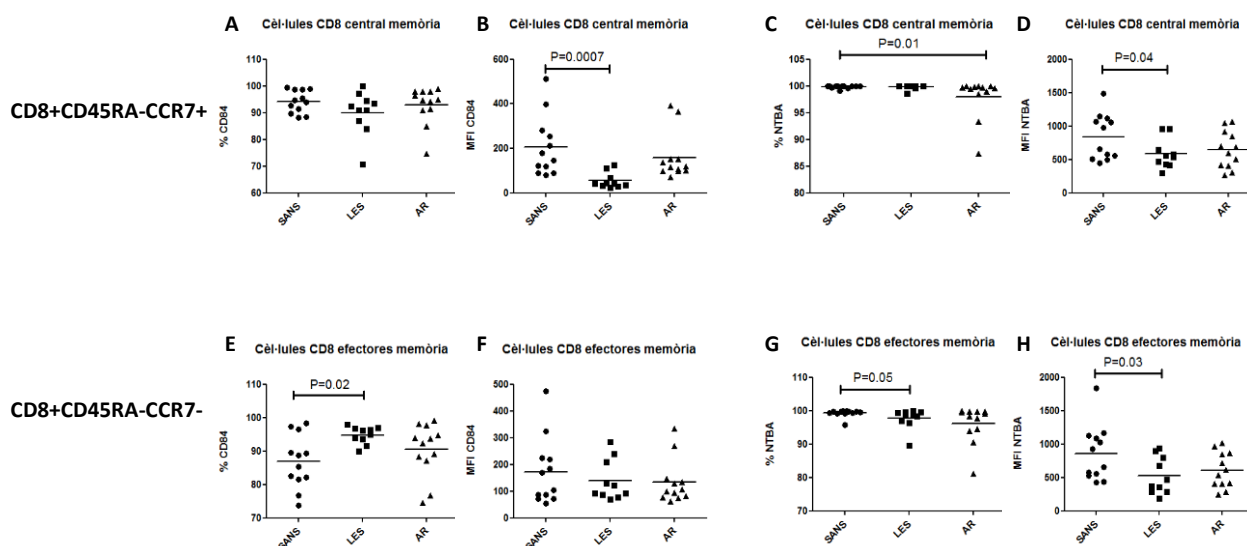
on tot i ser un grup molt heterogeni, s'observen valors més elevats que el grup control. En el cas del ratio en MFI (veure figura 52B), els pacients de LES tenen un valor més baix que els grups control, mentre que els pacients d'AR tenen un valor similar als controls. Els percentatges cel·lulars de les subpoblacions no mostren diferències en LES ni en AR (veure figura 52C).



**FIGURA 52: A)** Relació entre el percentatge d'expressió de CD84 total i la isoforma en voluntaris sans , pacients de LES i pacients d'AR a les cèl·lules T CD8<sup>+</sup> central memòria. **B)** Relació entre el valor de la MFI de CD84 total i la isoforma en voluntaris sans, pacients de LES i pacients d'AR a les cèl·lules T CD8<sup>+</sup> central memòria. **C)** Percentatge absolut de cèl·lules T CD8<sup>+</sup> central memòria en voluntaris sans, pacients amb LES i pacients amb AR. **D)** Relació entre el percentatge d'expressió de CD84 total i la isoforma en voluntaris sans, pacients de LES i pacients d'AR a les cèl·lules T CD8<sup>+</sup> efectores memòria. **E)** Relació entre el valor de la MFI de CD84 total i la isoforma en voluntaris sans, pacients de LES i pacients d'AR a les cèl·lules T CD8<sup>+</sup> efectores memòria. **F)** Percentatge absolut de cèl·lules T CD8<sup>+</sup> efectores memòria en voluntaris sans, pacients amb LES i pacients amb AR. El valor de P indica les diferències significatives entre grups.

En representar el percentatge de la proteïna total CD84 de les cèl·lules central memòria (veure figura 53A), no s'observen diferències significatives en cap dels casos; però sí que es veuen diferències entre voluntaris sans i pacients amb LES en la representació de la MFI d'aquesta proteïna (veure figura 53B). La proteïna NTBA presenta diferències en el percentatge de cèl·lules positives de malalts d'AR respecte els voluntaris sans (veure figura 53C). A la figura 54D s'observa que les diferències més importants es troben entre el grup control i els pacients de LES. En les cèl·lules efectores memòria els pacients de LES tenen l'expressió de CD84 més

elevada quant a percentatge (veure figura 53E), mentre que el grup de pacients d'AR no presenten diferències. En el cas de la MFI (veure figura 53F), no existeixen diferències en els grups estudiats. El valor del percentatge de NTBA veure figura 53G) és lleugerament més baix en el grup de LES que en el control. Els valors de MFI de pacients de LES (veure figura 53H) mostren també una disminució significativa respecte el grup control. El grup d'AR no mostra diferències ni de percentatge ni de MFI.

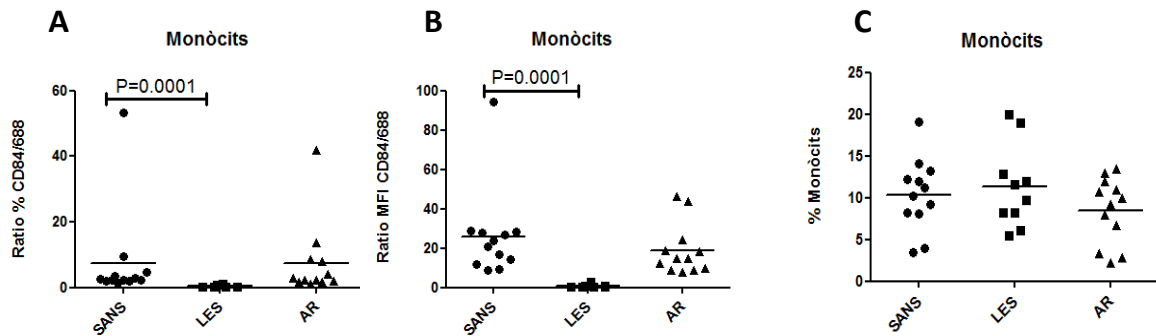


**FIGURA 53:** **A)** Valor del percentatge de l'expressió de CD84 en les cèl·lules T CD8<sup>+</sup> central memòria de pacients sans, pacients amb LES i pacients amb AR. **B)** Valor de la MFI de l'expressió de CD84 en les cèl·lules T CD8<sup>+</sup> central memòria de pacients sans, pacients amb LES i pacients amb AR. **C)** Valor del percentatge de l'expressió de NTBA en les cèl·lules T CD8<sup>+</sup> central memòria de pacients sans, pacients amb LES i pacients amb AR. **D)** Valor de la MFI de l'expressió de NTBA en les cèl·lules T CD8<sup>+</sup> central memòria de pacients sans, pacients amb LES i pacients amb AR. **E)** Valor del percentatge de l'expressió de CD84 en les cèl·lules T CD8<sup>+</sup> efectores memòria de pacients sans, pacients amb LES i pacients amb AR. **F)** Valor de la MFI de l'expressió de CD84 en les cèl·lules T CD8<sup>+</sup> efectores memòria de pacients sans, pacients amb LES i pacients amb AR. **G)** Valor del percentatge de l'expressió de NTBA en les cèl·lules T CD8<sup>+</sup> efectores memòria de pacients sans, pacients amb LES i pacients amb AR. **H)** Valor de la MFI de l'expressió de NTBA en les cèl·lules T CD8<sup>+</sup> efectores memòria de pacients sans, pacients amb LES i pacients amb AR. El valor de P indica les diferències

#### 4.6. MONÒCITS

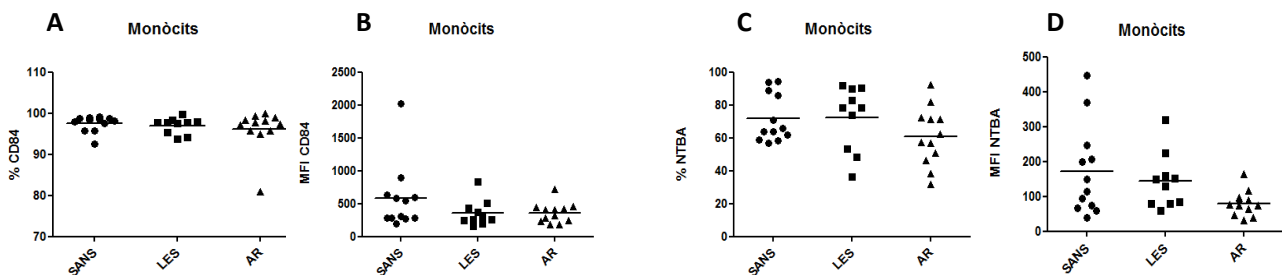
La sub població de monòcits, diferenciada dels limfòcits per tamany (FSC) i granularitat (SSC) al citòmetre, mostrà una expressió significativament més important de la isoforma; i conseqüentment un valor del quocient entre la proteïna total i la isoforma més baix en malalts de LES que en voluntaris sans, tant en percentatge (veure figura 54A) com en MFI (veure figura

54B). Quant al nombre de monòcits en els tres grups, no s'observen diferències significatives (veure figura 54C).



**FIGURA 54:** **A)** Relació entre el percentatge d'expressió de CD84 total i la isoforma en voluntaris sans, pacients de LES i pacients d'AR als monòcits. **B)** Relació entre el valor de la MFI de CD84 total i la isoforma en voluntaris sans, pacients de LES i pacients d'AR als monòcits. **C)** Percentatge absolut de monòcits en voluntaris sans, pacients amb LES i pacients amb AR.

Quant a l'expressió de CD84, no hi ha diferències ni en percentatge (veure figura 55A) ni en MFI (veure figura 55B) entre els tres grups d'estudi. L'expressió de NTBA mostra una tendència cap a un valor més baix de l'expressió en pacients d'AR, en percentatge (veure figura 55C) i en MFI (veure figura 55D), sense arribar a ser significativament diferent al grup control.



**FIGURA 55:** **A)** Valor del percentatge de l'expressió de CD84 en els monòcits de pacients sans, pacients amb LES i pacients amb AR. **B)** Valor de la MFI de l'expressió de CD84 en els monòcits de pacients sans, pacients amb LES i pacients amb AR. **C)** Valor del percentatge de l'expressió de NTBA en els monòcits de pacients sans, pacients amb LES i pacients amb AR. **D)** Valor de la MFI de l'expressió de NTBA en els monòcits de pacients sans, pacients amb LES i pacients amb AR.

## VII. DISCUSSIÓ







La identificació del clúster genètic *Sle1b* del cromosoma 1 com el principal locus de susceptibilitat al LES va fer que sorgissin estudis dirigits a identificar el paper dels membres SLAM, situats en aquest locus, en el trencament de la tolerància i l'aparició de l'autoimmunitat. En els últims anys s'han acumulat nombroses evidències que indiquen que aquests receptors modulen processos d'activació de limfòcits claus en el desenvolupament de malalties autoimmunes, com ara el desenvolupament de cèl·lules NKT, la producció de citocines al timus i la perifèria o la producció d'anticossos dependent del centre germinal (Cannons et al., 2010). Estudis genètics en famílies amb membres amb LES han demostrat també una associació entre el locus 1q23 amb una predisposició al desenvolupament de la malaltia (Cunninghame et al., 2008), (Zhong and Veillette, 2008). A més, l'anàlisi genètic i genòmic del locus *Sle1b* va revelar un alt grau de polimorfisme. Estudis en ratolins van permetre identificar i caracteritzar dos haplotips d'aquest locus: l'haplotip 1 en ratolins C57BL/6 i soques relacionades; i l'haplotip 2 en ratolins BALB/c i altres soques que desenvolupen el LES espontàniament (NZB/NZW, NZM2410) (Morel et al., 2010, Wandstrat et al., 2004). Es va observar que ratolins congènits (*B6.Sle1b*) derivats de la soca NZM2410 (NZB x NZW/F1) i C57BL/6, que conté el locus *Sle1b* (haplotip 2) en el fons genètic de l'haplotip 1, produeix nivells alts d'anticossos antinuclears.

Aquests polimorfismes dels gens de la família SLAM també es tradueixen en l'expressió diferencial d'isoformes generades per *splicing* alternatiu. Recentment s'han descrit diversos casos de polimorfismes de receptors SLAM involucrats en el desenvolupament d'autoimmunitat, com ara el treball que descriu una expressió alterada de dos receptors SLAM, CD244 i CD319, i una expressió diferencial de les isoformes d'aquestes molècules en pacients amb LES (Kim et al., 2010). És en aquest context que ens vàrem plantejar la hipòtesi que l'expressió diferencial de CD84 i de les seves isoformes podria estar implicada en el trencament de la tolerància i el desenvolupament de l'autoimmunitat, concretament de LES.

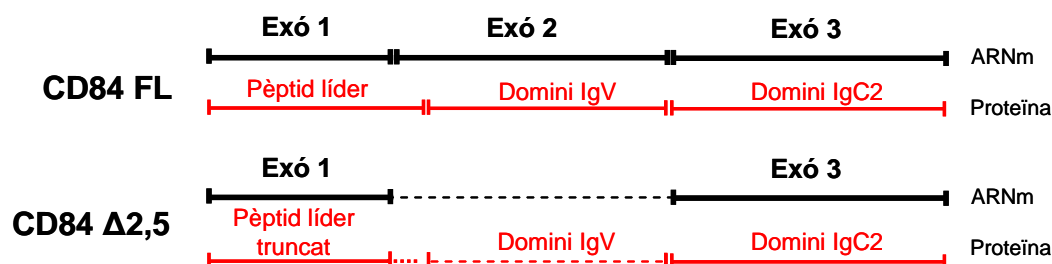
En primer lloc es va fer un estudi de les diferents bases de dades que recollien els diferents ESTs de la proteïna. En aquestes es va veure que els transcrits més freqüents i que tenien sentit biològic eren quatre (H1C22218.2, H1C22218.3, H1C22218.4 i H1C22218.5; que corresponen respectivament a CD84\_FL, CD84\_Δ2,5, CD84\_Δ5 i CD84\_Δ5,6), tres dels quals (H1C22218.3, H1C22218.4 i H1C22218.5) coincidien amb altres ARNm que ja s'havien descrit a altres treballs (Zaiss et al., 2003, Palou et al., 2000). Per aquest motiu es va decidir abordar l'anàlisi dels ARNm de la manera més específica possible. Inicialment es van dissenyar

oligonucleòtids específics per a cadascuna de les variants aprofitant les unions dels exons úniques que cadascuna d'elles tenia, però l'alt grau d'identitat entre elles no va permetre l'anàlisi seguint aquest mètode, per la qual cosa es va optar per optimitzar dues de les PCR que ens permetien analitzar l'expressió dels quatre transcrits. Els estudis anteriors duts a terme al nostre grup evidenciaven l'expressió de CD84 en diferents línies cel·lulars del sistema immune, és per aquest motiu que es va decidir iniciar per aquí l'estudi de les isoformes. Els resultats mostraren que hi havia una expressió diferencial de cadascuna de les variants esmentades en les línies testades, tot i que el transcrit CD84\_Δ2,5 mostrà nivells baixos en tots els casos (veure figura 26). Les variants també van ser detectades en les cèl·lules primàries de sang perifèrica com PBMCs, melsa i amígdala. Es va observar una tendència diferencial en cadascun dels llinatges hematopoètics, la qual cosa suggereix que, almenys a nivell gènic, CD84 podria estar regulant processos importants de la resposta immune. Les bandes corresponents als transcrits CD84\_Δ2,5 i CD84\_Δ5 són les que mostraren uns nivells més alts d'expressió gènica en tots els casos, i tenint en compte l'expressió del transcrit CD84\_Δ2,5 a la PCR específica per a aquesta, es pot concloure que la major part de la banda observada a 308 pb correspon al transcrit CD84\_Δ5. Això indica que el transcrit CD84\_Δ5 es troba més expressat a nivell gènic que el transcrit *full length*, la qual cosa explicaria que inicialment la proteïna descrita com a proteïna íntegra fos la corresponent al transcrit CD84\_Δ5 i no a CD84\_FL (De la Fuente et al., 1997).

La proteïna CD84 té dues funcions; la interacció homofílica a través del primer domini Ig i la funció de molècula transmissora de senyals. En el primer cas, la interacció totalment independent de la seva cua citoplasmàtica (Martin et al., 2001, Yan et al., 2007), dóna lloc a una activació de les cèl·lules T i una secreció d'IFN-γ i d'altres citocines. S'ha vist que aquesta interacció és clau entre cèl·lules T i cèl·lules B en la formació de centres germinals i en conseqüència de la generació de la immunitat humoral (Cannons et al 2010).

Degut a això, l'absència del primer domini Ig podria comprometre la funcionalitat de la molècula i tenir conseqüències per exemple en la formació dels centres germinals, de manera similar al que succeeix quan CD84 no està present (Cannons et al., 2010), i en l'activació de cèl·lules T i secreció de citocines (Martin et al., 2001). És el que succeiria si la isoforma CD84\_Δ2,5 estigués present a la membrana en quantitats importants. Aquesta isoforma està mancada dels exons 2 i 5. Mentre que l'exó 5 no semblaria tenir molta rellevància a nivell funcional, l'exó 2, que correspon al primer domini immunoglobulina de la proteïna a través

dels quals es produeixen les interaccions, tindria conseqüències funcionals importants ja que aquesta isoforma no podria unir-se homofílicament. En el nostre estudi hem conclòs que aquesta isoforma és detectable a nivell d'ARNm però no a nivell de proteïna. Una possible hipòtesi és que part del pèptid líder forma part del segon exó, absent en aquesta isoforma. La manca d'aquest fragment de pèptid líder podria fer que la proteïna no tingués la capacitat de translocar a la membrana (veure figura 53). També es podria deure a un error en els mecanismes de traducció.

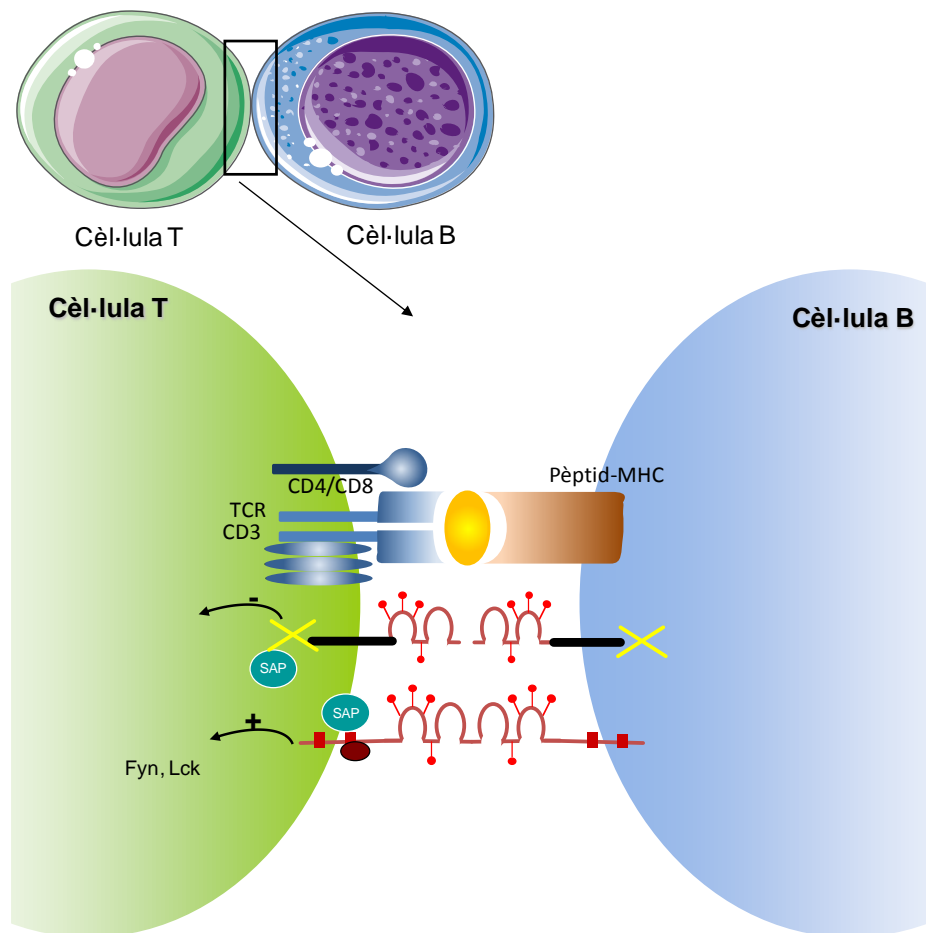


**FIGURA 53:** Esquema de l'organització dels exons de la part extracel·lular de dues de les isoformes de CD84. Mentre que CD84 FL té el pèptid líder complet, una part d'aquest es veu truncat en el cas de la isoforma CD84\_Δ2,5. Això podria fer que la proteïna no tingués la capacitat de anar cap a la membrana citoplasmàtica

Degut a que el nostre interès en aquesta isoforma raïa en les conseqüències funcionals que aquesta podria haver tingut a nivell de proteïna, en veure que aquesta isoforma no s'expressava a la membrana de les cèl·lules es va decidir descartar-la de l'estudi.

L'altra funció clau de CD84 consisteix en la senyalització cap a l'interior de la cèl·lula. Per fer-ho, aquesta proteïna conté quatre tirosines en la seva cua citoplasmàtica, dues d'elles formant part de motius ITSM. En cèl·lules T, CD84 és ràpidament fosforilada reclutant posteriorment la proteïna adaptadora SAP a través del motiu Y<sub>262</sub> (Deenick et al., 2010). S'ha demostrat que tot i que CD84 no requereix SAP per a la fosforilació, és imprescindible per la senyalització cap a l'interior de la cèl·lula (Tangye et al., 2003). La unió de SAP a CD84 també és important per a una bona formació dels centres germinals (Cannons et al., 2010). Per aquest motiu, la isoforma CD84\_Δ5,6, en la qual la manca dels exons 5 i 6 produeix un canvi en la pauta de

lectura que genera una cua citoplasmàtica única i sense motius tirosina, podria veure compromesa la seva funcionalitat de senyalització.



**FIGURA 54:** La presència de la isoforma CD84\_Δ5,6 provocaria que la interacció entre les cèl·lules T i B no fos del tot efectiva ja que no es produiria una senyalització cap a l'interior de la cèl·lula.

Quant a nivell de proteïna, la generació de l'anticòs específic contra la cua citoplasmàtica de la isoforma CD84\_Δ5,6 i la posterior validació tant en transfectants com en les diferents línies cel·lulars de diferents llinatges, ha permès estudiar l'expressió d'aquesta isoforma en les diferents subpoblacions de cèl·lules de sang perifèrica. Els resultats demostren que l'anticòs és sensible a la detecció de diferents nivells d'expressió de la isoforma, mostrant generalment, una expressió d'aquesta notablement més elevada en monòcits i en cèl·lules memòria. Però la importància d'una expressió elevada de la isoforma d'estudi rau en la seva relació vers a la proteïna total. En aquest cas, les subpoblacions amb una expressió de CD84\_Δ5,6 més elevada en relació a la proteïna total són les cèl·lules NK i els monòcits. Aquest fet podria estar indicant un rol funcional important en aquestes subpoblacions, algunes de les quals, com les cèl·lules

NK, han demostrat tenir un paper important en el desenvolupament de l'autoimmunitat (Schleinitz et al., 2010). Una expressió elevada de la isoforma es correspon amb unes cèl·lules activades, tal com demostren els estudis d'activació *in vitro* duts a terme tant en línies cel·lulars com en cultius primaris. Els nivells més baixos en canvi, es troben a les cèl·lules B i les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> naïve. Aquest fenotip es correspon amb unes cèl·lules que no han estat activades.

A la melsa, la isoforma CD84\_Δ5,6 també hi és present. Les cèl·lules transicionals mostren proporcions similars de proteïna total/isoforma. En termes absoluts, les cèl·lules T2 tenen una expressió incrementada tant de CD84 com de CD84\_Δ5,6, coincidint amb el que s'havia descrit anteriorment (De Salort et al., 2011) pel cas de la proteïna total. En el desenvolupament cap a cèl·lula de centre germinal, la proporció d'aquesta vers la proteïna total va canviant, indicant una regulació diferencial amb l'activació. D'aquesta manera, quan la cèl·lula està en un estat de cèl·lula verge, la proporció de la MFI entre la isoforma i la proteïna total és d'un 2,5. En el següent estadi d'activació, les cèl·lules pre-centre germinal mostren una expressió de la isoforma augmentada, mentre que en les de centre germinal la proporció de la isoforma cau significativament, mostrant una relació de MFI de proteïna total/isoforma del 4,5. Aquest fet pot deure's a la importància que té la senyalització de CD84 en els centres germinals, on s'ha vist que és clau per una bona interacció entre la cèl·lula T i la cèl·lula B (Cannons et al., 2010). Un increment de la isoforma en aquest tipus cel·lular per tant, produiria una senyalització de la interacció T:B deficient. En comparar les cèl·lules dels fol·licles amb les de la zona marginal, aquestes últimes tenen una proporció de la proteïna total/isoforma que representa la meitat respecte les cèl·lules fol·liculars. Aquesta diferència es deu principalment a una expressió de CD84 augmentada, ja que la isoforma expressa nivells similars en ambdós tipus cel·lulars. Les cèl·lules memòria *unswitched* representen una subpoblació de cèl·lules B involucrades en la immunitat humoral independent de les cèl·lules T contra determinats bacteris encapsulats (Kruetzmann et al., 2003). Aquest tipus cel·lular mostra una expressió de CD84 més elevada que les cèl·lules que ja han fet el canvi de classe, o *switched*, mostrant ambdues una proporció similar del MFI proteïna total/isoforma.

Per estudiar el comportament de les isoformes en front de l'activació, es van triar tres línies cel·lulars representatives de cadascun dels llinatges estudiats i es van estimular amb els activadors corresponents durant 2, 6 i 24 hores. Els resultats mostren que l'expressió de cadascuna de les isoformes varia amb l'activació. Les cèl·lules YT, que ja en condicions basals

mostren que la isoforma CD84\_Δ5,6 és gairebé la majoritària detectable a nivell d'ARNm; indiquen un augment notable de la seva expressió, fet que coincideix amb el que s'observa a nivell de proteïna. Les cèl·lules Jurkat activades mostren una disminució dels transcrits més llargs a favor de l'increment del transcrit corresponent a la isoforma CD84\_Δ5,6. Per últim, les cèl·lules Ramos, model de cèl·lula B, també mostren un augment del transcrit CD84\_Δ5,6, en aquest cas sense variar els nivells de la resta de transcrits. Aquests resultats mostren un increment del transcrit CD84\_Δ5,6 amb l'activació.

Els estudis d'activació amb cèl·lules primàries també evidencien un augment de l'expressió de la isoforma amb l'activació. En PBMCs l'activació amb  $\alpha$ -CD3 a les 72 hores mostra un augment important del CD84 total i de la isoforma, tant en cèl·lules T CD4<sup>+</sup> com en cèl·lules T CD8<sup>+</sup>. Amb l'estímul del PHA curiosament, l'expressió de CD84 a les 72 hores no varia o inclús disminueix lleugerament, mentre que la de la isoforma augmenta de manera important. Aquest fet podria indicar que, mentre que l'expressió de CD84 podria estar regulada per les senyals coestimulatòries que la cèl·lula rep, la presència de CD84\_Δ5,6 no dependria d'estímuls secundaris, raó per la qual la seva expressió es veuria augmentada inclús amb un estímul com el del PHA. L'estudi de l'activació de les cèl·lules B d'amígdala mostra també un augment de l'expressió tant de la proteïna total com de la isoforma. Amb PMA l'activació de la via de les MAP cinases fa que l'activació sigui més generalitzada i els nivells augmentin de manera més important que en estimular amb proteïna A.

En amígdala, la tendència es manté en activar les cèl·lules amb proteïna A i PMA, donant lloc a un augment de l'expressió de la isoforma CD84\_Δ5,6 respecte la proteïna total.

Els estudis funcionals de les isoformes ens han donat més informació sobre el comportament diferent de CD84\_FL i de CD84\_Δ5,6 quant a activació, amb una activació lleugerament superior de CD84\_Δ5,6 quan les cèl·lules són estimulades amb  $\alpha$ -CD3 i  $\alpha$ -CD28, diferència que es fa més notable a les 24 hores. Sembla ser que les cèl·lules en les que la presència de CD84\_Δ5,6 és més important, estarien sobreactivades respecte les cèl·lules no transfectades i sobre les transfectades amb CD84\_FL. Un altre fet funcional a destacar és la diferència en la secreció d'IL-2. Els nivells de IL-2 secretada pel transfectant de CD84\_Δ5,6 són molt similars als de les cèl·lules no transfectades i molt inferiors als del transfectant CD84\_FL, suggerint que la isoforma CD84\_Δ5,6, tot i trobar-se sobreexpressada a la membrana cel·lular, no podria establir funcions coestimulatòries que donessin lloc a la secreció de IL-2. L'estudi de l'expressió de CD84 en les diferents condicions d'activació va donar resultats sorprenents, ja

que es va veure un increment molt important de CD84 en el transfectant CD84\_Δ5,6 amb la doble activació a les 24 hores, arribant a doblar l'expressió del transfectant CD84\_FL.

Aquests resultats ens va fer pensar que probablement hi ha un problema en el reciclatge de la isoforma que fa que aquesta s'acumuli a la membrana cel·lular, efecte que s'incrementa quan les cèl·lules són activades. Dit procés podria donar lloc a una descompensació d'isoformes de CD84 a la membrana de la cèl·lula, incrementant-se dramàticament la presència de CD84\_Δ5,6 i en conseqüència disminuint la de la resta de la proteïna, fet que donaria lloc a una adhesió augmentada però a una senyalització deficient que impediria una funcionalitat correcta de la cèl·lula. En els resultats obtinguts en experiments d'internalització, s'observa que la isoforma CD84\_Δ5,6 no s'internalitza de la mateixa manera que la proteïna amb la cua citoplasmàtica completa, fet que ha corroborat la nostra hipòtesi.

Les cèl·lules B han estat històricament relacionades amb l'autoimmunitat degut a la producció d'autoanticossos, però diversos estudis han desvetllat la contribució d'aquest tipus cel·lular en altres aspectes del desenvolupament de les malalties autoimmunes, com en la seva capacitat per presentar l'antigen als limfòcits (Yanaba et al., 2008). En algunes d'aquestes malalties, com el LES, es pensa que el principal desencadenant del trencament de la tolerància són les cèl·lules B (Sang et al., 2013). D'altres malalties en canvi, com l'AR, es pensa que estan produïdes per una regulació deficient de les cèl·lules T (Cope et al., 2007). En aquest treball per tant s'han abordat dues patologies, que tot i ser malalties autoimmunes sistèmiques, es creu que poden tenir factors desencadenants diferents.

Probablement és per aquest motiu que mentre que en els pacients d'AR no s'han vist diferències significatives en cap dels paràmetres estudiats, en els pacients de LES s'han vist diferències importants tant en cèl·lules B2 com en la subpoblació de cèl·lules B1.

En la distribució d'aquestes dues subpoblacions, alguns autors assenyalen una distribució anormal en els pacients de LES, degut a un funcionament deficient dels mecanismes de control de la tolerància (Sang et al., 2013). Un augment de la subpoblació de cèl·lules B1 activades en malalts de LES indueix l'expansió de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> (Griffin and Rothstein, 2011). La no variació de la proporció de les subpoblacions en el nostre estudi pot deure's a l'estadi de la malaltia en la que es troben els subjectes d'estudi, els quals es troben en fase no activa de la malaltia. Tot i que l'AR es considera una malaltia autoimmune associada a les cèl·lules T, s'observa una lleugera disminució no significativa de la subpoblació B1 en aquest grup, que



coincideix amb el que s'observa a l'estudi de Moura et al. (Moura et al., 2010), el qual assenyala que pacients en una fase inicial de la malaltia presenten nivells més baixos de diferents subpoblacions de cèl·lules B.

En el nostre estudi, el qual avalua l'expressió de CD84 i de la isoforma CD84\_Δ5,6 en les diferents subpoblacions, l'expressió de CD84 total en cèl·lules B2 no mostra diferències, mentre que l'expressió de la isoforma CD84\_Δ5,6 és significativament més elevada en el grup de LES. Quant a les cèl·lules B1, són la principal font d'anticòs IgM, generats en absència de l'exposició a l'antigen, el que fa que tinguin una autorreactivitat elevada i contribueixin al desenvolupament de l'autoimmunitat (Duan and Morel, 2006). També s'ha relacionat aquesta subpoblació amb l'activació de les cèl·lules T en diversos estudis de ratolí (Griffin and Rothstein, 2011). En aquesta subpoblació s'observa la mateixa tendència que en les cèl·lules B2, tant en CD84 total com en la isoforma.

Se sap que les cèl·lules T estan implicades en el desenvolupament del LES (Moulton and Tsokos, 2011) i de l'AR (Skapenko et al., 2005). En el primer cas, s'ha observat que les cèl·lules T dels pacients amb LES mostren un fenotip similar al de les cèl·lules verges o anèrgiques, per la seva incapacitat de secretar citocines; però per altra banda mostren característiques de cèl·lules memòria, com ara que algunes molècules estan disposades a les basses lipídiques, preparades per ser activades. A més, hi ha treballs, com s'ha explicat en seccions anteriors, que demostren que diferents membres de la família SLAM tenen la seva funció alterada en les cèl·lules T d'alguns pacients de LES (Chatterjee et al., 2012). En el cas de l'AR, hi ha nombroses evidències que assenyalen que les cèl·lules T juguen un paper important en el desenvolupament d'aquesta malaltia, com ara que tant el sinovi com les cèl·lules de sang perifèrica dels pacients d'AR estan enriquides en cèl·lules T  $\gamma\delta$  (Su et al., 2013) o CD4<sup>+</sup>.

Quant a les freqüències de les diferents subpoblacions de cèl·lules T, s'ha observat una disminució en el nombre de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> activades en LES (Gomez-Martin et al., 2011). En AR, hi ha una certa controvèrsia. Alguns treballs assenyalen diferències importants en el balanç de les subpoblacions de cèl·lules T col·laboradores en malalts d'AR (Chen et al., 2012), donant lloc a un augment del balanç Th1/Th17 i en conseqüència, a la secreció de les citocines corresponents. D'altres afirmen que en malalts de AR no s'observen diferències en les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> (Moura et al., 2011). En el nostre treball s'han avaluat diferents subpoblacions de cèl·lules T CD4<sup>+</sup>, i en cap del casos s'han detectat les tendències comentades.

Quant a l'expressió de CD84, es veu una disminució de la proporció del MFI entre la proteïna total i la isoforma en les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> verges, el que indica un augment de la isoforma en els malalts de LES; tendència que es fa molt més evident en les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> memòria. Quant al percentatge de CD84, la tendència a que l'expressió de CD84 sigui més elevada coincideix amb el treball de Ding S *et al*, on es descriu que en els malalts de LES, la proteïna CD84 es troba augmentada a conseqüència d'una inhibició del microRNA-142-3p (Ding et al., 2012). En els pacients d'AR no s'observen diferències significatives en cap dels casos estudiats, a diferència del que es descriu en altres treballs (Weyand et al., 2000).

Les cèl·lules T reguladores són cèl·lules T supressores àmpliament relacionades amb el desenvolupament de l'autoimmunitat (Constantino et al., 2008, Wraith et al., 2004, Bacchetta et al., 2007, Cvetanovich et al., 2010), motiu pel qual van ser incloses en l'estudi. En aquesta malaltia, la funció d'aquestes cèl·lules es veu compromesa degut a una secreció aberrant de TNF- $\alpha$  (Ehrenstein et al., 2004), el que fa que hi hagi un increment en la seva freqüència cel·lular (Cooles et al., 2013), tendència que no s'observa en el present estudi.

Tot i que els resultats indiquen una tendència en la diferenciació de dos grups de pacients segons els nivells d'expressió de la isoforma, els resultats no són significatius. No s'observen diferències en LES en la fase no activa de la malaltia quant al nombre de cèl·lules T reguladores, coincidint amb el que es veu en altres estudis (Crispin et al., 2003), (Kim et al., 2012) En AR tampoc s'han obtingut diferències importants; a diferència del que s'ha vist en altres treballs (Kim et al., 2012).

Les cèl·lules T CD8<sup>+</sup> mostren diferències efectores importants amb les cèl·lules T CD4<sup>+</sup>, ja que tenen una resposta més ràpida als estímuls. La diferenciació va des de cèl·lules verges (CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>), les quals no tenen la capacitat citotòxica, cap a les cèl·lules efectores (CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>). Les cèl·lules que sobreviuen als processos de selecció i apoptosi esdevenen cèl·lules efectores memòria (CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>). Aquestes cèl·lules responen ràpidament als estímuls produint citocines i molècules efectores. Quan les cèl·lules esdevenen central memòria (CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup>), la resposta és més lenta, tot i que es creu que després d'un estímul les cèl·lules central memòria tenen la capacitat de migrar als òrgans perifèrics i esdevenir cèl·lules efectores memòria (Seder and Ahmed, 2003). En autoimmunitat, les cèl·lules T CD8<sup>+</sup> tenen un paper controvertit. D'una banda, aquestes cèl·lules poden ser autorreactives i tenir efectes patològics que produeixen dany tissular, ja que poden reconèixer l'antigen i matar la cèl·lula, bé a través de la via de Fas/FasL, o bé secretant a l'exterior citocines. També s'ha vist però que algunes subpoblacions de cèl·lules T CD8<sup>+</sup> han estat

identificades com a supressors en determinats models d'autoimmunitat mediada per cèl·lules T, com poden ser l'esclerosi múltiple i la diabetis tipus I (Medarova et al 2008). En el present treball, en el cas de les cèl·lules efectores memòria es veu una disminució de la població tant en pacients de LES com d'AR, tal com està descrit (Maldonado et al 2003).

Les diferències d'expressió de CD84 trobades als estudis que s'han dut a terme, mostren un cop més, una expressió més alta de la isoforma CD84\_Δ5,6 en les cèl·lules T CD8<sup>+</sup> verges dels malalts de LES, mentre que en termes de percentatge de la proteïna total es mostra una disminució d'aquesta en els malalts d'AR, el que tindria conseqüències en la senyalització. L'AR es considera, com s'ha explicat anteriorment, una malaltia autoimmuna mediada per cèl·lules T, per la qual cosa, la disminució en el percentatge de la població de cèl·lules verges podria deure's al seu paper supressor en aquest tipus de malalties autoimmunes. La tendència d'expressió augmentada en el grup de LES es manté a les cèl·lules efectores; mentre que els pacients d'AR presenten dos fenotips segons l'expressió de la isoforma, indicant que en alguns pacients la presència d'aquesta és baixa o nul·la. Aquest fet, indicaria per tant, una presència menor de la proteïna CD84 a la membrana, i conseqüentment una adhesió disminuïda en relació als pacients sans, el que produiria una senyalització deficient de les altres proteïnes coestimuladores.

Quant a les cèl·lules central memòria, s'observa la mateixa tendència que en les cèl·lules T CD8<sup>+</sup> anteriors: valors de la proporció proteïna total/isoforma incrementats en els malalts de LES, i disminuïts en els pacients d'AR. Analitzant els valors del percentatge de la proteïna total es veu que la disminució de la proporció es deu a una baixada en l'expressió del CD84, mentre que els valors de la isoforma es conserven. Els pacients de LES tenen per tant, una expressió de CD84 menor en les cèl·lules T CD8<sup>+</sup> memòria que el grup control, el que podria comprometre la seva funció citotòxica. En el cas de l'AR, l'augment sí que es deu a la variació en l'expressió de CD84\_Δ5,6, fet pel qual la funcionalitat citotòxica podria veure's compromesa indirectament per una senyalització deficient. Les cèl·lules efectores memòria mostren en LES un patró igual que la resta de subpoblacions T CD8<sup>+</sup>, mostrant que probablement les deficiències en l'expressió de CD84 es conserven al llarg de la diferenciació cel·lular.

Les cèl·lules NK són cèl·lules del sistema immune innat implicades en el control de les infeccions microbianes i els tumors. Treballs recents mostren que també tenen importants funcions reguladores degut a les interaccions establertes amb cèl·lules tant del sistema immune com d'altres tipus cel·lulars. S'ha observat una regulació deficient de la citotoxicitat d'aquest tipus cel·lular en diverses malalties autoimmunes, el que posa en evidència el paper

de les NK en el control d'altres tipus cel·lulars com els macròfags. En el LES està demostrat que la disminució de la població de cèl·lules NK està relacionada amb diverses manifestacions clíniques de la malaltia, com la nefritis o la trombocitopènia durant els estadis aguts de la malaltia. Quant als resultats relatius a la proporció de cèl·lules NK, no s'observen diferències en el grup de LES, a diferència del que es descriu per altres malalties autoimmunes de característiques similars, com la síndrome de Sjögern, on el percentatge de cèl·lules NK es veu reduït (Izumi et al., 2006). En el nostre estudi s'ha vist un increment de la isoforma CD84\_Δ5,6 tant en malalts de LES com en malalts d'AR, sense que l'expressió de la proteïna total es vegi alterada, a diferència del que s'ha vist amb altres membres SLAM (Hagberg et al., 2013). Això podria produir una interacció aberrant de les cèl·lules NK amb altres tipus cel·lulars, com les cèl·lules dendrítiques, que podria desencadenar importants reaccions que afectarien el desenvolupament de l'autoimmunitat (Schleinitz et al., 2010). En el cas d'una interacció augmentada de les cèl·lules NK amb les cèl·lules T reguladores produiria una resposta exacerbada de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> (Pedroza-Pacheco et al., 2013). Probablement per aquest motiu, en el nostre estudi no s'observen diferències, ja que els pacients es trobaven en una etapa no activa de la malaltia. En el grup d'AR en canvi, s'evidencia una disminució en aquest subpoblació. La bibliografia descriu observacions controvertides quant a la proporció d'aquesta subpoblació en malalts d'AR. Malgrat això el que sembla clar és que hi ha un funcionament aberrant d'aquest tipus cel·lular (Conigliaro et al., 2011). Les cèl·lules NK han estat relacionades en diversos treballs amb el desenvolupament d'AR, ja que s'han observat infiltrat d'aquestes cèl·lules a la membrana sinovial dels pacients, tot i que no està clar si promou la malaltia o pel contrari té un paper supressor en el desenvolupament d'aquesta (Ahern and Brennan, 2011).

Les cèl·lules NKT són una subpoblació heterogènia de limfòcits amb diferents especificitats i funcions. Algunes subpoblacions de cèl·lules NKT tenen habilitat supressora sobre la resposta immune, mentre que d'altres l'afavoreixen. D'aquesta manera, les cèl·lules NKT de tipus I promouen respostes reguladores i són freqüentment més patogèniques que les cèl·lules NKT de tipus II, les quals predominantment són inhibidores i protectores (Kumar and Delovitch, 2014). En general, les cèl·lules NKT són activades per cèl·lules presentadores d'antigen com ara cèl·lules dendrítiques, macròfags o cèl·lules B. Un cop activades, les cèl·lules NKT alliberen grans quantitats de citocines que promouen la resposta Th1 i Th2 (Onoe et al., 2007). Un treball relaciona una interacció deficient de CD150 entre cèl·lules NKT i cèl·lules dendrítiques amb el desenvolupament de la diabetis autoimmune en ratolins (Baev et al., 2008).

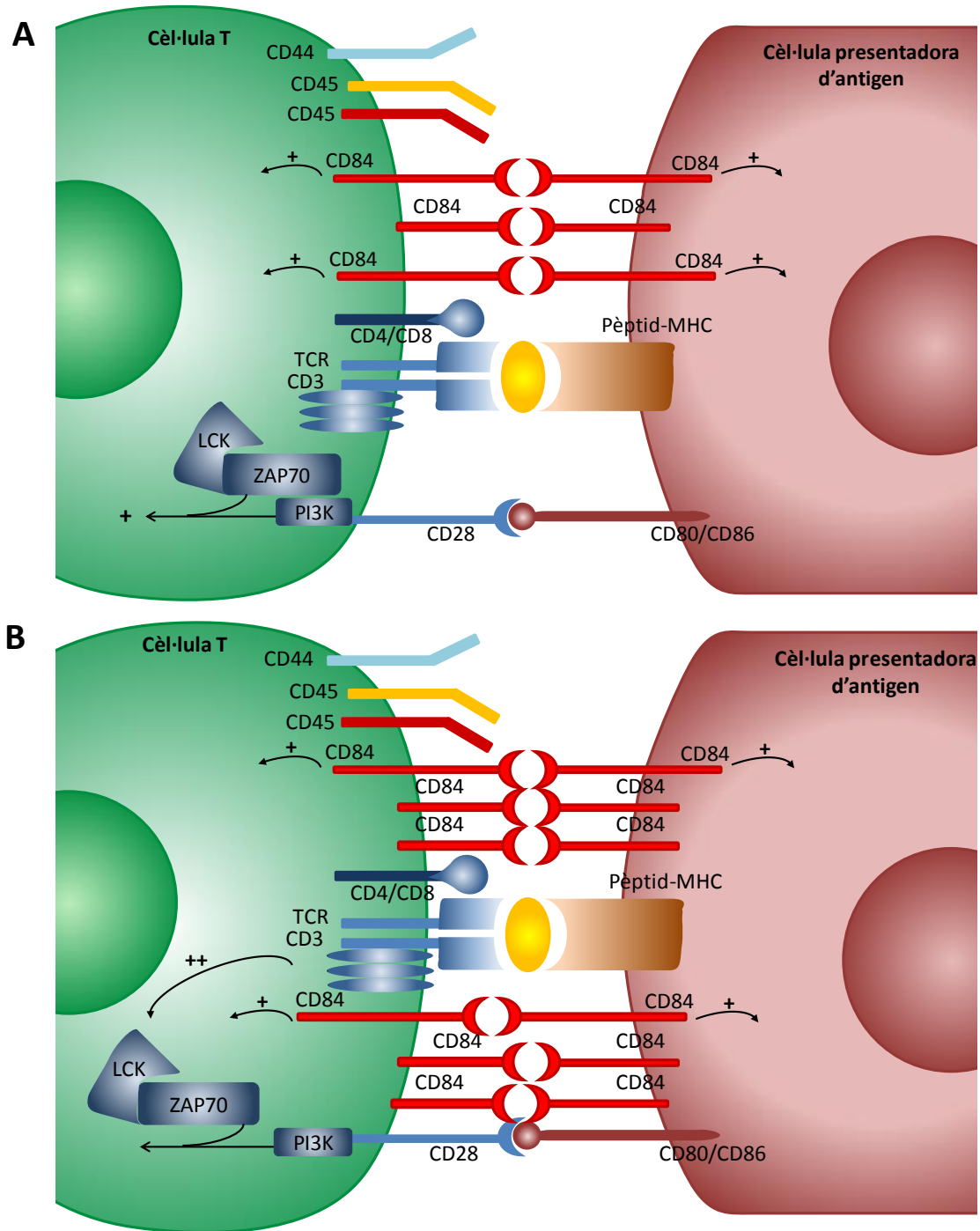
Tot i que està descrit que les NKT de tipus I es troben reduïdes en diferents desordres inflamatoris, càncer i malalties autoimmunes (Berzins et al., 2011), en aquest estudi no s'han vist diferències destacables en els percentatges absoluts d'aquestes subpoblacions. El que s'ha observat és un augment de la proporció de la isoforma en els pacients de LES sense que hi hagi un augment de la proteïna total. Aquest augment donaria lloc a una interacció més sostinguda entre les cèl·lules NKT i la cèl·lula presentadora d'antigen, provocant una hiperactivació de la resposta immune i probablement un alliberament de citocines més important que danyaria els teixits i col·laboraria en el desenvolupament de l'autoimmunitat. En els pacients d'AR en canvi, no s'observen diferències quant a la isoforma, però sí una lleugera disminució de la proteïna total.

Per últim, els monòcits també van ser estudiats ja que és una de les poblacions de cèl·lules de sang perifèrica més àmpliament relacionada amb una eliminació deficient de les restes cel·lulars apoptòtiques, clau en el desenvolupament del LES (Gaipl et al., 2007) i una sobreproducció de diferents citocines com IL-23, IFNs, IL-10, IL-6 i de NO (Byrne et al., 2012). A més, s'ha vist que la capacitat per activar les cèl·lules T també està compromesa, així la incapacitat de processar i presentar l'antigen (Shirakawa et al., 1985) i de produir una senyal coestimuladora òptima als limfòcits (Tsokos et al., 1996). Està descrit que en AR hi ha una disminució de la població d'una subpoblació de monòcits, mentre que en LES no s'observa aquesta diferència (Cairns et al., 2001), tot i que en el nostre treball no es veuen diferències. Aquests fets coincideixen amb els resultats trobats en aquest estudi, on s'observa un cop més, un increment en l'expressió de la isoforma en els malalts de LES, que podria afectar a una bona resposta coestimuladora; o pel contrari podria tenir efectes funcionals beneficiosos en incrementar la interacció amb altres cèl·lules, amb el que es veuria augmentada la senyalització de la resta de molècules coestimuladores.

A manera de conclusió, l'estudi fet amb pacients de LES i AR ha mostrat diferències molt interessants quant a l'expressió de la isoforma de CD84\_Δ5,6, descrita per primer cop en aquest treball. En termes generals, s'ha vist un augment de l'expressió de CD84\_Δ5,6 en totes les subpoblacions estudiades de malalts de LES, resultat que coincideix a un estat d'activació en els estudis *in vitro*. En AR en canvi, els resultats assenyalen una tendència contrària en algunes subpoblacions. Una possible explicació podria ser que la presència de més CD84\_Δ5,6 a la membrana fa que, encara que la proteïna no sigui funcionalment activa a nivell de senyalització intracel·lular, produeixi més adhesió i per tant afavoreixi la senyalització d'altres molècules coestimuladores, donant lloc a una hiperactivació del sistema immune (veure figura

55). Calen però, més estudis enfocats a desvetllar les conseqüències funcionals que la presència/absència d'aquesta proteïna podria tenir en el desenvolupament de l'autoimmunitat.

La conclusió final que es pot extreure d'aquest treball és que hi ha indicis que demostren que CD84 i les seves isoformes podrien tenir un paper important en el trencament de la tolerància i el desenvolupament de l'autoimmunitat. Les dues malalties estudiades, LES i AR, han donat resultats oposats. D'una banda en LES, l'expressió més elevada de la isoforma en cèl·lules naïve podria indicar que CD84 és un factor de susceptibilitat en el desenvolupament d'aquesta malaltia. D'altra banda, en AR no s'observa diferència d'expressió en els malalts sense tractament, mentre que el grup tractat en fase de la malaltia no activa presenta un increment de la proporció entre la proteïna total i la isoforma, suggerint que CD84 podria ser un biomarcador en el tractament de l'artritis.



**FIGURA 55:** Esquema de la presentació antigènica. En una situació normal (A), les proteïnes d'ambdós tipus cel·lulars interaccionen donant lloc al desencadenament de senyals intracel·lulars per dur a terme la resposta antigènica. En el cas que la isoforma CD84\_D5,6 es sobreexpressés a la membrana d'aquestes cèl·lules (B), la sinapsi immunològica seria més forta, el que produiria més senyalització de la resta de proteïnes, i per tant un estat cel·lular activat, tal i com es veu en el LES.

## VIII. CONCLUSIONS







1. El gen CD84 compta amb almenys 4 transcrits, que corresponen a CD84\_FL, CD84\_Δ2,5, CD84\_Δ5 i CD84\_Δ5,6 i que s'expressen de forma diferencial en els diferents llinatges hematopoètics de cèl·lules B, T i cèl·lules mieloides.
2. La variant majoritària no correspon a la proteïna íntegra, sinó a la isoforma CD84\_Δ5.
3. El transcrit CD84\_Δ5,6 presenta una expressió més elevada a nivell gènic amb l'activació en limfòcits T i B.
4. L'expressió del transcrit CD84\_Δ2,5 no va ser detectada a nivell de proteïna.
5. S'ha produït i validat un anticòs que permet detectar la isoforma CD84\_Δ5,6 per citometria de flux.
6. Les subpoblacions de cèl·lules NK i monòcits són les que tenen una expressió de CD84\_Δ5,6 més elevada en relació a la proteïna total.
7. Una expressió elevada de la isoforma CD84\_Δ5,6 es correspon amb un estat activat de les cèl·lules T i B.
8. La isoforma CD84\_Δ5,6 no pot establir senyals coestimulatòries que involucren la secreció d'IL-2.
9. La isoforma CD84\_Δ5,6 té un defecte en la internalització.
10. L'estudi amb pacients de LES mostren una expressió de CD84\_Δ5,6 augmentada en totes les subpoblacions estudiades, respecte les subpoblacions de voluntaris sans. Això es tradueix en un valor de la proporció CD84/ CD84\_Δ5,6 més baix pel cas dels malalts de LES. Les subpoblacions en les que aquest efecte és més significatiu són les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> memòria, NKT i monòcits.
11. L'estudi amb pacients d'AR no mostra, en termes generals, diferències importants respecte els voluntaris sans. Les diferències més significatives es donen amb un grup de pacients amb tractament, els quals mostren nivells més baixos de la isoforma CD84\_Δ5,6.
12. CD84 i les seves isoformes podrien tenir un paper important en el trencament de la tolerància i el desenvolupament de l'autoimmunitat. En el cas del LES, l'expressió més elevada d la isoforma en cèl·lules naïve podria indicar que CD84 és un factor de susceptibilitat en el desenvolupament d'aquesta malaltia. En AR en canvi, la diferència més significativa es troba en els malalts que estan rebent tractament, el que indica que CD84 podria ser emprat com un biomarcador en el tractament d'aquesta malaltia.



## IX. BIBLIOGRAFIA





- Ahern, D.J., and F.M. Brennan. 2011. The role of Natural Killer cells in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: major contributors or essential homeostatic modulators? *Immunology letters* 136:115-121.
- Alexander, D., M. Shiroo, A. Robinson, M. Biffen, and E. Shivan. 1992. The role of CD45 in T-cell activation--resolving the paradoxes? *Immunology today* 13:477-481.
- Almeida Gonzalez, D., A. Cabrera de Leon, C. Rodriguez Perez Mdel, B. Brito Diaz, A. Gonzalez Hernandez, D. Garcia Garcia, C. Vazquez Moncholi, and A. Aguirre Jaime. 2010. Efficiency of different strategies to detect autoantibodies to extractable nuclear antigens. *Journal of immunological methods* 360:89-95.
- Alonzo, E.S., R.A. Gottschalk, J. Das, T. Egawa, R.M. Hobbs, P.P. Pandolfi, P. Pereira, K.E. Nichols, G.A. Koretzky, M.S. Jordan, and D.B. Sant'Angelo. 2010. Development of promyelocytic zinc finger and ThPOK-expressing innate gamma delta T cells is controlled by strength of TCR signaling and Id3. *J Immunol* 184:1268-1279.
- Alt, F.W., A.L. Bothwell, M. Knapp, E. Siden, E. Mather, M. Koshland, and D. Baltimore. 1980. Synthesis of secreted and membrane-bound immunoglobulin mu heavy chains is directed by mRNAs that differ at their 3' ends. *Cell* 20:293-301.
- Alvarez-Errico, D., I. Oliver-Vila, E. Ainsua-Enrich, A.M. Gilfillan, C. Picado, J. Sayos, and M. Martin. 2011. CD84 negatively regulates IgE high-affinity receptor signaling in human mast cells. *J Immunol* 187:5577-5586.
- Arbuckle, M.R., M.T. McClain, M.V. Rubertone, R.H. Scofield, G.J. Dennis, J.A. James, and J.B. Harley. 2003. Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *The New England journal of medicine* 349:1526-1533.
- Arch, R., K. Wirth, M. Hofmann, H. Ponta, S. Matzku, P. Herrlich, and M. Zoller. 1992. Participation in normal immune responses of a metastasis-inducing splice variant of CD44. *Science* 257:682-685.
- Assarsson, E., T. Kambayashi, C.M. Persson, B.J. Chambers, and H.G. Ljunggren. 2005. 2B4/CD48-mediated regulation of lymphocyte activation and function. *J Immunol* 175:2045-2049.
- Assarsson, E., T. Kambayashi, J.D. Schatzle, S.O. Cramer, A. von Bonin, P.E. Jensen, H.G. Ljunggren, and B.J. Chambers. 2004. NK cells stimulate proliferation of T and NK cells through 2B4/CD48 interactions. *J Immunol* 173:174-180.
- Astorga, G.P. 1969. Immunological studies of an experimental chronic arthritis resembling rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* 12:589-596.
- Aversa, G., C.C. Chang, J.M. Carballido, B.G. Cocks, and J.E. de Vries. 1997. Engagement of the signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) on activated T cells results in IL-2-independent, cyclosporin A-sensitive T cell proliferation and IFN-gamma production. *J Immunol* 158:4036-4044.
- Bacchetta, R., E. Gambineri, and M.G. Roncarolo. 2007. Role of regulatory T cells and FOXP3 in human diseases. *The Journal of allergy and clinical immunology* 120:227-235; quiz 236-227.
- Bach, J.F. 2005. Infections and autoimmune diseases. *Journal of autoimmunity* 25 Suppl:74-80.
- Baev, D.V., S. Caielli, F. Ronchi, M. Coccia, F. Facciotti, K.E. Nichols, and M. Falcone. 2008. Impaired SLAM-SLAM homotypic interaction between invariant NKT cells and dendritic cells affects differentiation of IL-4/IL-10-secreting NKT2 cells in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 181:869-877.
- Balandraud, N., J. Roudier, and C. Roudier. 2004. Epstein-Barr virus and rheumatoid arthritis. *Autoimmunity reviews* 3:362-367.
- Bannister, K.M., J. Hay, A.R. Clarkson, and A.J. Woodroffe. 1984. Fc-specific reticulo-endothelial clearance in systemic lupus erythematosus and glomerulonephritis. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 3:287-292.
- Baorto, D.M., Z. Gao, R. Malaviya, M.L. Dustin, A. van der Merwe, D.M. Lublin, and S.N. Abraham. 1997. Survival of FimH-expressing enterobacteria in macrophages relies on glycolipid traffic. *Nature* 389:636-639.

- Barclay, A.N. 1999. Ig-like domains: evolution from simple interaction molecules to sophisticated antigen recognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:14672-14674.
- Barclay, A.N. 2003. Membrane proteins with immunoglobulin-like domains--a master superfamily of interaction molecules. *Seminars in immunology* 15:215-223.
- Bartolazzi, A., D. Jackson, K. Bennett, A. Aruffo, R. Dickinson, J. Shields, N. Whittle, and I. Stamenkovic. 1995. Regulation of growth and dissemination of a human lymphoma by CD44 splice variants. *Journal of cell science* 108 ( Pt 4):1723-1733.
- Benzeno, S., G. Narla, J. Allina, G.Z. Cheng, H.L. Reeves, M.S. Banck, J.A. Odin, J.A. Diehl, D. Germain, and S.L. Friedman. 2004. Cyclin-dependent kinase inhibition by the KLF6 tumor suppressor protein through interaction with cyclin D1. *Cancer research* 64:3885-3891.
- Berger, S.B., X. Romero, C. Ma, G. Wang, W.A. Faubion, G. Liao, E. Compeer, M. Keszei, L. Rameh, N. Wang, M. Boes, J.R. Regueiro, H.C. Reinecker, and C. Terhorst. 2010. SLAM is a microbial sensor that regulates bacterial phagosome functions in macrophages. *Nature immunology* 11:920-927.
- Berzins, S.P., M.J. Smyth, and A.G. Baxter. 2011. Presumed guilty: natural killer T cell defects and human disease. *Nature reviews. Immunology* 11:131-142.
- Binsky-Ehrenreich, I., A. Marom, M.C. Sobotta, L. Shvidel, A. Berrebi, I. Hazan-Halevy, S. Kay, A. Aleshin, I. Sagi, D.M. Goldenberg, L. Leng, R. Bucala, Y. Herishanu, M. Haran, and I. Shachar. 2013. CD84 is a survival receptor for CLL cells. *Oncogene*
- Black, D.L. 2003. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem* 72:291-336.
- Bock, T., D. Bausch-Fluck, A. Hofmann, and B. Wollscheid. 2012. CD proteome and beyond - technologies for targeting the immune cell surfaceome. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 17:1599-1612.
- Boles, K.S., and P.A. Mathew. 2001. Molecular cloning of CS1, a novel human natural killer cell receptor belonging to the CD2 subset of the immunoglobulin superfamily. *Immunogenetics* 52:302-307.
- Bombardier, C., D.D. Gladman, M.B. Urowitz, D. Caron, and C.H. Chang. 1992. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. *Arthritis and rheumatism* 35:630-640.
- Bottino, C., M. Falco, S. Parolini, E. Marcenaro, R. Augugliaro, S. Sivori, E. Landi, R. Biassoni, L.D. Notarangelo, L. Moretta, and A. Moretta. 2001. NTB-A [correction of GNTB-A], a novel SH2D1A-associated surface molecule contributing to the inability of natural killer cells to kill Epstein-Barr virus-infected B cells in X-linked lymphoproliferative disease. *The Journal of experimental medicine* 194:235-246.
- Bouchon, A., M. Cella, H.L. Grierson, J.I. Cohen, and M. Colonna. 2001. Activation of NK cell-mediated cytotoxicity by a SAP-independent receptor of the CD2 family. *J Immunol* 167:5517-5521.
- Breitfeld, D., L. Ohl, E. Kremmer, J. Ellwart, F. Sallusto, M. Lipp, and R. Forster. 2000. Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *The Journal of experimental medicine* 192:1545-1552.
- Brown, E.E., J.C. Edberg, and R.P. Kimberly. 2007. Fc receptor genes and the systemic lupus erythematosus diathesis. *Autoimmunity* 40:567-581.
- Brown, M.H., K. Boles, P.A. van der Merwe, V. Kumar, P.A. Mathew, and A.N. Barclay. 1998. 2B4, the natural killer and T cell immunoglobulin superfamily surface protein, is a ligand for CD48. *The Journal of experimental medicine* 188:2083-2090.
- Bryceson, Y.T., M.E. March, H.G. Ljunggren, and E.O. Long. 2006. Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood* 107:159-166.
- Byrne, J.C., J. Ni Gabhann, E. Lazzari, R. Mahony, S. Smith, K. Stacey, C. Wynne, and C.A. Jefferies. 2012. Genetics of SLE: functional relevance for monocytes/macrophages in disease. *Clinical & developmental immunology* 2012:582352.

- Cabezon, R., J. Sintes, L. Llinas, and D. Benitez-Ribas. 2011. Analysis of HLDA9 mAbs on plasmacytoid dendritic cells. *Immunology letters* 134:167-173.
- Cairns, A.P., A.D. Crockard, J.R. McConnell, P.A. Courtney, and A.L. Bell. 2001. Reduced expression of CD44 on monocytes and neutrophils in systemic lupus erythematosus: relations with apoptotic neutrophils and disease activity. *Annals of the rheumatic diseases* 60:950-955.
- Calpe, S., N. Wang, X. Romero, S.B. Berger, A. Lanyi, P. Engel, and C. Terhorst. 2008. The SLAM and SAP gene families control innate and adaptive immune responses. *Advances in immunology* 97:177-250.
- Cannons, J.L., S.G. Tangye, and P.L. Schwartzberg. 2010. SLAM family receptors and SAP adaptors in immunity. *Annual review of immunology* 29:665-705.
- Cannons, J.L., L.J. Yu, B. Hill, L.A. Mijares, D. Dombroski, K.E. Nichols, A. Antonellis, G.A. Koretzky, K. Gardner, and P.L. Schwartzberg. 2004. SAP regulates T(H)2 differentiation and PKC-theta-mediated activation of NF-kappaB1. *Immunity* 21:693-706.
- Cao, E., U.A. Ramagopal, A. Fedorov, E. Fedorov, Q. Yan, J.W. Lary, J.L. Cole, S.G. Nathenson, and S.C. Almo. 2006. NTB-A receptor crystal structure: insights into homophilic interactions in the signaling lymphocytic activation molecule receptor family. *Immunity* 25:559-570.
- Cappione, A., 3rd, J.H. Anolik, A. Pugh-Bernard, J. Barnard, P. Dutcher, G. Silverman, and I. Sanz. 2005. Germinal center exclusion of autoreactive B cells is defective in human systemic lupus erythematosus. *The Journal of clinical investigation* 115:3205-3216.
- Carmona, L., M. Cross, B. Williams, M. Lassere, and L. March. 2010. Rheumatoid arthritis. *Best practice & research. Clinical rheumatology* 24:733-745.
- Cocks, B.G., C.C. Chang, J.M. Carballido, H. Yssel, J.E. de Vries, and G. Aversa. 1995. A novel receptor involved in T-cell activation. *Nature* 376:260-263.
- Conigliaro, P., R. Scrivo, G. Valesini, and R. Perricone. 2011. Emerging role for NK cells in the pathogenesis of inflammatory arthropathies. *Autoimmunity reviews* 10:577-581.
- Cooles, F.A., J.D. Isaacs, and A.E. Anderson. 2013. Treg cells in rheumatoid arthritis: an update. *Current rheumatology reports* 15:352.
- Cope, A.P., H. Schulze-Koops, and M. Aringer. 2007. The central role of T cells in rheumatoid arthritis. *Clinical and experimental rheumatology* 25:S4-11.
- Costantino, C.M., C.M. Baecher-Allan, and D.A. Hafler. 2008. Human regulatory T cells and autoimmunity. *European journal of immunology* 38:921-924.
- Crispin, J.C., C.M. Hedrich, and G.C. Tsokos. 2013. Gene-function studies in systemic lupus erythematosus. *Nature reviews. Rheumatology* 9:476-484.
- Crispin, J.C., B.T. Keenan, M.D. Finnell, B.L. Bermas, P. Schur, E. Massarotti, E.W. Karlson, L.M. Fitzgerald, S. Ergin, V.C. Kyttaris, G.C. Tsokos, and K.H. Costenbader. 2010a. Expression of CD44 variant isoforms CD44v3 and CD44v6 is increased on T cells from patients with systemic lupus erythematosus and is correlated with disease activity. *Arthritis and rheumatism* 62:1431-1437.
- Crispin, J.C., S.N. Liossis, K. Kis-Toth, L.A. Lieberman, V.C. Kyttaris, Y.T. Juang, and G.C. Tsokos. 2010b. Pathogenesis of human systemic lupus erythematosus: recent advances. *Trends in molecular medicine* 16:47-57.
- Crispin, J.C., A. Martinez, and J. Alcocer-Varela. 2003. Quantification of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Journal of autoimmunity* 21:273-276.
- Crispin, J.C., M. Oukka, G. Bayliss, R.A. Cohen, C.A. Van Beek, I.E. Stillman, V.C. Kyttaris, Y.T. Juang, and G.C. Tsokos. 2008. Expanded double negative T cells in patients with systemic lupus erythematosus produce IL-17 and infiltrate the kidneys. *J Immunol* 181:8761-8766.
- Crotty, S., E.N. Kersh, J. Cannons, P.L. Schwartzberg, and R. Ahmed. 2003. SAP is required for generating long-term humoral immunity. *Nature* 421:282-287.
- Cui, J., E.A. Stahl, S. Saevarsdottir, C. Miceli, D. Diogo, G. Trynka, T. Raj, M.U. Mirkov, H. Canhao, K. Ikari, C. Terao, Y. Okada, S. Wedren, J. Askling, H. Yamanaka, S. Momohara, A. Taniguchi, K. Ohmura, F. Matsuda, T. Mimori, N. Gupta, M. Kuchroo, A.W. Morgan, J.D. Isaacs, A.G.



- Wilson, K.L. Hyrich, M. Herenius, M.E. Doorenspleet, P.P. Tak, J.B. Crusius, I.E. van der Horst-Bruinsma, G.J. Wolbink, P.L. van Riel, M. van de Laar, H.J. Guchelaar, N.A. Shadick, C.F. Allaart, T.W. Huizinga, R.E. Toes, R.P. Kimberly, S.L. Bridges, Jr., L.A. Criswell, L.W. Moreland, J.E. Fonseca, N. de Vries, B.E. Stranger, P.L. De Jager, S. Raychaudhuri, M.E. Weinblatt, P.K. Gregersen, X. Mariette, A. Barton, L. Padyukov, M.J. Coenen, E.W. Karlson, and R.M. Plenge. 2013. Genome-wide association study and gene expression analysis identifies CD84 as a predictor of response to etanercept therapy in rheumatoid arthritis. *PLoS genetics* 9:e1003394.
- Cunninghame Graham, D.S., T.J. Vyse, P.R. Fortin, A. Montpetit, Y.C. Cai, S. Lim, T. McKenzie, L. Farwell, B. Rhodes, L. Chad, T.J. Hudson, A. Sharpe, C. Terhorst, C.M. Greenwood, J. Wither, and J.D. Rioux. 2008. Association of LY9 in UK and Canadian SLE families. *Genes and immunity* 9:93-102.
- Cvetanovich, G.L., and D.A. Hafler. 2010. Human regulatory T cells in autoimmune diseases. *Current opinion in immunology* 22:753-760.
- Chatterjee, M., T. Rauen, K. Kis-Toth, V.C. Kytтары, C.M. Hedrich, C. Terhorst, and G.C. Tsokos. 2012. Increased expression of SLAM receptors SLAMF3 and SLAMF6 in systemic lupus erythematosus T lymphocytes promotes Th17 differentiation. *J Immunol* 188:1206-1212.
- Chattopadhyay, K., E. Lazar-Molnar, Q. Yan, R. Rubinstein, C. Zhan, V. Vigdorovich, U.A. Ramagopal, J. Bonanno, S.G. Nathenson, and S.C. Almo. 2009. Sequence, structure, function, immunity: structural genomics of costimulation. *Immunological reviews* 229:356-386.
- Chen, J., J. Li, H. Gao, C. Wang, J. Luo, Z. Lv, and X. Li. 2012. Comprehensive evaluation of different T-helper cell subsets differentiation and function in rheumatoid arthritis. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2012:535361.
- Chen, L. 2004. Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. *Nature reviews. Immunology* 4:336-347.
- Chtanova, T., S.G. Tangye, R. Newton, N. Frank, M.R. Hodge, M.S. Rolph, and C.R. Mackay. 2004. T follicular helper cells express a distinctive transcriptional profile, reflecting their role as non-Th1/Th2 effector cells that provide help for B cells. *J Immunol* 173:68-78.
- Chung, B., A. Aoukaty, J. Dutz, C. Terhorst, and R. Tan. 2005. Signaling lymphocytic activation molecule-associated protein controls NKT cell functions. *J Immunol* 174:3153-3157.
- D'Souza, I., P. Poorkaj, M. Hong, D. Nochlin, V.M. Lee, T.D. Bird, and G.D. Schellenberg. 1999. Missense and silent tau gene mutations cause frontotemporal dementia with parkinsonism-chromosome 17 type, by affecting multiple alternative RNA splicing regulatory elements. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:5598-5603.
- de la Fuente, M.A., P. Pizcueta, M. Nadal, J. Bosch, and P. Engel. 1997. CD84 leukocyte antigen is a new member of the Ig superfamily. *Blood* 90:2398-2405.
- de la Fuente, M.A., V. Tovar, P. Pizcueta, M. Nadal, J. Bosch, and P. Engel. 1999. Molecular cloning, characterization, and chromosomal localization of the mouse homologue of CD84, a member of the CD2 family of cell surface molecules. *Immunogenetics* 49:249-255.
- De Salort, J., J. Sintes, L. Llinas, J. Matesanz-Isabel, and P. Engel. 2011. Expression of SLAM (CD150) cell-surface receptors on human B-cell subsets: from pro-B to plasma cells. *Immunology letters* 134:129-136.
- Deenick, E.K., A. Chan, C.S. Ma, D. Gatto, P.L. Schwartzberg, R. Brink, and S.G. Tangye. 2010. Follicular helper T cell differentiation requires continuous antigen presentation that is independent of unique B cell signaling. *Immunity* 33:241-253.
- Del Valle, J.M., P. Engel, and M. Martin. 2003. The cell surface expression of SAP-binding receptor CD229 is regulated via its interaction with clathrin-associated adaptor complex 2 (AP-2). *The Journal of biological chemistry* 278:17430-17437.

- Detre, C., M. Keszei, X. Romero, G.C. Tsokos, and C. Terhorst. 2010. SLAM family receptors and the SLAM-associated protein (SAP) modulate T cell functions. *Seminars in immunopathology* 32:157-171.
- Diaz-Ramos, M.C., P. Engel, and R. Bastos. 2011. Towards a comprehensive human cell-surface immunome database. *Immunology letters* 134:183-187.
- Ding, S., Y. Liang, M. Zhao, G. Liang, H. Long, S. Zhao, Y. Wang, H. Yin, P. Zhang, Q. Zhang, and Q. Lu. 2012. Decreased microRNA-142-3p/5p expression causes CD4+ T cell activation and B cell hyperstimulation in systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism* 64:2953-2963.
- Ding, Y., X. Ju, M. Azlan, D.N. Hart, and G.J. Clark. 2011. Screening of the HLDA9 panel on peripheral blood dendritic cell populations. *Immunology letters* 134:161-166.
- Douglas, A.G., and M.J. Wood. 2011. RNA splicing: disease and therapy. *Briefings in functional genomics* 10:151-164.
- Duan, B., and L. Morel. 2006. Role of B-1a cells in autoimmunity. *Autoimmunity reviews* 5:403-408.
- Dupre, L., G. Andolfi, S.G. Tangye, R. Clementi, F. Locatelli, M. Arico, A. Aiuti, and M.G. Roncarolo. 2005. SAP controls the cytolytic activity of CD8+ T cells against EBV-infected cells. *Blood* 105:4383-4389.
- Ehrenstein, M.R., J.G. Evans, A. Singh, S. Moore, G. Warnes, D.A. Isenberg, and C. Mauri. 2004. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy. *The Journal of experimental medicine* 200:277-285.
- Eisterer, W., O. Bechter, W. Hilbe, M. van Driel, H.M. Lokhorst, J. Thaler, A.C. Bloem, U. Gunthert, and R. Stauder. 2001. CD44 isoforms are differentially regulated in plasma cell dyscrasias and CD44v9 represents a new independent prognostic parameter in multiple myeloma. *Leukemia research* 25:1051-1057.
- Engel, P., M.J. Eck, and C. Terhorst. 2003. The SAP and SLAM families in immune responses and X-linked lymphoproliferative disease. *Nature reviews. Immunology* 3:813-821.
- Erickson, L.D., B.G. Durell, L.A. Vogel, B.P. O'Connor, M. Cascalho, T. Yasui, H. Kikutani, and R.J. Noelle. 2002. Short-circuiting long-lived humoral immunity by the heightened engagement of CD40. *The Journal of clinical investigation* 109:613-620.
- Evsyukova, I., J.A. Somarelli, S.G. Gregory, and M.A. Garcia-Blanco. 2010. Alternative splicing in multiple sclerosis and other autoimmune diseases. *RNA biology* 7:462-473.
- Ezponda, T., M.J. Pajares, J. Agorreta, J.I. Echeveste, J.M. Lopez-Picazo, W. Torre, R. Pio, and L.M. Montuenga. 2010. The oncoprotein SF2/ASF promotes non-small cell lung cancer survival by enhancing survivin expression. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 16:4113-4125.
- Falco, M., E. Marcenaro, E. Romeo, F. Bellora, D. Marras, F. Vely, G. Ferracci, L. Moretta, A. Moretta, and C. Bottino. 2004. Homophilic interaction of NTBA, a member of the CD2 molecular family: induction of cytotoxicity and cytokine release in human NK cells. *European journal of immunology* 34:1663-1672.
- Fennelly, J.A., B. Tiwari, S.J. Davis, and E.J. Evans. 2001. CD2F-10: a new member of the CD2 subset of the immunoglobulin superfamily. *Immunogenetics* 53:599-602.
- Filipovich, A.H., K. Zhang, A.L. Snow, and R.A. Marsh. 2010. X-linked lymphoproliferative syndromes: brothers or distant cousins? *Blood* 116:3398-3408.
- Finerty, P.J., Jr., R. Muhandiram, and J.D. Forman-Kay. 2002. Side-chain dynamics of the SAP SH2 domain correlate with a binding hot spot and a region with conformational plasticity. *Journal of molecular biology* 322:605-620.
- Fischer, D.C., K. Noack, I.B. Runnebaum, D.O. Watermann, D.G. Kieback, S. Stamm, and E. Stickeler. 2004. Expression of splicing factors in human ovarian cancer. *Oncology reports* 11:1085-1090.
- Flaig, R.M., S. Stark, and C. Watzl. 2004. Cutting edge: NTB-A activates NK cells via homophilic interaction. *J Immunol* 172:6524-6527.

- Floto, R.A., M.R. Clatworthy, K.R. Heilbronn, D.R. Rosner, P.A. MacAry, A. Rankin, P.J. Lehner, W.H. Ouwehand, J.M. Allen, N.A. Watkins, and K.G. Smith. 2005. Loss of function of a lupus-associated FcγRIIb polymorphism through exclusion from lipid rafts. *Nature medicine* 11:1056-1058.
- Fox, S.B., J. Fawcett, D.G. Jackson, I. Collins, K.C. Gatter, A.L. Harris, A. Gearing, and D.L. Simmons. 1994. Normal human tissues, in addition to some tumors, express multiple different CD44 isoforms. *Cancer research* 54:4539-4546.
- Fraser, C.C., D. Howie, M. Morra, Y. Qiu, C. Murphy, Q. Shen, J.C. Gutierrez-Ramos, A. Coyle, G.A. Kingsbury, and C. Terhorst. 2002. Identification and characterization of SF2000 and SF2001, two new members of the immune receptor SLAM/CD2 family. *Immunogenetics* 53:843-850.
- Gaipl, U.S., L.E. Munoz, G. Grossmayer, K. Lauber, S. Franz, K. Sarter, R.E. Voll, T. Winkler, A. Kuhn, J. Kalden, P. Kern, and M. Herrmann. 2007. Clearance deficiency and systemic lupus erythematosus (SLE). *Journal of autoimmunity* 28:114-121.
- Gao, L., J. Wang, Y. Wang, and A. Andreadis. 2007. SR protein 9G8 modulates splicing of tau exon 10 via its proximal downstream intron, a clustering region for frontotemporal dementia mutations. *Molecular and cellular neurosciences* 34:48-58.
- Garni-Wagner, B.A., A. Purohit, P.A. Mathew, M. Bennett, and V. Kumar. 1993. A novel function-associated molecule related to non-MHC-restricted cytotoxicity mediated by activated natural killer cells and T cells. *Journal of Immunology* 151:60-70.
- Gillett, A., K. Maratou, C. Fewings, R.A. Harris, M. Jagodic, T. Aitman, and T. Olsson. 2009. Alternative splicing and transcriptome profiling of experimental autoimmune encephalomyelitis using genome-wide exon arrays. *PLoS one* 4:e7773.
- Gomez-Martin, D., M. Diaz-Zamudio, G. Vanoye, J.C. Crispin, and J. Alcocer-Varela. 2011. Quantitative and functional profiles of CD4+ lymphocyte subsets in systemic lupus erythematosus patients with lymphopenia. *Clinical and experimental immunology* 164:17-25.
- Gonzalez-Cabrero, J., C.J. Wise, Y. Latchman, G.J. Freeman, A.H. Sharpe, and H. Reiser. 1999. CD48-deficient mice have a pronounced defect in CD4(+) T cell activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:1019-1023.
- Goodnow, C.C., J. Sprent, B. Fazekas de St Groth, and C.G. Vinuesa. 2005. Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature* 435:590-597.
- Goodnow, C.C., C.G. Vinuesa, K.L. Randall, F. Mackay, and R. Brink. 2010. Control systems and decision making for antibody production. *Nature immunology* 11:681-688.
- Graham, D.B., M.P. Bell, M.M. McCausland, C.J. Huntoon, J. van Deursen, W.A. Faubion, S. Crotty, and D.J. Mckean. 2006. Ly9 (CD229)-deficient mice exhibit T cell defects yet do not share several phenotypic characteristics associated with SLAM- and SAP-deficient mice. *J Immunol* 176:291-300.
- Griewank, K., C. Borowski, S. Rietdijk, N. Wang, A. Julien, D.G. Wei, A.A. Mamchak, C. Terhorst, and A. Bendelac. 2007. Homotypic interactions mediated by Slamf1 and Slamf6 receptors control NKT cell lineage development. *Immunity* 27:751-762.
- Griffin, D.O., and T.L. Rothstein. 2011. A small CD11b(+) human B1 cell subpopulation stimulates T cells and is expanded in lupus. *The Journal of experimental medicine* 208:2591-2598.
- Grigoryev, Y.A., S.M. Kurian, A.A. Nakorchevskiy, J.P. Burke, D. Campbell, S.R. Head, J. Deng, A.B. Kantor, J.R. Yates, 3rd, and D.R. Salomon. 2009. Genome-wide analysis of immune activation in human T and B cells reveals distinct classes of alternatively spliced genes. *PLoS one* 4:e7906.
- Guerra, S.G., T.J. Vyse, and D.S. Cunninghame Graham. 2012. The genetics of lupus: a functional perspective. *Arthritis research & therapy* 14:211.
- Gunthert, U., M. Hofmann, W. Rudy, S. Reber, M. Zoller, I. Hausmann, S. Matzku, A. Wenzel, H. Ponta, and P. Herrlich. 1991. A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell* 65:13-24.

- Hagberg, N., J. Theorell, H. Schlums, M.L. Eloranta, Y.T. Bryceson, and L. Ronnblom. 2013. Systemic Lupus Erythematosus Immune Complexes Increase the Expression of SLAM Family Members CD319 (CRACC) and CD229 (LY-9) on Plasmacytoid Dendritic Cells and CD319 on CD56dim NK Cells. *J Immunol* 191:2989-2998.
- Halaby, D.M., and J.P. Mornon. 1998. The immunoglobulin superfamily: an insight on its tissular, species, and functional diversity. *Journal of molecular evolution* 46:389-400.
- Halaby, D.M., A. Poupon, and J. Mornon. 1999. The immunoglobulin fold family: sequence analysis and 3D structure comparisons. *Protein engineering* 12:563-571.
- Harley, I.T., K.M. Kaufman, C.D. Langefeld, J.B. Harley, and J.A. Kelly. 2009. Genetic susceptibility to SLE: new insights from fine mapping and genome-wide association studies. *Nature reviews. Genetics* 10:285-290.
- Hedrick, S.M., D.I. Cohen, E.A. Nielsen, and M.M. Davis. 1984. Isolation of cDNA clones encoding T cell-specific membrane-associated proteins. *Nature* 308:149-153.
- Henning, G., M.S. Kraft, T. Derfuss, R. Pirzer, G. de Saint-Basile, G. Aversa, B. Fleckenstein, and E. Meinel. 2001. Signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) regulates T cellular cytotoxicity. *European journal of immunology* 31:2741-2750.
- Hepburn, A.L., J.C. Mason, S. Wang, C.J. Shepherd, O. Florey, D.O. Haskard, and K.A. Davies. 2006. Both Fc $\gamma$  and complement receptors mediate transfer of immune complexes from erythrocytes to human macrophages under physiological flow conditions in vitro. *Clinical and experimental immunology* 146:133-145.
- Herlands, R.A., J. William, U. Hershberg, and M.J. Shlomchik. 2007. Anti-chromatin antibodies drive in vivo antigen-specific activation and somatic hypermutation of rheumatoid factor B cells at extrafollicular sites. *European journal of immunology* 37:3339-3351.
- Howie, D., F.S. Laroux, M. Morra, A.R. Satoskar, L.E. Rosas, W.A. Faubion, A. Julien, S. Rietdijk, A.J. Coyle, C. Fraser, and C. Terhorst. 2005. Cutting edge: the SLAM family receptor Ly108 controls T cell and neutrophil functions. *J Immunol* 174:5931-5935.
- Howie, D., S. Okamoto, S. Rietdijk, K. Clarke, N. Wang, C. Gullo, J.P. Bruggeman, S. Manning, A.J. Coyle, E. Greenfield, V. Kuchroo, and C. Terhorst. 2002. The role of SAP in murine CD150 (SLAM)-mediated T-cell proliferation and interferon gamma production. *Blood* 100:2899-2907.
- Hron, J.D., L. Caplan, A.J. Gerth, P.L. Schwartzberg, and S.L. Peng. 2004. SH2D1A regulates T-dependent humoral autoimmunity. *The Journal of experimental medicine* 200:261-266.
- Huck, K., O. Feyen, T. Niehues, F. Ruschendorf, N. Hubner, H.J. Laws, T. Telieps, S. Knapp, H.H. Wacker, A. Meindl, H. Jumaa, and A. Borkhardt. 2009. Girls homozygous for an IL-2-inducible T cell kinase mutation that leads to protein deficiency develop fatal EBV-associated lymphoproliferation. *The Journal of clinical investigation* 119:1350-1358.
- Ichinose, K., Z. Zhang, T. Koga, Y.T. Juang, K. Kis-Toth, A.H. Sharpe, V. Kuchroo, J.C. Crispin, and G.C. Tsokos. 2013. Brief report: increased expression of a short splice variant of CTLA-4 exacerbates lupus in MRL/lpr mice. *Arthritis and rheumatism* 65:764-769.
- Izumi, Y., H. Ida, M. Huang, N. Iwanaga, F. Tanaka, K. Aratake, K. Arima, M. Tamai, M. Kamachi, H. Nakamura, T. Origuchi, A. Kawakami, P. Anderson, and K. Eguchi. 2006. Characterization of peripheral natural killer cells in primary Sjogren's syndrome: impaired NK cell activity and low NK cell number. *The Journal of laboratory and clinical medicine* 147:242-249.
- Jacobsen, M., D. Schweer, A. Ziegler, R. Gaber, S. Schock, R. Schwinzer, K. Wonigeit, R.B. Lindert, O. Kantarci, J. Schaefer-Klein, H.I. Schipper, W.H. Oertel, F. Heidenreich, B.G. Weinschenker, N. Sommer, and B. Hemmer. 2000. A point mutation in PTPRC is associated with the development of multiple sclerosis. *Nature genetics* 26:495-499.
- Jacobson, D.L., S.J. Gange, N.R. Rose, and N.M. Graham. 1997. Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States. *Clinical immunology and immunopathology* 84:223-243.

- Johnson, A.E., C. Gordon, R.G. Palmer, and P.A. Bacon. 1995. The prevalence and incidence of systemic lupus erythematosus in Birmingham, England. Relationship to ethnicity and country of birth. *Arthritis and rheumatism* 38:551-558.
- Kambayashi, T., E. Assarsson, B.J. Chambers, and H.G. Ljunggren. 2001. Cutting edge: Regulation of CD8(+) T cell proliferation by 2B4/CD48 interactions. *J Immunol* 167:6706-6710.
- Kapsogeorgou, E.K., H.M. Moutsopoulos, and M.N. Manoussakis. 2008. A novel B7-2 (CD86) splice variant with a putative negative regulatory role. *J Immunol* 180:3815-3823.
- Karassa, F.B., T.A. Trikalinos, and J.P. Ioannidis. 2003. The Fc gamma RIIIA-F158 allele is a risk factor for the development of lupus nephritis: a meta-analysis. *Kidney international* 63:1475-1482.
- Karni, R., E. de Stanchina, S.W. Lowe, R. Sinha, D. Mu, and A.R. Krainer. 2007. The gene encoding the splicing factor SF2/ASF is a proto-oncogene. *Nature structural & molecular biology* 14:185-193.
- Keszei, M., C. Detre, S.T. Rietdijk, P. Munoz, X. Romero, S.B. Berger, S. Calpe, G. Liao, W. Castro, A. Julien, Y.Y. Wu, D.M. Shin, J. Sancho, M. Zubiaur, H.C. Morse, 3rd, L. Morel, P. Engel, N. Wang, and C. Terhorst. 2011. A novel isoform of the Ly108 gene ameliorates murine lupus. *The Journal of experimental medicine* 208:811-822.
- Kiel, M.J., O.H. Yilmaz, T. Iwashita, C. Terhorst, and S.J. Morrison. 2005. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* 121:1109-1121.
- Kim, J.R., J.N. Chae, S.H. Kim, and J.S. Ha. 2012. Subpopulations of regulatory T cells in rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, and Behcet's disease. *Journal of Korean medical science* 27:1009-1013.
- Kim, J.R., S.O. Mathew, R.K. Patel, R.M. Pertusi, and P.A. Mathew. 2010. Altered expression of signalling lymphocyte activation molecule (SLAM) family receptors CS1 (CD319) and 2B4 (CD244) in patients with systemic lupus erythematosus. *Clinical and experimental immunology* 160:348-358.
- Kingsbury, G.A., L.A. Feeney, Y. Nong, S.A. Calandra, C.J. Murphy, J.M. Corcoran, Y. Wang, M.R. Prabhu Das, S.J. Busfield, C.C. Fraser, and J.L. Valleval. 2001. Cloning, expression, and function of BLAME, a novel member of the CD2 family. *J Immunol* 166:5675-5680.
- Koh, A.E., S.W. Njoroge, M. Feliu, A. Cook, M.K. Selig, Y.E. Latchman, A.H. Sharpe, R.B. Colvin, and E. Paul. 2011. The SLAM family member CD48 (Slamf2) protects lupus-prone mice from autoimmune nephritis. *Journal of autoimmunity* 37:48-57.
- Kohler, G., T. Pearson, and C. Milstein. 1977. Fusion of T and B cells. *Somatic cell genetics* 3:303-312.
- Konig, H., J. Moll, H. Ponta, and P. Herrlich. 1996. Trans-acting factors regulate the expression of CD44 splice variants. *The EMBO journal* 15:4030-4039.
- Korman, B.D., M.I. Alba, J.M. Le, I. Alevizos, J.A. Smith, N.P. Nikolov, D.L. Kastner, E.F. Remmers, and G.G. Illei. 2008. Variant form of STAT4 is associated with primary Sjogren's syndrome. *Genes and immunity* 9:267-270.
- Kreslavsky, T., A.K. Savage, R. Hobbs, F. Gounari, R. Bronson, P. Pereira, P.P. Pandolfi, A. Bendelac, and H. von Boehmer. 2009. TCR-inducible PLZF transcription factor required for innate phenotype of a subset of gammadelta T cells with restricted TCR diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:12453-12458.
- Krishnan, S., B. Chowdhury, and G.C. Tsokos. 2006. Autoimmunity in systemic lupus erythematosus: integrating genes and biology. *Seminars in immunology* 18:230-243.
- Kroeze, W.K., D.J. Sheffler, and B.L. Roth. 2003. G-protein-coupled receptors at a glance. *Journal of cell science* 116:4867-4869.
- Kruetzmann, S., M.M. Rosado, H. Weber, U. Germing, O. Tournilhac, H.H. Peter, R. Berner, A. Peters, T. Boehm, A. Plebani, I. Quinti, and R. Carsetti. 2003. Human immunoglobulin M memory B cells controlling *Streptococcus pneumoniae* infections are generated in the spleen. *The Journal of experimental medicine* 197:939-945.

- Krummel, M.F., and J.P. Allison. 1995. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *The Journal of experimental medicine* 182:459-465.
- Kruse, M., E. Meinl, G. Henning, C. Kuhnt, S. Berchtold, T. Berger, G. Schuler, and A. Steinkasserer. 2001. Signaling lymphocytic activation molecule is expressed on mature CD83+ dendritic cells and is up-regulated by IL-1 beta. *J Immunol* 167:1989-1995.
- Kubin, M.Z., D.L. Parshley, W. Din, J.Y. Waugh, T. Davis-Smith, C.A. Smith, B.M. Macduff, R.J. Armitage, W. Chin, L. Cassiano, L. Borges, M. Petersen, G. Trinchieri, and R.G. Goodwin. 1999. Molecular cloning and biological characterization of NK cell activation-inducing ligand, a counterstructure for CD48. *European journal of immunology* 29:3466-3477.
- Kubota, K., H. Katoh, K. Muguruma, and K. Koyama. 1999. Characterization of a surface membrane molecule expressed by natural killer cells in most inbred mouse strains: monoclonal antibody C9.1 identifies an allelic form of the 2B4 antigen. *Immunology* 96:491-497.
- Kumar, K.R., L. Li, M. Yan, M. Bhaskarabhatla, A.B. Mobley, C. Nguyen, J.M. Mooney, J.D. Schatzle, E.K. Wakeland, and C. Mohan. 2006. Regulation of B cell tolerance by the lupus susceptibility gene Ly108. *Science* 312:1665-1669.
- Kumar, V., and T.L. Delovitch. 2014. Different subsets of natural killer T cells may vary in their roles in health and disease. *Immunology* 142:321-336.
- Kumaresan, P.R., W.C. Lai, S.S. Chuang, M. Bennett, and P.A. Mathew. 2002. CS1, a novel member of the CD2 family, is homophilic and regulates NK cell function. *Molecular immunology* 39:1-8.
- Lafferty, K.J., S.J. Prowse, A. Al-Adra, H.S. Warren, J. Vasalli, and E. Reich. 1980. An improved assay for interleukin 2 (lymphocyte growth factor) produced by mitogen-activated lymphocytes. *The Australian journal of experimental biology and medical science* 58:533-544.
- Lanier, L.L. 1998. NK cell receptors. *Annual review of immunology* 16:359-393.
- Latchman, Y., and H. Reiser. 1998. Enhanced murine CD4+ T cell responses induced by the CD2 ligand CD48. *European journal of immunology* 28:4325-4331.
- Lee, J.K., S.O. Mathew, S.V. Vaidya, P.R. Kumaresan, and P.A. Mathew. 2007a. CS1 (CRACC, CD319) induces proliferation and autocrine cytokine expression on human B lymphocytes. *J Immunol* 179:4672-4678.
- Lee, Y., B. Kim, Y. Shin, S. Nam, P. Kim, N. Kim, W.H. Chung, J. Kim, and S. Lee. 2007b. ECGene: an alternative splicing database update. *Nucleic acids research* 35:D99-103.
- Lewis, J., L.J. Eiben, D.L. Nelson, J.I. Cohen, K.E. Nichols, H.D. Ochs, L.D. Notarangelo, and C.S. Duckett. 2001. Distinct interactions of the X-linked lymphoproliferative syndrome gene product SAP with cytoplasmic domains of members of the CD2 receptor family. *Clin Immunol* 100:15-23.
- Li, C., C. Iosef, C.Y. Jia, V.K. Han, and S.S. Li. 2003. Dual functional roles for the X-linked lymphoproliferative syndrome gene product SAP/SH2D1A in signaling through the signaling lymphocyte activation molecule (SLAM) family of immune receptors. *The Journal of biological chemistry* 278:3852-3859.
- Li, W., M.H. Sofi, S. Rietdijk, N. Wang, C. Terhorst, and C.H. Chang. 2007. The SLAM-associated protein signaling pathway is required for development of CD4+ T cells selected by homotypic thymocyte interaction. *Immunity* 27:763-774.
- Linterman, M.A., R.J. Rigby, R.K. Wong, D. Yu, R. Brink, J.L. Cannons, P.L. Schwartzberg, M.C. Cook, G.D. Walters, and C.G. Vinuesa. 2009. Follicular helper T cells are required for systemic autoimmunity. *The Journal of experimental medicine* 206:561-576.
- Liu, Z., and A. Davidson. 2012. Taming lupus-a new understanding of pathogenesis is leading to clinical advances. *Nature medicine* 18:871-882.
- Lynch, K.W. 2004. Consequences of regulated pre-mRNA splicing in the immune system. *Nature reviews. Immunology* 4:931-940.
- Ma, C.S., K.E. Nichols, and S.G. Tangye. 2007. Regulation of cellular and humoral immune responses by the SLAM and SAP families of molecules. *Annual review of immunology* 25:337-379.

- Magistrelli, G., P. Jeannin, N. Herbault, A. Benoit De Coignac, J.F. Gauchat, J.Y. Bonnefoy, and Y. Delneste. 1999. A soluble form of CTLA-4 generated by alternative splicing is expressed by nonstimulated human T cells. *European journal of immunology* 29:3596-3602.
- Mak, T.W.a.M.S. 2011. Primer to the Immune Response: Academic Cell Update Edition. Academic Cell,
- Markin, R.S., J. Linder, K. Zuerlein, E. Mroczek, H.L. Grierson, B. Brichacek, and D.T. Purtilo. 1987. Hepatitis in fatal infectious mononucleosis. *Gastroenterology* 93:1210-1217.
- Marsh, R.A., L. Madden, B.J. Kitchen, R. Mody, B. McClimon, M.B. Jordan, J.J. Bleesing, K. Zhang, and A.H. Filipovich. 2010. XIAP deficiency: a unique primary immunodeficiency best classified as X-linked familial hemophagocytic lymphohistiocytosis and not as X-linked lymphoproliferative disease. *Blood* 116:1079-1082.
- Martin, M., J.M. Del Valle, I. Saborit, and P. Engel. 2005. Identification of Grb2 as a novel binding partner of the signaling lymphocytic activation molecule-associated protein binding receptor CD229. *J Immunol* 174:5977-5986.
- Martin, M., X. Romero, M.A. de la Fuente, V. Tovar, N. Zapater, E. Esplugues, P. Pizcueta, J. Bosch, and P. Engel. 2001. CD84 functions as a homophilic adhesion molecule and enhances IFN-gamma secretion: adhesion is mediated by Ig-like domain 1. *J Immunol* 167:3668-3676.
- Martinez, A., J. Varade, A. Marquez, M.C. Cenit, L. Espino, N. Perdigones, J.L. Santiago, M. Fernandez-Arquero, H. de la Calle, R. Arroyo, J.L. Mendoza, B. Fernandez-Gutierrez, E.G. de la Concha, and E. Urcelay. 2008. Association of the STAT4 gene with increased susceptibility for some immune-mediated diseases. *Arthritis and rheumatism* 58:2598-2602.
- Mathew, P.A., B.A. Garni-Wagner, K. Land, A. Takashima, E. Stoneman, M. Bennett, and V. Kumar. 1993. Cloning and characterization of the 2B4 gene encoding a molecule associated with non-MHC-restricted killing mediated by activated natural killer cells and T cells. *Journal of Immunology* 151:5328-5337.
- Mathew, S.O., K.K. Rao, J.R. Kim, N.D. Bambard, and P.A. Mathew. 2009. Functional role of human NK cell receptor 2B4 (CD244) isoforms. *European journal of immunology* 39:1632-1641.
- Matlin, A.J., F. Clark, and C.W. Smith. 2005. Understanding alternative splicing: towards a cellular code. *Nature reviews. Molecular cell biology* 6:386-398.
- Meinke, S., and C. Watzl. 2013. NK cell cytotoxicity mediated by 2B4 and NTB-A is dependent on SAP acting downstream of receptor phosphorylation. *Frontiers in immunology* 4:3.
- Merrell, M., and L.E. Shulman. 1955. Determination of prognosis in chronic disease, illustrated by systemic lupus erythematosus. *Journal of chronic diseases* 1:12-32.
- Messmer, B., P. Eissmann, S. Stark, and C. Watzl. 2006. CD48 stimulation by 2B4 (CD244)-expressing targets activates human NK cells. *J Immunol* 176:4646-4650.
- Mikhalap, S.V., L.M. Shlapatska, A.G. Berdova, C.L. Law, E.A. Clark, and S.P. Sidorenko. 1999. CDw150 associates with src-homology 2-containing inositol phosphatase and modulates CD95-mediated apoptosis. *J Immunol* 162:5719-5727.
- Morel, L. 2010. Genetics of SLE: evidence from mouse models. *Nature reviews. Rheumatology* 6:348-357.
- Morra, M., J. Lu, F. Poy, M. Martin, J. Sayos, S. Calpe, C. Gullo, D. Howie, S. Rietdijk, A. Thompson, A.J. Coyle, C. Denny, M.B. Yaffe, P. Engel, M.J. Eck, and C. Terhorst. 2001. Structural basis for the interaction of the free SH2 domain EAT-2 with SLAM receptors in hematopoietic cells. *The EMBO journal* 20:5840-5852.
- Moser, G., B. Tier, R.E. Crump, M.S. Khatkar, and H.W. Raadsma. 2009. A comparison of five methods to predict genomic breeding values of dairy bulls from genome-wide SNP markers. *Genetics, selection, evolution : GSE* 41:56.
- Moulton, V.R., and G.C. Tsokos. 2011. Abnormalities of T cell signaling in systemic lupus erythematosus. *Arthritis research & therapy* 13:207.
- Moura, R.A., R. Cascao, I. Perpetuo, H. Canhao, E. Vieira-Sousa, A.F. Mourao, A.M. Rodrigues, J. Polido-Pereira, M.V. Queiroz, H.S. Rosario, M.M. Souto-Carneiro, L. Graca, and J.E. Fonseca.

2011. Cytokine pattern in very early rheumatoid arthritis favours B-cell activation and survival. *Rheumatology (Oxford)* 50:278-282.
- Moura, R.A., P. Weinmann, P.A. Pereira, J. Caetano-Lopes, H. Canhao, E. Sousa, A.F. Mourao, A.M. Rodrigues, M.V. Queiroz, M.M. Souto-Carneiro, L. Graca, and J.E. Fonseca. 2010. Alterations on peripheral blood B-cell subpopulations in very early arthritis patients. *Rheumatology (Oxford)* 49:1082-1092.
- Munitz, A., I. Bachelet, S. Fraenkel, G. Katz, O. Mandelboim, H.U. Simon, L. Moretta, M. Colonna, and F. Levi-Schaffer. 2005. 2B4 (CD244) is expressed and functional on human eosinophils. *J Immunol* 174:110-118.
- Nagy, N., K. Mattsson, A. Maeda, A. Liu, L. Szekely, and E. Klein. 2002. The X-linked lymphoproliferative disease gene product SAP is expressed in activated T and NK cells. *Immunology letters* 82:141-147.
- Nakajima, H., M. Cella, H. Langen, A. Friedlein, and M. Colonna. 1999. Activating interactions in human NK cell recognition: the role of 2B4-CD48. *European journal of immunology* 29:1676-1683.
- Nanda, N., P. Andre, M. Bao, K. Clauser, F. Deguzman, D. Howie, P.B. Conley, C. Terhorst, and D.R. Phillips. 2005. Platelet aggregation induces platelet aggregate stability via SLAM family receptor signaling. *Blood* 106:3028-3034.
- Nath, S.K., S. Han, X. Kim-Howard, J.A. Kelly, P. Viswanathan, G.S. Gilkeson, W. Chen, C. Zhu, R.P. McEver, R.P. Kimberly, M.E. Alarcon-Riquelme, T.J. Vyse, Q.Z. Li, E.K. Wakeland, J.T. Merrill, J.A. James, K.M. Kaufman, J.M. Guthridge, and J.B. Harley. 2008. A nonsynonymous functional variant in integrin-alpha(M) (encoded by ITGAM) is associated with systemic lupus erythematosus. *Nature genetics* 40:152-154.
- Nichols, K.E., D.P. Harkin, S. Levitz, M. Krainer, K.A. Kolquist, C. Genovese, A. Bernard, M. Ferguson, L. Zuo, E. Snyder, A.J. Buckler, C. Wise, J. Ashley, M. Lovett, M.B. Valentine, A.T. Look, W. Gerald, D.E. Housman, and D.A. Haber. 1998. Inactivating mutations in an SH2 domain-encoding gene in X-linked lymphoproliferative syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:13765-13770.
- Nichols, K.E., J. Hom, S.Y. Gong, A. Ganguly, C.S. Ma, J.L. Cannons, S.G. Tangye, P.L. Schwartzberg, G.A. Koretzky, and P.L. Stein. 2005. Regulation of NKT cell development by SAP, the protein defective in XLP. *Nature medicine* 11:340-345.
- Oaks, M.K., K.M. Hallett, R.T. Penwell, E.C. Stauber, S.J. Warren, and A.J. Tector. 2000. A native soluble form of CTLA-4. *Cellular immunology* 201:144-153.
- Odegard, J.M., B.R. Marks, L.D. DiPlacido, A.C. Poholek, D.H. Kono, C. Dong, R.A. Flavell, and J. Craft. 2008. ICOS-dependent extrafollicular helper T cells elicit IgG production via IL-21 in systemic autoimmunity. *The Journal of experimental medicine* 205:2873-2886.
- Ohashi, P.S. 2002. T-cell signalling and autoimmunity: molecular mechanisms of disease. *Nature reviews. Immunology* 2:427-438.
- Ohl, K., and K. Tenbrock. 2011. Inflammatory cytokines in systemic lupus erythematosus. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2011:432595.
- Oliver-Vila, I., I. Saborit-Villarroya, P. Engel, and M. Martin. 2008. The leukocyte receptor CD84 inhibits Fc epsilon RI-mediated signaling through homophilic interaction in transfected RBL-2H3 cells. *Molecular immunology* 45:2138-2149.
- Onoe, K., Y. Yanagawa, K. Minami, N. Iijima, and K. Iwabuchi. 2007. Th1 or Th2 balance regulated by interaction between dendritic cells and NKT cells. *Immunologic research* 38:319-332.
- Orengo, J.P., and T.A. Cooper. 2007. Alternative splicing in disease. *Advances in experimental medicine and biology* 623:212-223.
- Ortutay, C., and M. Vihinen. 2006. Immunome: a reference set of genes and proteins for systems biology of the human immune system. *Cellular immunology* 244:87-89.
- Ortutay, C., and M. Vihinen. 2009. Immunome knowledge base (IKB): an integrated service for immunome research. *BMC immunology* 10:3.



- Pachlopnik Schmid, J., D. Canioni, D. Moshous, F. Touzot, N. Mahlaoui, F. Hauck, H. Kanegane, E. Lopez-Granados, E. Mejstrikova, I. Pellier, L. Galicier, C. Galambrun, V. Barlogis, P. Bordigoni, A. Fourmaintraux, M. Hamidou, A. Dabadie, F. Le Deist, F. Haerynck, M. Ouachee-Chardin, P. Rohrlich, J.L. Stephan, C. Lenoir, S. Rigaud, N. Lambert, M. Milili, C. Schiff, H. Chapel, C. Picard, G. de Saint Basile, S. Blanche, A. Fischer, and S. Latour. 2011. Clinical similarities and differences of patients with X-linked lymphoproliferative syndrome type 1 (XLP-1/SAP deficiency) versus type 2 (XLP-2/XIAP deficiency). *Blood* 117:1522-1529.
- Palou, E., F. Piroto, J. Sole, J.H. Freed, B. Peral, C. Vilardell, R. Vilella, J. Vives, and A. Gaya. 2000. Genomic characterization of CD84 reveals the existence of five isoforms differing in their cytoplasmic domains. *Tissue antigens* 55:118-127.
- Pan, Q., O. Shai, L.J. Lee, B.J. Frey, and B.J. Blencowe. 2008. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nature genetics* 40:1413-1415.
- Parolini, S., C. Bottino, M. Falco, R. Augugliaro, S. Giliani, R. Franceschini, H.D. Ochs, H. Wolf, J.Y. Bonnefoy, R. Biassoni, L. Moretta, L.D. Notarangelo, and A. Moretta. 2000. X-linked lymphoproliferative disease. 2B4 molecules displaying inhibitory rather than activating function are responsible for the inability of natural killer cells to kill Epstein-Barr virus-infected cells. *The Journal of experimental medicine* 192:337-346.
- Pasquier, B., L. Yin, M.C. Fondaneche, F. Relouzat, C. Bloch-Queyrat, N. Lambert, A. Fischer, G. de Saint-Basile, and S. Latour. 2005. Defective NKT cell development in mice and humans lacking the adapter SAP, the X-linked lymphoproliferative syndrome gene product. *The Journal of experimental medicine* 201:695-701.
- Peakman, M., and D. Vergani. Inmunología Básica y Clínica.
- Peck, S.R., and H.E. Ruley. 2000. Ly108: a new member of the mouse CD2 family of cell surface proteins. *Immunogenetics* 52:63-72.
- Pedroza-Pacheco, I., A. Madrigal, and A. Saudemont. 2013. Interaction between natural killer cells and regulatory T cells: perspectives for immunotherapy. *Cellular & molecular immunology* 10:222-229.
- Peggs, K.S., and J.P. Allison. 2005. Co-stimulatory pathways in lymphocyte regulation: the immunoglobulin superfamily. *British journal of haematology* 130:809-824.
- Peggs, K.S., S.A. Quezada, A.J. Korman, and J.P. Allison. 2006. Principles and use of anti-CTLA4 antibody in human cancer immunotherapy. *Current opinion in immunology* 18:206-213.
- Perkins, D., Z. Wang, C. Donovan, H. He, D. Mark, G. Guan, Y. Wang, T. Walunas, J. Bluestone, J. Listman, and P.W. Finn. 1996. Regulation of CTLA-4 expression during T cell activation. *J Immunol* 156:4154-4159.
- Perl, A., D.R. Fernandez, T. Telarico, E. Doherty, L. Francis, and P.E. Phillips. 2009. T-cell and B-cell signaling biomarkers and treatment targets in lupus. *Current opinion in rheumatology* 21:454-464.
- Ponta, H., L. Sherman, and P.A. Herrlich. 2003. CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nature reviews. Molecular cell biology* 4:33-45.
- Poy, F., M.B. Yaffe, J. Sayos, K. Saxena, M. Morra, J. Sumegi, L.C. Cantley, C. Terhorst, and M.J. Eck. 1999. Crystal structures of the XLP protein SAP reveal a class of SH2 domains with extended, phosphotyrosine-independent sequence recognition. *Molecular cell* 4:555-561.
- Purtilo, D.T., C.K. Cassel, J.P. Yang, and R. Harper. 1975. X-linked recessive progressive combined variable immunodeficiency (Duncan's disease). *Lancet* 1:935-940.
- Qi, H., J.L. Cannons, F. Klauschen, P.L. Schwartzberg, and R.N. Germain. 2008. SAP-controlled T-B cell interactions underlie germinal centre formation. *Nature* 455:764-769.
- Rahman, A., and D.A. Isenberg. 2008. Systemic lupus erythematosus. *The New England journal of medicine* 358:929-939.
- Remmers, E.F., R.M. Plenge, A.T. Lee, R.R. Graham, G. Hom, T.W. Behrens, P.I. de Bakker, J.M. Le, H.S. Lee, F. Batliwalla, W. Li, S.L. Masters, M.G. Booty, J.P. Carulli, L. Padyukov, L. Alfredsson, L.

- Klareskog, W.V. Chen, C.I. Amos, L.A. Criswell, M.F. Seldin, D.L. Kastner, and P.K. Gregersen. 2007. STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *The New England journal of medicine* 357:977-986.
- Rezaei, N., E. Mahmoudi, A. Aghamohammadi, R. Das, and K.E. Nichols. 2011. X-linked lymphoproliferative syndrome: a genetic condition typified by the triad of infection, immunodeficiency and lymphoma. *British journal of haematology* 152:13-30.
- Rodig, S.J., A. Shahsafaei, B. Li, and D.M. Dorfman. 2005. The CD45 isoform B220 identifies select subsets of human B cells and B-cell lymphoproliferative disorders. *Human pathology* 36:51-57.
- Rodriguez-Bayona, B., A. Ramos-Amaya, and J.A. Brieva. 2011. Differential expression of SLAMS and other modulatory molecules by human plasma cells during normal maturation. *Immunology letters* 134:122-128.
- Romero, X., D. Benitez, S. March, R. Vilella, M. Miralpeix, and P. Engel. 2004. Differential expression of SAP and EAT-2-binding leukocyte cell-surface molecules CD84, CD150 (SLAM), CD229 (Ly9) and CD244 (2B4). *Tissue antigens* 64:132-144.
- Romero, X., N. Zapater, M. Calvo, S.G. Kalko, M.A. de la Fuente, V. Tovar, C. Ockeloen, P. Pizcueta, and P. Engel. 2005. CD229 (Ly9) lymphocyte cell surface receptor interacts homophilically through its N-terminal domain and relocalizes to the immunological synapse. *J Immunol* 174:7033-7042.
- Rosenfeld, M.G., C.R. Lin, S.G. Amara, L. Stolarsky, B.A. Roos, E.S. Ong, and R.M. Evans. 1982. Calcitonin mRNA polymorphism: peptide switching associated with alternative RNA splicing events. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79:1717-1721.
- Saborit-Villarroya, I., J.M. Del Valle, X. Romero, E. Esplugues, P. Lauzurica, P. Engel, and M. Martin. 2005. The adaptor protein 3BP2 binds human CD244 and links this receptor to Vav signaling, ERK activation, and NK cell killing. *J Immunol* 175:4226-4235.
- Saborit-Villarroya, I., A. Martinez-Barricocal, I. Oliver-Vila, P. Engel, J. Sayos, and M. Martin. 2008. The adaptor 3BP2 activates CD244-mediated cytotoxicity in PKC- and SAP-dependent mechanisms. *Molecular immunology* 45:3446-3453.
- Sang, A., Y.Y. Zheng, and L. Morel. 2013. Contributions of B cells to lupus pathogenesis. *Molecular immunology*
- Sanz, I., and F.E. Lee. 2010. B cells as therapeutic targets in SLE. *Nature reviews. Rheumatology* 6:326-337.
- Sayos, J., M. Martin, A. Chen, M. Simarro, D. Howie, M. Morra, P. Engel, and C. Terhorst. 2001. Cell surface receptors Ly-9 and CD84 recruit the X-linked lymphoproliferative disease gene product SAP. *Blood* 97:3867-3874.
- Sayos, J., K.B. Nguyen, C. Wu, S.E. Stepp, D. Howie, J.D. Schatzle, V. Kumar, C.A. Biron, and C. Terhorst. 2000. Potential pathways for regulation of NK and T cell responses: differential X-linked lymphoproliferative syndrome gene product SAP interactions with SLAM and 2B4. *International immunology* 12:1749-1757.
- Sayos, J., C. Wu, M. Morra, N. Wang, X. Zhang, D. Allen, S. van Schaik, L. Notarangelo, R. Geha, M.G. Roncarolo, H. Oettgen, J.E. De Vries, G. Aversa, and C. Terhorst. 1998. The X-linked lymphoproliferative-disease gene product SAP regulates signals induced through the co-receptor SLAM. *Nature* 395:462-469.
- Schleinitz, N., F. Vely, J.R. Harle, and E. Vivier. 2010. Natural killer cells in human autoimmune diseases. *Immunology* 131:451-458.
- Schwartzberg, P.L., K.L. Mueller, H. Qi, and J.L. Cannons. 2009. SLAM receptors and SAP influence lymphocyte interactions, development and function. *Nature reviews. Immunology* 9:39-46.
- Seder, R.A., and R. Ahmed. 2003. Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation. *Nature immunology* 4:835-842.

- Seemayer, T.A., T.G. Gross, R.M. Egeler, S.J. Pirruccello, J.R. Davis, C.M. Kelly, M. Okano, A. Lanyi, and J. Sumegi. 1995. X-linked lymphoproliferative disease: twenty-five years after the discovery. *Pediatric research* 38:471-478.
- Sharifi, R., J.C. Sinclair, K.C. Gilmour, P.D. Arkwright, C. Kinnon, A.J. Thrasher, and H.B. Gaspar. 2004. SAP mediates specific cytotoxic T-cell functions in X-linked lymphoproliferative disease. *Blood* 103:3821-3827.
- Sharpe, A.H. 2009. Mechanisms of costimulation. *Immunological reviews* 229:5-11.
- Shirakawa, F., U. Yamashita, and H. Suzuki. 1985. Decrease in HLA-DR-positive monocytes in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *J Immunol* 134:3560-3562.
- Simpson, N., P.A. Gatenby, A. Wilson, S. Malik, D.A. Fulcher, S.G. Tangye, H. Manku, T.J. Vyse, G. Roncador, G.A. Huttley, C.C. Goodnow, C.G. Vinuesa, and M.C. Cook. 2010. Expansion of circulating T cells resembling follicular helper T cells is a fixed phenotype that identifies a subset of severe systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism* 62:234-244.
- Sintes, J., M. Cuenca, X. Romero, R. Bastos, C. Terhorst, A. Angulo, and P. Engel. 2013. Cutting edge: Ly9 (CD229), a SLAM family receptor, negatively regulates the development of thymic innate memory-like CD8+ T and invariant NKT cells. *J Immunol* 190:21-26.
- Sintes, J., X. Romero, J. de Salort, C. Terhorst, and P. Engel. 2010. Mouse CD84 is a pan-leukocyte cell-surface molecule that modulates LPS-induced cytokine secretion by macrophages. *Journal of leukocyte biology* 88:687-697.
- Sintes, J., X. Romero, P. Marin, C. Terhorst, and P. Engel. 2008. Differential expression of CD150 (SLAM) family receptors by human hematopoietic stem and progenitor cells. *Experimental hematology* 36:1199-1204.
- Skapenko, A., J. Leipe, P.E. Lipsky, and H. Schulze-Koops. 2005. The role of the T cell in autoimmune inflammation. *Arthritis research & therapy* 7 Suppl 2:S4-14.
- Smith, D.K., and H. Xue. 1997. Sequence profiles of immunoglobulin and immunoglobulin-like domains. *Journal of molecular biology* 274:530-545.
- Stark, S., and C. Watzl. 2006. 2B4 (CD244), NTB-A and CRACC (CS1) stimulate cytotoxicity but no proliferation in human NK cells. *International immunology* 18:241-247.
- Stastny, P. 1976. Mixed lymphocyte cultures in rheumatoid arthritis. *The Journal of clinical investigation* 57:1148-1157.
- Stastny, P. 1978. HLA-D and Ia antigens in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism* 21:S139-143.
- Streuli, M., L.R. Hall, Y. Saga, S.F. Schlossman, and H. Saito. 1987. Differential usage of three exons generates at least five different mRNAs encoding human leukocyte common antigens. *The Journal of experimental medicine* 166:1548-1566.
- Su, D., M. Shen, X. Li, and L. Sun. 2013. Roles of gammadelta T cells in the pathogenesis of autoimmune diseases. *Clinical & developmental immunology* 2013:985753.
- Suzuki, A., R. Yamada, Y. Kochi, T. Sawada, Y. Okada, K. Matsuda, Y. Kamatani, M. Mori, K. Shimane, Y. Hirabayashi, A. Takahashi, T. Tsunoda, A. Miyatake, M. Kubo, N. Kamatani, Y. Nakamura, and K. Yamamoto. 2008. Functional SNPs in CD244 increase the risk of rheumatoid arthritis in a Japanese population. *Nature genetics* 40:1224-1229.
- Tangye, S.G., S. Lazetic, E. Woollatt, G.R. Sutherland, L.L. Lanier, and J.H. Phillips. 1999. Cutting edge: human 2B4, an activating NK cell receptor, recruits the protein tyrosine phosphatase SHP-2 and the adaptor signaling protein SAP. *J Immunol* 162:6981-6985.
- Tangye, S.G., K.E. Nichols, N.J. Hare, and B.C. van de Weerd. 2003. Functional requirements for interactions between CD84 and Src homology 2 domain-containing proteins and their contribution to human T cell activation. *J Immunol* 171:2485-2495.
- Tangye, S.G., B.C. van de Weerd, D.T. Avery, and P.D. Hodgkin. 2002. CD84 is up-regulated on a major population of human memory B cells and recruits the SH2 domain containing proteins SAP and EAT-2. *European journal of immunology* 32:1640-1649.

- Tassi, I., and M. Colonna. 2005. The cytotoxicity receptor CRACC (CS-1) recruits EAT-2 and activates the PI3K and phospholipase Cgamma signaling pathways in human NK cells. *J Immunol* 175:7996-8002.
- Tatsuo, H., N. Ono, K. Tanaka, and Y. Yanagi. 2000. [The cellular receptor for measles virus: SLAM (CDw 150)]. *Uirusu* 50:289-296.
- Tazi, J., N. Bakkour, and S. Stamm. 2009. Alternative splicing and disease. *Biochim Biophys Acta* 1792:14-26.
- Tedder T.F., W.N., Engel P. 1995. B-cell antigens section report in Schlossman S (ed): Leucocyte Typing V.
- .
- Tovar, V., M.A. de la Fuente, P. Pizcueta, J. Bosch, and P. Engel. 2000. Gene structure of the mouse leukocyte cell surface molecule Ly9. *Immunogenetics* 51:788-793.
- Townsend, M.J., J.G. Monroe, and A.C. Chan. 2010. B-cell targeted therapies in human autoimmune diseases: an updated perspective. *Immunological reviews* 237:264-283.
- Trowbridge, I.S., and M.L. Thomas. 1994. CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development. *Annual review of immunology* 12:85-116.
- Tsokos, G.C. 2011. Systemic lupus erythematosus. *The New England journal of medicine* 365:2110-2121.
- Tsokos, G.C., B. Kovacs, P.P. Sfikakis, S. Theocharis, S. Vogelgesang, and C.S. Via. 1996. Defective antigen-presenting cell function in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism* 39:600-609.
- Valdez, P.A., H. Wang, D. Seshasayee, M. van Lookeren Campagne, A. Gurney, W.P. Lee, and I.S. Grewal. 2004. NTB-A, a new activating receptor in T cells that regulates autoimmune disease. *The Journal of biological chemistry* 279:18662-18669.
- Valiante, N.M., and G. Trinchieri. 1993. Identification of a novel signal transduction surface molecule on human cytotoxic lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* 178:1397-1406.
- van der Merwe, P.A., D.L. Bodian, S. Daenke, P. Linsley, and S.J. Davis. 1997. CD80 (B7-1) binds both CD28 and CTLA-4 with a low affinity and very fast kinetics. *The Journal of experimental medicine* 185:393-403.
- Vang, T., M. Congia, M.D. Macis, L. Musumeci, V. Orru, P. Zavattari, K. Nika, L. Tautz, K. Tasken, F. Cucca, T. Mustelin, and N. Bottini. 2005. Autoimmune-associated lymphoid tyrosine phosphatase is a gain-of-function variant. *Nature genetics* 37:1317-1319.
- Veillette, A. 2006. Immune regulation by SLAM family receptors and SAP-related adaptors. *Nature reviews. Immunology* 6:56-66.
- Veillette, A. 2010. SLAM-family receptors: immune regulators with or without SAP-family adaptors. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2:a002469.
- Verykokakis, M., M.D. Boos, A. Bendelac, E.J. Adams, P. Pereira, and B.L. Kee. 2010. Inhibitor of DNA binding 3 limits development of murine slam-associated adaptor protein-dependent "innate" gammadelta T cells. *PloS one* 5:e9303.
- Vinuesa, C.G., M.A. Linterman, C.C. Goodnow, and K.L. Randall. 2010. T cells and follicular dendritic cells in germinal center B-cell formation and selection. *Immunological reviews* 237:72-89.
- Vyse, T.J., and J.A. Todd. 1996. Genetic analysis of autoimmune disease. *Cell* 85:311-318.
- Waggoner, S.N., R.T. Taniguchi, P.A. Mathew, V. Kumar, and R.M. Welsh. 2010. Absence of mouse 2B4 promotes NK cell-mediated killing of activated CD8+ T cells, leading to prolonged viral persistence and altered pathogenesis. *The Journal of clinical investigation* 120:1925-1938.
- Wahl, M.C., C.L. Will, and R. Luhrmann. 2009. The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell* 136:701-718.
- Wandstrat, A., and E. Wakeland. 2001. The genetics of complex autoimmune diseases: non-MHC susceptibility genes. *Nature immunology* 2:802-809.

- Wandstrat, A.E., C. Nguyen, N. Limaye, A.Y. Chan, S. Subramanian, X.H. Tian, Y.S. Yim, A. Pertsemliadis, H.R. Garner, Jr., L. Morel, and E.K. Wakeland. 2004. Association of extensive polymorphisms in the SLAM/CD2 gene cluster with murine lupus. *Immunity* 21:769-780.
- Wang, A., F. Batteux, and E.K. Wakeland. 2010a. The role of SLAM/CD2 polymorphisms in systemic autoimmunity. *Current opinion in immunology* 22:706-714.
- Wang, E.T., R. Sandberg, S. Luo, I. Khrebtukova, L. Zhang, C. Mayr, S.F. Kingsmore, G.P. Schroth, and C.B. Burge. 2008. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature* 456:470-476.
- Wang, G., A.C. Abadia-Molina, S.B. Berger, X. Romero, M.S. O'Keeffe, D.I. Rojas-Barros, M. Aleman, G. Liao, E. Maganto-Garcia, M. Fresno, N. Wang, C. Detre, and C. Terhorst. 2012. Cutting edge: Slamf8 is a negative regulator of Nox2 activity in macrophages. *J Immunol* 188:5829-5832.
- Wang, N., S. Calpe, J. Westcott, W. Castro, C. Ma, P. Engel, J.D. Schatzle, and C. Terhorst. 2010b. Cutting edge: The adapters EAT-2A and -2B are positive regulators of CD244- and CD84-dependent NK cell functions in the C57BL/6 mouse. *J Immunol* 185:5683-5687.
- Wang, N., A. Satoskar, W. Faubion, D. Howie, S. Okamoto, S. Feske, C. Gullo, K. Clarke, M.R. Sosa, A.H. Sharpe, and C. Terhorst. 2004. The cell surface receptor SLAM controls T cell and macrophage functions. *The Journal of experimental medicine* 199:1255-1264.
- Ward, A.J., and T.A. Cooper. 2010. The pathobiology of splicing. *The Journal of pathology* 220:152-163.
- Watzl, C., C.C. Stebbins, and E.O. Long. 2000. NK cell inhibitory receptors prevent tyrosine phosphorylation of the activation receptor 2B4 (CD244). *J Immunol* 165:3545-3548.
- Weiner, L.M., J.C. Murray, and C.W. Shuptrine. 2012. Antibody-based immunotherapy of cancer. *Cell* 148:1081-1084.
- Weyand, C.M., E. Bryl, and J.J. Goronzy. 2000. The role of T cells in rheumatoid arthritis. *Archivum immunologiae et therapeuticae experimentalis* 48:429-435.
- Wojcik, H., E. Griffiths, S. Staggs, J. Hagman, and S. Winandy. 2007. Expression of a non-DNA-binding Ikaros isoform exclusively in B cells leads to autoimmunity but not leukemogenesis. *European journal of immunology* 37:1022-1032.
- Wraith, D.C., K.S. Nicolson, and N.T. Whitley. 2004. Regulatory CD4+ T cells and the control of autoimmune disease. *Current opinion in immunology* 16:695-701.
- Yan, Q., V.N. Malashkevich, A. Fedorov, E. Fedorov, E. Cao, J.W. Lary, J.L. Cole, S.G. Nathenson, and S.C. Almo. 2007. Structure of CD84 provides insight into SLAM family function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:10583-10588.
- Yanaba, K., J.D. Bouaziz, T. Matsushita, C.M. Magro, E.W. St Clair, and T.F. Tedder. 2008. B-lymphocyte contributions to human autoimmune disease. *Immunological reviews* 223:284-299.
- Yanagi, Y., Y. Yoshikai, K. Leggett, S.P. Clark, I. Aleksander, and T.W. Mak. 1984. A human T cell-specific cDNA clone encodes a protein having extensive homology to immunoglobulin chains. *Nature* 308:145-149.
- Yang, W., N. Shen, D.Q. Ye, Q. Liu, Y. Zhang, X.X. Qian, N. Hiranikarn, D. Ying, H.F. Pan, C.C. Mok, T.M. Chan, R.W. Wong, K.W. Lee, M.Y. Mok, S.N. Wong, A.M. Leung, X.P. Li, Y. Avihingsanon, C.M. Wong, T.L. Lee, M.H. Ho, P.P. Lee, Y.K. Chang, P.H. Li, R.J. Li, L. Zhang, W.H. Wong, I.O. Ng, C.S. Lau, P.C. Sham, and Y.L. Lau. 2010. Genome-wide association study in Asian populations identifies variants in ETS1 and WDFY4 associated with systemic lupus erythematosus. *PLoS genetics* 6:e1000841.
- Yusuf, I., R. Kageyama, L. Monticelli, R.J. Johnston, D. Ditoro, K. Hansen, B. Barnett, and S. Crotty. 2010. Germinal center T follicular helper cell IL-4 production is dependent on signaling lymphocytic activation molecule receptor (CD150). *J Immunol* 185:190-202.
- Zaiss, M., C. Hirtreiter, M. Rehli, A. Rehm, L.A. Kunz-Schughart, R. Andreesen, and B. Hennemann. 2003. CD84 expression on human hematopoietic progenitor cells. *Experimental hematology* 31:798-805.

- Zhang, W., T. Wan, N. Li, Z. Yuan, L. He, X. Zhu, M. Yu, and X. Cao. 2001. Genetic approach to insight into the immunobiology of human dendritic cells and identification of CD84-H1, a novel CD84 homologue. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 7:822s-829s.
- Zhong, M.C., and A. Veillette. 2008. Control of T lymphocyte signaling by Ly108, a signaling lymphocytic activation molecule family receptor implicated in autoimmunity. *The Journal of biological chemistry* 283:19255-19264.
- Zhou, Y., J. Yuan, Y. Pan, Y. Fei, X. Qiu, N. Hu, Y. Luo, W. Lei, Y. Li, H. Long, A.H. Sawalha, B. Richardson, and Q. Lu. 2009. T cell CD40LG gene expression and the production of IgG by autologous B cells in systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol* 132:362-370.
- Zola, H. 2006. Medical applications of leukocyte surface molecules--the CD molecules. *Mol Med* 12:312-316.
- Zola, H., and B. Swart. 2005. The human leucocyte differentiation antigens (HLDA) workshops: the evolving role of antibodies in research, diagnosis and therapy. *Cell research* 15:691-694.
- Zola, H., B. Swart, A. Banham, S. Barry, A. Beare, A. Bensussan, L. Boumsell, D.B. C, H.J. Buhring, G. Clark, P. Engel, D. Fox, B.Q. Jin, P.J. Macardle, F. Malavasi, D. Mason, H. Stockinger, and X. Yang. 2007. CD molecules 2006--human cell differentiation molecules. *Journal of immunological methods* 319:1-5.
- Zucchetto, A., I. Cattarossi, P. Nanni, E. Zaina, G. Prato, M. Gilestro, D. Marconi, P. Bulian, F.M. Rossi, L. Del Vecchio, P. Omede, M. Geuna, G. Del Poeta, and V. Gattei. 2011. Cluster analysis of immunophenotypic data: the example of chronic lymphocytic leukemia. *Immunology letters* 134:137-144.
- Zvaifler, N.J. 1973. The immunopathology of joint inflammation in rheumatoid arthritis. *Advances in immunology* 16:265-336.

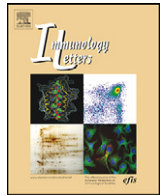


**X. ANNEX**









## Towards a comprehensive human cell-surface immunome database

M. Carmen Díaz-Ramos, Pablo Engel, Ricardo Bastos\*

*Institut d'investigacions Biomèdiques Agust Pi i Sunyer (IDIBAPS), Dept. of Cell Biology, Immunology and Neurosciences, University of Barcelona, Spain*

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 14 September 2010

Accepted 24 September 2010

Available online 3 November 2010

#### Keywords:

Cell-surface proteins  
Immune cells  
Lymphoid tissues  
Immunome

### ABSTRACT

The human immune system is a complex machinery involving numerous proteins. Proteins located at the cell surface of immune cells are of particular relevance due not only to their participation in the network of interactions that regulate the immune response but also to their potential as excellent targets for diagnostic and therapeutic interventions. The main objective of this project is to generate a comprehensive database of the human cell-surface proteins expressed in immune cells and lymphoid tissues. For this purpose, we have integrated information collected from primary literature, databases and electronic information sources. This manually curated database includes the gene symbol and name of the protein, describes the family that each protein belongs to, indicates their type of extracellular domains, and compiles data regarding their expression. Thus far we have identified and catalogued 1015 genes and proteins. The largest families in this compendium are the Ig superfamily with 195 members (~20%) and the G-protein coupled receptor superfamily with 147 members (~14%). Other abundant families include the C-type lectin and the cytokine receptor families with 43 and 42 members respectively (4%). About 25% of the proteins belong to minor families and approximately 4% lack any clear family assignment. More than 60% of the genes encode proteins without a CD number. This database will serve to boost the production of new monoclonal antibodies and to stimulate studies aimed at characterizing the function of these proteins in the immune system as well as identifying potential new biomarkers and therapeutic targets.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

For the immune system to function correctly it requires the coordinated expression and action of hundreds of genes and proteins. Among these, the cell-surface proteins expressed by leukocytes are of particular importance due to their critical functions they play in the network of interactions that regulate the innate and adaptive immune response. Many of these proteins have been identified and characterized using monoclonal antibodies (mAbs), and named according to the CD nomenclature approved by the Human Leukocyte Differentiation Antigens (HLDA) Workshops and Conferences. There are currently some 500 described leukocyte cell-surface molecules, over 360 of them with CD names [1]. But these CD molecules probably represent only a relatively small fraction of the total number of plasma membrane proteins expressed by leukocytes. In fact, it has been estimated that there may be 2500 leukocyte cell-surface molecules in total [1]. In a recently published bioinformatics analysis, da Cunha et al. have generated a catalogue of 3702 transmembrane proteins located at the surface of human cells [2]. More recently, Uhlén and co-workers have esti-

estimated that about 5500 human genes code for membrane proteins, which corresponds to approximately 26% of the known human protein-coding genes [3]. Certainly, many of these genes may also be expressed on the cell surface of leukocytes.

Several databases surveying all of the known human immune system genes have been developed and feature functional and genomic information [4–7]. Thus far, however, no database has been created that includes genes expressed in leukocytes, or in immune cells in general, that code for cell-surface proteins. We have endeavoured to create such a database centered upon the key role of the cell-surface molecules in the functioning and regulation of the immune response, and as potential markers for diagnostic and therapeutic applications. In this paper, we describe a unique database of those genes expressed in immune cells and lymphoid tissues that code for proteins located at, or associated with (e.g. glycosyl-phosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins), the plasma membrane. In line with other authors, who have coined the term “immunome” to refer to the human set of immunology-related genes and proteins (analogous to such terms as proteome or genome) [8], we have decided to call this database the “cell-surface immunome”. This manually curated database includes the official HUGO gene symbol and the protein name, describes the family that each protein belongs to, and indicates the domains that the proteins possess on their extracellular region. In addition, this database provides information about the expression of the genes

\* Corresponding author at: IDIBAPS, University of Barcelona, Casanova 143, Barcelona 08036, Spain. Tel.: +34 93 227 5540; fax: +34 93 227 5455.

E-mail address: [rbastos@clinic.ub.es](mailto:rbastos@clinic.ub.es) (R. Bastos).

in leukocytes and/or lymphoid tissues or in various other cell types (e.g. platelets, erythrocytes). To date, it contains 1015 entries, a number that is likely to increase in the future. We hope it will be expanded and enhanced by contributions from members of the scientific community.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Information sources, databases, and web resources

Genes expressed by immune cells whose protein products are located at, or associated (GPI-anchored proteins) with, the plasma membrane were systematically collected from research and review articles, textbooks and electronic information sources. CD (Cluster of Differentiation) proteins, cell-surface molecules defined by the Human Leukocyte Differentiation Antigens (HLDA) Workshops, were obtained from Zola et al. [9]. New CD molecules approved by the 9th International HLDA Conference (Barcelona, March 2010) were also included (<http://www.hlda9.org>). The main databases employed were the Human Protein Reference Database (HPRD) [10], BioGPS [11], GeneCards [12] and SOURCE [13]. The proteomic database HPRD (<http://www.hprd.org/query>) was used to search for protein expression, subcellular localization and domain architecture information. In addition, it was also used to look for potential candidates. The Gene portal BioGPS (<http://biogps.gnf.org>) was used to consult and verify gene expression data, while the web-based databases GeneCards (<http://www.genecards.org/>) and SOURCE (<http://smd.stanford.edu>) were consulted for gene and functional annotations and expression information. Other web resources, like UniProt (<http://www.uniprot.org/>), Entrez Gene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) and Gene Ontology [14] were also used. In order to gather information regarding protein families and domains three additional web tools were utilized: PANTHER [15], Pfam [16] and SMART [17]. Finally, to search for potential candidates, the Ingenuity Knowledge Base (<http://www.ingenuity.com/>)

and the Immunome databases (<http://bioinf.uta.fi/immunome/>) were also employed.

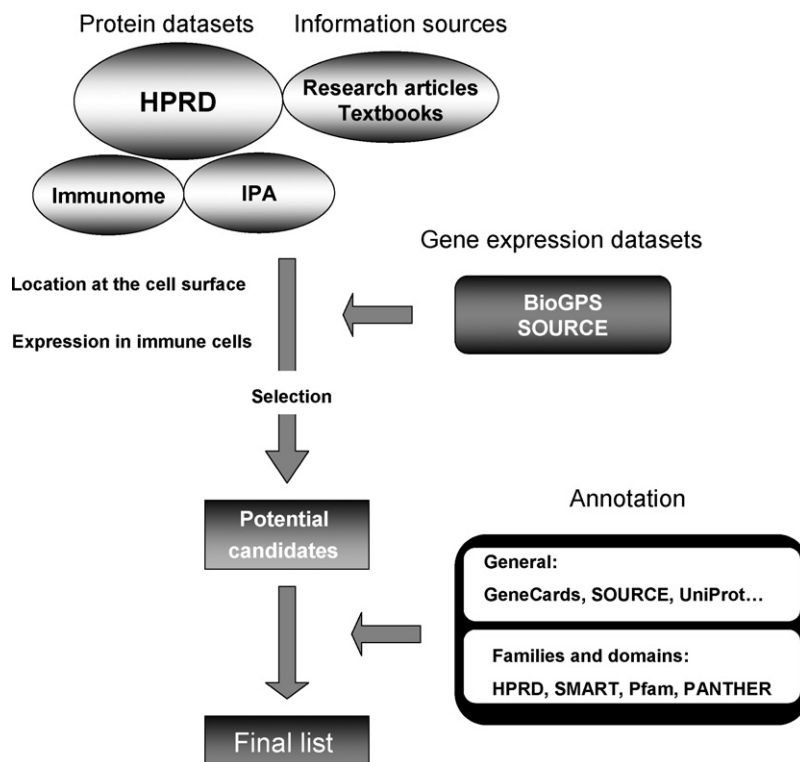
### 2.2. Collecting and annotating genes

To build this new database, searches were performed initially in HPRD for genes expressed either in immune cells or in primary and secondary lymphoid tissues and whose corresponding proteins are located at the cell surface. Additional candidates were searched in the Ingenuity Knowledge Base and the Immunome databases as well as in the published literature. A recently published paper [2] that describes a catalogue of more than 3700 genes believed to encode proteins located at the cell surface of human cells was used as a reference list. A close inspection of this gene collection, one-by-one, was carried out. Selected candidate genes were further validated using the web tools and resources mentioned above (Fig. 1). Altogether, 1015 genes were selected for our database.

## 3. Results

### 3.1. Organization and composition of the cell-surface immunome database

After an exhaustive survey of the literature and numerous databases, we have thus far identified 1015 genes expressed in immune cells or in primary and secondary lymphoid tissues whose corresponding proteins are located on the plasma membrane. Although the vast majority of genes code for proteins with trans-membrane domains, there are also membrane associated proteins, e.g., GPI-anchored proteins. As shown in Supplementary Table 1, these genes are organized in families or superfamilies. In addition, this database provides information regarding their expression and, more specifically, whether they are expressed in leukocytes or in lymphoid tissues or in other specific cell types (e.g. erythrocytes or platelets). It indicates as well which structural domains types, if



**Fig. 1.** Workflow of the procedure used to generate the database. Shown are the starting protein and gene expression datasets, and annotation programs used to generate the database. Potential candidates had to fulfill two conditions: to be located at the cell surface and to be expressed in immune cells or lymphoid tissues.

**Table 1**

List with the most abundant families and number of members with an assigned CD.

Family name	N° of members	% of the total molecules	Members with CD	% of total family members
Ig superfamily	195	19	134	69
G-protein coupled receptor superfamily	147	14	22	15
C-type lectin family	49	5	23	47
Cytokine receptor family	44	4	28	64
Protein kinase superfamily	34	3	15	44
MHC family	30	3	6	20
Solute carrier family	29	3	3	10
TNF receptor superfamily	26	3	21	81
Integrin family	23	2	17	74
Tetraspanin family	20	2	9	45
Major facilitator superfamily	20	2	0	0
ABC transporters superfamily	18	2	2	11
TNF superfamily	17	2	11	65
Peptidase protein family	16	2	2	13
Transient receptor family	14	1	0	0
Cadherin family	13	1	3	23
Potassium channel family	13	1	0	0
Toll-like receptor family	12	1	9	75
Sialomucin family	12	1	9	75
Leucine-rich repeat family	11	1	5	45

any, are present in the extracellular regions of their corresponding proteins. Finally, it also specifies those genes that code for cell-surface molecules with an assigned CD as defined by the Human Leukocyte Differentiation Antigens (HLDA) Workshops.

### 3.2. Families, CDs and domains

Table 1 shows the 20 superfamilies and families that have more than 10 members. As expected, the largest group is the Ig superfamily (IgSF) with 195 members (almost 20% of the dataset) followed by the G-protein coupled receptor (GPCR) superfamily with 147 members (about 14%). Other large families include the C-type lectin and the cytokine receptor families with 49 (5%) and 44 (4%) proteins respectively. Families with 30–40 members are the protein kinase superfamily (34) and the MHC family (30) representing about 3% each, while those with 20–30 members include the TNF receptor superfamily (26) and the Integrin (23) and Tetraspanin (20) families. Among the families with less than 20 proteins we found the ABC transporters superfamily (18), the TNF superfamily (17), and the Toll-like receptor family (12), these three groups representing between 1 and 2% of the dataset. The Toll-like receptors were considered members of an independent family and not as a family within the Leucine-rich receptor superfamily. Nearly 15% of the proteins belong to minor families (3–10 members) and about 10% either belong to families with less than 3 members or do not have a clear family assignment (for a complete list see Supplemental Table 2).

Table 1 also indicates the number of members in each family that have a CD number. The IgSF, the largest, is also the one with the most CD assignments: out of 195 IgSF members, 134 have CD names, representing almost 70% of the dataset. In contrast, the second largest family, the GPCR family has only 22 members with a CD name out of 147 members (15%). Other families with high percentages of CDs include the TNF receptor superfamily (80%), the Toll-like receptor family (75%), the Integrin and Sialomucin families (over 70%), and the TNF and Cytokine families (over 60%). Some families, like the Major facilitator superfamily, as well as the Transient receptor and Potassium channel families do not have any CD members (Fig. 2 and Table 1).

A total of 55 different domains were identified on the extracellular region, most of them appearing in just a few proteins. Table 2 shows the most common extracellular domains. At the top of the list is the Immunoglobulin domain (IG), found in 250 proteins. This encompasses all types of IG domains, i.e., IGC, IGC2, IGV and IG-like.

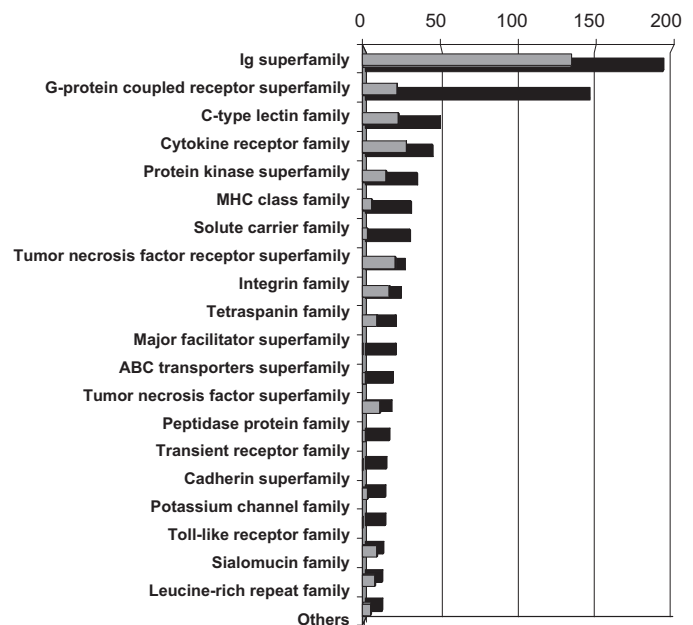


Fig. 2. Graph representing the major families and the number of CD proteins each contains. Graph depicting the most abundant families with the number of total members (black bar), as well as the number of members with a CD number (grey bar).

Other common domains are the Fibronectin type 3 domain (FN3) and the C-type lectin (CTL) found in 61 and 49 proteins respectively. Less frequently encountered domains, which are nevertheless still found in a notable number of proteins, include the Leucine-rich repeats (LRR), the TNF and TNFR, the Integrin alpha (INTA) and SUSHI domains. A complete list of the domains can be found in Supplemental Table S3.

## 4. Discussion

In this paper we describe the creation of a database that includes those genes expressed by immune cells which encode for proteins located at the cell surface. Hence, we have decided to call it the “cell-surface immunome database”. The term “immunome” was originally coined to refer to the totality of rearranged antibodies and antigen receptors in the human population [18]. It was later

**Table 2**  
List with the most frequent extracellular domains.

Symbol	Description Name	N° of members
IG	Immunoglobulin	250
FN3	Fibronectin type 3 domain	61
CTL	C-type lectin	49
LRR	Leucine-rich repeats	28
TNFR	Tumour necrosis factor receptor family	26
EGF	Epidermal growth factor domain	19
INTA	Integrin alpha	17
TNF	Tumour necrosis factor family	17
PSI	Domain found in Plexins, Semaphorins and Integrins	15
CADHERIN	Cadherin repeats	13
SUSHI	Sushi domain (SCR repeat)	13
VWA	Von Willebrand factor (vWF) type A domain	13
EGFCA	Calcium-binding EGF-like domain	12
EGFL	Epidermal growth factor-like domain	10
LDLA	Low-density lipoprotein receptor domain class A	10
DISINT	Homologues of snake disintegrins	8
SEMA	Semaphorin domain	8
ANK	Ankyrin repeats	7
SR	Scavenger receptor Cys-rich	7
CUB	Domain first found in C1r, C1s, uEGF, and bone morphogenetic protein	6
LDLRB	Low-density lipoprotein-receptor YWTD domain	6
ACR	ADAM cysteine-rich domain	5
FU	Furin-like repeats	5
FZ	Fz domain	5
REP	Replication protein	5
FN2	Fibronectin type 2 domain	5

used by other authors to denote the set of human genes and proteins involved in various processes of the immune system; i.e., immunology-related genes [8]. Here, we use the term cell-surface immunome to denote that set of genes expressed in immune cells or lymphoid tissues whose proteins are located on the plasma membrane. Thus far we have identified and recorded 1015 genes. This number probably represents only a part of the entire cell-surface immunome. In a recently published paper, Fagerberg et al. [3] analyzed the protein sequences from the 21,416 annotated genes in the human genome using, and then comparing seven different membrane topology prediction methods. Based on a majority decision method they estimated that 5539 human genes code for membrane proteins, which corresponds to 26% of the human-coding genes. This estimation is in agreement with what has been reported by other authors [19]. Da Cunha et al. [2] employing a bioinformatics strategy, identified 3702 genes that coded for cell-surface transmembrane proteins (~20% of all known genes). Taking into account these numbers, as well as previous estimations on the number of plasma membrane proteins expressed by leukocytes [1], it is very likely that our database is not complete. Once our database is accessible on the HCDM webpage (<http://www.hlda9.org>), contributions from different groups and researchers will therefore be essential to the successful expansion and improvement of our current compendium. Most likely the majority of genes missing in our database correspond to proteins expressed on cells other than leukocytes, but which are present in lymphoid tissues such as stromal or endothelial cells.

In total, we have identified 54 families that have at least 3 members. About 10% of the genes either belong to families with less than 3 members or lack any clear family assignment. The most abundant family is the IgSF, representing almost 20% of the dataset. This was not unexpected since the IgSF is one of the largest and most diverse groups of proteins in the human genome [20]. Members of this family play a central role in multiple mechanisms in the immune system including cell-cell communication, recognition, adhesion and signalling [21,22]. It is therefore not surprising that the most common domain is the IG domain, which is present in approximately 25% of the proteins in our database. Next in size is the GPRC superfamily, which represents about 14% of the dataset.

Despite constituting the second largest group, it only represents about 20% of the total number of GPCRs estimated to be present at the cell surface [2]. Interestingly, the IgSF is also the family with the highest numbers of CDs, comprising almost 70% of the total. In contrast, only 15% of the members of the GPRC superfamily have a CD number. One likely explanation is that these molecules may have a lower immunogenicity, since CD assignment is strictly based on the availability of mAbs able to recognize the natural protein [23]. Other families with high percentages of CDs are the TNF receptor superfamily (80%), the Toll-like receptor family (75%), the Integrin and Sialomucin families (over 70%), and the TNF and Cytokine families (over 60%). This was expected given the essential roles these molecules play in the regulation of immune responses. Several relatively abundant families, which might be included in the general functional category of transporters [19] such as the Major facilitator superfamily, and the Transient receptor and Potassium channel families do not have any CD designation. The fact that the expression of most of these molecules is not restricted to leukocytes may explain this.

By using recombinant proteins, antibodies, especially polyclonal antibodies, have been generated against a large percentage of proteins encoded by the genes recorded in this database [24]. However, we estimate that for more than half of these proteins, there are no mAbs currently available with the capacity to recognize such proteins in their natural conformation. Thus, we hope that this database will boost the production of new mAbs and consequently stimulate additional studies to address the functional role these proteins play in immune responses. The ultimate goal of this database is to serve as a reference set for studies aiming to identify and characterize potential diagnostic and therapeutic targets and biomarkers of disease.

#### Acknowledgements

This publication was made possible by grants from the *Ministerio de Ciencia e Innovación* (SAF 2006-00490 and SAF 2009-07071) and from the *Fondo de Investigación Sanitaria* (FIS PI080320). The authors thank all members of the laboratory for their participation in the generation of the database.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.imlet.2010.09.016.

## References

- [1] Zola H. Medical applications of leukocyte surface molecules – the CD molecules. *Mol Med* 2006;12:312–6.
- [2] da Cunha JP, Galante PA, de Souza JE, de Souza RF, Carvalho PM, Ohara DT, et al. Bioinformatics construction of the human cell surfaceome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:16752–7.
- [3] Fagerberg L, Jonasson K, von HG, Uhlen M, Berglund L. Prediction of the human membrane proteome. *Proteomics* 2010;10:1141–9.
- [4] Brusci V, Zeleznikow J, Petrovsky N. Molecular immunology databases and data repositories. *J Immunol Methods* 2000;238:17–28.
- [5] Kelley J, de BB, Trowsdale J. IRIS: a database surveying known human immune system genes. *Genomics* 2005;85:503–11.
- [6] Ortutay C, Vihinen M. Immunome: a reference set of genes and proteins for systems biology of the human immune system. *Cell Immunol* 2006;244:87–9.
- [7] Ortutay C, Vihinen M. Immunome knowledge base (IKB): an integrated service for immunome research. *BMC Immunol* 2009;10:3–7.
- [8] Ortutay C, Siermala M, Vihinen M. Molecular characterization of the immune system: emergence of proteins, processes, and domains. *Immunogenetics* 2007;59:333–48.
- [9] Zola H, Swart B, Nicholson I, Voss E. Leukocyte and stromal cell molecules. The CD markers. New York: Wiley; 2007.
- [10] Keshava Prasad TS, Goel R, Kandasamy K, Keerthikumar S, Kumar S, Mathivanan S, et al. Human protein reference database – 2009 update. *Nucleic Acids Res* 2009;37:D767–72.
- [11] Wu C, Orozco C, Boyer J, Leglise M, Goodale J, Batalov S, et al. BioGPS: an extensible and customizable portal for querying and organizing gene annotation resources. *Genome Biol* 2009;10:R130.
- [12] Rebhan M, Chalifa-Caspi V, Prilusky J, Lancet D. GeneCards: a novel functional genomics compendium with automated data mining and query reformulation support. *Bioinformatics* 1998;14:656–64.
- [13] Diehn M, Sherlock G, Binkley G, Jin H, Matese JC, Hernandez-Boussard T, et al. SOURCE: a unified genomic resource of functional annotations, ontologies, and gene expression data. *Nucleic Acids Res* 2003;31:219–23.
- [14] Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The gene ontology consortium. *Nat Genet* 2000;25:25–9.
- [15] Thomas PD, Campbell MJ, Kejariwal A, Mi H, Karlak B, Daverman R, et al. PANTHER: a library of protein families and subfamilies indexed by function. *Genome Res* 2003;13:2129–41.
- [16] Sonnhammer EL, Eddy SR, Durbin R. Pfam: a comprehensive database of protein domain families based on seed alignments. *Proteins* 1997;28:405–20.
- [17] Letunic I, Doerks T, Bork P. SMART 6: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res* 2009;37:D229–32.
- [18] Pederson T. The immunome. *Mol Immunol* 1999;36:1127–8.
- [19] Almen MS, Nordstrom KJ, Fredriksson R, Schioth HB. Mapping the human membrane proteome: a majority of the human membrane proteins can be classified according to function and evolutionary origin. *BMC Biol* 2009;7:50–64.
- [20] Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001;409:860–921.
- [21] Barclay AN. Membrane proteins with immunoglobulin-like domains—a master superfamily of interaction molecules. *Semin Immunol* 2003;15:215–23.
- [22] Buljan M, Bateman A. The evolution of protein domain families. *Biochem Soc Trans* 2009;37:751–5.
- [23] Zola H, Swart BW. Human leucocyte differentiation antigens. *Trends Immunol* 2003;24:353–4.
- [24] Berglund L, Bjorling E, Oksvold P, Fagerberg L, Asplund A, Szgyarto CA, et al. A gene-centric Human Protein Atlas for expression profiles based on antibodies. *Mol Cell Proteomics* 2008;7:2019–27.

