

Helena Aguilar Calafell

Tesi doctoral

Barcelona



**CARACTERITZACIÓ MOLECULAR D'UN NOU
RECEPTOR IMMUNOLÒGIC
RESTRINGIT AL LLINATGE MIELOMONOCÍTIC**

**Departament de Ciències Experimentals
i de la Salut
Programa de Doctorat en Ciències de la Salut
i de la Vida
Universitat Pompeu Fabra**

Dipòsit legal: B.7882-2007

ISBN:

Helena Aguilar Calafell

Tesi doctoral

Barcelona, 2006

**CARACTERITZACIÓ MOLECULAR D'UN NOU
RECEPTOR IMMUNOLÒGIC
RESTRINGIT AL LLINATGE MIELOMONOCÍTIC**

Memòria presentada per optar a l'obtenció del títol de Doctor per

la Universitat Pompeu Fabra (UPF)

Treball dirigit pels Drs. Miguel López-Botet Arbona

i Joan Sayós Ortega

Unitat d'Immunopatologia cel·lular

Departament de Ciències Experimentals i de la Salut (CEXS)

Programa de Doctorat en Ciències de la Salut i de la Vida de la UPF

**Dr. Miguel López-Botet Arbona
Director de Tesi**

**Dr. Joan Sayós Ortega
Director de Tesi**

Al Joan, el meu marit,

sense tu no ho hagués aconseguit.

A la Laura, per ser la meva angeleta.

*El destí el forgem nosaltres mateixos,
amb els errors i les bondats
dels homes i dones que creuen el nostre camí.
Agraïm i perdonem, doncs, per seguir forjant.*

Salvador Espriu

ABREVIATURES

AcM	Anticòs monoclonal
ADN	Àcid desoxiribonucleic
APC	Cèl·lula presentadora d'antigen
CLM	<i>CMRF-35-like molecule</i>
DAP-10	DNAX proteïna adaptadora de 10 kDa
DAP-12	DNAX proteïna adaptadora de 12 kDa
DC	Cèl·lula dendrítica
ERK	Quinasa regulada per senyals extracel·lulars
FcR	Receptor Fc
GM-CSF	Factor estimulator de colònies de monòcits i macròfags
IFN	Interferó
Ig-SF	Superfamília de les immunoglobulines
ILT	<i>Immunoglobulin-like transcript</i>
IL	Interleucina
ITAM	Seqüència activadora d'immunoreceptors que conté tirosines
ITIM	Seqüència activadora d'immunoreceptors que conté tirosines
LPS	Lipopolisacàrid bacterià
Lys	Lisina
iMDDC	Cèl·lules dendrítiques immadures derivades de monòcits
mMDDC	Cèl·lules dendrítiques madures derivades de monòcits
MHC	Complex major d'histocompatibilitat
M-CSF	Factor estimulator de colònies de macròfags
NFAT	Factor nuclear de cèl·lules T activades
NF-kB	Factor nuclear k de cèl·lules B

NK	Cèl·lula <i>Natural Killer</i> o citotòxica natural
PBMC	Cèl·lules mononuclears de sang perifèrica
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
PI3K	Fosfatidil inositol 3 quinasa
PMA	Èster de forbol (<i>Phorbol-12-myristate-13-acetate</i>)
RBL	Línia de basòfils de rata
SAM	Anticòs d'ovella anti-IgG de ratolí
SHIP	Inositol fosfatasa amb dominis SH2
SH2	<i>Src homology 2</i>
SHP	Tirosina fosfatasa amb dominis SH2
Siglec	<i>Sialic acid Immunoglobuline Lectin</i>
SIRP	<i>Signal Regulatory Protein</i>
TCR	Receptor de limfòcits T
TLR	<i>Toll-like receptors</i>
TREM	<i>Triggering receptor expressed on monocytes</i>
TNF	Factor de Necrosi Tumoral
WB	<i>Western blot</i>

3.8 Assaigs de l'activació d'un gen reporter.	43
3.9 Mesura de l'alliberació del TNF α .	44
3.10 Assaig de la mobilització de calci.	45
4. Resultats	49
4.1 Clonatge d'IREM-2/CD300e.	49
4.2 Homologia d'IREM-2 amb molècules relacionades.	51
4.3 Expressió d'IREM-2	
4.3.1 Expressió d'IREM-2 a nivell transcripcional.	54
4.3.2 Obtenció d'anticossos monoclonals específics per IREM-2.	55
4.3.3 Distribució de la proteïna IREM-2.	57
4.3.4 Expressió d'IREM-2 al llarg de la diferenciació dels monòcits.	60
4.4 Caracterització bioquímica d'IREM-2.	64
4.5 Associació d'IREM-2 a molècules adaptadores.	66
4.6 IREM-2 indueix l'activitat transcripcional de NFAT.	68
4.7 IREM-2 indueix l'alliberació de TNF α en monòcits.	71
4.8 L'AcM UP-H2 mobilitza calci intracel·lular però no activa ERK a través d'IREM-2 en monòcits.	72
4.9 Aplicació de l'anticòs per la caracterització de leucèmies.	75
5. Discussió	79
6. Conclusions	93
7. Referències bibliogràfiques	97

RESUM

Per tal d'identificar nous membres de la família de receptors CD300L, es va fer una cerca a la base de dades genòmica utilitzant les seqüències d'IREM-1 (nou receptor inhibidor identificat en el nostre laboratori) i CMRF-35, i es va descriure un nou membre de la família anomenat "*immune receptor expressed on myeloid cells*" (IREM-2/CD300e). El gen localitzat en el cromosoma 17q25.1 codifica per una proteïna de 205 aminoàcids formada per una regió extracel·lular amb un domini immunoglobulina i una regió transmembrana amb un residu carregat positivament (Lys), el qual permet predir la seva possible associació a una molècula adaptadora. La interacció entre IREM-2 i DAP-12 es va confirmar en cèl·lules COS transfectades. Emprant els anticossos específics generats amb cèl·lules de sang perifèrica i del moll de l'os vàrem observar que l'expressió d'IREM-2 està restringida a cèl·lules hematopoètiques madures del llinatge mielomonocític. La diferenciació *in vitro* a macròfags o cèl·lules dendrítiques immadures provoca una disminució de l'expressió d'IREM-2. L'estimulació, amb els anticossos específics, d'IREM-2 en la línia cel·lular RBL (leucèmia basofílica de rata) juntament amb DAP-12 induïx l'activitat transcripcional d'NFAT i en absència de DAP-12 es requereix la presència d'un coestímul, el PMA, per produir activitat transcripcional. A més a més, l'estimulació d'IREM-2 en monòcits induïx la producció de TNF- α i l'alliberació de calci intracel·lular. Com a conclusió, aquests resultats indiquen que IREM-2 és un nou receptor activador de la superfamília de les immunoglobulines expressat en el llinatge mielomonocític.

1. INTRODUCCIÓ

1.1 Immunitat innata

La capacitat per a discriminar un microorganisme d'un altre és una de les característiques principals de la immunitat innata i representa la primera línia defensiva contra els patògens. Els elements essencials d'aquesta són les barreres físiques i químiques, com són els epitelis i les substàncies antimicrobianes secretades per aquests; les proteïnes sanguínies, entre les que s'inclouen membres del sistema del complement i altres mediadors de la inflamació; i les cèl·lules fagocítiques (neutròfils, macròfags) i altres leucòcits, com les cèl·lules citotòxiques naturals (NKs). Tot i que la immunitat innata i la immunitat específica tenen mecanismes de resposta diferents, s'acaben integrant.

1.2. Participació de les cèl·lules mielomonocítiques en la resposta immunitària.

Els monòcits circulants donen lloc a una varietat de macròfags residents en diferents teixits i a altres cèl·lules especialitzades com són les cèl·lules dendrítiques i els osteoclastes. Els monòcits s'originen a la medul·la òssia, a partir d'un progenitor mieloide comú compartit amb els neutròfils, i en ser alliberats al torrent circulatori circulen durant dies abans d'entrar als teixits per tal d'abastar-los de macròfags tissulars (Volkman and Gowans 1965). La morfologia dels monòcits madurs a la circulació perifèrica és heterogènia i constitueixen entre un cinc i un deu per cent dels leucòcits circulants en humans. Estímuls proinflamatoris, metabòlics i immunològics són els que provoquen el reclutament dels monòcits als teixits perifèrics (Van Furth, Diesselhoff-den Dulk et al. 1973), on té lloc la diferenciació a macròfags o a cèl·lules dendrítiques

contribuint, així, a la defensa i al remodelatge i reparació dels teixits. Tot i que és clar que els monòcits són els precursors dels macròfags i de les cèl·lules dendrítiques, aquesta via de diferenciació i desenvolupament està relativament poc estudiada *in vivo*.

Inicialment els monòcits eren identificats per l'expressió de CD14, però l'expressió diferencial de CD14 i CD16 (també conegut com FcγRIII) va permetre dividir els monòcits en dos subgrups: les cèl·lules CD14^{hi}CD16⁻, anomenades monòcits clàssics i les cèl·lules CD14⁺CD16⁺ (Passlick, Flieger et al. 1989). Aquestes últimes expressen més molècules MHC classe II i CD32 (també conegut com FcγRII). Les cèl·lules CD14^{hi}CD16⁻ expressen CCR2 mentre que els monòcits CD14⁺CD16⁺ expressen CCR5 (Weber, Belge et al. 2000). Grage-Griebenow *et al* van descriure un subgrup addicional de cèl·lules definides per l'expressió de CD14, CD16 i CD64 (també conegut com FcγRI). Aquestes combinen característiques de monòcits i DCs, amb una elevada expressió de CD86 i HLA-DR i una alta activitat estimuladora de cèl·lules T. Comparats amb els monòcits CD14^{hi}CD16⁻CD64⁺, els monòcits CD14⁺CD16⁺CD64⁺ mostren una elevada activitat fagocítica i produeixen grans quantitats de citokines com el TNF i la IL-6 (Grage-Griebenow, Zawatzky et al. 2001). Tot i que aquestes observacions obtingudes han permès una millor comprensió del destí i de la funció dels diferents subgrups de monòcits, per tal de determinar el paper funcional d'aquestes cèl·lules, manquen estudis realitzats en un context més fisiològic.

Sallusto i Lanzavecchia van mostrar la generació de cèl·lules dendrítiques a partir de monòcits obtinguts de sang perifèrica després del cultiu *in vitro* amb les citokines GM-CSF i IL-4. Tot i que els sistemes de diferenciació dels monòcits *in vitro* possiblement no mimetitzen les condicions fisiològiques que controlen els mecanismes de diferenciació dels monòcits *in vivo*, actualment, aquest mètode és el més emprat per

fer estudis de diferenciació i maduració de cèl·lules dendrítiques, donada la dificultat que comporta treballar amb cèl·lules dendrítiques aïllades i cultivades *ex-vivo*. A més a més, d'aquesta manera és com s'obtenen les cèl·lules dendrítiques pels tractaments immunoterapèutics contra el càncer (Banchereau and Palucka 2005).

Les cèl·lules dendrítiques immadures derivades dels monòcits poden ser madurades mitjançant el tractament amb diferents estímuls com són l'LPS, TNF α , INF γ o CD40L (Ardavin, Martinez del Hoyo et al. 2001). La maduració de les cèl·lules dendrítiques és un procés complex que s'associa a l'augment d'expressió de MHC II i de molècules coestimuladores, juntament amb canvis importants com són la capacitat de processament i de presentació de l'antigen, el comportament migratori, i la capacitat de modular i induir les respostes de cèl·lules B, T i NK (Palucka, Taquet et al. 1999). Dades recents suggereixen que estímuls de maduració diferents podrien conferir funcions específiques a les cèl·lules dendrítiques derivades de monòcits, reflectint la plasticitat de la diferenciació dels monòcits (Banchereau and Palucka 2005). La IL-4 sembla que té un paper essencial com a reguladora de la diferenciació de monòcits a cèl·lules dendrítiques. L'efecte de la IL-4 sobre la diferenciació dels monòcits té lloc mitjançant la modulació de l'expressió de diferents receptors de citoquines (Menetrier-Caux, Thomachot et al. 2001), és a dir, la IL-4 provoca una disminució de l'expressió del receptor del M-CSF (CD115), una disminució de la producció de M-CSF i fa que es mantingui l'expressió del receptor del GM-CSF (CD116).

El M-CSF condueix la diferenciació dels monòcits a macròfags i aquest efecte és augmentat en presència de IL-6 i INF γ (Chomarar, Banchereau et al. 2000; Delneste, Charbonnier et al. 2003). El M-CSF actua com un regulador negatiu de la diferenciació dels monòcits a cèl·lules dendrítiques induint una producció autocrina de la citoquina i

un augment de l'expressió del seu receptor. Per altra banda, s'ha demostrat que el bloqueig de la diferenciació a DCs és degut a la combinació dels efectes produïts pels patògens, a través dels lligands dels TLRs, com per les citoquines secretades per les cèl·lules inflamatòries (Rotta, Edwards et al. 2003).

Geissmann i col·laboradors van demostrar que en afegir TGF- β als monòcits humans cultivats amb GM-CSF i IL-4 s'estimulava la diferenciació de les cèl·lules de Langerhans (Geissmann, Prost et al. 1998). Això ha sigut corroborat pel fet que els ratolins deficientes en TGF- β tenen un defecte en les cèl·lules de Langerhans però no en el desenvolupament de la resta de cèl·lules dendrítiques (Borkowski, Letterio et al. 1996).

Els osteoclastes es formen per la fusió de precursors d'origen mielomonocític i degut a les seves característiques immunohistoquímiques són considerats un tipus especialitzat de macròfags. La diferenciació dels osteoclastes *in vitro* té lloc mitjançant l'estimulació de cèl·lules hematopoètiques enriquides (per exemple cèl·lules de la melsa o cèl·lules del moll de l'os) amb una combinació de les citoquines RANKL i M-CSF (Lacey, Timms et al. 1998; Quinn, Elliott et al. 1998) o amb el cultiu conjunt amb altres cèl·lules que produeixen aquests factors, com per exemple les cèl·lules T activades (Horwood, Kartsogiannis et al. 1999).

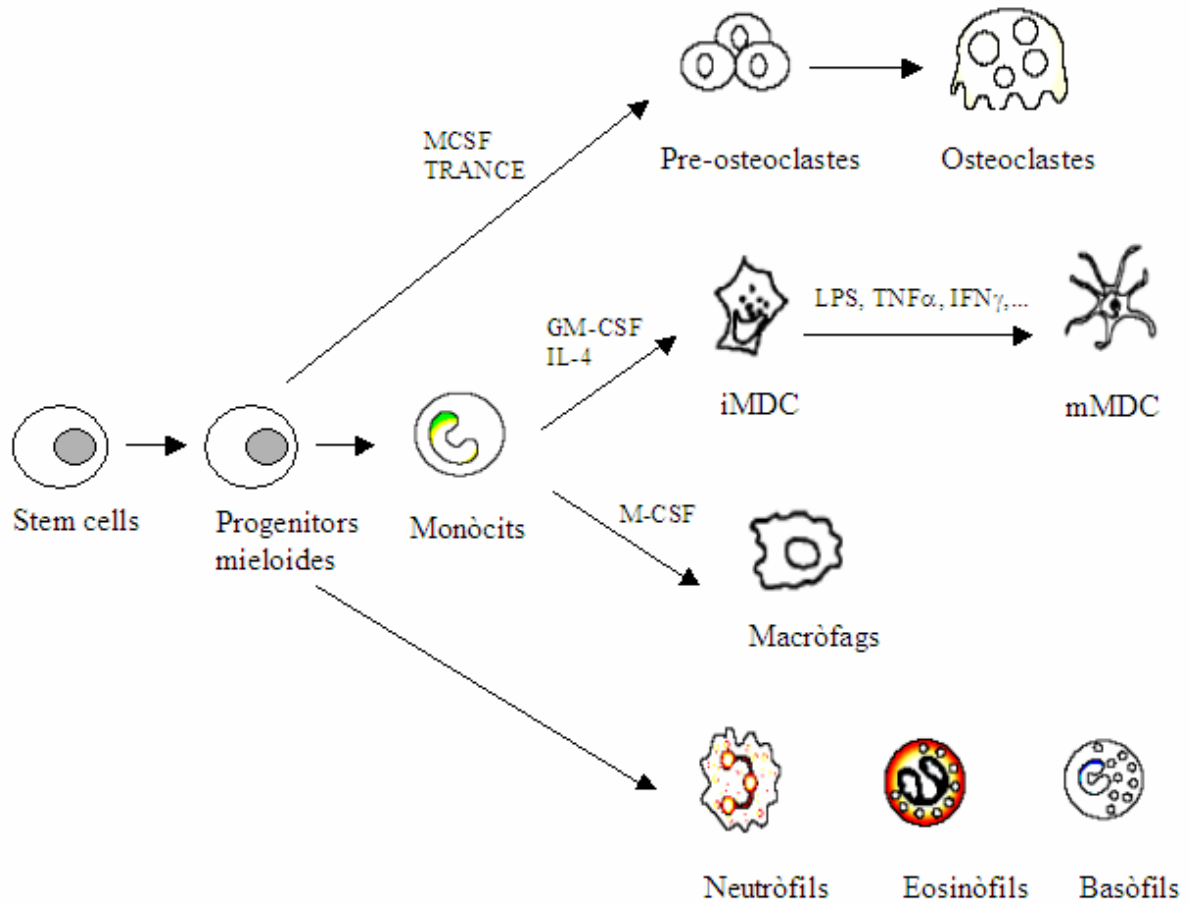


Figura 1. Origen i diferenciació de les cèl·lules mieloides.

1.3. Receptors activadors i inhibidors implicats en la immunitat innata.

La primera línia de defensa ve donada per l'acció coordinada de diferents tipus de cèl·lules efectores com són les cèl·lules fagocítiques i les *natural killer* (NK). Aquestes cèl·lules expressen a la seva superfície una sèrie de receptors, alguns dels quals reconeixen patògens i activen respostes contra els estímuls infecciosos o inflamatoris. Els *Toll-like receptors* (TLRs) reconeixen diferents estructures microbianes com són el lipopolisacàrid, l'àcid lipoteicòic, la flagelina i l'ADN bacterià (Poltorak, He et al. 1998; Hoffmann, Kafatos et al. 1999; Akira, Takeda et al. 2001;

Medzhitov 2001). Els receptors de la mannososa, *scavengers* i de la dectina promouen la unió i la fagocitosi dels microorganismes i partícules estranyes (Aderem and Underhill 1999; Linehan, Martinez-Pomares et al. 2000; Brown, Taylor et al. 2002).

Les cèl·lules involucrades en la immunitat innata, a més a més, expressen receptors de les superfamílies de les immunoglobulines i de les lectines que reconeixen molècules que s'expressen de forma endògena, com per exemple: molècules de classe I (MHC I) (Lanier 1998; Dietrich, Nakajima et al. 2000), CD47 (Oldenborg, Zheleznyak et al. 2000), CD200 (Barclay, Wright et al. 2002) i àcids siàlics (Crocker and Varki 2001). Aquests receptors contenen *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs* (ITIMs) els quals mitjançant la unió de proteïnes tirosina fosfatases provoquen un efecte inhibidor. Per tant, les cèl·lules fagocítiques i les NKs, mentre interaccionen amb els seus lligands naturals reben contínuament senyals d'inhibició, donant lloc a la tolerància pel que és propi. Durant la infecció, els senyals d'activació causats pels patògens superen els que transmeten els receptors inhibidors. D'altra banda, alguns patògens indueixen la disminució de l'expressió dels lligands dels receptors inhibidors. Així doncs, la resposta immunitària innata contra els patògens i la tolerància al que és propi depèn d'un equilibri dinàmic entre els senyals activadors i inhibidors.

Un fet curiós és que normalment els receptors inhibidors normalment es troben codificats en clústers que també contenen gens que codifiquen per receptors activadors (Trowsdale 2001). Les formes activadores i inhibidores tenen un domini extracel·lular molt similar mentre que la part intracel·lular és molt diferent. Els receptors activadors no tenen elements de senyalització en la seva part citoplasmàtica, però tenen un residu amb càrrega positiva en el fragment transmembrana el qual permet l'associació del receptor amb molècules adaptadores les quals contenen *immunoreceptor tyrosine-based*

activation motifs (ITAMS) on s'uniran les tirosina quinases per donar lloc a l'activació (Tomasello, Blery et al. 2000). En definitiva, els motius ITIM i ITAM dels receptors de superfície són la base estructural dels dos tipus de senyalització oposada.

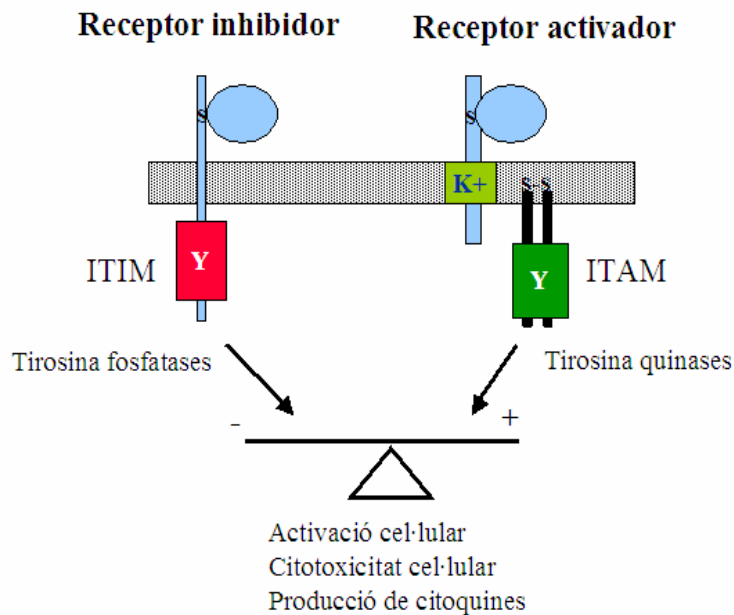


Figura 2: Representació esquemàtica d'un receptor activador i un receptor inhibidor.

1.3.1. Receptors inhibidors

Els receptors inhibidors es caracteritzen per la seva capacitat d'inhibir senyals iniciats per altres receptors de la superfície cel·lular. Aquests posseeixen un o més motius ITIM en el seu domini intracitoplasmàtic els quals compleixen la seqüència consens (V/IxYxxL/V) (Long 1999). Després de la interacció del receptor amb el seu lligant té lloc la fosforilació de les tirosines de l'ITIM duent a terme una recaptació i

activació de les fosfatases que contenen dominis SH2, com per exemple SHP-1, SHP-2 (*Src homology 2 domain containing protein tyrosine phosphatase 1, 2*) i SHIP (*Src homology SH2 domain-containing inositol phosphatase*) (Malbec, Fong et al. 1998). Els assaigs *in vitro* indiquen que els diferents receptors amb motius ITIM mostren certa preferència a l'hora d'associar-se a un tipus de fosfatases o a un altre, però la base estructural d'aquesta selectivitat encara no s'ha definit. SHP-1 s'expressa principalment en el citoplasma de les cèl·lules hematopoètiques (Pei, Lorenz et al. 1994) i conté dos dominis SH2, un domini fosfatasa catalític i dos llocs de fosforilació de tirosines a la regió C terminal. Quan SHP-1 és activat té lloc la defosforilació d'elements clau en la via d'activació de cèl·lules limfoides i mieloides produint-se una inhibició de l'activació cel·lular (Bolland and Ravetch 1999). S'ha demostrat que SHP-1 pot defosforilar src quinases, molècules que contenen ITAMs, syk quinases i proteïnes adaptadores com LAT, SLP-70. SHIP interfereix amb la senyalització depenent de calci a l'hidrolitzar fosfoinositols de membrana (PIP₃). La funció de SHP-2 està pitjor definida.

1.3.2 Receptors activadors

Els receptors activadors tenen un domini intracel·lular més curt i a la regió transmembrana hi ha un aminoàcid amb càrrega positiva (Lys o Arg). Aquest residu permetrà l'associació del receptor amb molècules adaptadores que es caracteritzen per expressar un aminoàcid amb càrrega negativa en el fragment transmembrana i contenir ITAMs a la part intracitoplasmàtica.

L'activació del receptor promourà la fosforilació de les molècules adaptadores que contenen els ITAMs i la recaptació i activació de les quinases Syk (*spleen tyrosine*

kinase) (Chu, Morita et al. 1998) i/o Zap-70 (*ζ-chain-associated protein 70*) (van Oers and Weiss 1995). Aquestes, llavors, s'uniran i fosforilaran Cbl i Grb2 (*growth factor receptor binding protein 2*), la qual cosa donarà lloc al reclutament i activació de PI3K (*phosphatidylinositol 3-kinase*), PLC- γ (*phospholipase C γ*) i les vies d'ERK (*extracellular-signal-regulated kinase*) (McVicar, Taylor et al. 1998). Finalment, l'activació del receptor provoca una mobilització de calci intracel·lular, una reorganització del citoesquelet d'actina i l'activació de diferents complexos transcripcionals, com és el cas d'ELK1, el factor nuclear de cèl·lules T activades (NFAT), la proteïna activadora 1 (AP1) i el factor nuclear kB (NF-kB), la qual cosa promou diverses funcions com són la producció de citokines, proliferació o citotoxicitat cel·lular (Isakov 1998).

Alguns receptors activadors també poden contribuir a la supervivència mitjançant el reconeixement de molècules endògenes, l'expressió de les quals és induïda en situacions d'estrès, en cèl·lules tumorals, en el transcurs d'una infecció vírica o en processos inflamatoris, com és el cas de les molècules anomenades MICA i MICB (*MHC class I-related chain*).

1.3.2.1 Proteïnes adaptadores que contenen el motiu ITAM en cèl·lules mieloides.

L'ITAM va ser inicialment descrit com una seqüència comú que es trobava en les cues citoplasmàtiques de les cadenes associades al T-cell receptor (TCR), B-cell receptor (BCR) i certs Fc receptors (Reth 1989). Actualment, s'ha descrit que el motiu YxxL/Ix6-8YxxL/I es troba present en un bon nombre de receptors i de proteïnes adaptadores transmembrana (TCR ζ , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , FcR γ , CD79a, CD79b,

KARAP/DAP-12). Les tirosines inserides a l'ITAM són necessàries per la inducció de senyals intracel·lulars (Letourneur and Klausner 1992).

Tot i que la majoria d'ITAMs es troben en petites molècules adaptadores, hi ha alguns receptors que porten l'ITAM integrat en el seu domini citoplasmàtic, com per exemple FcRIIA i Dectin-1 (Brown, Herre et al. 2003) els quals es troben presents en les cèl·lules mieloides. S'ha descrit que alguns virus codifiquen per proteïnes que contenen ITAMs i també s'ha detectat en teixits no hematopoètics com per exemple en el cervell, particularment en les cèl·lules de la microglia. Una altra funció dels ITAMs és la reorganització del citoesquelet induïda per receptors d'adhesió (Urzainqui, Serrador et al. 2002).

Concretament en les cèl·lules mieloides, les dues molècules adaptadores que contenen ITAMs expressades són DAP-12 i la cadena FcR γ (Takai, Li et al. 1994; Lanier and Bakker 2000). La cadena FcR γ és requerida per la funció dels receptors per IgG, FcR γ I (CD64) i FcR γ III (CD16), i del receptor per IgE, FcR ϵ I (Ravetch and Bolland 2001)

L'última molècula adaptadora identificada va ser anomenada *killer cell activating receptor-associated protein* (KARAP), *DNAX activating protein of 12 kDa* (DAP-12) i *tyrosine kinase binding protein* (TYROBP) (Lanier, Corliss et al. 1998; Tomasello, Olcese et al. 1998). S'han trobat transcrits de DAP-12 en peixos, rosegadors, porcs i humans, la qual cosa mostra l'elevat grau de conservació d'aquest component de la senyalització cel·lular en vertebrats. S'ha detectat expressió de DAP-12 tant en cèl·lules limfoides com en cèl·lules mieloides, on es pot associar amb diferents immunoreceptors activadors contribuint a una gran diversitat de funcions

biològiques involucrades en la regulació de la resposta immune i en altres processos biològics com per exemple el remodelatge de l'os.

1.3.2.2 DAP-10

DAP-10 és una proteïna de membrana de tipus I de 93 aminoàcids. Està formada per un domini extracel·lular molt curt i un domini transmembrana amb un residu carregat negativament (Asp) que es troba conservat a la resta de molècules adaptadores. El domini intracitoplasmàtic té un motiu Tyr-X-X-Met (YxxM) que és diferent als ITAM (que trobem a la resta de molècules adaptadores), i és un potencial lloc d'unió a la subunitat p85 de la PI3K, la qual suggereix el seu paper com a molècula adaptadora (Chang, Dietrich et al. 1999). El motiu YxxM acostuma a ser present en molècules coestimuladores, com per exemple, CD28, ICOS o CD19.

Els gens de DAP-10 i DAP-12 es troben en el cromosoma humà 19q13.1, en la orientació transcripcional oposada i separats només per 130 parells de bases (Wu, Song et al. 1999). DAP-10 s'expressa predominantment en cèl·lules hematopoètiques, més concretament en cèl·lules NK, cèl·lules T, monòcits, granulòcits i cèl·lules dendrítiques.

DAP-10 s'ha descrit associat a NKG2D, un receptor activador de superfície que s'expressa en cèl·lules NK, cèl·lules T CD8⁺, cèl·lules T $\gamma\delta$ i macròfags. NKG2D és estimulat pels seus lligands (MICA, MICB i UL-16 binding proteins (ULBP)) en cèl·lules que han patit modificacions per infeccions, transformació tumoral o estrès (Bauer, Groh et al. 1999; Jamieson, Diefenbach et al. 2002). Estudis recents en ratolins han demostrat que NKG2D pot enviar diferents tipus de senyals en funció de la seva associació a DAP-10 o DAP-12. A grans trets, aquests resultats indiquen que en cèl·lules T, NKG2D només dóna lloc a senyals coestimuladors, i en canvi, en els cas de

les cèl·lules que participen en la immunitat innata, com són les cèl·lules NK o els macròfags, els senyals produïts són tant estimuladors com coestimuladors. Sembla ser que aquesta versatilitat ve donada per l'expressió selectiva de DAP-10 i DAP-12 en els diferents tipus cel·lulars i la seva associació diferent a les isoformes alternatives de NKG2D (Diefenbach, Tomasello et al. 2002; Gilfillan, Ho et al. 2002).

1.4 Receptors de la Ig-SF que s'expressen en les cèl·lules mieloides.

1.4.1. *ILT (Immunoglobulin-like transcript)/LILR (Leukocyte Ig-like receptors) /MIR (Monocyte/macrophage Ig-like receptors)/ CD85*

Aquesta família inclou deu receptors diferents els quals tenen entre dos i quatre dominis immunoglobulina extracel·lulars tipus C2 i difereixen en el seu domini transmembrana i la regió intracel·lular (Cosman, Fanger et al. 1997). Els receptors ILT2, ILT3, ILT4, ILT5 i LIR8 es caracteritzen per tenir cues citoplasmàtiques llargues amb ITIMs, en canvi, els receptors ILT-1, LIR-6a, LIR-6b, ILT-7 i ILT-8 mostren un domini intracel·lular molt curt, sense motius de senyalització, i un aminoàcid arginina amb càrrega positiva en el fragment transmembrana que els permet associar-se a la proteïna adaptadora FcR γ . Finalment, el receptor ILT-6 no consta de domini intracitoplasmàtic ni domini transmembrana, la qual cosa suggereix que podria ser secretat com a receptor soluble (figura 3).

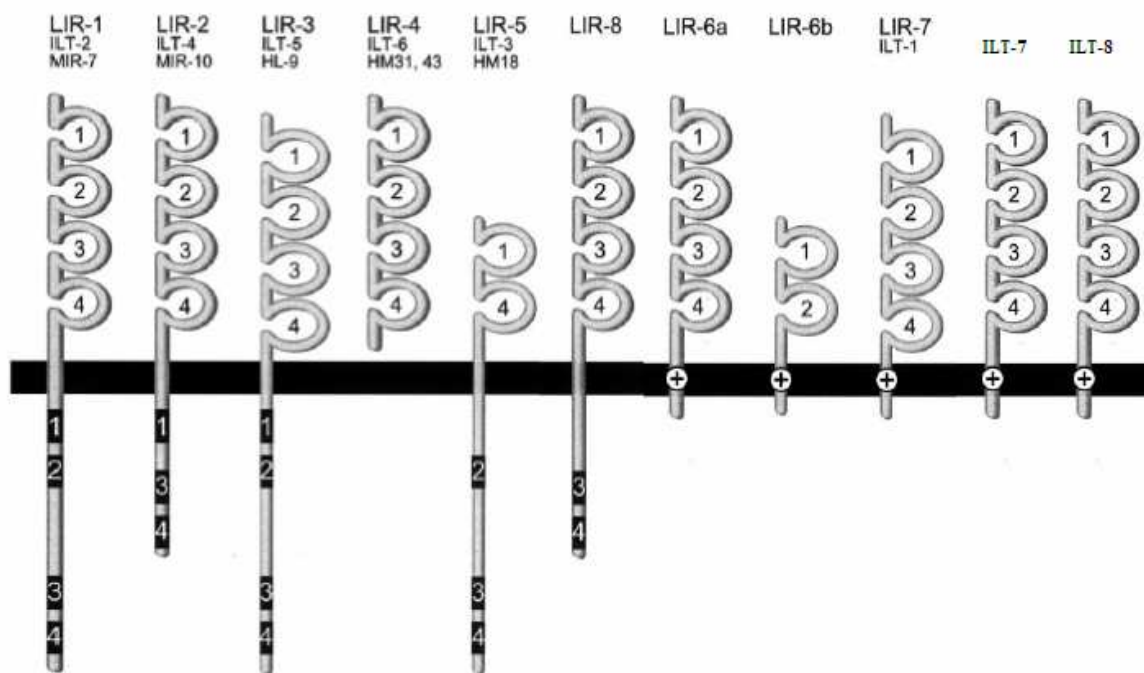


Figura 3: Formes activadores i inhibidores de la família de receptors ILT/LIR/MIR.

Font: Adaptació de Luis Borges i David Cosman, 2000.

Aquests receptors són homòlegs als KIRs (Long, Burshtyn et al. 1997), al receptor Fc α R (Maliszewski, March et al. 1990), al receptor inhibidor associat a leucòcits (LAIR) (Meyaard, Adema et al. 1997) i al receptor activador de NKs (NKp46) (Pessino, Sivori et al. 1998). Els gens que codifiquen per tots aquests receptors es troben en el cromosoma humà 19q13.4 i estan estretament lligats (Wagtman, Rojo et al. 1997; Torkar, Norgate et al. 1998; Wende, Colonna et al. 1999). Els homòlegs múrids dels ILT/LIR/MIRs s'anomenen *paired Ig-like receptors* (PIRs) i estan localitzats en el cromosoma 7 (Hayami, Fukuta et al. 1997; Kubagawa, Burrows et al. 1997). Aquests es caracteritzen per cinc dominis immunoglobulina extracel·lulars tipus C2 i un tipus V. Mentre que només s'ha descrit un receptor múrid inhibidor (PIRB) se n'han trobat com

a mínim vuit isoformes (PIRAs) que donen lloc a l'activació mitjançant la unió a la molècula adaptadora FcR γ (Maeda, Kurosaki et al. 1998; Yamashita, Ono et al. 1998; Kubagawa, Chen et al. 1999).

Tot i que ILT/LIR/MIRs s'expressen preferentment en cèl·lules mieloides, es coneix que totes les cèl·lules B perifèriques expressen ILT-2 i que diferents subgrups de NKs i cèl·lules T expressen ILT-1 o ILT-2 o ILT-5. En el compartiment mioide, els monòcits expressen tots els ILTs, mentre que els granulòcits només expressen ILT-1 i ILT-5. Les cèl·lules dendrítiques expressen ILT-1 i/o ILT-3 i en funció d'aquesta expressió diferencial poden ser classificades en dos subgrups (Cella, Jarrossay et al. 1999). Les cèl·lules ILT3⁺/ILT1⁺ expressen marcadors típics de cèl·lules mieloides com són CD33, CD11c i CD13 i engloben les cèl·lules dendrítiques madures (CD1a⁻) i immadures (CD1a⁺), mentre que les cèl·lules ILT3⁺/ILT1⁻ corresponen als monòcits plasmacitoides els quals expressen CD45RA, CD36, requereixen IL-3 per viure en cultiu i representa que són l'únic tipus cel·lular especialitzat en la producció d'interferó de tipus I (IFN-I) (Cella, Jarrossay et al. 1999; Siegal, Kadowaki et al. 1999).

S'ha demostrat que ILT-2 i ILT-4 interaccionen amb un ampli ventall de molècules de classe I, com són HLA-A, HLA-B i HLA-G (Borges, Hsu et al. 1997; Colonna, Navarro et al. 1997). També s'ha vist que ILT-2 s'uneix a la molècula UL18 codificada pel citomegalovirus humà (HCMV) (Chapman, Heikeman et al. 1999). Els lligands de la resta de receptors de la família encara s'han de descobrir.

1.4.2 TREMs (*Triggering receptor expressed on monocytes*)

La família dels TREM inclou dos receptors activadors i un receptor inhibidor en humans (Colonna 2003). TREM-1 i TREM-2 humans són glicoproteïnes de membrana formades per un domini immunoglobulina de tipus V a la part extracel·lular, una regió transmembrana amb un aminoàcid carregat positivament (lisina) i una cua citoplasmàtica curta (Bouchon, Dietrich et al. 2000) (figura 4). Els dos receptors s'associen a DAP-12 per tal de realitzar la seva funció (Bouchon, Dietrich et al. 2000; Bouchon, Facchetti et al. 2001).

El receptor més proper als TREMs és Nkp44, un receptor activador que s'expressa en les cèl·lules NK, codificat per un gen lligat al que codifica pels TREM (Cantoni, Bottino et al. 1999). Menors nivells d'homologia es troben entre els TREM i els membres de la família del CMRF35 (Jackson, Hart et al. 1992; Green, Clark et al. 1998; Speckman, Wright-Daw et al. 2003). En el clúster dels TREM està inclòs, com a mínim, un altre gen que codifica per una molècula, *TREM-like transcript 1* (TLT1), la qual conté un motiu ITIM a la seva cua citoplasmàtica, que faria possible la seva funció com a receptor inhibidor. Mitjançant l'anàlisi computacional de la zona genòmica dels TREM, s'han predit altres pseudogens i TREM-like gens (figura 4).

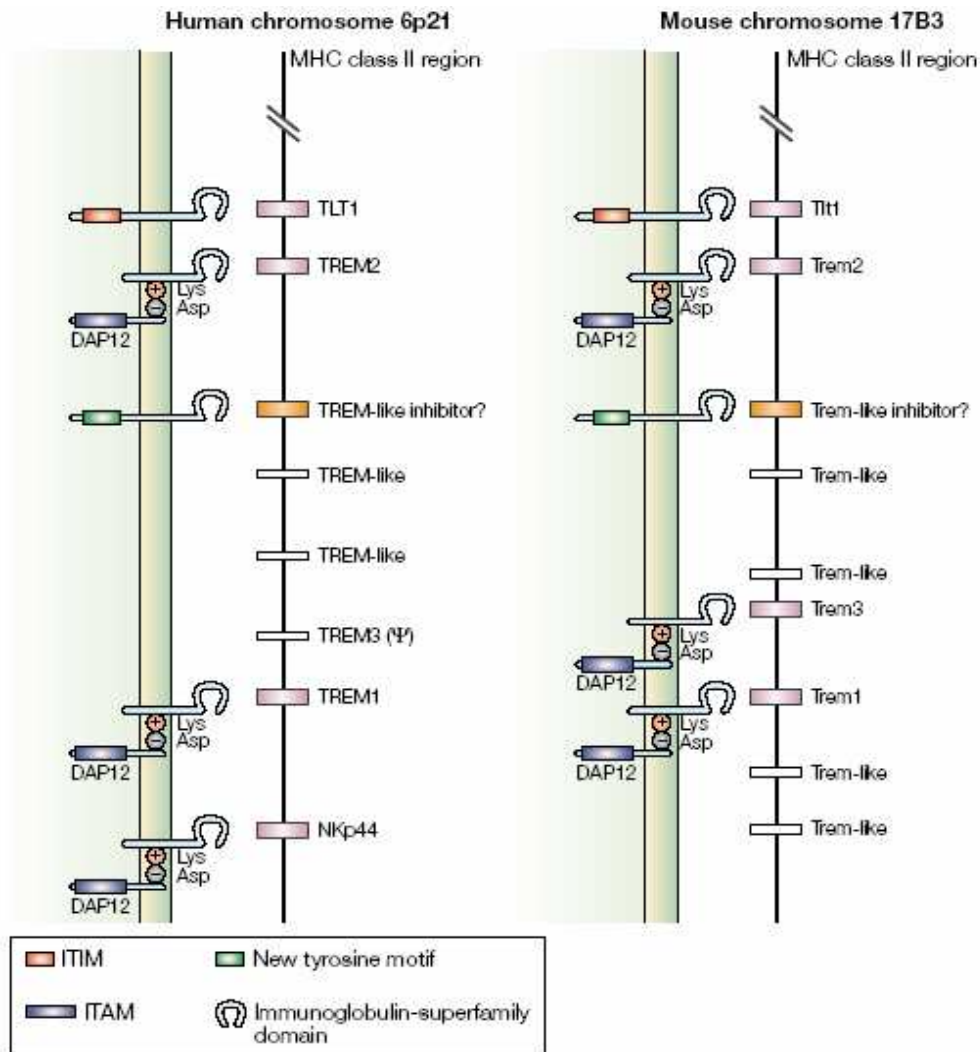


Figura 4: Organització del clúster humà i de ratolí dels TREM.

Font: Marco Colonna, 2003.

Els homòlegs de ratolí de TREM-1 i TREM-2 també s'han identificat, i a més a més s'ha trobat un tercer membre, *Trem 3*, que només existeix com a pseudogen en humans. Trem2 i Trem 3 de ratolí també s'associen amb l'adaptador DAP-12 en línies cel·lulars de macròfag transfectades i promouen l'activació cel·lular i l'alliberació de l'òxid nítric (Daws, Lanier et al. 2001; Chung, Seaman et al. 2002).

TREM-1 s'expressa en neutròfils i en un subgrup de monòcits i macròfags de la sang (Bouchon, Dietrich et al. 2000). A nivell de teixit es troba de forma selectiva en macròfags alveolars, cèl·lules especialitzades en el reconeixement de patògens, eliminació i fagocitosi de cèl·lules apoptòtiques. A més a més, també s'expressa en infiltrats neutrofílics, cèl·lules de la pell i nòduls limfàtics que han estat infectats per fongs o bacteris tant Gram-positius com Gram-negatius (Bouchon, Facchetti et al. 2001). Aquesta distribució tissular de TREM-1 indica el seu paper en la inflamació així com el fet que l'activació amb anticossos monoclonals en monòcits i en granulòcits estimula la producció de citocines i quimocines pro-inflamatòries (Bouchon, Dietrich et al. 2000; Bleharski, Kiessler et al. 2003). Quan s'utilitza LPS com a coestímul, a més a més dels anticossos monoclonals, s'observa un increment elevat de la producció de TNF i IL-1 α , mostrant que TREM-1 pot augmentar respostes inflamatòries iniciades pels TLRs. En estudis *in vivo* el paper de TREM-1, com a amplificador de la inflamació, s'ha confirmat, ja que en models de xoc sèptic el bloqueig de TREM-1 protegeix al ratolí contra el xoc i la mort (Bouchon, Facchetti et al. 2001). Tot això indica que TREM-1 té un paper crucial en l'amplificació de la resposta inflamatòria provocada pels bacteris. La identificació dels seus lligands naturals és essencial per la millor comprensió de la seva rellevància fisiològica durant la resposta innata.

TREM-2 principalment controla la funció de les cèl·lules dendrítiques, osteoclastes i micròglia. TREM-2 s'expressa en cèl·lules dendrítiques immadures derivades dels monòcits (Bouchon, Hernandez-Munain et al. 2001). Quan aquestes cèl·lules són exposades a productes microbians s'activen a través dels TLRs, el receptor del TNF (TNFR), CD40 i el receptor de TRANCE (TRANCER) (Banchereau and Steinman 1998) i llavors té lloc una disminució de l'expressió de TREM-2 (Bouchon,

Hernandez-Munain et al. 2001) i d'altres molècules com per exemple FcγR. L'expressió de CCR7 dirigeix la migració de les cèl·lules dendrítiques a les àrees de cèl·lules T dels nòduls limfàtics i augmenta l'expressió de MHC, molècules d'adhesió i coestimuladores que permeten la presentació de l'antigen. Tot i que TREM-2 va ser inicialment caracteritzat en cèl·lules dendrítiques derivades a partir de monòcits *in vitro*, evidències recents indiquen que podria ser important per la funció del cervell i per la formació de l'os donat que s'ha detectat en osteoclastes (Kaifu, Nakahara et al. 2003) i micròglia (Schmid, Sautkulis et al. 2002). Els osteoclastes són cèl·lules gegants multinucleades derivades de la fusió de precursors mieloides mononuclears en presència de dues citocines: *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) i *TNF-related activation-induced cytokine* (TRANCE) (Wong, Josien et al. 1999). No obstant precursors monocítics derivats de pacients deficients en TREM-2 i DAP-12 no aconsegueixen diferenciar-se *in vitro* a osteoclastes madurs. Per altra banda, la micròglia respon a molts estímuls fisiològics i d'estrès secretant citocines i factors neurotròpics. A més a més, contribueix a la reparació del teixit fagocitant neurones danyades.

1.4.3. SIRPs (*Signal-regulatory proteins*)

Són glicoproteïnes de membrana que s'expressen en cèl·lules mieloides, com és el cas dels macròfags, monòcits, granulòcits, cèl·lules dendrítiques i els seus precursors (Veillette, Thibaudeau et al. 1998; Brooke, Holbrook et al. 2004) i a més a més, en neurones (Adams, van der Laan et al. 1998). En humans s'han descrit a nivell de proteïna tres membres diferents: SIRPα, SIRPβ1 i SIRPβ2, l'últim dels quals s'expressa en cèl·lules T i cèl·lules NK activades. Estructuralment es caracteritzen per tenir tres

dominis immunoglobulina extracel·lulars i diferents dominis transmembrana i citoplasmàtic (Kharitononkov, Chen et al. 1997) en funció de si actuen com a receptors inhibidors o activadors.

SIRP α mostra un domini intracel·lular que conté quatre ITIMs que en ser activats reclutaran i activaran les tirosina fosfatases SHP1 i SHP2 (Timms, Carlberg et al. 1998) les quals defosforilaran diferents proteïnes donant lloc a una regulació de diferents funcions cel·lulars. Probablement, la funció de SIRP α més ben documentada és el paper inhibidor de la fagocitosi de cèl·lules hoste per macròfags. La interacció d'aquest receptor amb el seu lligand, CD47, genera un senyal inhibidor mediat per SHP-1 que regula negativament la fagocitosi (Yamao, Noguchi et al. 2002). Ratolins als quals els manca SIRP α tenen un augment en la taxa d'eliminació de plaquetes circulants (Inagaki, Yamao et al. 2000), evidències recents també impliquen a SIRP α en l'eliminació dels eritròcits vells. Un altre exemple de regulació negativa a través d'aquesta molècula és la inhibició de la producció de TNF induïda per LPS en macròfags (Smith, Patel et al. 2003). No obstant, SIRP α no només participa en senyals negatius, també s'ha vist que l'activació del receptor mitjançant CD47 en macròfags pot promoure la producció de NO via *SIRP α -associated Janus kinase* (JAK2), suggerint que SIRP α també pot activar certes funcions efectores (Alblas, Honing et al. 2005). Hi ha un ampli ventall de molècules que poden interaccionar amb SIRP α com són les tirosina quinases CSK i PYK2 i les molècules adaptadores Grb2, Fyb/SLAP-130 i SKAP55hom (Kharitononkov, Chen et al. 1997; Timms, Carlberg et al. 1998; Veillette, Thibaudreau et al. 1998; Stofega, Argetsinger et al. 2000).

Apart de tot això també sembla que la interacció SIRP α -CD47 té un paper en la fusió dels macròfags per formar cèl·lules multinucleades *in vitro* (Saginario, Sterling et

al. 1998; Han, Sterling et al. 2000). Cal veure si també és rellevant per la fusió dels osteoclastes i la formació de la cèl·lula gegant multinucleada *in vivo*. També sembla que SIRP α produeix senyals que poden modular la maduració de les cèl·lules dendrítiques (Latour, Tanaka et al. 2001). Finalment, SIRP α sembla tenir cert control sobre la migració de les cèl·lules mieloides, ja que la interacció de SIRP α en monòcits o granulòcits amb CD47 en cèl·lules epitelials o endotelials és important per la migració epitelial o transendotelial.

SIRP β 1 s'expressa en monòcits, granulòcits i cèl·lules dendrítiques (Dietrich, Cella et al. 2000; Tomasello, Cant et al. 2000; Liu, Soto et al. 2005). Tot i que està estretament relacionat amb SIRP α sembla que no s'uneix a CD47 i no conté ITIMs citoplasmàtics o altres motius de senyalització coneguts. SIRP β 1 es caracteritza per tenir un domini citoplasmàtic molt curt i un aminoàcid carregat positivament en el fragment transmembrana el qual permetrà l'associació amb DAP-12 en monòcits (Dietrich, Cella et al. 2000; Tomasello, Cant et al. 2000) i macròfags o a DAP-10 en mastòcits transfectants (RBL-2H3) (Anfossi, Lucas et al. 2003).

S'ha demostrat en cèl·lules RBL-2H3 que l'associació de SIRP β 1 amb DAP-10, contràriament a la interacció SIRP β 1-DAP-12, no li proporciona propietats estimuladores, com es demostra amb la incapacitat d'induir una alliberació de serotonina o una secreció de TNF significatives. No obstant, el complex SIRP β 1-DAP-10 actua com a un potent coestimulador suggerint l'existència de senyals coestimuladors en cèl·lules d'origen mioide. Aquest resultat també suggereix que les diferents funcions dels receptors de superfície donades per la unió a diferents molècules adaptadores permet donar diferents respostes al mateix lligand a diferents temps o sota diferents condicions.

1.4.4. CD200 receptors (CD200R)

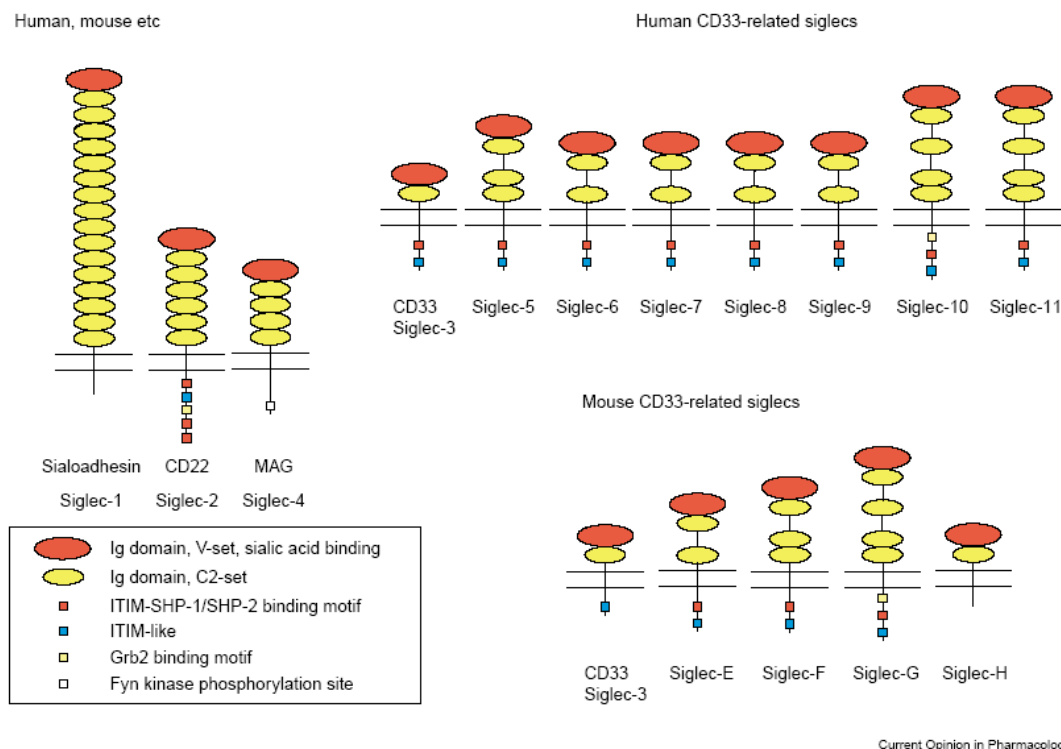
OX2, actualment designada com a CD200, és una glicoproteïna de superfície que s'expressa en un gran nombre de cèl·lules com són els timòcits, les cèl·lules B, les cèl·lules T activades, les neurones i les cèl·lules endotelials. La proteïna CD200 està formada per dos dominis immunoglobulina i un domini transmembrana i és el lligand d'un receptor relacionat estructuralment, anomenat CD200R. Anàlisis filogenètics mostren que el receptor està molt estretament relacionat a CD200 i que podria haver sorgit per duplicació gènica. La única diferència important és que el receptor consta d'una cua citoplasmàtica llarga la qual conté residus tirosina que poden ser fosforilats (Barclay, Wright et al. 2002). A més a més, se sap que CD200R es pot associar a SHIP donant lloc a una disminució de l'activitat de les cèl·lules mieloides.

1.4.5. SIGLECs (*Sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectins*)

Els Siglecs són una família de proteïnes de membrana de tipus I, amb un nombre variable de dominis immunoglobulina, que uneixen l'àcid siàlic (Figura 5).

Els Siglecs es poden dividir en dos subgrups: els *CD33-related siglecs*, que inclou el siglec-3 i els siglecs del 5 a l'11, els quals difereixen de forma significativa entre espècies (Angata, Margulies et al. 2004); i un altre grup que engloba siglec-1 o sialoadhesina, siglec-4 o *myelin-associated glycoprotein* (MAG) i siglec-2 o CD22, els quals estan menys emparentats. Tots els siglecs, excepte la MAG que es troba en cèl·lules oligodendrocítiques i cèl·lules de Schwann, s'expressen en cèl·lules del sistema immunitari. De fet, els CD33-related siglecs es troben en totes les cèl·lules del sistema

immune innat com són els monòcits, macròfags, cèl·lules dendrítiques, neutròfils, eosinòfils, basòfils i mastòcits (Lock, Zhang et al. 2004; Zhang, Biedermann et al. 2004). Els gens que codifiquen pels CD33-related siglecs s'agrupen a la regió q13.3-13.4 del cromosoma humà 19 i han evolucionat per una sèrie de duplicacions repetides. Sembla ser que el clúster dels gens CD33-related siglecs mostra diferències importants entre les diferents espècies de mamífers la qual cosa suggereix l'existència d'una ràpida evolució.



Current Opinion in Pharmacology

Figura 5: Família dels SIGLECs. Font: Paul R. Crocker, 2005.

La presència de motius ITIM i ITIM-like en la cua citoplasmàtica de 8 dels siglecs humans indica que tenen algun paper en la modulació de la funció cel·lular mitjançant el reclutament de molècules tirosina fosfatases, com són SHP-1 i SHP-2

(Ravetch and Lanier 2000). S'han descrit una gran varietat d'efectes després de l'addició d'anticossos contra els siglecs a diferents cèl·lules del sistema immunitari, com per exemple, inducció d'apoptosi en eosinòfils i neutròfils (Nutku, Aizawa et al. 2003), inhibició de la proliferació cel·lular en la leucèmia mieloide aguda (AML) (Balaian and Ball 2005) i alliberació de citoquines en monòcits (Lajaunias, Dayer et al. 2005) entre d'altres. Tot i amb això els mecanismes d'actuació encara són desconeguts.

CD22 i CD33-related siglecs són capaços d'inhibir l'alliberació de calci produïda per l'entrecreuament de receptors activadors. En un estudi recent, s'ha demostrat que, en el cas de CD22, la inhibició del flux de calci donada per l'activació del receptor de la cèl·lula B, és deguda a la interacció de la calci-ATPasa de membrana amb SHP-1 (Chen, McLean et al. 2004).

Fins ara, els siglecs s'han estudiat majoritàriament en el context d'adhesió i senyalització cel·lular però cada cop hi ha més evidències del paper que juguen en el procés d'endocitosi, mecanisme emprat per fagocitar les cèl·lules apoptòtiques i els patògens. Un exemple seria el siglec-5 humà, que s'expressa en monòcits, el qual dirigeix els fragments $F(ab)_2$ de l'anti-siglec-5 als endosomes donant lloc a una endocitosi ràpida (Lock, Zhang et al. 2004).

Sia és un terme genèric per designar una família de sucres de nou carbonis que deriven de l'àcid neuramínic o l'àcid ceto-deoxinonosònic. Normalment, en els extrems no reduïts de la cadena d'oligosacàrids s'hi troben unides una gran varietat de proteïnes i lípids. Tots els siglecs reconeixen formes de Sia que es troben a la superfície cel·lular, més concretament, els lligands dels CD33-related siglecs, en humans, són l'àcid N-glicolilneuramínic (Neu5Gc) i l'àcid N-acetilneuramínic (Neu5Ac). Tot i amb això, s'estan trobant altres molècules que interaccionen amb els siglecs de forma

independent de l'àcid siàlic. La sialoadhesina és una molècula d'adhesió altament expressada en macròfags subcapsulars que es troben en els nòduls limfàtics i pot interaccionar de forma dependent d'àcid siàlic amb cèl·lules mieloides i cèl·lules limfoides o bé amb la proteïna *macrophage galactose-binding lectin* (MGL-1) de forma independent de l'àcid siàlic (Kumamoto, Higashi et al. 2004).

1.4.6. Família CMRF35/IREM/CD300

Inicialment es van identificar els receptors CMRF35A (Jackson, Hart et al. 1992) i CMRF35H (Green, Clark et al. 1998) mitjançant un anticòs monoclonal el qual reconeixia un epítoc compartit. Aquestes molècules que pertanyen a la superfamília de les immunoglobulines tenen un domini immunoglobulina de tipus V, s'expressen en monòcits, neutròfils i un subgrup de limfòcits B i T, i són de funció desconeguda, tot i que la presència d'un motiu ITIM a la regió intracitoplasmàtica del receptor CMRF35H suggereix que aquesta molècula podria tenir un paper regulador en la funció leucocitària.

L'objectiu d'aquesta tesi va ser el clonatge i la caracterització d'un nou membre, que pertany a aquesta família de receptors, IREM-2.

2. OBJECTIUS

OBJECTIUS

- 1) Clonatge d'un nou receptor humà de la família CD300L anomenat IREM-2.
- 2) Generació d'anticossos específics per IREM-2 i anàlisi de la seva distribució en cèl·lules hematopoètiques.
- 3) Caracterització molecular i funcional d'IREM-2.

3. MATERIALS I MÈTODES

3.1 Cèl·lules i anticossos.

Les següents línies cel·lulars: P815 (mastocitoma múrid), 300.19 (línia cel·lular pre-B de ratolí), Jurkat, U937, THP-1, K562, MonoMac 6, HL60, Raji i NKL es van créixer a 37°C en una atmosfera al 5% de CO₂ amb el medi de cultiu cel·lular RPMI 1640/Glutamax (Gibco, Paisley, United Kingdom) complementat amb un 10% de sèrum boví fetal inactivat (FCS), 100 IU/ml de penicil·lina i 100 µg/ml estreptomina. La línia cel·lular RBL (*Rat Basophilic Leukemia*) i les cèl·lules COS-7 es van créixer en medi DMEM completat amb 10% de FCS inactivat per calor, 2 mM glutamina i 1mM de piruvat sòdic.

Les PBMCs van ser purificades a partir de sang humana per centrifugació en un gradient de Ficoll-Histopaque (LymphoprepTM, Axis-Shield PoC AS, Oslo, Norway). Les PBMCs obtingudes es van rentar amb PBS i es van activar amb 2 µg/ml de fitohemaglutinina (PHA). Per aïllar els monòcits es van resuspendre les PBMCs a una concentració final de 2x10⁶/ml en RPMI 1640 més 10% FCS i es van deixar durant 60 minuts a 37°C per tal de facilitar l'adherència al plàstic. Les cèl·lules no adherents es varen eliminar i les adherides es van rentar dues vegades amb PBS. La població enriquida en monòcits es va mantenir en cultiu durant 6 dies amb medi control o en medi amb diferents citocines emprades a les següents concentracions: 500U/ml GM-CSF (Amgen, Thousands Oaks, CA), 10 ng/ml IL-4 (Peprotech) i 1µg/ml LPS (Sigma, St Louis, MO). Aquestes cèl·lules van ser desenganxades del plàstic després d'incubar-les durant 15 minuts amb PBS-1mM EDTA.

L'anticòs monoclonal Anti-HA (12CA5) va ser descrit anteriorment (Kitzig, Martinez-Barriocanal et al. 2002). L'anticòs anti-fosfotirosina acoblat directament a la

peroxidasa és de Zymed. L'anticòs Anti-DAP-12 va ser un regal del Dr. Lanier (UCSF, San Francisco).

3.2 Plasmidis.

Per a l'expressió en cèl·lules COS del receptor Fc γ RI, aquest es va amplificar per PCR a partir d'ADNc de monòcits i es va clonar entre les dianes HindIII/BamHI del vector pFLAG-CMV-2 (Sigma) amb els oligonucleòtids específics: 5' Cg AAg CTT ATg ATT CCA gCA gTg gTC 3' i l'antisentit 5' Cg ggA TCC CTA CTg Tgg Tgg TTT CTC 3'. Els vectors d'expressió que codifiquen per c-fyn (Kitzig, Martinez-Barriocanal et al. 2002), CD3 ζ (Hall, Sancho et al. 1993) i DAP-12 (Bellon, Heredia et al. 1999) humans han estat descrits anteriorment.

3.3 Clonatge d'IREM-2.

Per tal de clonar la forma completa d'IREM-2, a partir de l'ADNc de PBMCs com a motlle, es van realitzar dues PCRs consecutives (*nested PCR*). La primera PCR es va realitzar amb els següents oligonucleòtids específics: 5' CCA gAA CCA CTA gAA ATC ATT Agg ACC 3' i 5' gTC gAT gAg gCA ggA gTg TgC TCA CAg 3'. La segona PCR es va dur a terme fent servir el producte de la primera PCR com a motlle i el següent parell d'oligonucleòtids específics: 5' CCT AgA TCT ATg Agg gTC ATC AgT gCT AAg AgT 3' i 5' gCC gTC gAC CTA Agg CCT gCT gAT ggT gCT gTA 3'. En els dos casos les condicions de la PCR van ser: 94°C durant 3 min, 94°C durant 1 min, 65°C durant 1,5 min i 72°C durant 3 min, repetint això 35 cicles. Els productes de

PCR es van analitzar en gels d'agarosa a l'1% amb bromur d'etidi. Els fragments amplificats es van clonar en el vector pCR2.1 (Invitrogen, San Diego, CA) i es van seqüenciar amb el kit ABI PRISM Bigs Dyes Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystems) i el primer T7 universal. Per tal d'expressar la molècula en les cèl·lules COS i RBL es va amplificar l'ADNc d'IREM-2 (sense el pèptid senyal) per PCR i es va clonar entre les dianes BglII i SalI del vector pDisplay (Invitrogen) amb els oligonucleòtids específics: 5' CCT AgA TCT TCA ggC TgT TTg TCT CTg 3' i 5' gCC gTC gAC CTA TCT TCC Agg Agg AgC CCA CTg 3'.

3.4 Transfecció cel·lular.

Les cèl·lules 300.19 i RBL van ser trasfectades de forma estable amb 20 μ g d'IREM-2-HA/pDisplay i amb o sense la construcció que conté la molècula adaptadora DAP-12. Les cèl·lules es van electroporar a 250 V i a 950 μ F en l'electroporador Gene Pulser (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) i es van seleccionar posteriorment amb 1 mg/ml de G-418 (GIBCO BRL). L'expressió d'IREM-2-HA a la superfície cel·lular va ser detectada per citometria de flux (FacsScan Becton Dickinson, Mountain View, CA) amb l'anticòs anti-HA i l'expressió de DAP-12 es va testar per Western blot amb un anticòs específic anti-DAP-12. Els clons d'alta expressió es van generar per dilució límit.

Les cèl·lules COS-7 van ser cotransfectades de forma transitòria per electroporació a 200 V i 975 μ F amb les construccions que contenen les molècules: c-fyn, IREM-2-HA/pDisplay i Fc ϵ RI γ o CD3 ζ o DAP-12 i unes 48 hores després van ser

lisades per fer assaigs d'immunoprecipitació tal com s'havien descrit anteriorment (Kitzig, Martinez-Barriocanal et al. 2002).

3.5 Generació d'anticossos anti IREM-2.

Ratolins femella de la soca BALB/C de 6 setmanes van rebre dues injeccions intraperitoneals de 10 milions de la línia cel·lular transfectada 300.19/IREM-2-HA cada 15 dies. Dues setmanes més tard es va repetir la immunització en forma de recordatori intravenós amb el mateix immunogen. Tres dies després es van aïllar les cèl·lules de la melsa i es van fusionar amb el mieloma SP2 (proporció 4:1), emprant *polyethyleneglycol 4000* (PEG 4000) segons es va descriure prèviament (Galfre and Milstein 1981). Els sobrenedants dels hibridomes es van testar per citometria tenyint la línia cel·lular transfectada RBL IREM-2-HA i els positius posteriorment es van testar contra l'altre transfectant, RBL IREM-1-HA, per tal de descartar els possibles anticossos anti-HA. L'anti IREM-2 (UP-H1) es va conjuguar directament al fluorocrom FITC mitjançant la formació d'un enllaç tiourea estable entre els grups amino lliures (Lys) i el FITC tal com s'ha descrit anteriorment (Jobbagy and Kiraly 1966).

3.6 Citometria de flux i anticossos.

Estudis d'immunofluorescència dobles i simples (Figures 3 i 4) es van realitzar com s'havia descrit anteriorment (Bellon, Kitzig et al. 2002) emprant un citòmetre de flux FACScan amb un *software* CellQuest (Becton Dickinson Biosciences-BDB-, San Jose, CA). Es van utilitzar els següents anticossos per l'anàlisi: anti-HA, anti-myc, anti-

IREM-2 (UP-H1 i UP-H2) i anticossos IgG marcats directament amb ficoeritrina (PE) contra CD4, CD56, CD80, CD14, CD1a i els corresponents controls isotípics (Becton Dickinson).

L'anàlisi immunofenotípic de l'expressió d'IREM-2, realitzat en col·laboració amb el grup del Dr. Orfao, es va avaluar en el moll de l'os (MO) i en sang perifèrica (PB) d'onze donants sans (7 MO i 4 PB mostres) seguint el mètode descrit anteriorment de tinció amb 4 colors (Almeida, Bueno et al. 1999). L'adquisició de les dades es va realitzar en un citòmetre de flux FACSCalibur emprant el *software* CellQuest (Becton Dickinson Biosciences-BDB). Per l'anàlisi de les dades es va utilitzar el programa Paint-A-Gate PRO (BDB). Es van identificar les següents poblacions cel·lulars d'acord amb la metodologia prèviament descrita (Orfao, Ortuno et al. 2004): 1) cèl·lules B madures (CD19, SSC^{low}, CD45⁺⁺, HLA-DR⁺), cèl·lules T/NK (CD3/CD56, SSC^{low}, CD45⁺⁺, HLA-DR^{-dim}), basòfils (CD123⁺⁺⁺, HLA-DR⁻), eosinòfils (cèl·lules autofluorescents amb SSC^{high}, CD45⁺), cèl·lules dendrítiques limfoplasmocitoides (CD123⁺⁺⁺, HLA-DR⁺), mastòcits (CD117⁺⁺⁺, CD45⁺), CD34⁺ i CD34⁻ cèl·lules B precursors (CD34⁻ o CD34⁺, SSC^{low}, CD45^{dim}), precursors mieloides (SSC^{high}, CD45^{dim}, CD34⁺), cèl·lules eritroides nucleades (SSC^{low}, CD45⁻), CD16⁺ cèl·lules dendrítiques monocítiques (CD16⁺, CD45⁺⁺, CD34⁻, SSC^{int}), cèl·lules monocítiques (CD64⁺⁺, CD14^{-/+}, CD45⁺⁺) en mostres de MO, i; 2) cèl·lules B (SSC^{low}, HLA-DR⁺), cèl·lules T/NK (SSC^{low}, HLA-DR^{-dim}), basòfils (CD123⁺⁺⁺, HLA-DR⁻), eosinòfils (cèl·lules autofluorescents amb SSC^{high}), neutròfils (SSC^{high}, CD16⁺, CD14^{-dim}), cèl·lules dendrítiques limfoplasmocitoides (CD123⁺⁺⁺, HLA-DR⁺, CD16⁻, CD33⁺), CD16⁺ cèl·lules dendrítiques monocítiques (CD123^{dim}, HLA-DR⁺⁺, CD16⁺, CD33⁺),

cèl·lules dendrítiques mieloides (CD33⁺⁺⁺, HLA-DR⁺⁺) i monòcits (CD14⁺⁺, CD33⁺⁺) en mostres de PB.

3.7 Assaigs d'entrecreuament, immunoprecipitacions i *Western blot*.

Es va marcar la superfície dels monòcits amb ¹²⁵I (Amersham) seguint els protocols prèviament descrits (Carretero, Cantoni et al. 1997). Aquests es van lisar amb el tampó de lisi que contenia un 1% de Tritó X-100 i les proteïnes solubilitzades es van immunoprecipitar emprant els anticossos anti-IREM-2 (UP-H1), anti-CD16 o anti-CD94 com a control negatiu i proteïna G-Sepharosa. Les mostres es van analitzar per SDS-PAGE i autoradiografia.

Pels experiments d'entrecreuament es van estimular 10⁶ cèl·lules per punt a 37°C durant diferents períodes de temps (0, 5, 10 i 15 minuts) amb 1 µg de UP-H2, B73.1 com a control positiu i NC8 com a control negatiu, seguit de 5 µg de SAM. A continuació les cèl·lules es van lisar en tampó de lisi que contenia tritó a l'1%.

Les cèl·lules COS-7 transfectades transitòriament es van tractar amb pervanadat afegint 100 µl d'una barreja d'ortovanadat sòdic 0,1mM (Sigma) i H₂O₂ 10mM a 10⁷ cèl·lules en 900 µl de PBS i deixant-les 10 minuts a 37°C.

Les cèl·lules RBL i les cèl·lules COS-7 transfectades es van lisar amb el tampó de lisi amb Tritó X-100 (1% Tritó X-100, 150 mM NaCl, 20mM HEPES (pH 7.5), 50mM NaF, 1mM ortovanadat sòdic, 1mM EGTA, PMSF 2 % i inhibidors de proteases 1%). Els lisats es van centrifugar a 14000 rpm durant 15 min a 4°C i els sobrenedants es van utilitzar per la immunoprecipitació. Es van fer clarejats amb 30 µl de proteïna G Sepharose (GIBCO BRL) i 5 µl de sèrum de ratolí durant 1 hora a 4°C i seguidament es

van realitzar les immunoprecipitacions amb els anticossos indicats durant 3 hores a 4°C. A continuació es van rentar les boles tres vegades amb el tampó de lisi, es va afegir el tampó de càrrega i les mostres es van desnaturalitzar sota condicions reductores o no reductores per escalfor durant 6 minuts a 100°C. Els precipitats es van tractar amb o sense l'enzim N-glycosidase F (Roche) tota la nit a 37°C.

Tant els lisats com els immunoprecipitats obtinguts es van córrer en un gel de poliacrilamida i les proteïnes es van transferir a membranes de PVDF (Millipore Corp, Bedford, MA) mitjançant transferència semi-humida. Les membranes es van bloquejar durant una hora o bé amb llet al 5% en TBS (Tris 20mM (pH 7.6), NaCl 150mM) o bé amb BSA en el cas del WB amb l'anticòs anti-fosfotirosina. A continuació es van incubar tota la nit amb els anticossos específics indicats en TTBS (Tris 20mM (pH 7.6), NaCl 150mM, 2% Tween 20) i amb llet a l'1%. La unió dels diferents anticossos es va detectar amb anticossos secundaris conjugats amb peroxidasa (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) i es va visualitzar mitjançant un kit de quimioluminiscència (West Pico Supersignal kit, Pierce, Rocford, IL) i Hyperfilms (Amersham, Bucks, United Kingdom). Les membranes reutilitzades amb altres anticossos es van tractar prèviament amb glicina 0,1M pH=2,6 durant 30 minuts.

3.8 Assaigs d'activació de la transcripció d'un gen reporter.

Es van electroporar 4×10^7 cèl·lules RBL i RBL-IREM-2 +/- DAP-12 (950µF, 250V), en medi DMEM sense sèrum, amb vectors que contenien el gen de la luciferasa (0,5 µg/10⁶ cèl·lules) sota el control de: a) tres còpies en tàndem del lloc distal NFAT-AP-1 del promotor múrid de la IL-2 (3xNFAT Luc) o b) el promotor del TNF-α humà

(TNF- α Luc). Per tal de normalitzar l'eficiència de la transfecció, a la vegada es va transfectar un vector d'expressió que contenia el gen de la Renilla (Promega: 0,1 μ g/10⁶ cèl·lules) (Aramburu, Yaffe et al. 1999). Després de l'electroporació les cèl·lules es van incubar a 37°C durant 24 hores en medi RPMI amb sèrum. Aquestes cèl·lules van ser estimulades durant 6 hores amb els anticossos UP-H1 i UP-H2 (o els controls isotípics) emprant la línia cel·lular P815 que expressa FcR com a cèl·lula presentadora. Com a control positiu es va usar la IgE i la ionomicina a una concentració de 10 μ g/ml i 1 μ M respectivament. Els experiments de coestimulació es van realitzar amb una concentració de PMA de 20nM. Després de rentar les cèl·lules amb PBS es van lisar amb 100 μ l de tampó de lisi (Promega) i es van mesurar l'activitat luciferasa amb 15 μ l per punt seguint les instruccions del kit *Dual Luciferase reporter kit* (Promega). L'activitat luciferasa es va determinar en un luminòmetre (Berthold Detection Systems, Pforzheim, Alemanya) i es va expressar com a unitats de llum relativa per segon (RLU/s).

3.9 Mesura de l'alliberació del TNF- α .

Els monòcits purificats es van sembrar a una concentració de 100.000 cèl·lules per pou, en plaques de 96 pous de fons pla, prèviament tractades amb F(ab')₂ sheep anti-mouse (SAM) IgG (10 μ g/ml) més un dels següents anticossos: UP-H2 (anti-IREM-2), B73.1 (anti-CD16) o HP-1F7 (anti-MHC class I). Transcorregudes 24 hores es van recollir els sobrenedants i la secreció de TNF- α es va quantificar per ELISA d'acord amb les instruccions del fabricant del kit (Bender MedSystems).

3.10 Assaig de la mobilització de calci.

El monitoratge dels canvis en la concentració de calci intracel·lular es va realitzar mitjançant la sonda fluorescent Fluo-3/AM (Molecular Probes, Eugene, OR) segons les condicions descrites prèviament (Vicente-Manzanares, Rey et al. 1999). Es van estimular 10×10^6 cèl·lules per punt, en 0,5 ml de medi HBSS, amb fragment $F(ab')_2$ de l'anticòs UP-H2 (10 μ g/ml), amb l'anticòs B73.1 (10 μ g/ml) o amb una IgG1 control (10 μ g/ml). En els temps indicats es va afegir SAM com a agent d'entrecruament (20 μ g/ml). La concentració de calci intracel·lular es va analitzar en un citòmetre de flux FACScan (Becton Dickinson) emprant el programa CellQuest. Només es van incloure a l'anàlisi les cèl·lules vives carregades amb Fluo-3/AM.

4. RESULTATS

4.1 Clonatge d'IREM-2/CD300e:

Emprant l'estratègia del triple híbrid en llevats, en el nostre laboratori es va identificar un nou receptor de superfície anomenat "immune receptor expressed on myeloid cells" (IREM-1/CD300f) (nombre d'accés AY303545). Aquesta molècula te una elevada homologia amb dos receptors clonats anteriorment anomenats CMRF-35/CD300c i IRP60/CMRF35-H/CD300a. Els gens que codifiquen per aquestes tres molècules estan localitzats a la mateixa regió del cromosoma 17 (17q21.5) i sembla que pertanyen a una família multigènica de receptors activadors i inhibidors. Per tal d'identificar nous membres d'aquesta família de receptors es va fer una cerca a la base de dades genòmica Ensembl (Ensembl Blast server a l'adreça electrònica www.ensembl.org) utilitzant les seqüències d'IREM-1 i CMRF-35.

Una vegada identificada una seqüència d'ADNc homòloga a les seqüències testades es van dissenyar uns oligonucleòtids específics i es va clonar un ADNc emprant cèl·lules mononuclears de sang perifèrica (PBMCs) com a motlle. La seqüència de nucleòtids obtinguda després de la PCR va ser de 740 parells de bases i contenia un ORF de 618 parells de bases. Aquesta codificava per un polipèptid de 205 aminoàcids i el seu pes molecular predit era de 23 kDa.

Es tracta d'una proteïna transmembrana de tipus I amb un pèptid senyal hidrofòbic d'uns 12 aminoàcids. La regió extracel·lular conté un domini immunoglobulina variable (IgV) i un possible lloc d'N-glicosilació (NLS). El fragment

transmembrana es caracteritza per tenir un aminoàcid amb càrrega positiva (lisina) seguit per una cua citosòlica curta de 16 aminoàcids (figura 1).

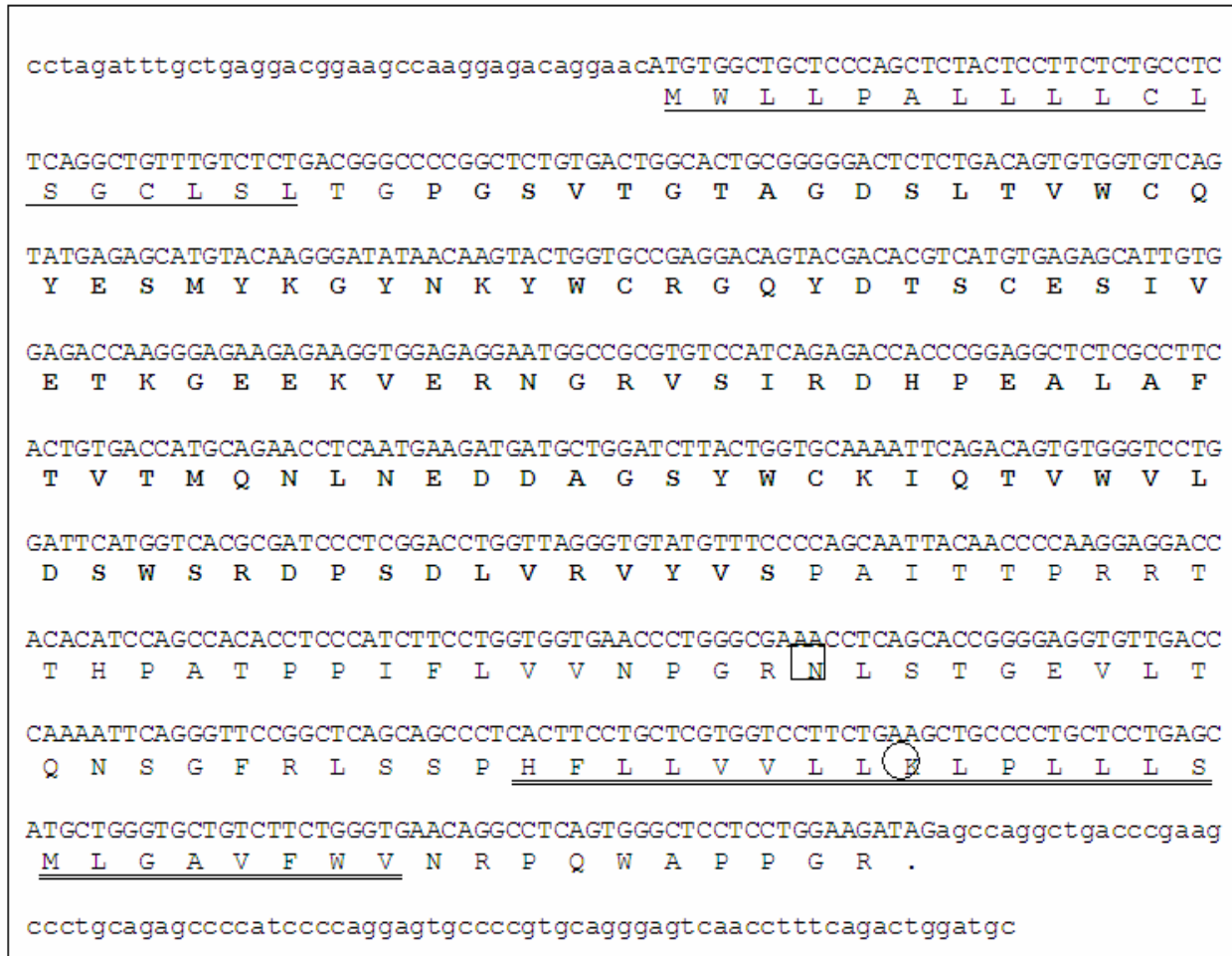


Figura 1. Seqüències nucleotídica i aminoacídica predites d'IREM-2. La seqüència nucleotídica traduïda d'IREM-2 es mostra en lletra majúscula i la seqüència aminoacídica predita està escrita sota d'aquesta. El domini immunoglobulina està marcat en negreta, el pèptid senyal i el fragment transmembrana estan subratllats amb una i dues línies respectivament i l'aminoàcid amb càrrega positiva (Lys) està encerclat. El lloc potencial de N-glicosilació està emmarcat en un quadre.

4.2. Homologia d'IREM-2 amb molècules relacionades.

L'alineament de la seqüència d'aminoàcids del domini immunoglobulina extracel·lular d'IREM-2 amb les seqüències de les altres molècules de la família mostra un grau d'homologia del 56% amb IREM-1, del 62% amb CMRF35-H i del 64% amb CMRF35-A. En canvi, en el cas de les molècules NKp44 i TREM-2 sobre les quals s'ha descrit que també són homòlogues a CMRF-35A i CMRF-35-H, l'homologia és menor (aproximadament 50%), però és remarcable la presència de dos residus de cisteïna conservats (C50 i C58) al costat de dos residus de cisteïna (C36 i C104) que estan involucrats en l'estructura secundària del domini immunoglobulina (figura 2).

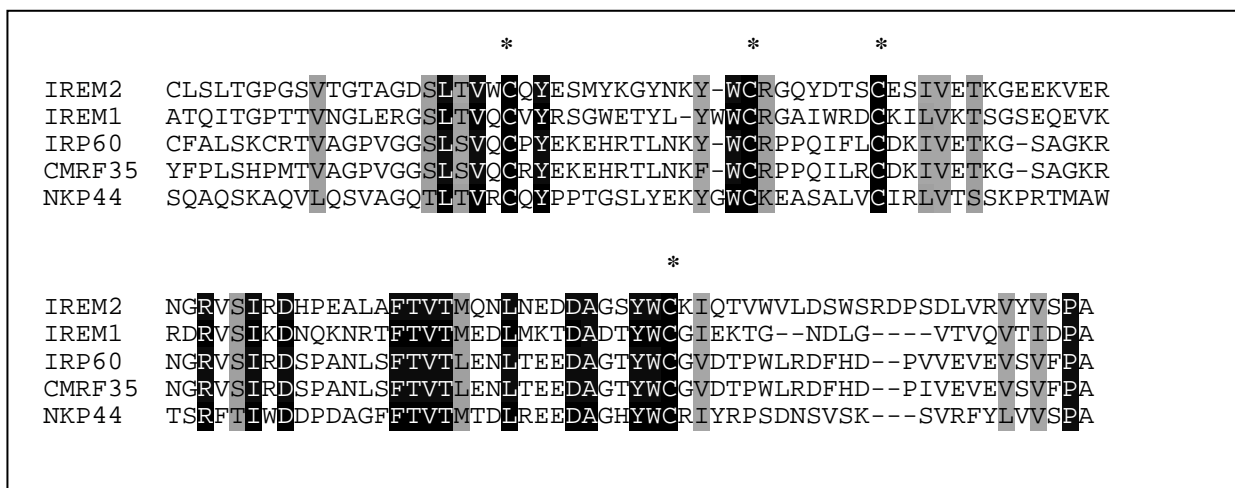


Figura 2. Alineament del domini Ig d'IREM-2 amb els dominis Ig d'altres proteïnes relacionades com són IRP60, CMRF35 i NKp44. Els residus idèntics estan indicats en negre i els residus similars en gris. Les cisteïnes marcades amb un asterisc estan altament conservades.

El gen que codifica per IREM-2 es localitza a la regió 17q25.1, molt proper als gens que codifiquen per CMRF35, IRP60 i IREM-1. Fent l'alineament de l'ADNc

d'IREM-2 amb la seqüència genòmica varem determinar l'organització del gen d'IREM-2 el qual té 11Kb i consta de 4 exons. L'exó 1 codifica per la regió no traduïda i el pèptid senyal. L'exó 2 codifica pel domini immunoglobulina, mentre que l'exó 3 codifica per la regió proximal al domini transmembrana. Aquest últim, el domini citoplasmàtic i la regió UT 5' són codificats per l'exó 4 (figura 3).

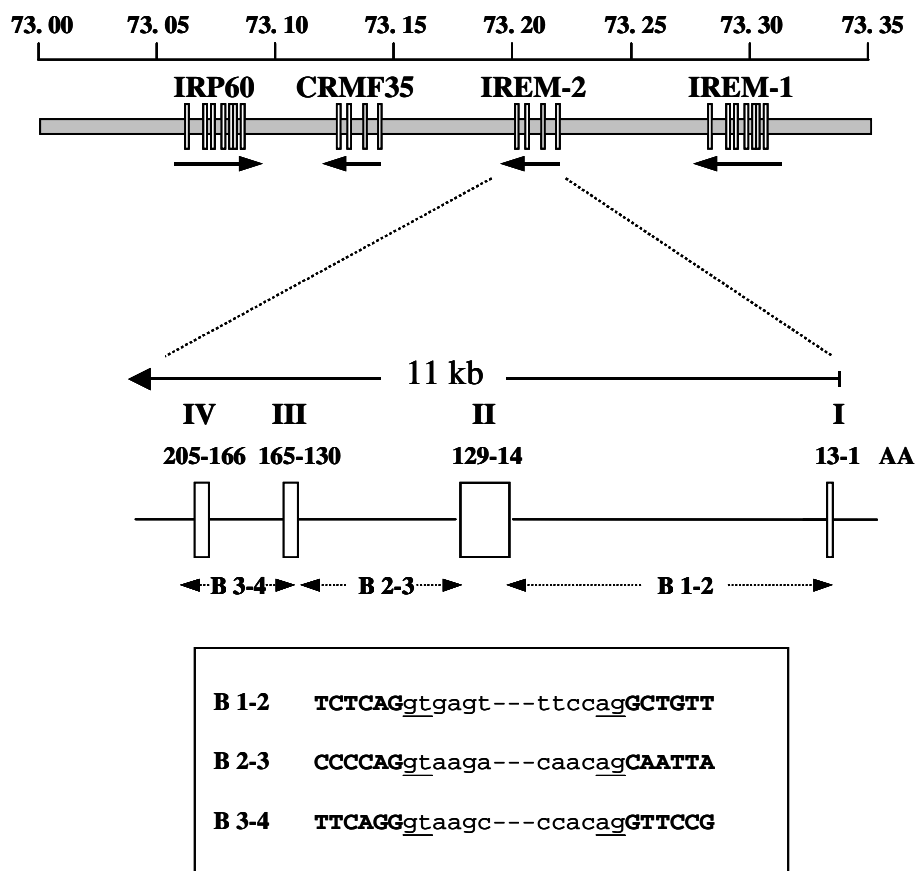


Figura 3. Organització esquemàtica del locus CMRF35/IREM en el cromosoma 17 i organització genòmica d'IREM-2. Els exons estan representats per quadres i els introns per línies connectores. Les unió exó-intró del gen IREM-2 es mostren en el quadre inferior.

En quant a l'homologia d'IREM-2 amb les molècules murines de la família CLM varem comparar amb els receptors que mostraven el domini de senyalització més semblant a IREM-2 (figura 4). Els receptors CLM-2, CLM-4 i CLM-6 tenen un aminoàcid lisina en el domini transmembrana el qual permet l'associació amb proteïnes adaptadores. L'alineament de la seqüència d'aminoàcids d'IREM-2 amb les seqüències de les molècules murines CLM-4 i CLM-6 mostra un grau d'homologia d'un 50% i en el cas de l'ortòleg d'IREM-2, que és CLM-2, el grau d'homologia és d'un 70%.

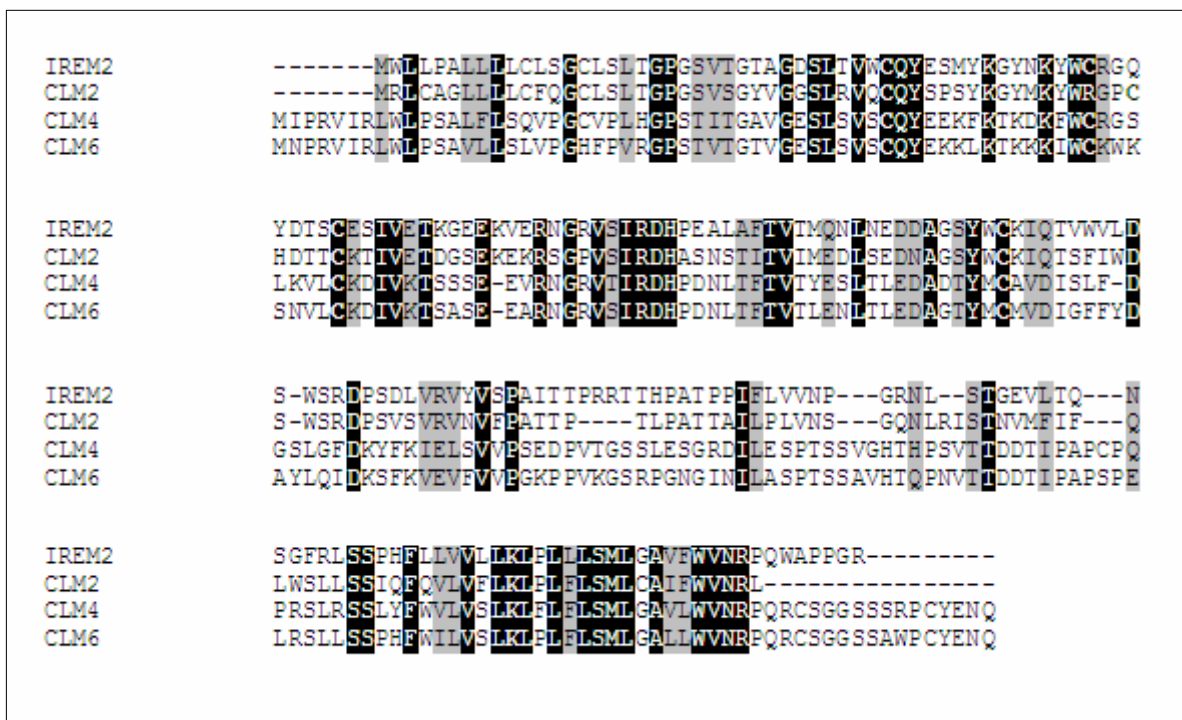


Figura 4. Comparació de les seqüències proteïques d'IREM-2 amb CLM-2, CLM-4 i CLM-6. Els residus idèntics estan indicats en negre i els residus similars en gris.

4.3. Expressió d'IREM-2

4.3.1 Expressió d'IREM-2 a nivell transcripcional.

El patró d'expressió d'IREM-2, determinat per RT-PCR, mostrava la presència de l'ARNm, codificant per aquest receptor, tant en PBMCs no activades, com activades amb PHA durant 24 hores, a partir de diferents donants (figura 5). En canvi, no es va detectar expressió d'IREM-2 en cap de les línies cel·lulars estudiades: línies cel·lulars B (721.221 i RPMI-8866), T (Jurkat, Molt-4, TALL103/2 i Skw), NK (NKL) i mieloides (U937 i HL60) (figura 6).

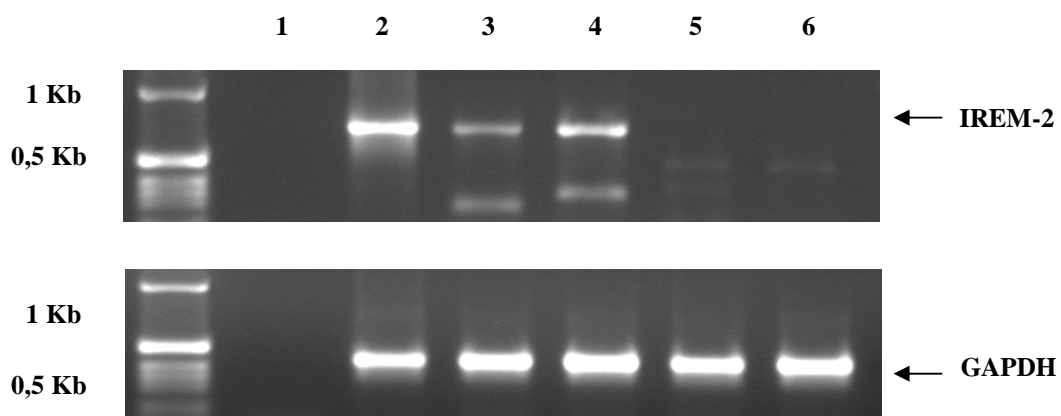


Figura 5. L'ARN missatger d'IREM-2 s'expressa en monòcits humans. A partir d'ARNs obtinguts de diferents tipus cel·lulars es van realitzar retrotranscripcions per tal d'amplificar IREM-2. Els productes d'ADNc es van resoldre en un gel d'agarosa a l'1%. En els diferents carrils trobem: Control negatiu, llibreria de PBLs activades (control positiu), PBLs activades, monòcits, cèl·lules T i cèl·lules NK.

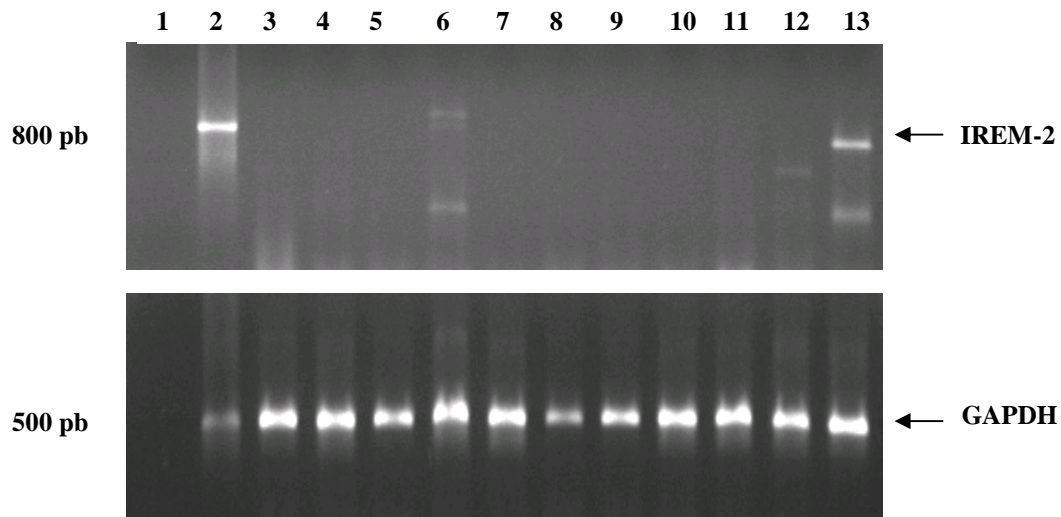


Figura 6. L'ARN missatger d'IREM-2 no s'expressa en línies cel·lulars humanes. Control negatiu, llibreria de PBLs activades (control positiu), Jurkat, Molt-4, TALL103/2, SKW, 721.221, RPMI-8866, NKL, U937, HL60, HEP2, PBLs activades.

4.3.2 Obtenció d'anticossos monoclonals específics per IREM-2.

Per tal de poder analitzar l'expressió cel·lular d'IREM-2 es van generar anticossos específics. Es van immunitzar els ratolins amb la línia cel·lular murina 300.19 transfectada, de forma estable, amb una construcció que contenia IREM-2 unit a l'epítot HA per la part N-terminal (figura 7).

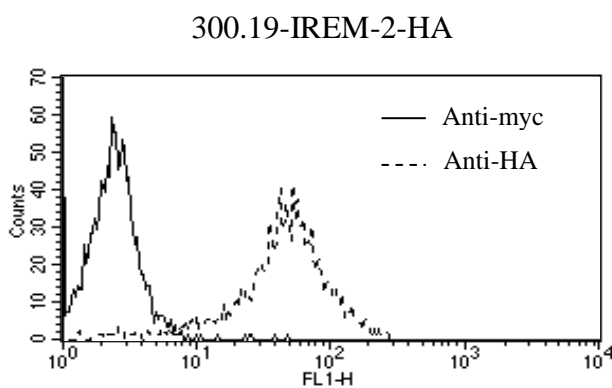


Figura 7. Expressió d'IREM-2-HA en el transfectant estable de la línia 300.19 murina.

Determinació per immunofluorescència indirecta de l'expressió d'IREM-2-HA en les cèl·lules 300.19 transfectades establement per electroporació. Com a control negatiu es mostra la tinció amb el sobrenedant de l'hibridoma anti-myc.

Es van obtenir dos anticossos específics UP-H1 (d'isotip IgG2a, k) i UP-H2 (d'isotip IgG1, k) els quals tenien específicament la línia cel·lular RBL trasfectada amb IREM-2-HA, però no la línia original ni la trasfectada amb IREM-1-HA. Això ens permetia descartar els anticossos que poguessin ser anti-HA o que tinguessin reactivitat creuada entre les dues molècules (figura 8).

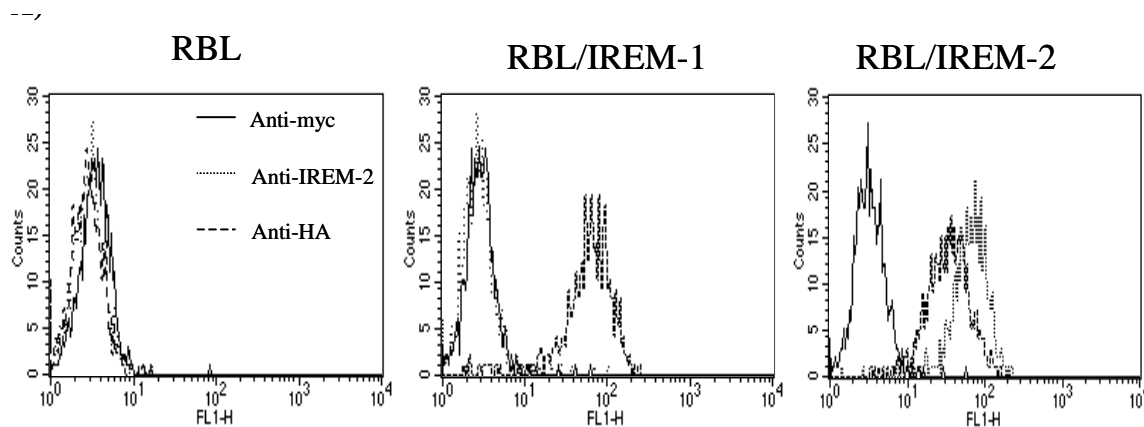


Figura 8. UP-H1 i UP-H2 reconeixen específicament IREM-2 en RBLs trasfectades. Les RBL trasfectades amb la construcció que codifica per IREM-2 amb l'epítot HA van ser tenyides per immunofluorescència indirecta amb els dos anticossos anti-IREM-2. Això es va comparar amb les RBL originals i les trasfectades amb IREM-1-HA. L'expressió d'ambdues molècules es va confirmar emprant l'anticòs anti-HA.

Per acabar de verificar que els anticossos eren específics contra la molècula en estudi es van fer transfeccions transitòries de cèl·lules COS amb una construcció que contenia IREM-2 sense l'epítot HA i en presència o absència de l'adaptador DAP-12. Al veure una tinció molt similar en els dos casos podem dir que no és necessària la presència de DAP-12 per a que la molècula surti a la superfície (figura 9), a diferència

del receptor TREM-1, el qual en presència de la molècula adaptadora millora la seva expressió en superfície.

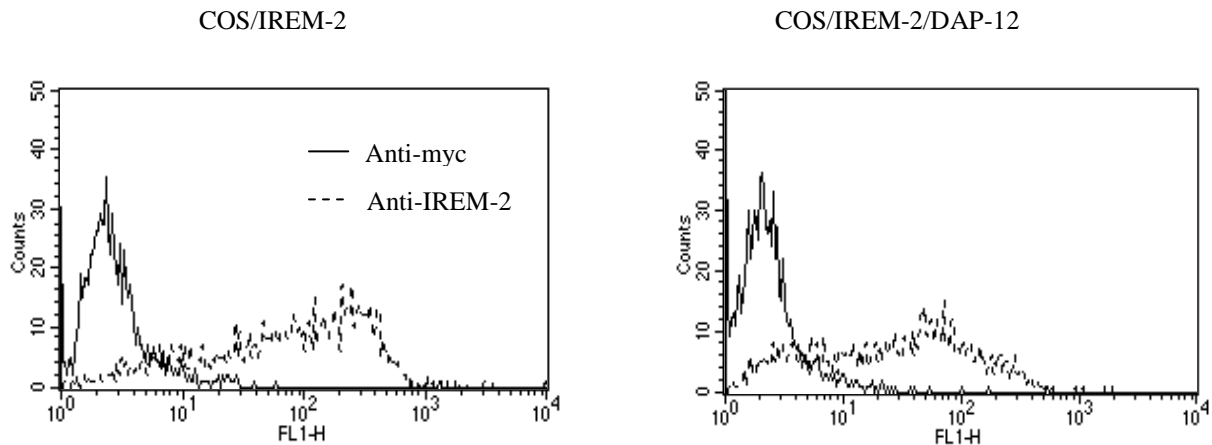


Figura 9. IREM-2 s'expressa a la superfície de les cèl·lules COS tant en presència com en absència de DAP-12. Es van transfectar de forma transitòria cèl·lules COS amb IREM-2 amb o sense DAP-12 i 48 hores després de la transfecció, es van tenyir mitjançant immunofluorescència indirecta amb els anticossos UP-H1 i myc. L'expressió de DAP-12 es va verificar per citometria de flux en cèl·lules permeabilitzades (no mostrada).

4.3.3 Distribució de la proteïna IREM-2.

Per tal de determinar l'expressió de la molècula IREM-2, es van utilitzar els dos anticossos per immunofluorescència indirecta en diferents línies cel·lulars: B (721.221 i RPMI-8866), T (Jurkat, Molt-4, TALL103/2 i Skw), NK (NKL i NK3.3) i mieloides (U937, THP1, K562, HL60 i MonoMac-6) i en tots els casos la tinció va ser negativa, és a dir, cap d'aquestes línies expressa IREM-2. Paral·lelament, es van fer marcatges sobre cèl·lules fresques de la sang i es va veure que l'anticòs s'unia específicament a la

superfície dels monòcits mentre que no es va detectar tinció en cèl·lules T, B ni NK (figura 10).

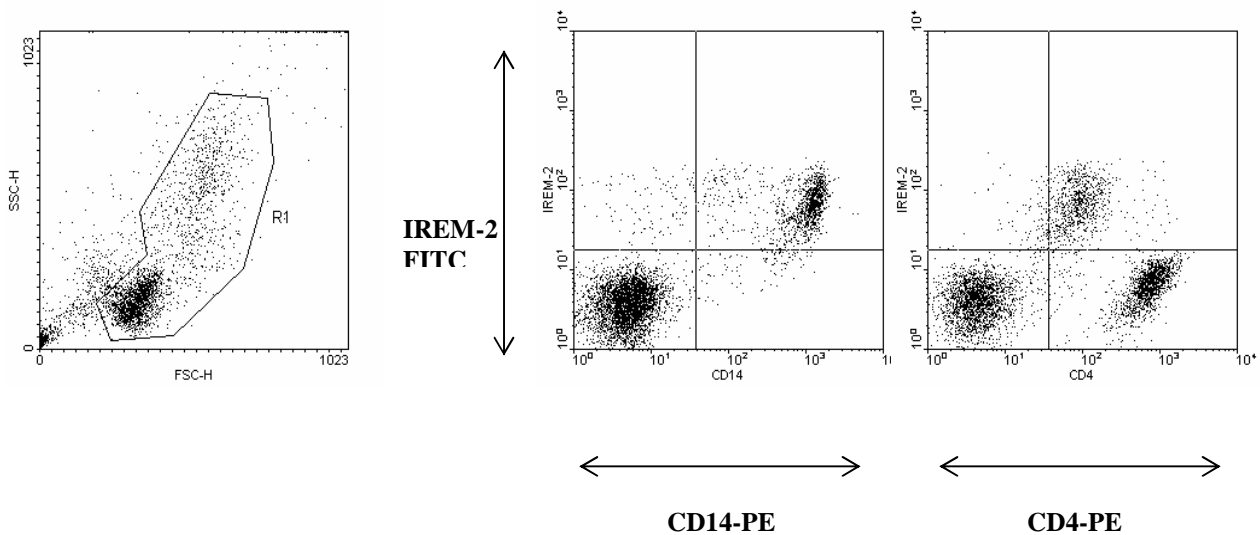


Figura 10. IREM-2 s'expressa a la superfície dels monòcits de la sang. Anàlisi per citometria de flux de les PBMCs.

Un estudi més detallat realitzat en col·laboració amb el Dr. Orfao i el Dr. García-Montero, amb intenció d'identificar quines subpoblacions del moll de l'os i cèl·lules de sang perifèrica expressaven IREM-2 queda resumit a la taula 1. La reactivitat per l'anti-IREM-2 està restringida a cèl·lules del llinatge mielomonocític, i és absent a la resta de llinatges cel·lulars. L'anàlisi de la molècula en mostres de medul·la òssia confirma que les cèl·lules monocítiques positives per IREM-2 apareixen durant un estat de maduració bastant tardà, després de que els precursors monocítics hagin adquirit nivells elevats d'expressió de CD14 i CD64 com es mostra a la taula 2.

Taula 1 Expressió d'IREM-2 en cèl·lules hematopoètiques de medul·la òssia i de sang perifèrica d'onze individus adults sans. Els resultats estan expressats com la mediana \pm la desviació estàndard i el rang del percentatge de cèl·lules IREM-2 positives.

		Medul·la Òssia (n=7)	Sang (n=4)
Precursors hematopoètics	Precursors eritroides	Negatiu	
	Precursors mieloides	Negatiu	
	Precursors cèl·lules B CD34 ⁻ i CD34 ⁺	Negatiu	
<u>Cèl·lules madures</u>	Limfòcits B	Negatiu	Negatiu
	Limfòcits T/NK	Negatiu	Negatiu
	Neutròfils	Negatiu	Negatiu
	Mastòcits	Negatiu	
	Eosinòfils	Negatiu	Negatiu
	Basòfils	Negatiu	Negatiu
	DCs limfoplasmocitoides	Negatiu	Negatiu
	DCs mieloides	80% \pm 6% (74%-85%)	100 %
	Monòcits	43% \pm 12% (26%-59%)	100 %

Taula 2. Patrons de maduració associats a l'expressió d'IREM-2 en el llinatge monocític i a les cèl·lules dendrítiques monocítiques CD16 positives. Es va realitzar a partir de mostres de medul·la òssia de 4 donants. Els resultats estan expressats com la mediana \pm la desviació estàndard i el rang del percentatge de cèl·lules IREM-2 positives.

Subgrup cel·lular	Distribució relativa
CD64 ⁺ /CD45 ⁺ /CD14 ⁻ /IREM-2 ⁻	29% \pm 6% (26%-36%)
CD64 ⁺ /CD45 ⁺⁺ /CD14 ⁺ /IREM-2 ⁻	34% \pm 7% (27%-39%)
CD64 ⁺ /CD45 ⁺⁺ /CD14 ⁺ /IREM-2 ⁺	33% \pm 12% (22%-45%)
CD64 ⁺ /CD45 ⁺⁺ /CD14 ⁻ /IREM-2 ⁺	3% \pm 1% (2%-5%)

4.3.4 Expressió d'IREM-2 al llarg de la diferenciació dels monòcits.

Amb la finalitat d'analitzar el patró d'expressió d'IREM-2 en macròfags i cèl·lules dendrítiques immadures obtingudes in vitro, es van cultivar els monòcits en presència de GM-CSF o GM-CSF més IL-4 com es descriu en l'apartat de materials i mètodes. Després de mantenir les cèl·lules 6 dies en cultiu, l'anàlisi per citometria de

flux mostra una pèrdua total de l'expressió d'IREM-2 en les cèl·lules dendrítiques immadures i una certa disminució en el cas dels monòcits tractats amb GM-CSF, més o menys acusada en funció del donant. Contràriament, els monòcits tractats amb LPS mantenen l'expressió d'IREM-2.

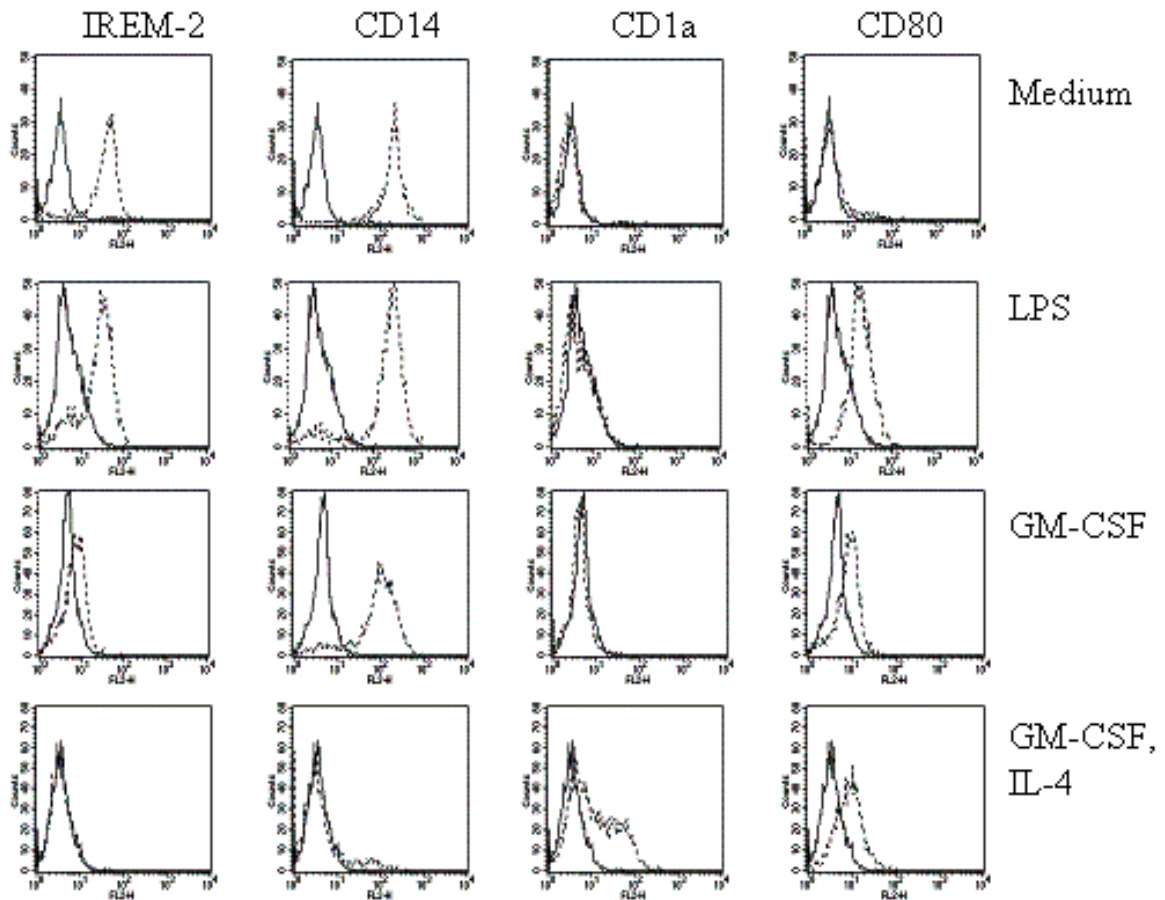


Figura 11. Anàlisi immunofenotípic dels monòcits humans després del tractament amb LPS, GM-CSF o GM-CSF/IL-4. Els monòcits es van cultivar sota condicions estàndard amb GM-CSF, GM-CSF/IL-4 o LPS durant 6 dies i posteriorment es va analitzar per citometria de flux l'expressió d'IREM-2, CD14, CD1a i CD80. Aquest resultat és una mostra representativa d'un grup de quatre experiments realitzats.

En el cas dels monòcits tractats exclusivament amb IL-4 s'observa una disminució de l'expressió d'IREM-2 i de CD14 bastant ràpida, donat que ja s'observa a les 12 hores (dades no mostrades) i és molt evident a les 36 i a les 60 hores (figura 12).

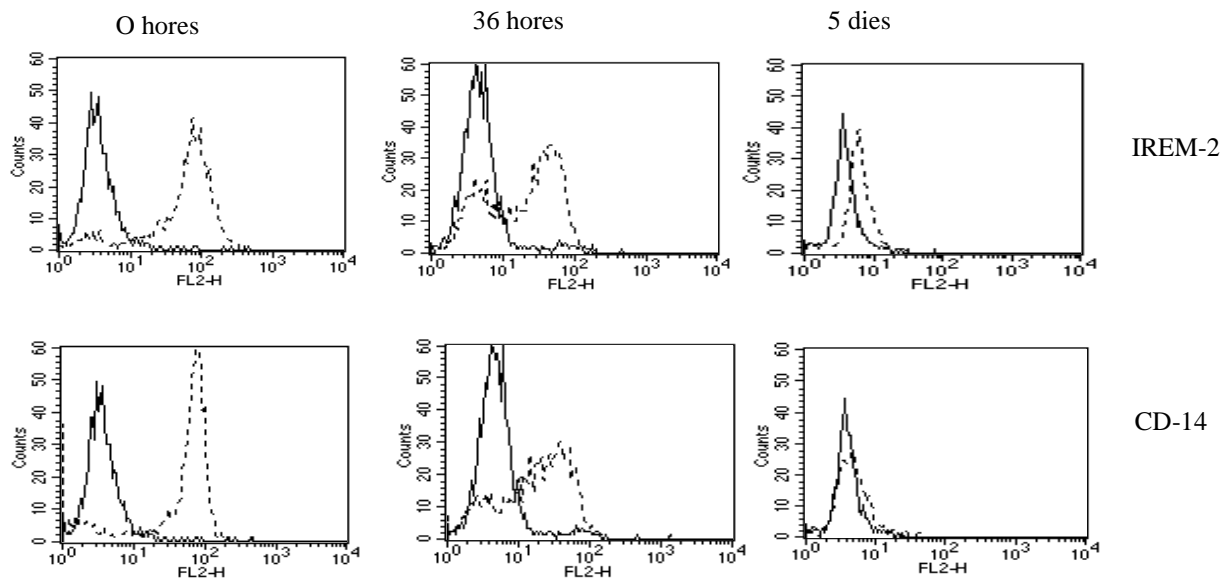


Figura 12. Cinètica de l'expressió d'IREM-2 durant l'estimulació dels monòcits amb IL-4.

Es van determinar els nivells d'expressió d'IREM-2 per citometria de flux dels monòcits sense tractar, a les 36 hores i als 5 dies de tractament amb la IL-4.

Per tal de veure si era possible induir l'expressió d'IREM-2 en les línies cel·lulars U937 i THP-1 es van afegir els següents estímuls: Vitamina D₃ (50nM), PMA (10 ng/ml), PMA+IL-4, IL-4 (10 ng/ml), GM-CSF (500U/ml) i GM-CSF+IL-4 durant 3 i 6 dies i es va determinar per citometria de flux l'expressió d'IREM-2, CD14, CD1a i CD80. El tractament de les cèl·lules U937 amb GM-CSF produeix un lleuger però reproducible increment en l'expressió d'IREM-2 i de CD14 a partir de les 12 hores. La

resta de condicions provades tant a les cèl·lules U937 com a les THP-1 no produeixen cap canvi en l'expressió del receptor en estudi (dades no mostrades).

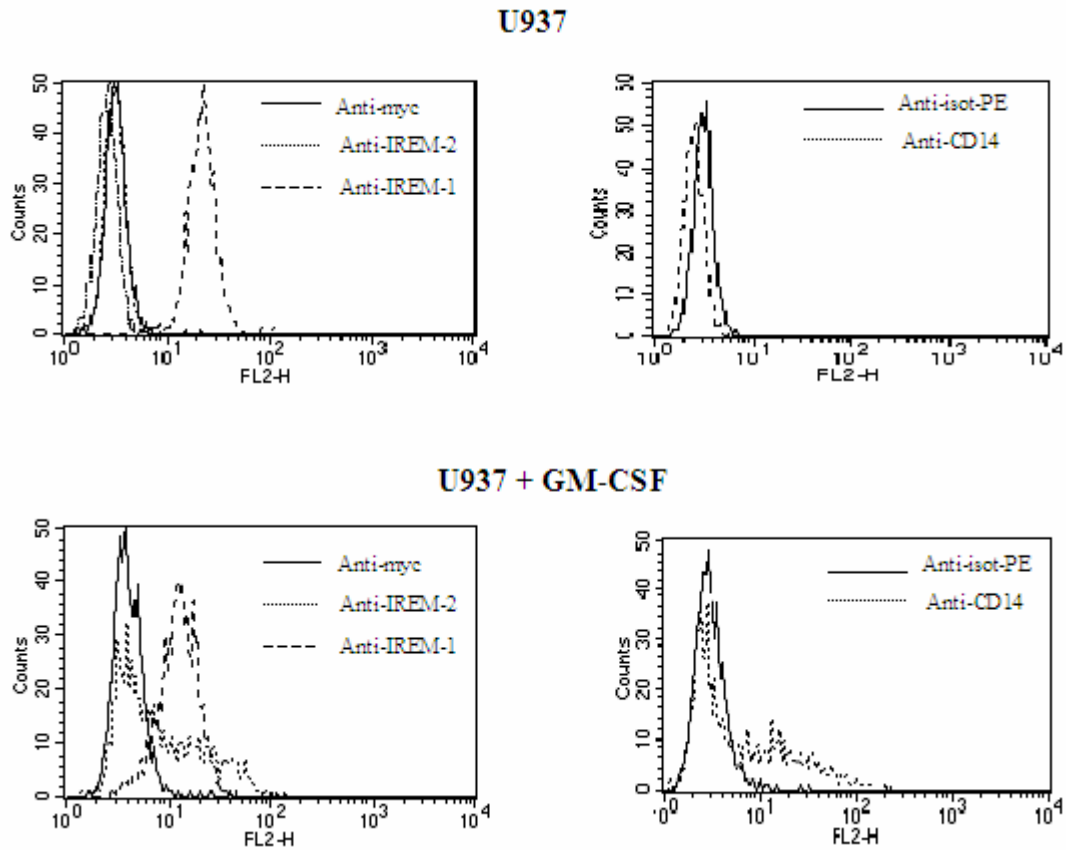


Figura 13. Efecte del GM-CSF sobre l'expressió d'IREM-2 en la línia cel·lular U937. Es va determinar per immunofluorescència indirecta l'expressió d'IREM-2 i CD14 en cèl·lules U937 tractades i sense tractar amb GM-CSF, emprant l'anticòs anti-IREM-1 com a control positiu de la tinció.

L'efecte del GM-CSF sobre els monòcits i la línia cel·lular U937 sembla contradictori, donat que en el cas dels monòcits s'observa una certa disminució de l'expressió d'IREM-2 i en canvi amb les cèl·lules U937 es veu un clar augment. Això es

podria justificar pel fet que les cèl·lules es trobin en un estat de maduració diferent o bé per l'existència de senyals complementaris durant el procés de diferenciació.

4.4. Caracterització bioquímica d'IREM-2

Per tal de determinar les característiques bioquímiques d'IREM-2 es van realitzar diferents experiments d'immunoprecipitació i *western blot* tant en cèl·lules transfectades com en monòcits obtinguts a partir de PBMCs de diferents donants sans. Després d'immunoprecipitar amb els anticossos UP-H1, UP-H2 i α -HA els lisats obtinguts amb la línia cel·lular RBL transfectada amb IREM-2, es van analitzar els precipitats per *western blot* amb l'anticòs α -HA i es va veure una banda d'uns 34 kDa. El pes molecular es va reduir a 30 kDa després de desglicosilar la mostra (Fig. 14). Aquest resultat és coherent amb la informació obtinguda a partir de la seqüència proteica.

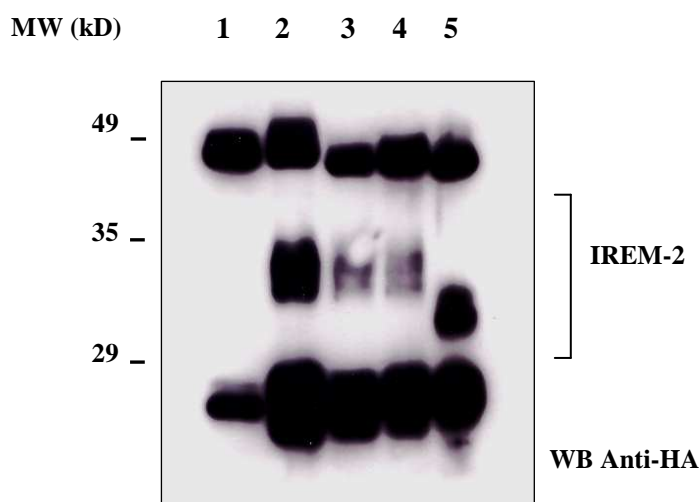


Figura 14. IREM-2 és una glicoproteïna monomèrica de 32 kD.

RBLs transfectades van ser immunoprecipitades amb els anticossos anti-CD94 com a control negatiu, anti-HA, UP-H1 i UP-H2. Els immunoprecipitats van ser analitzats per WB amb l'anticòs anti-HA sota condicions reductores. Després del tractament amb la *N-glycosidasa* el pes molecular de la proteïna es va reduir a 30 kD.

Es van obtenir resultats molt similars a partir de l'anàlisi d'IREM-2 immunoprecipitat de la superfície dels monòcits marcats amb 125 I, on també es pot observar que la mobilitat de la proteïna no va canviar en variar les condicions del tampó de càrrega a condicions no reductores, indicant que aquest receptor no dimeritza a través de ponts disulfur (Fig. 15). A més a més, es va fer una immunoprecipitació dels monòcits i un WB amb l'anticòs anti-IREM-2, donant lloc a patrons electroforètics comparables amb els anteriors (Fig. 16).

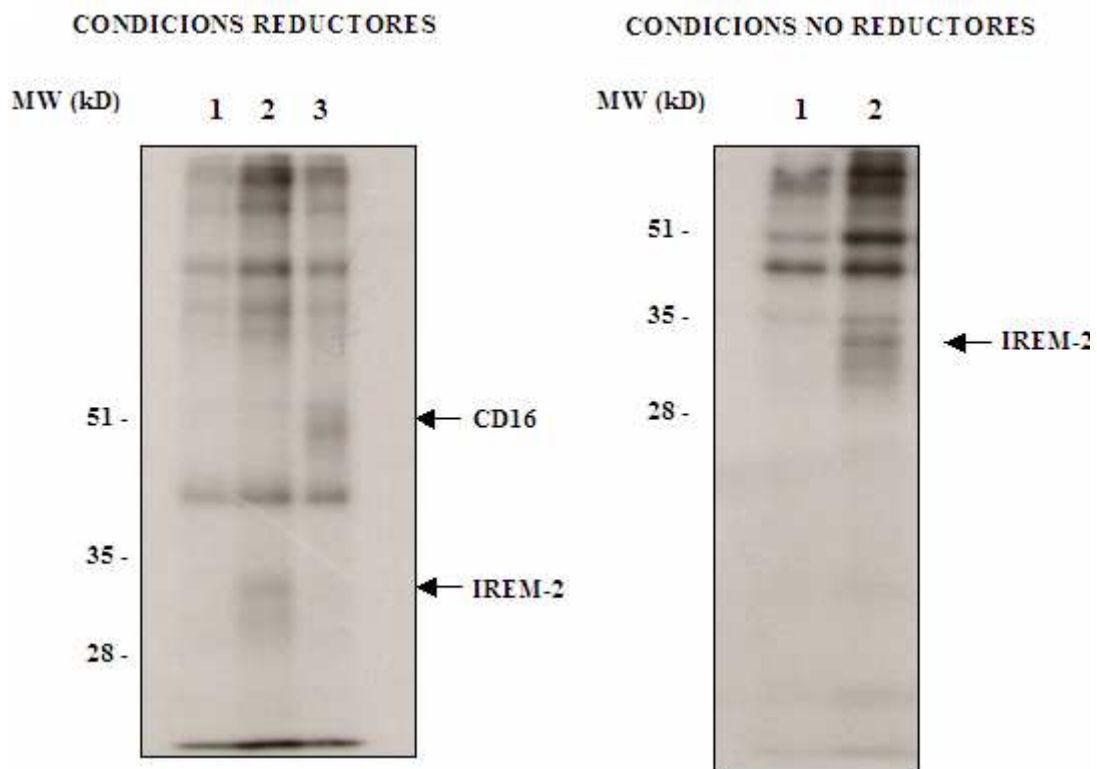


Figura 15. Immunoprecipitació d'IREM-2 en monòcits. La immunoprecipitació a partir de monòcits marcats amb I^{125} , amb els anticossos UP-H1 i UP-H2, mostra una proteïna de 34 kD en un gel d'acrilamida sota condicions reductores i no reductores.

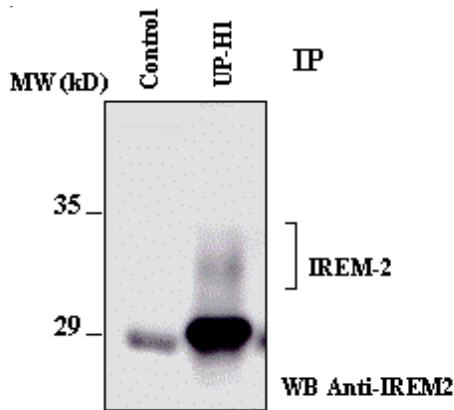


Figura 16. Immunoprecipitació d'IREM-2 en monòcits. Els monòcits van ser immunoprecipitats amb els anticossos anti-CD94 com a control negatiu i UP-H1. Els immunoprecipitats van ser analitzats per WB amb l'anticòs UP-H1 sota condicions reductores.

4.5. Associació d'IREM-2 a molècules adaptadores.

La presència d'una lisina a la regió transmembrana d'IREM-2 suggereix que aquest receptor s'associa amb molècules adaptadores que contenen ITAMs. Fins ara s'han descrit quatre possibles molècules adaptadores (DAP-12, DAP-10, Fc ϵ RI γ i CD3 ζ) que es poden associar a receptors activadors que contenen una càrrega positiva. Per tal de determinar si IREM-2 és capaç d'associar-se a algun d'aquests adaptadors es va fer una cotransfecció transitòria en cèl·lules COS amb la Src quinasa c-fyn, IREM-2-HA i els adaptadors DAP-12, Fc ϵ RI γ i CD3 ζ .

En presència de la quinasa Fyn els tres adaptadors es van fosforilar a nivell de les tirosines. L'anàlisi per WB amb l'anticòs anti-fosfotirosina dels immunoprecipitats amb l'anticòs anti-HA a partir de les cèl·lules COS transfectades mostrava que IREM-2 és capaç d'unir-se a DAP-12, mentre que no es va detectar interacció amb les altres molècules Fc ϵ RI γ i CD3 ζ (figura 17 A). Posteriorment es va fer un assaig molt similar, també en cèl·lules COS transfectades de forma transitòria, en el que es va veure interacció d'IREM-2 amb l'adaptador DAP-10 (figura 17B).

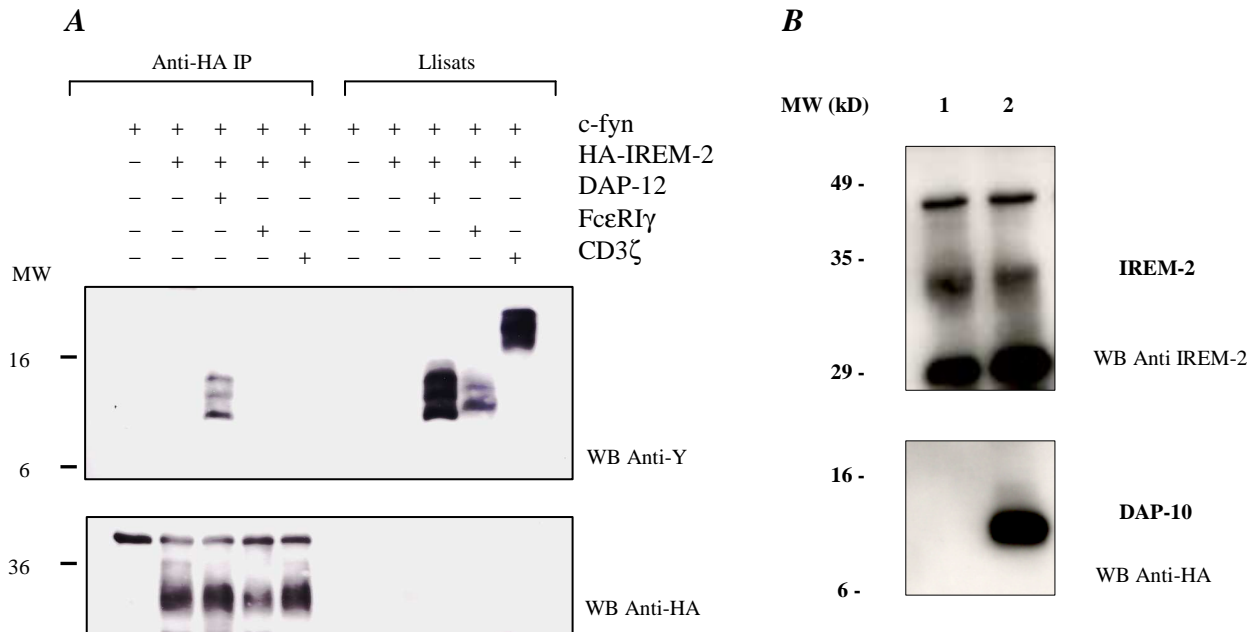


Figura 17. IREM-2 s'associa amb les proteïnes adaptadores DAP-12 i DAP-10 en cèl·lules COS. A) Les cèl·lules COS van ser cotransfectades de forma transitòria amb IREM-2 i c-fyn conjuntament amb DAP-12, CD3ζ o FcεRIγ. Els immunoprecipitats van ser analitzats en un gel de poliacrilamida al 15% sota condicions desnaturalitzants i transferits a una membrana de PVDF. Aquesta va ser hibridada amb els anticossos anti-fosfotirosina o anti-HA i llavors visualitzada per ECL. B) Les cèl·lules COS van ser cotransfectades de forma transitòria amb (1) IREM-2 i (2) IREM-2 més DAP-10-HA. 48 hores després es van lliar, immunoprecipitar amb l'anticòs anti-HA i es va realitzar el WB amb els anticossos anti-IREM-2 i anti-HA seqüencialment .

Amb l'intenció de veure l'associació d'IREM-2 amb DAP-12 en monòcits es van fer diferents experiments d'immunoprecipitació del receptor amb cèl·lules tractades amb pervanadat i seguidament un WB amb els anticossos anti-fosfotirosina, anti-DAP-

12 o anti-cadena gamma, però en cap dels casos es detecta interacció entre les dues proteïnes (dades no mostrades).

4.6. IREM-2 indueix l'activitat transcripcional de NFAT

Per tal d'explorar la possible funció estimuladora d'IREM-2 es van transfectar les cèl·lules RBL amb IREM-2 amb o sense l'adaptador DAP-12. L'expressió d'IREM-2 es va confirmar per tinció en superfície i la de DAP-12 per citometria en les cèl·lules permeabilitzades (figura 18).

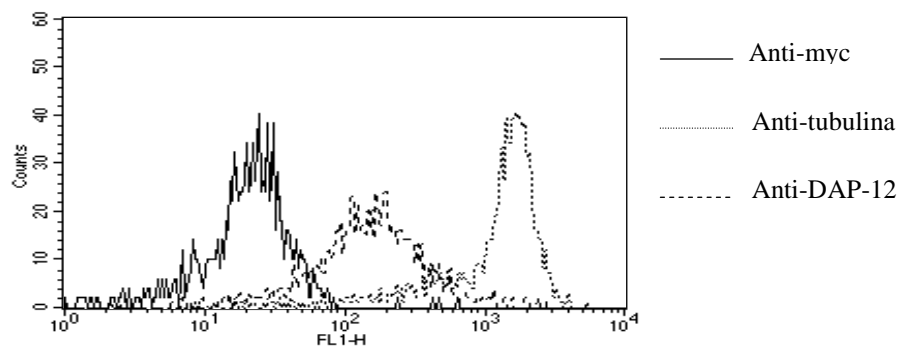


Figura 18. Expressió de DAP-12 en el transfectant estable de la línia cel·lular RBL. Determinació per immunofluorescència indirecta de l'expressió de la molècula adaptadora DAP-12 en les cèl·lules RBL transfectades establement per electroporació. Com a control negatiu es mostra la tinció amb el sobrenedant del mieloma myc i com a control positiu es fa servir l'anticòs anti-tubulina.

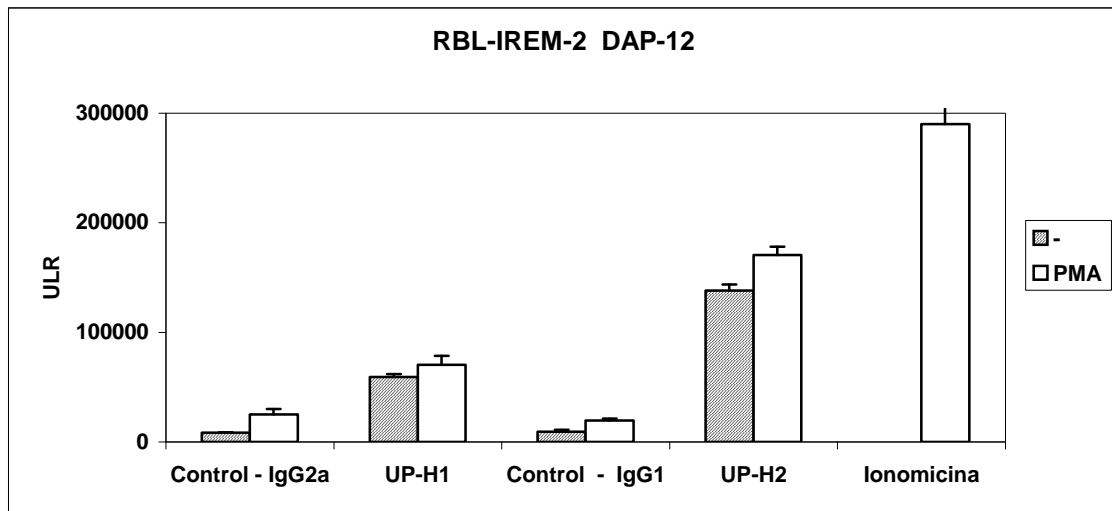
Seguidament les cèl·lules van ser transfectades de forma transitòria amb una construcció que contenia el gen de la luciferasa com a reporter sota el control d'un promotor dependent de NFAT/AP1. Les cèl·lules transfectades van ser estimulades amb

els anticossos UP-H1, UP-H2 i controls isotípics presentats per la línia cel·lular P815 tal com s'ha descrit en materials i mètodes. Es va observar la inducció d'una activitat luciferasa significant en el cas de les RBL/IREM-2/DAP-12 estimulades amb els anticossos anti-IREM-2 comparat amb els controls isotípics. En els quatre experiments realitzats, UP-H2 va ser bastant més efectiu que UP-H1 per induir l'activació. Com a control positiu es va utilitzar la ionomicina més el PMA (figura 19 A). Es van obtenir resultats molt semblants quan es va emprar la IgE com a control positiu i no es va detectar inducció de l'activitat luciferasa en el cas de les RBL originals (dades no mostrades).

Quan varem realitzar el mateix assaig amb un plasmidi que contenia el gen de la luciferasa sota el control d'una seqüència d'unió a NF- κ B (NF- κ B Luc) varem veure que no hi havia cap mena d'activitat transcripcional induïda per l'estimulació amb els anticossos anti-IREM-2 (dades no mostrades) comparat amb l'efecte de la ionomicina més el PMA emprats com a control positiu .

Realitzant el mateix experiment en absència de DAP-12 observem que l'anticòs no és capaç d'induir l'activitat transcripcional de NFAT. En aquest cas, però, en presència d'un coestímul com és el PMA, sí que té lloc la inducció de l'activitat transcripcional de NFAT (figura 19 B). Això suggereix l'associació d'IREM-2 amb un altre adaptador, que podria ser DAP-10 donat que s'expressa en RBLs i hem observat la seva interacció amb IREM-2 en cèl·lules COS.

A



B

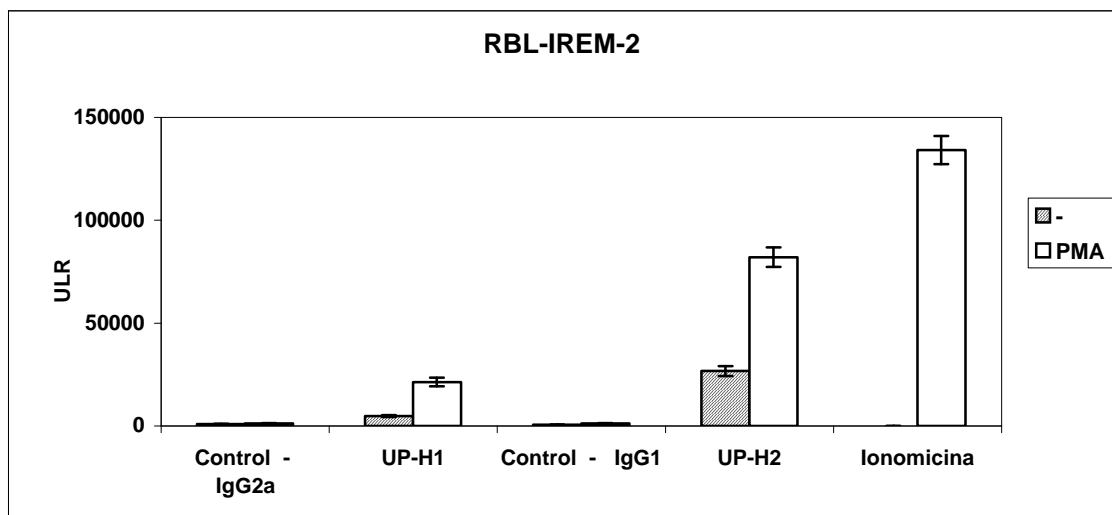


Figura 19. L'entrecreuament d'IREM-2 és capaç de induir activitat transcripcional. Les cèl·lules RBL/IREM-2/DAP-12 (A) i RBL/IREM-2 (B) es van transfectar transitòriament amb el plasmidi 3xNFAT Luc. 24 hores després les cèl·lules es van estimular amb la línia cel·lular P815 en presència dels anticossos anti-IREM-2 i els controls respectius. Es va fer l'assaig en paral·lel afegint PMA com a coestimulador. L'activitat luciferasa es va avaluar després de 8 hores d'estimulació.

4.7. IREM-2 indueix l'alliberació de TNF α en monòcits

Un altre assaig que es va realitzar per tal de confirmar que IREM-2 podria actuar com un receptor activador va ser l'estimulació d'IREM-2 present a la superfície dels monòcits amb l'anticòs específic UP-H2 i la mesura mitjançant un ELISA de l'alliberació de TNF α . Com es mostra a la figura 20 la unió de l'anticòs al receptor provoca una producció de TNF α significativa en comparació amb el control isotípic, tot i amb això els nivells de TNF α detectats van ser menors que els produïts per l'estimulació amb l'anticòs anti-CD16 (figura 20). També es van fer assaigs de coestimulació d'IREM-2 amb LPS o CD64, però no es van observar efectes de potenciació sobre l'alliberació de la citoquina (dades no mostrades).

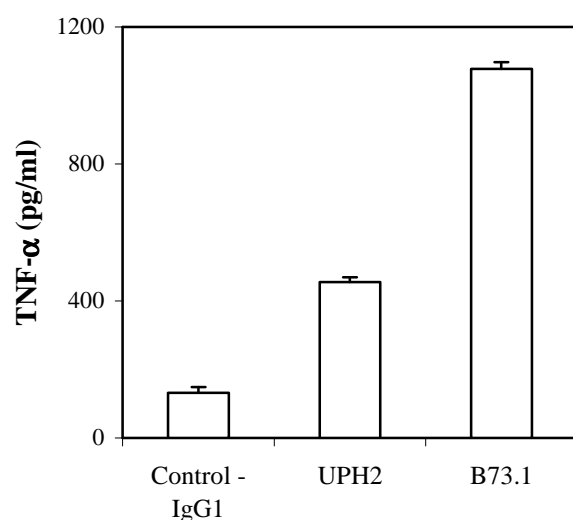


Figura 20. IREM-2 indueix l'alliberació de TNF α en monòcits. Les cèl·lules van ser estimulades durant 24 hores amb els anticòs UP-H2 (anti-IREM-2), B73.1 (anti-CD16) o una IgG1 com a control negatiu enganxats al plàstic mitjançant l'antisèrum d'ovella anti-ratolí (SAM) i els sobrenedants van ser analitzats per ELISA per mesurar la quantitat de TNF α alliberat. Aquest experiment és representatiu d'un grup de quatre realitzats.

4.8. L'anticòs UP-H2 mobilitza calci intracel·lular però no activa ERK a través d'IREM-2 en monòcits.

Per explorar possibles vies a través de les quals podria estar senyalitzant IREM-2, es van dur a terme experiments de mobilització de calci intracel·lular emprant monòcits. Com es mostra a la figura 21, l'entrecreuament del receptor IREM-2 amb l'anticòs UP-H2 va induir un cert augment en la concentració del calci intracel·lular, tot i que l'increment és menor que l'induït per l'anticòs anti-CD16.

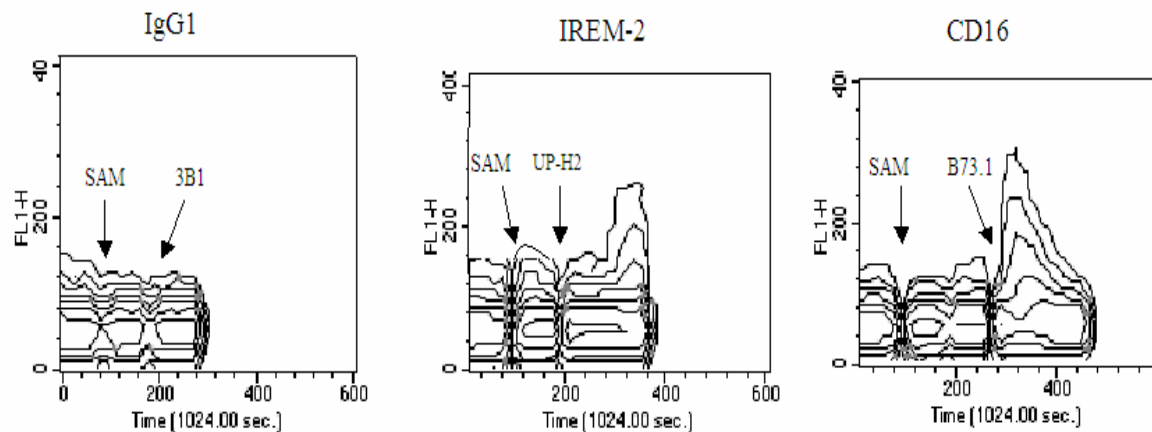


Figura 21. L'entrecreuament d'IREM-2 indueix la mobilització de $(Ca^{2+})_i$. Es van incubar els monòcits amb la sonda fluorescent Fluo-3/AM i es van estimular amb els anticòs UP-H2 (anti-IREM-2), B73.1 (anti-CD16) o una IgG1 com a control negatiu. A continuació es va afegir un antiserum d'ovella anti-ratolí com agent d'entrecreuament. Les fletxes indiquen el moment en que es van afegir els anticòs.

Per altra banda, es va observar que l'entrecreuament d'IREM-2 amb l'anticòs UP-H2 en monòcits no indueix una fosforilació ràpida i transitòria d'ERK 1/2 com és el

cas del receptor CD16 (figura 22). Aquests resultats no permeten implicar la via de les MAP quinases en la senyalització a través d'IREM-2.

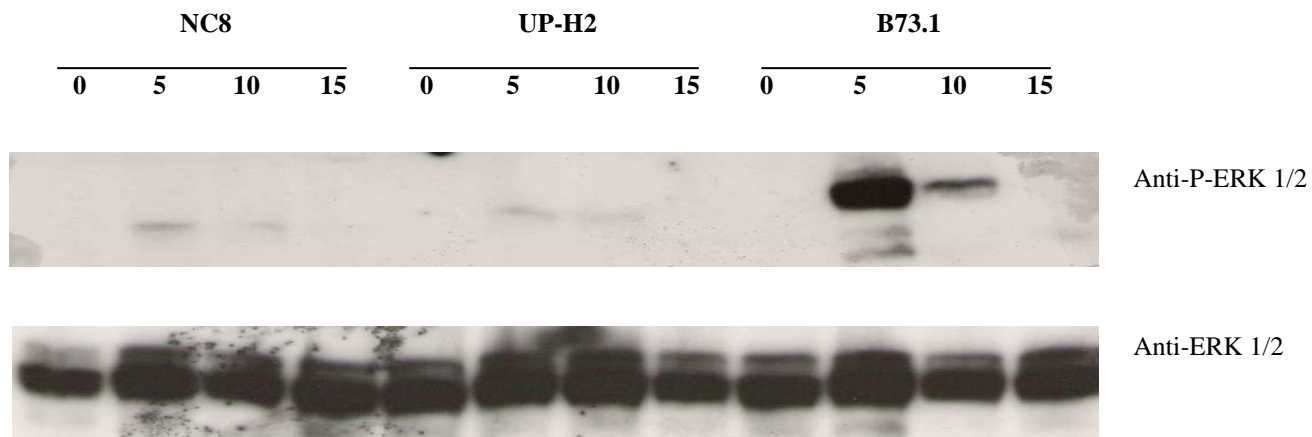


Figura 22. L'entrecreuament de CD16 indueix fosforilació de MAPK en monòcits. Es van estimular les cèl·lules a 37°C amb els anticossos anti-IREM-2, anti-CD16 i una IgG1 com a control durant els temps indicats. Els lisats cel·lulars es van resoldre en condicions no reductores en un gel d'acrilamida al 10% i es van transferir a una membrana de nitrocel·lulosa. Seguidament la membrana es va revelar amb un anticòs anti-ERK 1/2 fosforilat i posteriorment es va rehibridar amb un anticòs anti-ERK com a control de la quantitat de lisat analitzat en cada carril.

Com s'ha descrit que alguns receptors de superfície, com per exemple LAIR-1, participen en la inhibició de la diferenciació dels monòcits a cèl·lules dendrítiques immadures interferint en la via de senyalització del GM-CSF, nosaltres varem pensar que potser IREM-2 podia regular la diferenciació dels monòcits. Per fer això es van cultivar els monòcits amb GM-CSF+IL-4 en presència d'anti-IREM-2 o d'anti CD94, com a control negatiu, enganxats a la placa amb SAM emprat com agent

d'entrecreuament. Als 6 dies de cultiu es va determinar per citometria de flux els nivells d'expressió de CD14 i de CD1a podent observar que no hi ha cap efecte dels anticossos, UP-H2 o CD229, sobre la diferenciació de les cèl·lules dendrítiques immadures (figura 23).

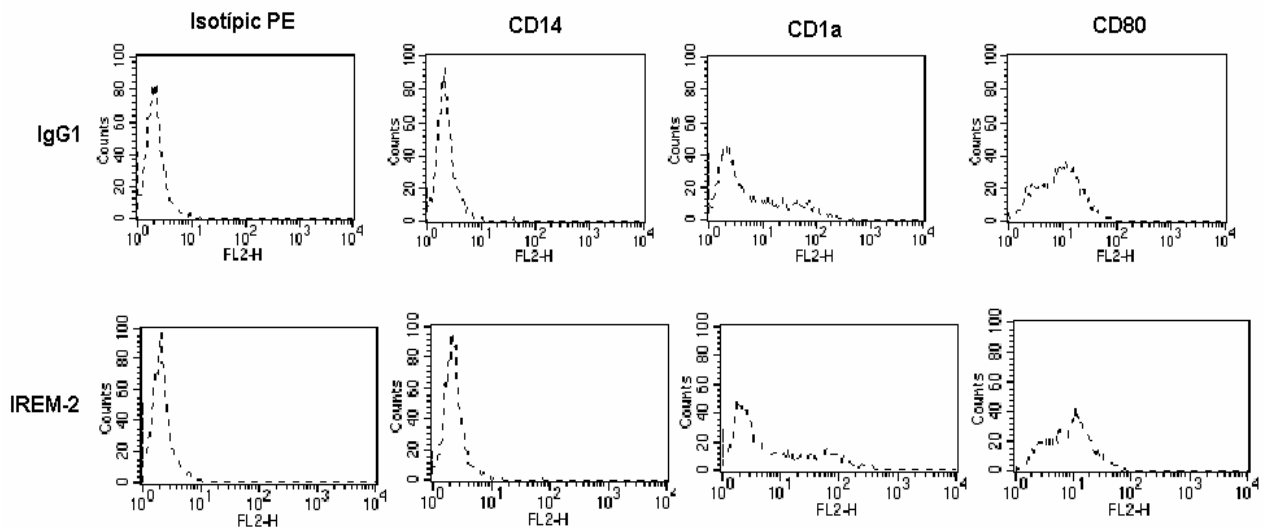


Figura 23. L'entrecreuament d'IREM-2 no inhibeix els efectes del GM-CSF i la IL-4 en els monòcits. Els monòcits es van cultivar durant 6 dies amb GM-CSF i IL-4 en presència d'IREM-2 o de CD229 com a control, seguidament es va determinar per immunofluorescència indirecta l'expressió de CD14, CD1a i CD80. Aquest experiment és representatiu de tres realitzats.

Donat que la migració dels monòcits de la sang a zones d'inflamació requereix adhesió a l'endoteli i a les proteïnes de la matriu extracel·lular, es va comprovar si l'activació d'IREM-2 en monòcits, mitjançant els anticossos, estimulava un augment de l'expressió de diferents molècules d'adhesió i coestimuladores, com són: CD11b,

CD11c, ICAM, VCAM, CD69, CD80, CD83 i CD16. En cap dels casos, però, es va observar un canvi en l'expressió d'aquestes proteïnes (dades no mostrades).

4.9. Aplicació dels anticossos anti-IREM-2 per la caracterització de leucèmies.

En col·laboració amb el grup del Dr. Orfao i del Dr. García-Montero s'ha estudiat un ampli panell de leucèmies limfoblàstiques agudes i processos limfoproliferatius crònics en els quals no s'ha detectat l'expressió d'IREM-2. A més a més, s'ha realitzat l'anàlisi immunofenotípic de l'expressió d'IREM-2 en mostres del moll de l'os de quinze pacients amb leucèmia mieloide crònica (CML; n=1), leucèmia mieloide aguda (AML; n=10) o síndromes mielodisplàsics (MDS; n=4). En tots els casos els blasts leucèmics mieloides van ser negatius per IREM-2, concordant amb l'absència del receptor en progenitors hematopoètics immadurs (Taula 2).

Actualment s'estan realitzant estudis immunofenotípics més extensos per tal de determinar si els anticossos anti-IREM-2 són una eina útil per refinar les classificacions immunofenotípiques i la definició de nous subgrups de leucèmies mieloides per citometria de flux.

5. DISCUSSIÓ

En aquest treball descrivim el clonatge i la caracterització molecular i funcional d'un nou receptor, IREM-2 (*Immune Receptor Expressed by Myeloid cells-2*), que pertany a la família CMRF35/IREM/CD300.

D'aquesta família multigènica, fins ara s'han descrit dos receptors inhibidors anomenats CMRF35H/IRP60/CD300a (Green, Clark et al. 1998) i l'IREM-1/CD300f (Alvarez-Errico, Aguilar et al. 2004) i dos activadors CMRF35A/CD300c (Jackson, Hart et al. 1992) i IREM-2/CD300e. Els gens d'aquesta família es troben a la regió q25.1 del cromosoma humà 17 i s'ha demostrat que aquest locus està lligat a la susceptibilitat a la psoriasis suggerint una participació d'aquests membres de la família en malalties inflamatòries (Speckman, Wright-Daw et al. 2003).

Inicialment es van identificar els receptors CMRF35A i CMRF35H amb l'ajuda d'un anticòs monoclonal, el qual reconeixia un epítop present en la superfície de monòcits, neutròfils, un subgrup de limfòcits B i T i línies cel·lulars limfoides (Clark, Green et al. 2000). L'epítop reconegut es va trobar en dues molècules de superfície, el CMRF-35A i el CMRF-35H. Aquestes dues proteïnes mostren un domini immunoglobulina tipus V extracel·lular amb més d'un 90% d'homologia, però la regió intracel·lular és completament diferent. El CMRF-35H té tres ITIMs en el domini citoplasmàtic, mentre que el CMRF-35A té un domini citoplasmàtic molt curt, sense ITIMs o cap altre motiu de senyalització conegut i un residu glutàmic en el domini transmembrana, suggerint la seva possible associació a alguna molècula encara desconeguda. S'expressen de forma independent un de l'altre i són productes de gens diferents, la qual cosa indica que aquestes dues molècules poden tenir papers diferents però relacionats en la regulació de la funció leucocitària.

IREM-2 es va clonar per homologia a un nou receptor inhibidor IREM-1 (*Immune Receptor Expressed by Myeloid cells-1*) que també va ser identificat en el nostre laboratori emprant l'estratègia del triple híbrid en llevats. Aquest és un receptor inhibidor que conté cinc residus tirosina en la cua citoplasmàtica, dos dels quals es troben inclosos en motius ITIM. S'ha demostrat que la interacció d'IREM-1 amb SHP-1 té lloc mitjançant la tirosina 205 i que l'estimulació del receptor amb anticossos específics inhibeix el procés d'activació induïda del receptor Fc γ Re (Alvarez-Errico, Aguilar et al. 2004). A més a més, IREM-1 s'associa amb la subunitat p85 α de la PI3K, la qual cosa suggereix una possible dualitat funcional del receptor. L'expressió cel·lular d'IREM-1 es troba restringida al llinatge mieloide en (monòcits, granulòcits, mastòcits, basòfils, eosinòfils i cèl·lules dendrítiques).

IREM-2 és una glicoproteïna de membrana de tipus I que conté a la regió extracel·lular un domini Ig de tipus V el qual mostra un grau d'homologia d'aproximadament un 65% amb el domini Ig de les molècules de la família, IREM-1, CMRF35-H i CMRF35-A. I en el cas de les molècules Nkp44 i TREM-2 l'homologia és menor, aproximadament un 50%. Cal destacar la presència, en el domini Ig d'IREM-2, d'un segon pont disulfur (Cys37-Cys45) a més a més dels altres dos residus de cisteïna involucrats en l'estructura secundària del domini extracel·lular. Aquest parell de cisteïnes addicionals permeten definir una nova subfamília de molècules tipus Ig, que inclouria proteïnes transmembrana de tipus I, tals com IREM-2, Nkp 44 i TREM-2 entre d'altres (Cantoni, Ponassi et al. 2003). Aquestes proteïnes tot i presentar una dèbil homologia entre elles i estar codificades en cromosomes diferents (els gens de la família CD300 estan en el cromosoma 17q25.2 i Nkp44 i TREM-2 en el cromosoma 6p21.1) comparteixen un domini Ig tipus V similar i un segon pont disulfur altament conservat

suggerint que poden provenir d'un ancestre comú. És possible que l'estructura particular d'aquest subgrup de proteïnes estigui relacionada amb les interaccions amb els seus lligants.

Paral·lelament, fent una cerca en la base de dades GenBank EST murines per tal de buscar seqüències homòlogues al domini Ig de TREM-2, el grup del Dr. Seaman va clonar i caracteritzar un nou receptor múrid. Aquesta proteïna, amb una seqüència molt similar al receptor humà IREM-1, es va anomenar CLM-1 (CMRF-35-like molecule) (Chung, Humphrey et al. 2003). Al igual que IREM-1, CLM-1 conté varies tirosines en el seu domini intracel·lular. Aquests residus formen part tant de motius ITIM convencionals, als quals s'associa SHP-1 donant lloc a una funció inhibidòria, com de motius YxxM, que s'han relacionat amb senyals d'activació via associació amb la fosfatidilinositol 3'-quinasa.

Fent una cerca amb la seqüència de CLM-1 es van trobar 8 gens amb dominis extracel·lulars homòlegs, demostrant l'existència d'una família multigènica que es troba en el cromosoma 11 múrid. Els dominis de senyalització dels receptors d'aquesta família mostren una gran variabilitat. CLM-2, CLM-4 i CLM-6 tenen un aminoàcid lisina en el domini transmembrana, el qual presumiblement permet l'associació amb proteïnes adaptadores com DAP-12 (Chung, Humphrey et al. 2003). Tot i que tots tres receptors presenten una elevada homologia amb IREM-2, l'ortòleg múrid d'IREM-2 és CLM-2. CLM-5 sembla ser l'ortòleg de CMRF-35A (Daish, Starling et al. 1993) i està format per un domini citoplasmàtic curt i un residu glutamat carregat negativament en el fragment transmembrana. CLM-8 correspon al receptor humà CMRF-35H (Green, Clark et al. 1998) i malgrat la conservació dels residus tirosina degut als canvis en alguns residus adjacents importants es fa difícil predir quina funcionalitat té aquest

receptor. CML-9 té un residu tirosina però no forma part de cap motiu conegut d'unió a proteïnes de senyalització.

El patró d'expressió de les molècules CRMF35/CD300 està restringit a les cèl·lules hematopoètiques. IRP-60 es va detectar a la superfície de les cèl·lules NK, monòcits, granulòcits i un petit grup de cèl·lules T. La distribució de CRMF35A no és gaire clara donat que l'anticòs emprat en l'estudi d'aquesta molècula també interacciona amb IRP-60. La utilització d'un antisèrum policlonal ha permès veure expressió de la proteïna, al menys, en la superfície dels monòcits i de les cèl·lules T. Les nostres dades preliminars a nivell d'ARNm mostraven que l'expressió d'IREM-2 està restringida al llinatge mieloide. Per tal d'estudiar detalladament l'expressió d'IREM-2 varem generar dos anticossos específics (UP-H1 i UP-H2) i varem analitzar l'expressió del receptor en diferents mostres de sang perifèrica i del moll de l'os. El fet que l'expressió d'IREM-2 estigui restringida a les cèl·lules dendrítiques que provenen del llinatge mieloide i a les cèl·lules monocítiques, juntament amb el fet que la resta de molècules descrites de la família mostrin una distribució molt més àmplia, permet de forma indirecta excloure la possibilitat de que els anticossos UP-H1 i UP-H2 puguin reconèixer els altres membres de la família de CRMF35.

L'anàlisi d'IREM-2 en les mostres del moll de l'os ens indica que no hi ha expressió del receptor durant els estadis primerencs de maduració, ja que no és detectat en els precursors CD34⁺ a diferència d'IREM-1. IREM-2 apareix en un estat de diferenciació bastant avançat, concretament després de que els precursors monocítics són CD64 positius i ja han adquirit nivells elevats d'expressió de CD14, és a dir quan són monòcits madurs. Això concorda amb el fet que la línia cel·lular leucèmica

monocítica U937 no expressa IREM-2 fins que no es madura mitjançant l'addició de GM-CSF en el medi de cultiu.

La disponibilitat dels anticossos també ens va permetre realitzar un estudi detallat de l'expressió d'IREM-2 durant la diferenciació dels monòcits en assaigs *in vitro*. Els monòcits tractats amb IL-4 i GM-CSF es diferencien a cèl·lules dendrítiques immadures (Sallusto and Lanzavecchia 1994; Sanchez-Torres, Garcia-Romo et al. 2001) i durant aquest procés l'expressió d'IREM-2 es perd. El fet que trobem IREM-2 a la superfície de les cèl·lules dendrítiques mieloides contrasta amb el fet que quan les diferenciem *in vitro* s'observi la desaparició del receptor. Tot i que les cèl·lules dendrítiques generades *in vitro* poden funcionar com a cèl·lules presentadores d'antigen, el seu ús com a model per l'estudi de la diferenciació és limitat. Quan es mantenen els monòcits exclusivament amb IL-4 també s'observa una disminució de l'expressió tant de CD14 com d'IREM-2. El tractament amb GM-CSF produeix una certa disminució més o menys acusada en funció del donant. En el cas dels monòcits tractats amb LPS no hi ha canvis substancials en el patró d'expressió de la molècula. La generació de les cèl·lules dendrítiques *in vitro* depèn directament de la IL-4 evitant així la diferenciació cap a la via dels macròfags (Menetrier-Caux, Thomachot et al. 2001). Diferents estudis han demostrat que la IL-4 pot regular l'expressió de diferents molècules mieloides com és el cas de CD209/DC-SIGN (DC-specific ICAM3 grabbing non integrin). DC-SIGN es troba en un petit subgrup de cèl·lules CD14⁺ i la seva expressió es veu fortament incrementada (Relloso, Puig-Kroger et al. 2002) després del tractament de les cèl·lules amb IL-4, a diferència d'IREM-2. Per altra banda, altres molècules com TREM-1 mostren un patró d'expressió diferent, essent expressat en monòcits i neutròfils però absent en les cèl·lules dendrítiques (Bouchon, Dietrich et al. 2000). *In vivo* TREM-1 es

troba amb diferents nivells d'expressió en diversos tipus de macròfags, mentre que TREM-2 s'expressa en cèl·lules dendrítiques derivades de monòcits (Bouchon, Hernandez-Munain et al. 2001). La maduració de les cèl·lules dendrítiques amb LPS, TNF- α , CD40L, IL-1 β , oligonucleòtids CpG o IgG agregada dóna lloc a la pèrdua de l'expressió de TREM-2.

Resumint, sembla que l'expressió d'IREM-2 està absolutament restringida a les cèl·lules dendrítiques mieloides i a les cèl·lules monocítiques, no es troba en estadis de maduració inicials i la seva expressió es troba regulada per diferents estímuls com són la IL-4 i el GM-CSF.

L'ADNc d'IREM-2 codifica per una proteïna de 205 aminoàcids que conté un domini Ig extracel·lular i una regió transmembrana amb un aminoàcid amb càrrega positiva (Lys), que permet predir la seva possible associació a una molècula adaptadora. Es van fer experiments per tal d'analitzar la interacció d'IREM-2 amb diferents molècules adaptadores (DAP-12, CD3- ζ , Fc ϵ RI γ o DAP-10) en cèl·lules COS transfectades i es va veure associació del receptor amb DAP-12 i DAP-10. Donat que aquesta línia cel·lular no expressa cap de les molècules adaptadores conegudes (DAP-12, CD3- ζ , Fc ϵ RI γ o DAP-10), podem concloure que almenys en cèl·lules COS transfectades, l'expressió en superfície d'IREM-2 no depèn de la seva associació amb molècules adaptadores. En el cas de TREM-1 la seva expressió es veu parcialment incrementada en presència de DAP-12, suggerint que TREM-1 necessita la presència d'una molècula adaptadora per tal d'expressar-se de forma eficient a la superfície cel·lular (Bouchon, Dietrich et al. 2000).

Els resultats obtinguts en RBLs ens mostren que IREM-2 podria estar implicat en dos tipus diferents d'activació cel·lular en funció de quin adaptador s'està emprant.

En associació amb DAP-12, IREM-2 és capaç d'induir l'activitat transcripcional de NFAT. En canvi, en absència de DAP-12 l'entrecruament d'IREM-2, per si sol, no confereix propietats estimuladores donat que no s'indueix l'activitat transcripcional de NFAT. En aquest cas, però, en presència d'un coestímul com és el PMA, sí que té lloc la inducció de l'activitat transcripcional de NFAT, suggerint l'existència de senyals coestimuladores en cèl·lules d'origen mieloide. Nosaltres, a més a més, suggerim que l'adaptador al qual s'associaria IREM-2 podria ser DAP-10 donat que s'expressa en RBLs de forma endògena i hem observat la seva interacció amb el receptor en cèl·lules COS.

Aquests resultats són anàlegs a observacions prèvies realitzades amb el receptor SIRP β 1, que s'expressa en cèl·lules del llinatge mieloide, els quals demostren que en el model cel·lular de les RBLs, l'associació d'aquest receptor amb diferents molècules adaptadores (DAP-12 i DAP-10) dictamina les propietats estimuladores o coestimuladores respectivament (Anfossi, Lucas et al. 2003). L'associació de SIRP β 1 amb diferents molècules adaptadores recorda a la composició variable d'altres receptors oligomèrics. Els receptors activadors CD16, Nkp46 i Nkp30 es poden associar amb CD3 ζ i FcR γ . Un altre exemple similar seria el cas de NKG2D, sobre el qual s'ha descrit que en ratolí DAP-10 i DAP-12 contribueixen a l'activitat estimuladora de la molècula en cèl·lules NKs, mentre que DAP-10 és el responsable de la funció coestimuladora en cèl·lules T. Degut a un *splicing* alternatiu s'expressen dues isoformes la llarga i la curta de NKG2D (mNKG2D-L i mNKG2D-S) en cèl·lules NK i T CD8⁺ activades (Diefenbach, Tomasello et al. 2002). Assaigs d'immunoprecipitació demostren que DAP-10 s'associa a les dues isoformes mentre que DAP-12 només s'associa a mNKG2D-S. En humans hNKG2D també funciona com a receptor activador

en cèl·lules NK i com a receptor coestimulador en cèl·lules T, no obstant els mecanismes que donen lloc a aquesta duplicitat de funcions són diferents. hNKG2D s'associa exclusivament a DAP-10 i no es detecta interacció amb DAP-12 (Billadeau, Upshaw et al. 2003). En cèl·lules NKs la senyalització té lloc a través de dues vies, una a través de PI3K i l'altra dóna lloc a la fosforilació de VaV1 i Rac (Billadeau, Upshaw et al. 2003).

La capacitat d'IREM-2 d'associar-se a DAP-12 en cèl·lules transfectades, així com el fet que s'indueix l'activitat transcripcional de NFAT en RBLs transfectades, ens indica que aquesta molècula pot actuar com un receptor activador. A més a més, l'estimulació d'IREM-2 induïx la producció de $TNF\alpha$ i l'alliberació de calci intracel·lular en monòcits. Aquestes dades confirmen que IREM-2 és el primer receptor activador identificat de la família del CMRF-35. Tot i l'evidència de la interacció entre IREM-2 i DAP-12 en cèl·lules COS transfectades, nosaltres no hem pogut coprecipitar les dues molècules en monòcits humans. Encara que aquest fet pugui ser degut a limitacions tècniques, no es pot excloure la idea que hi hagi alguna altra molècula que s'uneixi de forma preferencial a IREM-2 en monòcits, i pugui bloquejar la interacció amb DAP-12. Aquesta hipòtesis explicaria perquè tot i observar l'alliberament de $TNF\alpha$, no veïem estimulació d'ERK quan activem IREM-2 amb anticossos específics. Donat que s'ha descrit que la via de senyalització de DAP-12 inclou l'activació d'aquest enzim (Jiang, Zhong et al. 2002), aquests resultats reforçarien l'idea d'una via de senyalització alternativa independent de DAP-12.

TREM-1 és important en la resposta inflamatòria aguda i crònica i pot ajudar a modular el xoc sèptic (Bouchon, Dietrich et al. 2000). Donades les similituds entre IREM-2 i TREM-1 podríem suggerir que la funció d'IREM-2 està relacionada amb la

resposta inflamatòria. Mentre que el principal paper de TREM-1 es troba en granulòcits, monòcits i macròfags, TREM-2 controla principalment la funció d'altres cèl·lules mieloides, cèl·lules dendrítiques, osteoclastes i cèl·lules de la microglia. Relacionat amb el paper de TREM-2 i DAP-12 en la migració i l'activació de les DCs, s'ha observat que ratolins deficientes en DAP-12 acumulen DCs a la pell i a la mucosa i tenen la resposta cel·lular Th1 alterada (Bakker, Hoek et al. 2000; Tomasello, Blery et al. 2000; Tomasello, Desmoulins et al. 2000). Per tant, TREM-2, i probablement altres receptors associats a DAP-12 que s'expressen en cèl·lules dendrítiques com SIR β 1 i IREM-2, podrien regular la resposta T *in vivo* per activació de les APCs.

Recentment s'ha descrit que diferents receptors associats a molècules adaptadores que contenen ITAMs com són, TREM-2, MDL-1, SIRP β , PIR-A i OSCAR, s'expressen en osteoclastes (Koga, Inui et al. 2004) i també s'ha vist que CLM-1, un receptor inhibidor membre de la família ortòloga murina de CMRF-35 té un paper important en la regulació de l'osteoclastogènesi (Chung, Humphrey et al. 2003), aquestes dades ens suggereixen que IREM-2 pot participar també en el processos que regulen la formació de l'os. Estudis addicionals són necessaris per tal d'esclarir i entendre el repertori d'immunoreceptors involucrats en la regulació dels osteoclastes.

L'identificació dels lligands fisiològics d'IREM-2 és fonamental per tal d'entendre millor el paper biològic del receptor en les cèl·lules mieloides. Malauradament, de moment no tenim informació sobre la identitat dels possibles lligands de cap membre de la família CD300. Com hem comentat anteriorment, el fet que les molècules TREM-2, Nkp44 i IREM-2 comparteixin un segon parell de cisteïnes conservades donant lloc a una estructura particular, podria reflectir que aquests receptors interaccionin amb lligands que comparteixen elements estructurals comuns.

S'ha demostrat que TREM-2 s'uneix a bacteris Gram positius i Gram negatius i que aquesta unió pot ser trencada per productes aniònics, suggerint que TREM-2 reconeix els patògens via carbohidrats carregats que s'expressen a la superfície del microorganisme (Daws, Sullam et al. 2003). A més a més, aquest receptor uneix proteïnes expressades en línies cel·lulars d'astrocitoma. La capacitat de TREM-2 d'unir tant lligands endògens com exògens és una característica que es dona en altres receptors com són els receptors *scavengers*, el receptor 3 del complement, CD14 i alguns dels Toll-like receptors (Gordon 2002). L'estructura de TREM-2 inclou un grup de residus carregats positivament en l'extrem N-terminal similar a la que es troba en els receptors *scavengers*. Curiosament l'estructura de Nkp44 també mostra una regió on es concentren moltes càrregues positives exposades a la superfície de la molècula (Cantoni, Ponassi et al. 2003) i s'ha descrit que s'uneix a la hemaglutinina viral de forma dependent de l'àcid siàlic (Arnon, Lev et al. 2001).

Altres famílies de receptors, de forma similar, tenen receptors activadors que utilitzen DAP-12 i receptors inhibidors que recluten les tirosina fosfatases SHP-1 i SHP-2 com per exemple els KIRs, els SIRPs, Ly-49 de ratolí o CD94/NKG2. Alguns dels membres inhibidors d'aquestes famílies reconeixen lligands propis: MHC classe I per KIR i Ly-49 (Karlhofer, Ribaldo et al. 1992; Colonna and Samaridis 1995), HLA-E per CD94/NKG2A (Braud, Allan et al. 1998) i CD47 per SIRP α 1 (Jiang, Lagenaur et al. 1999). El receptor activador NKG2C reconeix el mateix lligand que la seva parella inhibidora (NKG2A) (Vance, Jamieson et al. 1999) i hi ha evidències funcionals de que membres activadors de les famílies KIR i Ly-49 reconeixen MHC classe I (Nakamura, Linnemeyer et al. 1999). Alguns receptors activadors d'aquestes famílies també reconeixen lligands associats a patògens. Així doncs, mentre que els receptors

inhibidors sembla que normalment reconeixen molècules pròpies, els receptors activadors poden reconèixer tant molècules de patògens com molècules pròpies. No obstant, també s'ha pogut comprovar que certs virus han desenvolupat estratègies d'evasió, per exemple, codificant per lligands de receptors inhibidors. Per exemple, s'ha descrit que el virus de CMV humà codifica per una proteïna, UL18, que actua com lligand del receptor inhibidor CD85j/ILT2 (Cosman, Fanger et al. 1997). Aquest mecanisme bloqueja la eliminació de cèl·lules infectades per el virus per part de les cèl·lules NKs. Per tot això, es considera la possibilitat de que els lligands per IREM-2 podrien ser tan endògens com exògens, suggerint un paper dual del receptor en la funció normal dels teixits i en la defensa contra microorganismes.

Per concloure, en el nostre laboratori hem clonat i caracteritzat un nou receptor activador anomenat IREM-2 que s'expressa de forma selectiva en monòcits i cèl·lules dendrítiques mieloides. La identificació del seu lligant és primordial per tal de poder determinar el seu paper fisiològic.

6. CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

- 1) IREM-2 és un nou receptor activador humà de la IgSF, que pertany a la família CMRF35/CD300.
- 2) L'expressió d'IREM-2 està restringida al llinatge mielomonocític i es detecta en monòcits madurs CD14⁺ CD64⁺ i cèl·lules dendrítiques mieloides.
- 3) Els anticossos anti-IREM-2 poden ser d'utilitat en l'estudi fenotípic de leucèmies mieloides.
- 4) L'expressió d'IREM-2 es perd en cèl·lules dendrítiques immadures derivades de monòcits diferenciats *in vitro* amb IL-4 i GM-CSF.
- 5) IREM-2 expressat en cèl·lules transfectades s'associa a les molècules adaptadores DAP-10 i DAP-12.
- 6) L'estimulació amb anticossos anti-IREM-2 induïx l'activitat transcripcional de NFAT en cèl·lules RBL cotransfectades amb DAP-12. En absència de DAP-12 l'activació es detecta només en presència de coestimulació amb PMA.
- 7) L'estimulació d'IREM-2 amb anticossos monoclonals induïx l'alliberació de TNF i la mobilització de calci en monòcits.

7. BIBLIOGRAFIA

- Adams, S., L. J. van der Laan, et al. (1998). "Signal-regulatory protein is selectively expressed by myeloid and neuronal cells." J Immunol **161**(4): 1853-9.
- Aderem, A. and D. M. Underhill (1999). "Mechanisms of phagocytosis in macrophages." Annu Rev Immunol **17**: 593-623.
- Akira, S., K. Takeda, et al. (2001). "Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity." Nat Immunol **2**(8): 675-80.
- Alblas, J., H. Honing, et al. (2005). "Signal regulatory protein alpha ligation induces macrophage nitric oxide production through JAK/STAT- and phosphatidylinositol 3-kinase/Rac1/NAPDH oxidase/H₂O₂-dependent pathways." Mol Cell Biol **25**(16): 7181-92.
- Almeida, J., C. Bueno, et al. (1999). "Extensive characterization of the immunophenotype and pattern of cytokine production by distinct subpopulations of normal human peripheral blood MHC II+/lineage- cells." Clin Exp Immunol **118**(3): 392-401.
- Alvarez-Errico, D., H. Aguilar, et al. (2004). "IREM-1 is a novel inhibitory receptor expressed by myeloid cells." Eur J Immunol **34**(12): 3690-701.
- Anfossi, N., M. Lucas, et al. (2003). "Contrasting roles of DAP10 and KARAP/DAP12 signaling adaptors in activation of the RBL-2H3 leukemic mast cell line." Eur J Immunol **33**(12): 3514-22.
- Angata, T., E. H. Margulies, et al. (2004). "Large-scale sequencing of the CD33-related Siglec gene cluster in five mammalian species reveals rapid evolution by multiple mechanisms." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(36): 13251-6.
- Aramburu, J., M. B. Yaffe, et al. (1999). "Affinity-driven peptide selection of an NFAT inhibitor more selective than cyclosporin A." Science **285**(5436): 2129-33.
- Ardavin, C., G. Martinez del Hoyo, et al. (2001). "Origin and differentiation of dendritic cells." Trends Immunol **22**(12): 691-700.
- Arnon, T. I., M. Lev, et al. (2001). "Recognition of viral hemagglutinins by NKp44 but not by NKp30." Eur J Immunol **31**(9): 2680-9.
- Bakker, A. B., R. M. Hoek, et al. (2000). "DAP12-deficient mice fail to develop autoimmunity due to impaired antigen priming." Immunity **13**(3): 345-53.
- Balaian, L. and E. D. Ball (2005). "Anti-CD33 monoclonal antibodies enhance the cytotoxic effects of cytosine arabinoside and idarubicin on acute myeloid leukemia cells through similarities in their signaling pathways." Exp Hematol **33**(2): 199-211.
- Banchereau, J. and A. K. Palucka (2005). "Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer." Nat Rev Immunol **5**(4): 296-306.
- Banchereau, J. and R. M. Steinman (1998). "Dendritic cells and the control of immunity." Nature **392**(6673): 245-52.
- Barclay, A. N., G. J. Wright, et al. (2002). "CD200 and membrane protein interactions in the control of myeloid cells." Trends Immunol **23**(6): 285-90.

- Bauer, S., V. Groh, et al. (1999). "Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA." Science **285**(5428): 727-9.
- Bellon, T., A. B. Heredia, et al. (1999). "Triggering of effector functions on a CD8+ T cell clone upon the aggregation of an activatory CD94/kp39 heterodimer." J Immunol **162**(7): 3996-4002.
- Bellon, T., F. Kitzig, et al. (2002). "Mutational analysis of immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs of the Ig-like transcript 2 (CD85j) leukocyte receptor." J Immunol **168**(7): 3351-9.
- Billadeau, D. D., J. L. Upshaw, et al. (2003). "NKG2D-DAP10 triggers human NK cell-mediated killing via a Syk-independent regulatory pathway." Nat Immunol **4**(6): 557-64.
- Bleharski, J. R., V. Kiessler, et al. (2003). "A role for triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in host defense during the early-induced and adaptive phases of the immune response." Journal of immunology Baltimore, Md. 1950 **170**(7): 3812-8.
- Bolland, S. and J. V. Ravetch (1999). "Inhibitory pathways triggered by ITIM-containing receptors." Adv. Immunol. **72**: 149-77.
- Borges, L., M. L. Hsu, et al. (1997). "A family of human lymphoid and myeloid Ig-like receptors, some of which bind to MHC class I molecules." J Immunol **159**(11): 5192-6.
- Borkowski, T. A., J. J. Letterio, et al. (1996). "A role for endogenous transforming growth factor beta 1 in Langerhans cell biology: the skin of transforming growth factor beta 1 null mice is devoid of epidermal Langerhans cells." J Exp Med **184**(6): 2417-22.
- Bouchon, A., J. Dietrich, et al. (2000). "Cutting edge: inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes." J Immunol **164**(10): 4991-5.
- Bouchon, A., F. Facchetti, et al. (2001). "TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock." Nature **410**(6832): 1103-7.
- Bouchon, A., C. Hernandez-Munain, et al. (2001). "A DAP12-mediated pathway regulates expression of CC chemokine receptor 7 and maturation of human dendritic cells." J. Exp. Med. **194**(8): 1111-22.
- Braud, V. M., D. S. Allan, et al. (1998). "HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C." Nature **391**(6669): 795-9.
- Brooke, G., J. D. Holbrook, et al. (2004). "Human lymphocytes interact directly with CD47 through a novel member of the signal regulatory protein (SIRP) family." J Immunol **173**(4): 2562-70.
- Brown, G. D., J. Herre, et al. (2003). "Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans." J Exp Med **197**(9): 1119-24.
- Brown, G. D., P. R. Taylor, et al. (2002). "Dectin-1 is a major beta-glucan receptor on macrophages." J Exp Med **196**(3): 407-12.

Bibliografia

- Cantoni, C., C. Bottino, et al. (1999). "NKp44, a triggering receptor involved in tumor cell lysis by activated human natural killer cells, is a novel member of the immunoglobulin superfamily." *J Exp Med* **189**(5): 787-96.
- Cantoni, C., M. Ponassi, et al. (2003). "The three-dimensional structure of the human NK cell receptor NKp44, a triggering partner in natural cytotoxicity." *Structure (Camb)* **11**(6): 725-34.
- Carretero, M., C. Cantoni, et al. (1997). "The CD94 and NKG2-A C-type lectins covalently assemble to form a natural killer cell inhibitory receptor for HLA class I molecules." *Eur J Immunol* **27**(2): 563-7.
- Cella, M., D. Jarrossay, et al. (1999). "Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon." *Nat Med* **5**(8): 919-23.
- Clark, G. J., B. J. Green, et al. (2000). "The CMRF-35H gene structure predicts for an independently expressed member of an ITIM/ITAM pair of molecules localized to human chromosome 17." *Tissue antigens* **55**(2): 101-9.
- Colonna, M. (2003). "TREM2 in the immune system and beyond." *Nat. Rev. Immunol.* **3**(6): 445-53.
- Colonna, M., F. Navarro, et al. (1997). "A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells." *J Exp Med* **186**(11): 1809-18.
- Colonna, M. and J. Samaridis (1995). "Cloning of immunoglobulin-superfamily members associated with HLA-C and HLA-B recognition by human natural killer cells." *Science* **268**(5209): 405-8.
- Cosman, D., N. Fanger, et al. (1997). "A novel immunoglobulin superfamily receptor for cellular and viral MHC class I molecules." *Immunity* **7**(2): 273-82.
- Crocker, P. R. and A. Varki (2001). "Siglecs, sialic acids and innate immunity." *Trends Immunol* **22**(6): 337-42.
- Chang, C., J. Dietrich, et al. (1999). "Cutting edge: KAP10, a novel transmembrane adapter protein genetically linked to DAP12 but with unique signaling properties." *J Immunol* **163**(9): 4651-4.
- Chapman, T. L., A. P. Heikeman, et al. (1999). "The inhibitory receptor LIR-1 uses a common binding interaction to recognize class I MHC molecules and the viral homolog UL18." *Immunity* **11**(5): 603-13.
- Chen, J., P. A. McLean, et al. (2004). "CD22 attenuates calcium signaling by potentiating plasma membrane calcium-ATPase activity." *Nat Immunol* **5**(6): 651-7.
- Chomarat, P., J. Banchereau, et al. (2000). "IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages." *Nat Immunol* **1**(6): 510-4.
- Chu, D. H., C. T. Morita, et al. (1998). "The Syk family of protein tyrosine kinases in T-cell activation and development." *Immunol Rev* **165**: 167-80.

- Chung, D. H., M. B. Humphrey, et al. (2003). "CMRF-35-like molecule-1, a novel mouse myeloid receptor, can inhibit osteoclast formation." J Immunol **171**(12): 6541-8.
- Chung, D. H., W. E. Seaman, et al. (2002). "Characterization of TREM-3, an activating receptor on mouse macrophages: definition of a family of single Ig domain receptors on mouse chromosome 17." Eur. J. Immunol. **32**(1): 59-66.
- Daish, A., G. C. Starling, et al. (1993). "Expression of the CMRF-35 antigen, a new member of the immunoglobulin gene superfamily, is differentially regulated on leucocytes." Immunology **79**(1): 55-63.
- Daws, M. R., L. L. Lanier, et al. (2001). "Cloning and characterization of a novel mouse myeloid DAP12-associated receptor family." Eur. J. Immunol. **31**(3): 783-91.
- Daws, M. R., P. M. Sullam, et al. (2003). "Pattern Recognition by TREM-2: Binding of Anionic Ligands." J. Immunol. **171**(2): 594-9.
- Delneste, Y., P. Charbonnier, et al. (2003). "Interferon-gamma switches monocyte differentiation from dendritic cells to macrophages." Blood **101**(1): 143-50.
- Diefenbach, A., E. Tomasello, et al. (2002). "Selective associations with signaling proteins determine stimulatory versus costimulatory activity of NKG2D." Nat Immunol **3**(12): 1142-9.
- Dietrich, J., M. Cella, et al. (2000). "Cutting edge: signal-regulatory protein beta 1 is a DAP12-associated activating receptor expressed in myeloid cells." J Immunol **164**(1): 9-12.
- Dietrich, J., H. Nakajima, et al. (2000). "Human inhibitory and activating Ig-like receptors which modulate the function of myeloid cells." Microbes Infect **2**(3): 323-9.
- Galfre, G. and C. Milstein (1981). "Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures." Methods Enzymol **73**(Pt B): 3-46.
- Geissmann, F., C. Prost, et al. (1998). "Transforming growth factor beta1, in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 4, induces differentiation of human peripheral blood monocytes into dendritic Langerhans cells." J Exp Med **187**(6): 961-6.
- Gilfillan, S., E. L. Ho, et al. (2002). "NKG2D recruits two distinct adapters to trigger NK cell activation and costimulation." Nat Immunol **3**(12): 1150-5.
- Gordon, S. (2002). "Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response." Cell **111**(7): 927-30.
- Grage-Griebenow, E., R. Zawatzky, et al. (2001). "Identification of a novel dendritic cell-like subset of CD64(+) / CD16(+) blood monocytes." Eur J Immunol **31**(1): 48-56.
- Green, B. J., G. J. Clark, et al. (1998). "The CMRF-35 mAb recognizes a second leukocyte membrane molecule with a domain similar to the poly Ig receptor
Expression of the CMRF-35 antigen, a new member of the immunoglobulin gene superfamily, is differentially regulated on leucocytes." Int Immunol **10**(7): 891-9.

- Hall, C. G., J. Sancho, et al. (1993). "Reconstitution of T cell receptor zeta-mediated calcium mobilization in nonlymphoid cells." Science **261**(5123): 915-8.
- Han, X., H. Sterling, et al. (2000). "CD47, a ligand for the macrophage fusion receptor, participates in macrophage multinucleation." J Biol Chem **275**(48): 37984-92.
- Hayami, K., D. Fukuta, et al. (1997). "Molecular cloning of a novel murine cell-surface glycoprotein homologous to killer cell inhibitory receptors." J Biol Chem **272**(11): 7320-7.
- Hoffmann, J. A., F. C. Kafatos, et al. (1999). "Phylogenetic perspectives in innate immunity." Science **284**(5418): 1313-8.
- Horwood, N. J., V. Kartsogiannis, et al. (1999). "Activated T lymphocytes support osteoclast formation in vitro." Biochem Biophys Res Commun **265**(1): 144-50.
- Inagaki, K., T. Yamao, et al. (2000). "SHPS-1 regulates integrin-mediated cytoskeletal reorganization and cell motility." Embo J **19**(24): 6721-31.
- Isakov, N. (1998). "ITAMs: immunoregulatory scaffolds that link immunoreceptors to their intracellular signaling pathways." Receptors Channels **5**(5): 243-53.
- Jackson, D. G., D. N. Hart, et al. (1992). "Molecular cloning of a novel member of the immunoglobulin gene superfamily homologous to the polymeric immunoglobulin receptor." Eur J Immunol **22**(5): 1157-63.
- Jamieson, A. M., A. Diefenbach, et al. (2002). "The role of the NKG2D immunoreceptor in immune cell activation and natural killing." Immunity **17**(1): 19-29.
- Jiang, K., B. Zhong, et al. (2002). "Syk regulation of phosphoinositide 3-kinase-dependent NK cell function." J Immunol **168**(7): 3155-64.
- Jiang, P., C. F. Lagenaur, et al. (1999). "Integrin-associated protein is a ligand for the P84 neural adhesion molecule." J Biol Chem **274**(2): 559-62.
- Jobbagy, A. and K. Kiraly (1966). "Chemical characterization of fluorescein isothiocyanate-protein conjugates." Biochim Biophys Acta **124**(1): 166-75.
- Kaifu, T., J. Nakahara, et al. (2003). "Osteopetrosis and thalamic hypomyelinosi with synaptic degeneration in DAP12-deficient mice." J Clin Invest **111**(3): 323-32.
- Karlhofer, F. M., R. K. Ribaldo, et al. (1992). "MHC class I alloantigen specificity of Ly-49+ IL-2-activated natural killer cells." Nature **358**(6381): 66-70.
- Kharitonov, A., Z. Chen, et al. (1997). "A family of proteins that inhibit signalling through tyrosine kinase receptors." Nature **386**(6621): 181-6.
- Kitzig, F., A. Martinez-Barriocanal, et al. (2002). "Cloning of two new splice variants of Siglec-10 and mapping of the interaction between Siglec-10 and SHP-1." Biochem Biophys Res Commun **296**(2): 355-62.
- Koga, T., M. Inui, et al. (2004). "Costimulatory signals mediated by the ITAM motif cooperate with RANKL for bone homeostasis." Nature **428**(6984): 758-63.

- Kubagawa, H., P. D. Burrows, et al. (1997). "A novel pair of immunoglobulin-like receptors expressed by B cells and myeloid cells." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(10): 5261-6.
- Kubagawa, H., C. C. Chen, et al. (1999). "Biochemical nature and cellular distribution of the paired immunoglobulin-like receptors, PIR-A and PIR-B." J Exp Med **189**(2): 309-18.
- Kumamoto, Y., N. Higashi, et al. (2004). "Identification of sialoadhesin as a dominant lymph node counter-receptor for mouse macrophage galactose-type C-type lectin 1." J Biol Chem **279**(47): 49274-80.
- Lacey, D. L., E. Timms, et al. (1998). "Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation." Cell **93**(2): 165-76.
- Lajaunias, F., J. M. Dayer, et al. (2005). "Constitutive repressor activity of CD33 on human monocytes requires sialic acid recognition and phosphoinositide 3-kinase-mediated intracellular signaling." Eur J Immunol **35**(1): 243-51.
- Lanier, L. L. (1998). "NK cell receptors." Annu Rev Immunol **16**: 359-93.
- Lanier, L. L. and A. B. Bakker (2000). "The ITAM-bearing transmembrane adaptor DAP12 in lymphoid and myeloid cell function." Immunol Today **21**(12): 611-4.
- Lanier, L. L., B. C. Corliss, et al. (1998). "Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells." Nature **391**(6668): 703-7.
- Latour, S., H. Tanaka, et al. (2001). "Bidirectional negative regulation of human T and dendritic cells by CD47 and its cognate receptor signal-regulator protein- α : down-regulation of IL-12 responsiveness and inhibition of dendritic cell activation." J Immunol **167**(5): 2547-54.
- Letourneur, F. and R. D. Klausner (1992). "Activation of T cells by a tyrosine kinase activation domain in the cytoplasmic tail of CD3 epsilon." Science **255**(5040): 79-82.
- Linehan, S. A., L. Martinez-Pomares, et al. (2000). "Mannose receptor and scavenger receptor: two macrophage pattern recognition receptors with diverse functions in tissue homeostasis and host defense." Adv Exp Med Biol **479**: 1-14.
- Liu, Y., I. Soto, et al. (2005). "SIRPbeta1 is expressed as a disulfide-linked homodimer in leukocytes and positively regulates neutrophil transepithelial migration." J Biol Chem **280**(43): 36132-40.
- Lock, K., J. Zhang, et al. (2004). "Expression of CD33-related siglecs on human mononuclear phagocytes, monocyte-derived dendritic cells and plasmacytoid dendritic cells." Immunobiology **209**(1-2): 199-207.
- Long, E. O. (1999). "Regulation of immune responses through inhibitory receptors." Annu Rev Immunol **17**: 875-904.
- Long, E. O., D. N. Burshtyn, et al. (1997). "Killer cell inhibitory receptors: diversity, specificity, and function." Immunol. Rev. **155**: 135-44.

- Maeda, A., M. Kurosaki, et al. (1998). "Requirement of SH2-containing protein tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2 for paired immunoglobulin-like receptor B (PIR-B)-mediated inhibitory signal." *J Exp Med* **187**(8): 1355-60.
- Malbec, O., D. C. Fong, et al. (1998). "Fc epsilon receptor I-associated lyn-dependent phosphorylation of Fc gamma receptor IIB during negative regulation of mast cell activation." *J Immunol* **160**(4): 1647-58.
- Maliszewski, C. R., C. J. March, et al. (1990). "Expression cloning of a human Fc receptor for IgA." *J Exp Med* **172**(6): 1665-72.
- McVicar, D. W., L. S. Taylor, et al. (1998). "DAP12-mediated signal transduction in natural killer cells. A dominant role for the Syk protein-tyrosine kinase." *J Biol Chem* **273**(49): 32934-42.
- Medzhitov, R. (2001). "Toll-like receptors and innate immunity." *Nat Rev Immunol* **1**(2): 135-45.
- Menetrier-Caux, C., M. C. Thomachot, et al. (2001). "IL-4 prevents the blockade of dendritic cell differentiation induced by tumor cells." *Cancer Res* **61**(7): 3096-104.
- Meyaard, L., G. J. Adema, et al. (1997). "LAIR-1, a novel inhibitory receptor expressed on human mononuclear leukocytes." *Immunity* **7**(2): 283-90.
- Nakamura, M. C., P. A. Linnemeyer, et al. (1999). "Mouse Ly-49D recognizes H-2Dd and activates natural killer cell cytotoxicity." *J Exp Med* **189**(3): 493-500.
- Nutku, E., H. Aizawa, et al. (2003). "Ligation of Siglec-8: a selective mechanism for induction of human eosinophil apoptosis." *Blood* **101**(12): 5014-20.
- Oldenborg, P. A., A. Zheleznyak, et al. (2000). "Role of CD47 as a marker of self on red blood cells." *Science* **288**(5473): 2051-4.
- Orfao, A., F. Ortuno, et al. (2004). "Immunophenotyping of acute leukemias and myelodysplastic syndromes." *Cytometry A* **58**(1): 62-71.
- Palucka, K. A., N. Taquet, et al. (1999). "Lipopolysaccharide can block the potential of monocytes to differentiate into dendritic cells." *J Leukoc Biol* **65**(2): 232-40.
- Passlick, B., D. Flieger, et al. (1989). "Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood." *Blood* **74**(7): 2527-34.
- Pei, D., U. Lorenz, et al. (1994). "Intramolecular regulation of protein tyrosine phosphatase SH-PTP1: a new function for Src homology 2 domains
- Lck-dependent tyrosyl phosphorylation of the phosphotyrosine phosphatase SH-PTP1 in murine T cells
- Overexpression, purification, and characterization of SHPTP1, a Src homology 2-containing protein-tyrosine-phosphatase." *Biochemistry* **33**(51): 15483-93.

- Pessino, A., S. Sivori, et al. (1998). "Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity." J Exp Med **188**(5): 953-60.
- Poltorak, A., X. He, et al. (1998). "Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene." Science **282**(5396): 2085-8.
- Quinn, J. M., J. Elliott, et al. (1998). "A combination of osteoclast differentiation factor and macrophage-colony stimulating factor is sufficient for both human and mouse osteoclast formation in vitro." Endocrinology **139**(10): 4424-7.
- Ravetch, J. V. and S. Bolland (2001). "IgG Fc receptors." Annu Rev Immunol **19**: 275-90.
- Ravetch, J. V. and L. L. Lanier (2000). "Immune inhibitory receptors." Science **290**(5489): 84-9.
- Relloso, M., A. Puig-Kroger, et al. (2002). "DC-SIGN (CD209) expression is IL-4 dependent and is negatively regulated by IFN, TGF-beta, and anti-inflammatory agents." J Immunol **168**(6): 2634-43.
- Reth, M. (1989). "Antigen receptor tail clue." Nature **338**(6214): 383-4.
- Rotta, G., E. W. Edwards, et al. (2003). "Lipopolysaccharide or whole bacteria block the conversion of inflammatory monocytes into dendritic cells in vivo." J Exp Med **198**(8): 1253-63.
- Saginario, C., H. Sterling, et al. (1998). "MFR, a putative receptor mediating the fusion of macrophages." Mol Cell Biol **18**(11): 6213-23.
- Sallusto, F. and A. Lanzavecchia (1994). "Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha." J Exp Med **179**(4): 1109-18.
- Sanchez-Torres, C., G. S. Garcia-Romo, et al. (2001). "CD16+ and CD16- human blood monocyte subsets differentiate in vitro to dendritic cells with different abilities to stimulate CD4+ T cells." Int Immunol **13**(12): 1571-81.
- Schmid, C. D., L. N. Sautkulis, et al. (2002). "Heterogeneous expression of the triggering receptor expressed on myeloid cells-2 on adult murine microglia." J Neurochem **83**(6): 1309-20.
- Siegal, F. P., N. Kadowaki, et al. (1999). "The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood." Science **284**(5421): 1835-7.
- Smith, R. E., V. Patel, et al. (2003). "A novel MyD-1 (SIRP-1alpha) signaling pathway that inhibits LPS-induced TNFalpha production by monocytes." Blood **102**(7): 2532-40.
- Speckman, R. A., J. A. Wright-Daw, et al. (2003). "Novel immunoglobulin superfamily gene cluster, mapping to a region of human chromosome 17q25, linked to psoriasis susceptibility." Hum. Genet. **112**(1): 34-41.

- Stofega, M. R., L. S. Argetsinger, et al. (2000). "Negative regulation of growth hormone receptor/JAK2 signaling by signal regulatory protein alpha." J Biol Chem **275**(36): 28222-9.
- Takai, T., M. Li, et al. (1994). "FcR gamma chain deletion results in pleiotropic effector cell defects." Cell **76**(3): 519-29.
- Timms, J. F., K. Carlberg, et al. (1998). "Identification of major binding proteins and substrates for the SH2-containing protein tyrosine phosphatase SHP-1 in macrophages." Mol Cell Biol **18**(7): 3838-50.
- Tomasello, E., M. Blery, et al. (2000). "Signaling pathways engaged by NK cell receptors: double concerto for activating receptors, inhibitory receptors and NK cells." Semin Immunol **12**(2): 139-47.
- Tomasello, E., C. Cant, et al. (2000). "Association of signal-regulatory proteins beta with KARAP/DAP-12." Eur J Immunol **30**(8): 2147-56.
- Tomasello, E., P. O. Desmoulins, et al. (2000). "Combined natural killer cell and dendritic cell functional deficiency in KARAP/DAP12 loss-of-function mutant mice." Immunity **13**(3): 355-64.
- Tomasello, E., L. Olcese, et al. (1998). "Gene structure, expression pattern, and biological activity of mouse killer cell activating receptor-associated protein (KARAP)/DAP-12." J Biol Chem **273**(51): 34115-9.
- Torkar, M., Z. Norgate, et al. (1998). "Isotypic variation of novel immunoglobulin-like transcript/killer cell inhibitory receptor loci in the leukocyte receptor complex." Eur J Immunol **28**(12): 3959-67.
- Trowsdale, J. (2001). "Genetic and functional relationships between MHC and NK receptor genes." Immunity **15**(3): 363-74.
- Urzainqui, A., J. M. Serrador, et al. (2002). "ITAM-based interaction of ERM proteins with Syk mediates signaling by the leukocyte adhesion receptor PSGL-1." Immunity **17**(4): 401-12.
- Van Furth, R., M. C. Diesselhoff-den Dulk, et al. (1973). "Quantitative study on the production and kinetics of mononuclear phagocytes during an acute inflammatory reaction." J Exp Med **138**(6): 1314-30.
- van Oers, N. S. and A. Weiss (1995). "The Syk/ZAP-70 protein tyrosine kinase connection to antigen receptor signalling processes." Semin Immunol **7**(4): 227-36.
- Vance, R. E., A. M. Jamieson, et al. (1999). "Recognition of the class Ib molecule Qa-1(b) by putative activating receptors CD94/NKG2C and CD94/NKG2E on mouse natural killer cells." J Exp Med **190**(12): 1801-12.
- Veillette, A., E. Thibaudeau, et al. (1998). "High expression of inhibitory receptor SHPS-1 and its association with protein-tyrosine phosphatase SHP-1 in macrophages." J Biol Chem **273**(35): 22719-28.

- Vicente-Manzanares, M., M. Rey, et al. (1999). "Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in stromal cell-derived factor-1 alpha-induced lymphocyte polarization and chemotaxis." J Immunol **163**(7): 4001-12.
- Volkman, A. and J. L. Gowans (1965). "The Origin Of Macrophages From Bone Marrow In The Rat." Br J Exp Pathol **46**: 62-70.
- Wagtmann, N., S. Rojo, et al. (1997). "A new human gene complex encoding the killer cell inhibitory receptors and related monocyte/macrophage receptors." Curr Biol **7**(8): 615-8.
- Weber, C., K. U. Belge, et al. (2000). "Differential chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulations." J Leukoc Biol **67**(5): 699-704.
- Wende, H., M. Colonna, et al. (1999). "Organization of the leukocyte receptor cluster (LRC) on human chromosome 19q13.4." Mamm Genome **10**(2): 154-60.
- Wong, B. R., R. Josien, et al. (1999). "TRANCE is a TNF family member that regulates dendritic cell and osteoclast function." J Leukoc Biol **65**(6): 715-24.
- Wu, J., Y. Song, et al. (1999). "An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10." Science **285**(5428): 730-2.
- Yamao, T., T. Noguchi, et al. (2002). "Negative regulation of platelet clearance and of the macrophage phagocytic response by the transmembrane glycoprotein SHPS-1." J Biol Chem **277**(42): 39833-9.
- Yamashita, Y., M. Ono, et al. (1998). "Inhibitory and stimulatory functions of paired Ig-like receptor (PIR) family in RBL-2H3 cells." J Immunol **161**(8): 4042-7.
- Zhang, J. Q., B. Biedermann, et al. (2004). "The murine inhibitory receptor mSiglec-E is expressed broadly on cells of the innate immune system whereas mSiglec-F is restricted to eosinophils." Eur J Immunol **34**(4): 1175-84.