



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Implicacions funcionals i terapèutiques de les interaccions moleculars mitjançades per CD5 i CD6 en les respostes immunitàries

Marc Orta Mascaró

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

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

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



Implicacions funcionals i terapèutiques de les interaccions moleculars mitjançades per CD5 i CD6 en les respostes immunitàries

Tesi presentada per
Marc Orta Mascaró

Per a optar al títol de Doctor en Biomedicina per la Universitat de
Barcelona

Unitat d'Immunologia
Departament de Biologia cel·lular, Immunologia i Neurociències
Facultat de Medicina
Universitat de Barcelona

Direcció:

Francisco Lozano Soto, MD, PhD

Esther Carreras Margalef, PhD

Barcelona, 2016

*A la Laura,
a la meva filla en camí,
per totes les experiències que hem viscut i viurem junts*

Agraïments

Finalment arribo als agraïments, per mi la part més difícil de resumir de tota la tesis, ja que és difícil sintetitzar en unes poques línies la gran ajuda i suport que m'han donat totes les persones del meu voltant al llarg d'aquests quatre anys.

Començaré pels meus companys de laboratori, però per sobre de tot, amics.

Paco, tengo que empezar contigo ya que sin ti nada de esto habría sido posible. Te doy las gracias por elegirme a mí entre otros candidatos y darme la oportunidad de realizar mi tesis doctoral en tu laboratorio. Igualmente, también te agradezco la confianza que has depositado en mí en numerosas ocasiones durante estos cuatro años, el tener siempre la puerta abierta de tu despacho, y el esfuerzo de corregir esta tesis en un tiempo record. Gracias.

Esther, com no podia ser d'altre manera, ets la següent en aquesta llista i t'agraeixo tot el que m'has ensenyat durant aquests quatre anys, la paciència que vas tenir amb mi durant els primers mesos, el ser tan positiva i comprensiva quan alguna cosa no sortia bé, i la teva generositat al voler compartir les llargues estones al estabulari amb mi i el zymosan.

Inês, ¿cuál ha sido el día que te he pedido ayuda y no has estado allí, fuera cual fuera el numero de ratones, de ELISA o de órganos a procesar? Te doy las gracias por haberme ayudado siempre en todo, por nuestras largas charlas, por tus recetas y por darme a conocer los *pasteis de belem*.

Noe, bandida! Et trobaré a faltar. Trobaré a faltar reconèixer quan t'acostes pel passadís sense haver-te vist, les teves melodies de mòbil "patxangueres" que ressonaven per tota la planta, les teves bromes i comentaris que em feien riure sol davant l'ordinador, la teva predisposició sempre a ajudar a tothom en el que fos i, per sobre de tot, els productes del Perelló. Avisa'm quan iniciïs la distribució a gran escala.

Marta, gràcies per les teves crítiques constructives als Què fas i els teus consells sobre protocols i experiments en els nostres amics comuns, els CD6KO. Gràcies també per les teves recomanacions musicals, així com per discutir amb el mateix fervor si els ratolins WT han de ser germans o comprats o sobre els diferents finals possibles de Juego de Tronos.

¡Marius! Gracias por tus prácticos consejos en lo que a modelos animales se refiere, por siempre encontrar un momento para ayudarme en tu apretada agenda, por ilustrarme en el curioso mundo de las guitarras y ukuleles, y por la multitud de carcajadas que me has arrancado con tus siempre imprevisibles y únicos comentarios.

Fer, aunque hemos coincidido menos en tiempo y proyecto, ha sido tiempo suficiente para que pudieras enseñarme de tu experiencia tanto en el laboratorio como en publicaciones y

congresos. La lección más importante me la has enseñado tú: no bajar NUNCA la guardia cuando se llega al aeropuerto de Viena y llega el momento de coger el tren.

María, mi relevo en el proyecto de CD5. Gracias por cogerlo con esas ganas y motivación, estoy seguro que lo llevarás lejos porque en este poco tiempo que hemos coincidido ya me has dejado impresionado con tus grandes habilidades en el laboratorio. Sin embargo, si la batucada te tiene que servir para liberar las frustraciones de los experimentos, mejor compra los tambores al por mayor.

Adelaida, aunque te deje la última, no por ello la menos importante. Muchas gracias por tus sabios consejos y sugerencias en el proyecto del CD6KO, fruto de tu gran experiencia y que me han resultado siempre tan valiosos.

També m'agradaria agrair a aquells que ja no estan, però que també han aportat la seva part en aquest projecte. A la Cristina Escoda, no sé que hauria fet sense els teus consells i trucs en el GraphPad i l'Adobe Illustrator. Ester Carrasco, gràcies per animar-me i fer-me riure en els moments on els ànims anaven de baixada, i sobretot, per contagiar-me de la il·lusió de tenir fills (sí, al final ho has aconseguit). Rafa, aunque fue breve, fue intenso. Tú fuiste quién me adiestró en el arte de marcar y manipular ratones, y con quién me reí con ganas durante mis primeros meses en el CEK. Gracias por todo, espero que los yanquis te estén tratando bien. Vanesa... ¿qué decir? Te he echado de menos, y son tantas las cosas que me has enseñado y donde me has ayudado que te doy las gracias por ello. Sin ir más lejos, ese delicioso salmón con vinagreta de naranja que aun hago de vez en cuando.

A l'equip de citometria del servei d'immuno de l'hospital: Mireia, Maria, Montse i Juanjo, moltes gràcies per la vostra paciència cada cop que trucava i per la vostra comprensió. També a l'equip de l'estabulari: Pep, Iván, Ignacio, Robert i Gari, per sempre intentar posar facilitats a tot el que volia fer.

Vull agrair de manera especial a la gent de Marsella la seva càlida rebuda i tot el temps que em van dedicar durant la meva estada. Al Bernard per acceptar la meva proposta d'estança i fer possible l'experiència, i al Romain, Laura, Elise, Camille, Christian, Ana, Kristoff i Claude per estar sempre disponibles pel que necessités, i en especial a la Marie per, tot i ser una persona tremendament ocupada, dedicar-me tant de temps a ensenyar-me. A l'Antonio, pels nostres *citron time* i les discussions interminables sobre CD5, CD6 i Cbl. Per suposat, no m'oblido del que va començar sent el meu company de pis per convertir-se en un dels meus millors amics. *Luciano et Anca, merci beaucoup pour avoir fait de mon séjour à Marseille une expérience inoubliable.*

Als nostres col·laboradors, ja que sense la seva ajuda aquesta tesi no hauria estat tan completa. Al Dr. Rubén Vicente de la UPF, per posar a la nostra disposició el seu laboratori i realitzar les lectures de calci juntament amb l'Amado. Als Dr. Ramón i Jesús Merino, pel seu

sentit de l'humor i per mostrar-se sempre tan oberts a col·laborar. A les Dres. M^aLuisa Gaspar i Isabel Cortegano per la seva experiència i dedicació en l'anàlisi de progenitors hematopoètics.

Als Bioguapos, per fer-me sentir part d'aquesta gran família i pel vostre allau de consells sobre com muntar satisfactòriament una tesis doctoral amb el Word i no perdre la cordura en el procés: Moni, Laia, Txell, Pao, Heleia, Olalla i Ernest. Al Roma i l'Anneta pels cafès i japos que ens muntàvem els divendres davant del Clínic, els trobaré a faltar. I en especial al Jonys i l'Amado, per passar-nos-ho tant bé entre copes de vi barat del *badulaque* al que va ser el nostre cubil a Mordorland. Amado, a tu per doble perquè apart de ser un gran amic has resultat ser un col·laborador clau ja que junts vam obtenir uns grans resultats que van fer avançar de manera indiscutible el projecte del CD6KO.

A la meva família, als meus pares Vicenç i Anna per recolzar-me en tot el que he fet i per donar-m'ho sempre tot. Als meus germans Albert i Ignasi, perquè no sé que hauria fet si hagués estat fill únic sense tots els bons moments que hem tingut durant tots aquests anys. Als meus avis, tiets i cosins per aconseguir que mai em senti sol.

I aquí m'aturo un segons. Quan arribo a tu són tantes les coses que et vull agrair que no sé com fer-ho en només les línies que em queden. Laura, com ja t'he dit alguna vegada, gràcies per ensenyar-me a viure i fer-me millor persona.

I finalment a tu, a la personeta que esta a punt d'arribar, perquè mai havia tingut tantes ganes de conèixer algú per primera vegada. Gràcies per les alegries, il·lusions i bones estones que em donaràs. Gràcies per fer-me pare.

Índex

ABREVIATURES	15
1. INTRODUCCIÓ	17
El sistema immunitari	19
1.1 El sistema immunitari innat	20
1.1.1 Cèl·lules del sistema immunitari innat	20
1.1.2 Receptors de la immunitat innata	22
1.2 El sistema immunitari adaptatiu	27
1.2.1 Cèl·lules del sistema immunitari adaptatiu	28
1.2.1.1 Limfòcits B	28
I. El receptor de cèl·lules B (BCR)	28
II. Desenvolupament i maduració de limfòcits B al moll d'os	29
III. Activació de les cèl·lules B	30
1.2.1.2 Limfòcits T	31
I. El receptor de cèl·lules T (TCR)	32
II. Desenvolupament i maduració de limfòcits T al timus	32
Formació del TCR	32
Maduració dels timòcits: selecció positiva i negativa	33
Generació de cèl·lules T reguladores naturals (nTreg)	34
III. Homeòstasis limfocitària a la perifèria	35
Cèl·lules naïve	35
Cèl·lules efectores/memòria innata	36
IV. Activació d'una cèl·lula T	37
La sinapsis immunològica	37
Polarització de cèl·lules naïve	38
1.2.2 Receptors limfocitaris accessoris	41
1.2.2.1 El receptor limfocitari CD5	43
A. Estructura gènica	43
B. Expressió tissular	43
C. Lligands	44

D. Regió citoplasmàtica	45
E. Funcions.....	46
Modulació de l'activació de cèl·lules T i B	46
Maduració de cèl·lules T	47
Tolerància	47
Supervivència	48
F. Paper de CD5 en Autoimmunitat	49
G. Paper de CD5 en la resposta immunitària contra el càncer.....	49
H. Polimorfismes genètics	50
I. Paper de CD5 com receptor de patògens.....	50
1.2.2.2 El receptor limfocitari CD6.....	51
A. Estructura gènica	51
B. Expressió tissular	51
C. Lligands	52
D. Regió citoplasmàtica	52
E. Isoformes de CD6	54
F. Funcions.....	54
Modulació de l'activació de cèl·lules T	54
Maduració de cèl·lules T	56
Supervivència	56
G. Paper de CD6 en Autoimmunitat.....	56
H. Paper de CD6 en la resposta immunitària contra el càncer.....	58
I. Paper de CD6 com receptor de patògens.....	58
2. HIPÒTESI DE TREBALL I OBJECTIUS	59
3. MATERIALS I MÈTODES	63
3.1 Ratolins.....	65
3.1.1 Generació d'un animal deficient en CD6	65
3.1.2 Genotipat d'animals <i>knock-out</i> i disseny de creuaments.....	66
3.2 Citometria de flux.....	66
3.2.1 Anticossos	66
3.2.2 Estudi de poblacions limfocitàries en ratolins CD6 ^{-/-}	67

3.2.3 Estudi de poblacions limfocitàries en animals CD6 ^{-/-} i transgènics per diferents TCR	68
3.3 Estudis immunoquímics	69
3.3.1 Anàlisi de l'alliberació de calci intracel·lular.....	69
3.3.1.1 Estudi de calci per microscòpia	69
3.3.1.2 Estudi de calci per citometria	69
3.3.2 Anàlisi per Immunoblot de molècules senyalitzadores intracel·lulars	70
Estimulació cel·lular	70
Preparació de llisats totals.....	70
Preparació de gels SDS-PAGE	70
Càrrega del gel i migració proteica	71
Transferència	71
Western Blot	71
3.3.2 Anàlisi per citometria de molècules senyalitzadores intracel·lulars	72
3.4 Cultius cel·lulars	72
3.4.1 Estudi de la secreció de citocines d'esplenòcits.....	72
3.4.2 Estudi de la proliferació de cèl·lules T aïllades.....	72
Sensibilització de la placa amb anti-CD3.....	72
Separació de cèl·lules T perifèriques CD4 ⁺ i CD8 ⁺ per selecció negativa	73
Marcatge amb Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)	73
Inducció de proliferació cel·lular	73
Marcatge i lectura cel·lular	74
3.5 Estudis in vivo	74
3.5.1 Proliferació (BrdU)	74
Timus	74
Teixits limfoides secundaris.....	74
3.5.2 Apoptosi.....	74
3.5.3 Resposta a un antígen dependent de cèl·lules T.....	75
3.6 Quimeres competitives de moll d'os	75
3.7 Models animals de malaltia	76
3.7.1 Model de xoc sèptic induït per zymosan	76
3.7.2 Model d'artritis induïda per col·lagen (CIA)	77
3.7.3 Model de càncer heterotòpic (B16)	79
3.7.4 Model d'infecció mono/poli-bacteriana	79
3.8 Anàlisis estadístic	80
4. RESULTATS	81

4.1 Anàlisi de les implicacions fenotípiques i funcionals de les interaccions mitjançades per CD6: generació i estudi d'un model murí deficient (knockout) per a CD6	83
4.1.1 Generació d'una línia de ratolins deficients en CD6	83
4.1.1.1 <i>Estudi fenotípic de les principals poblacions limfocitàries en ratolins deficients en CD6</i>	84
4.1.1.1.1 Moll d'os.....	84
4.1.1.1.2 Timus.....	86
4.1.1.1.3 Teixits limfoides secundaris	88
4.1.1.2 <i>Estudi funcional de cèl·lules T deficients en CD6</i>	92
4.1.1.2.1 Mobilització de calci intracel·lular	92
4.1.1.2.2 Anàlisi de fosforilació de proteïnes senyalitzadores intracel·lulars ..	94
4.1.1.2.3 Estudi de proliferació <i>in vitro</i> de cèl·lules T madures perifèriques ..	96
4.1.1.2.4 Estudi de proliferació <i>in vivo</i> de timòcits.....	96
4.1.1.2.5 Resposta d'anticossos <i>in vivo</i> enfront a antígens T-dependents	97
4.1.1.2.6 Anàlisi de quimeres competitives de medul·la òssia.....	98
4.1.1.2.7 Estudi de l'apoptosi en timus de ratolins CD6 ^{-/-}	100
4.1.1.2.8 Estudi de la deficiència de CD6 en ratolins TCR transgènics	100
4.1.2 Implicacions funcionals de la deficiència de CD6 en models de malaltia	102
4.1.2.1 <i>Implicacions funcionals de la deficiència de CD6 en autoimmunitat</i> ...	102
4.1.2.2 <i>Implicacions funcionals de la deficiència de CD6 en càncer</i>	103
4.1.2.3 <i>Implicacions funcionals de la deficiència de CD6 en infecció</i>	103
4.2. Rellevància de l'expressió de CD5 en la resposta inflamatòria in vivo induïda per β-glucans	105
4.2.1 <i>Estudi comparatiu de la resposta inflamatòria in vivo i in vitro induïda per zymosan en ratolins C57BL/6 i CD1</i>	105
4.2.2 <i>Eficàcia de l'administració de rshCD5 enfront ZIGI en animals C57BL/6 i CD1</i>	109
4.2.3 <i>Paper del CD5 de membrana en el model de ZIGI</i>	110
5. DISCUSSIÓ	113
5.1 CD6	116
5.1.1 CD6 com a regulador negatiu del senyal del TCR al timus	116
5.1.2 Paper de CD6 en la supervivència de timòcits	118
5.1.3 CD6 com a regulador negatiu en perifèria.....	118

5.1.4 Paper de la interacció de CD6 amb CD166/ALCAM	120
5.1.5 Regulació creuada entre CD5 i CD6	122
5.1.6 CD6 en models de malaltia	123
5.2 CD5	128
5.2.1 Implicacions terapèutiques de la unió de CD5 a β -glucans	128
5.2.2 Implicacions funcionals de la unió de PAMPS a CD5 i CD6.....	131
6. CONCLUSIONS	135
7. REFERÈNCIES	139
ANNEX	153
Solucions	155
Publicacions	156

Abreviatures

AcMo: anticòs monoclonal	LIMP2: proteïna de membrana lisosomal 2
ACR: American Collegue of Rheumathology	LN: nòduls limfàtics
AICD: Mort per activació cel·lular	LOX1: receptor 1 de LDL oxidada tipus lectina
ALCAM/CD166: Molècula d'adhesió i activació cel·lular	LPS: Lipopolisacàrid
BCR: Receptor de cèl·lules B	LTA: Àcid lipoteicoic
CD4⁺SP: timòcit CD4 ⁺	MAPK: proteïna cinasa activada per mitògens
CD4⁺T_{EM}: Cèl·lula T CD4 ⁺ efectora memòria	MARCO: receptor de macròfags amb estructura de col·lagen
CD8⁺SP: timòcit CD8 ⁺	MFI: mitjana de la intensitat de fluorescència
CD8⁺T_{CM}: Cèl·lula T CD8 ⁺ de memòria central	MOG: glicoproteïna mielina oligodendròcit
CK2: Casein quinasa 2	MTOC: centre principal d'organització de microtúbuls
CLEC: domini tipus lectina c	MZ: zona marginal
CLP: model de lligació i punció cecal	NK: cèl·lula asesina natural
CLR: receptor tipus lectina c	NKT: cèl·lula T asesina natural
CSR1: proteïna de resposta a estrès cel·lular	NLR: receptor tipus NOD
DAMP: patró molecular associat a dany	O/N: tota la nit
DC: cèl·lula dendrítica	oxLDL: lipoproteïna de baixa densitat oxidada
DN: timòcit doble negatiu	PAMP: patró molecular associat a patògens
DP: timòcit doble positiu	PKC: proteïna quinasa C
EAE: encefalomièlitis al·lèrgica experimental	PRR: receptor de patrons
EGF: factor de creixement epidermal	RLR: RIG like receptor
EM: escleròsi múltiple	rshCD5: CD5 soluble recombinant humà
ES: cèl·lula mare embrionària	rshCD6: CD6 soluble recombinant humà
FAS1: fasciclin 1	SEB: Enterotoxina B de <i>Staphylococcus aureus</i>
FC: cèl·lules fol·liculars	SI: sinapsi immunològica
IEL: limfòcit intraepitelial	SMAC: complex d'activació supramolecular
ITAM: immunoreceptor activador a través de tirosines	SR: receptor scavenger
ITIM: immunoreceptor inhibidor a través de tirosines	SRCL: receptor scavenger amb domini tipus lectina
KOMP: Knock-out Mice Project Repository	SRCR-SF: família de receptors scavenger rics en cisteïnes
LAMP: glicoproteïna de membrana associada a lisosoma	SREC1 i SREC2: receptors scavenger expressats per cèl·lules endotelials
LAT: nexa d'activació de les cèl·lules T	

SR-PSOX: receptors scavenger per fosfatidilserina i lipoproteïnes de baixa densitat oxidades

TA: temperatura ambient

TCR: receptor de cèl·lules T

TEC: cèl·lula tímica epitelial

TLR: receptor tipus Toll

ZIGI: inflamació generalitzada induïda pe zymosan

1. Introducció

El sistema immunitari

El sistema immunitari és el conjunt d'estructures cel·lulars i moleculars que protegeixen i mantenen la integritat de l'individu enfront d'agressions externes (ex. bacteries) o internes (ex. càncer). Per aquesta funció defensiva, el sistema immunitari disposa de mecanismes de resposta immediata i innats (resposta innata o inespecífica), així com de mecanismes de resposta més tardana i no innats (resposta adquirida, adaptativa o específica).

El sistema innat, encarregat de les respostes innates, està integrat principalment per les barreres epitelials i mucoses i per cèl·lules hematopoètiques amb (ex. neutròfils, macròfags i cèl·lules dendrítiques) o sense (limfòcits innats) capacitat fagocítica. Aquests tipus cel·lulars presenten receptors molt poc polimòrfics, codificats per gens presents a la línia germinal i que reconeixen estructures molt conservades i compartides per diferents tipus de patògens. Per altra banda, el sistema adaptatiu, responsable de les respostes adquirides, està format principalment per cèl·lules d'origen hematopoètic però de llinatge limfoide (limfòcits T i B), amb uns receptors altament polimòrfics codificats per gens no expressats a la línia germinal que requereixen fenòmens de recombinació gènica per a la seva expressió, i que reconeixen detalls altament específics o exclusius de un tipus concret de patògen (**Fig 1.1**).

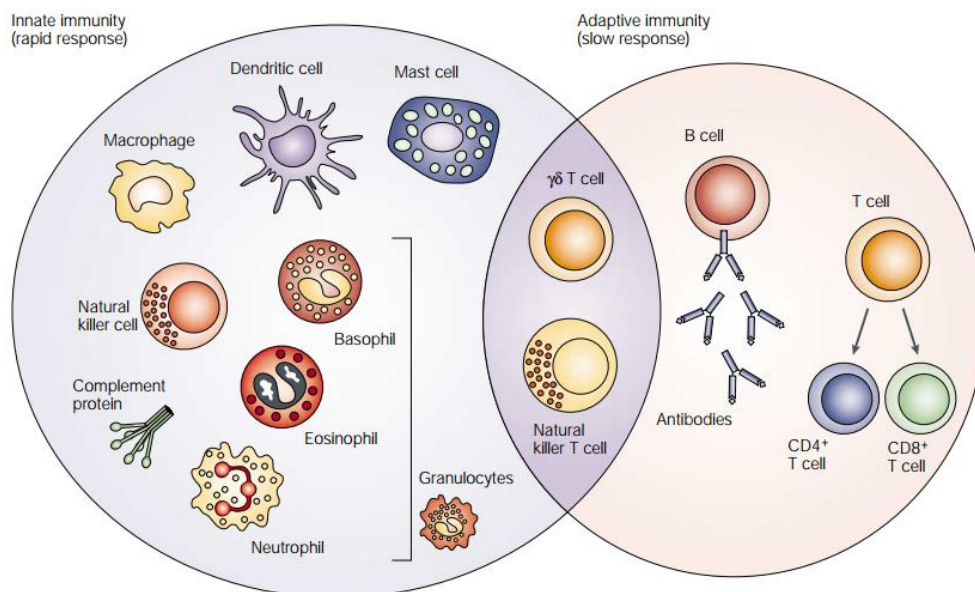


Figura 1.1. Cèl·lules de la immunitat innata i adaptativa. Dranoff G, 2004.

Tot i les evidents diferències, ambdós sistemes es necessiten l'un a l'altre per a una bona i eficient resposta immunitària. Així, macròfags i cèl·lules dendrítiques del sistema innat no només s'encarreguen de detectar i eliminar patògens, sinó que també actuen com a cèl·lules presentadores d'antigen (*Antigen Presenting Cell*; APC) per a cèl·lules del sistema adaptatiu (limfòcits T) mitjançant les seves molècules del complex principal d'histocompatibilitat (*major histocompatibility complex*; MHC). Per altra banda, l'activació dels limfòcits com a conseqüència

del reconeixement d'antígens promou la secreció de missatgers solubles (citocines) i d'interaccions intercel·lulars que reforcen les capacitats fagocítiques i destructores de patògens de les cèl·lules del sistema innat. Així doncs, al nostre organisme els dos sistemes són interdependents i es troben en constant comunicació, establint ponts i interaccions entre ambdós per optimitzar les respostes immunitàries.

1.1 El sistema immunitari innat

El sistema innat representa la primera línia de defensa (actua en qüestió de pocs minuts o màxim hores) davant una invasió per microorganismes externs, així com d'eliminació de molècules endògenes no desitjades o nocives. És doncs un sistema d'homeòstasis general que manté la integritat de l'individu davant agressions externes i internes. Aquest sistema innat esta format per un component cel·lular i un altre humoral. El cel·lular està constituït tal com s'ha mencionat abans per les barreres cutani-mucoses i endotelials i per cèl·lules fagocítiques i no fagocítiques d'origen hematopoètic (leucòcits polimorfonuclears, sistema mononuclear fagocític, limfòcits innats, etc). El component humoral el constitueixen principalment proteïnes solubles presents als líquids (humors) corporals, entre les quals destaquen les proteïnes del sistema complement i del sistema de la coagulació (Ricklin et al., 2010). Donat que una descripció detallada de tots i cadascun dels components cel·lulars i humorals del sistema innat estaria fora del context de la present memòria de Tesi ens limitarem a descriure algunes de les característiques de certs tipus cel·lulars i receptors.

1.1.1 Cèl·lules del sistema immunitari innat

Les cèl·lules d'origen hematopoètic dels sistema innat poden provenir de progenitors mieloides com és el cas de neutròfils, monòcits, macròfags i cèl·lules dendrítiques (excepte les plasmacitoides) però també limfoides, com seria el cas de cèl·lules NK, NKT i T $\gamma\delta$.

Neutròfils: Són les cèl·lules fagocítiques per excel·lència i actors principals en la inducció i resolució dels processos inflamatoris. A partir de la seva generació a la medul·la òssia, els neutròfils circularan per la sang durant les poques hores de que consta el seu curt temps de vida. Durant un procés inflamatori, els leucòcits residents al teixit infectat alliberen mediadors de la inflamació (incloent histamina, citocines i quimiocines) que provoquen l'activació dels endotelis i l'expressió subseqüent a la seva superfície de molècules específiques per a l'atracció i transvasament dels neutròfils circulants. Els típics passos per al reclutament de neutròfils circulants comprenen una primera adhesió làbil amb rodament sobre la superfície endotelial (*rolling*), l'adhesió ferma a l'endoteli (*spreading*), el transvasament, i la migració al teixit inflamat on alliberaran més mediadors de la inflamació (p.ex., TNF α i IL-1 β) contribuint a 1) eliminar el patogen invasor i 2) reclutar més cèl·lules amb capacitat fagocítica (Kolaczowska and Kubes, 2013) .

Monòcits: Els monòcits són cèl·lules mononucleades que es generen al moll de l'ós i representen a la sang el 4 o 10% de cèl·lules sanguínies circulants en humans i ratolins,

respectivament. Dins dels diferents subtipus, hi ha els monòcits “clàssics” caracteritzats en humans com a CD14⁺ i en ratolins com Ly6C^{hi}, els quals són reclutats als focus d’inflamació i que actuaran com a precursors de les cèl·lules fagocítiques perifèriques mononuclears: els macròfags i les cèl·lules dendrítiques (Ginhoux and Jung, 2014).

Macròfags: Els macròfags són cèl·lules que s’han diferenciat als teixits inflamats a partir de monòcits procedents de la sang, o bé a partir de progenitors embrionaris que s’han establert als teixits durant el desenvolupament, i són cèl·lules fagocítiques amb un paper molt rellevant (Ginhoux and Jung, 2014). Als òrgans limfoides com la melsa i els nòduls limfàtics (LN) es troben macròfags específics, amb una funció comú a tots ells: fagocitar partícules foranies i reclutar altres macròfags al lloc d’inflamació. A nivell general, segons les senyals que rebin de l’entorn, els macròfags s’activaran cap a un tipus M1, els quals fagociten i promouen una resposta proinflamatòria, o cap a tipus M2, que pel contrari secretaran IL-10 per generar una resposta antiinflamatòria (Murray and Wynn, 2011).

Cèl·lules dendrítiques (DC): Representen el cas més il·lustratiu de pont entre la immunitat innata i adaptativa. Les DCs immadures (iDCs) residents als teixits perifèrics s’encarreguen de fagocitar antígens i migrar als òrgans limfoides en forma madura (mDC) per a presentar als limfòcits T els antígens de naturalesa peptídica resultants a través de les seves molècules MHC. Si els limfòcits T reconeixen l’antigen com a exogen (no propi), s’activaran i alliberaran mediadors que permeten optimitzar encara més la presentació del antigen a altres limfòcits, augmentant el nombre de molècules MHC i de co-receptors. Les DC es poden classificar en diferents subtipus, però que en aquest treball no s’entrarà més en detall (Reis e Sousa, 2006).

Limfòcits innats:

1) Cèl·lules NK o assassines naturals: Aquestes cèl·lules, de l’anglès *Natural Killer* cells (NK), són una de les excepcions de la immunitat innata d’origen limfoide, i es caracteritzen per la seva ràpida resposta citolítica, la qual és especialment efectiva contra cèl·lules infectades per virus o en cèl·lules tumorals. Presenten a la seva superfície un conjunt de receptors activadors (ex. NKG2D) i inhibidors (ex. KIRs, CD94-NKG2A) que s’encarregaran de regular la seva resposta per a fer-la efectiva però no perjudicial per l’hoste. Els receptors activadors, per exemple, són capaços de detectar tant l’expressió de determinades molècules presents a la superfície de cèl·lules infectades per virus o bacteris, així com també l’absència de complexos MHC, situació freqüent en cèl·lules tumorals (Vivier et al., 2008). Apart de la seva acció citolítica *per se*, les NK respondran a la secreció de IL-12 per part de les DC i macròfags secretant elles mateixes IFN γ , d’aquesta manera activant tant cèl·lules de la immunitat innata (macròfags) com adaptativa (limfòcits T citotòxics), i potenciant la resposta inflamatòria per a l’eliminació del patogen invasor.

2) Cèl·lules assassines naturals T (NKT): Les cèl·lules NKT, al igual que les NK, tenen un origen limfoide i tenen la particularitat de presentar el receptor típic de cèl·lules T convencionals (TCR $\alpha\beta$), però amb un repertori molt restringit (utilitzen un set molt limitat de regions variables α

i β), que adquireixen durant els processos de selecció positiva dels timòcits doble positius al timus. D'aquesta manera disposen d'un TCR específic molt menys divers que el dels limfòcits T que reconeixerà glicolípid presentats per molècules tipus MHC com CD1d, induint respostes citotòxiques i producció de citocines de manera molt ràpida. Són doncs una mescla entre els dos tipus cel·lulars limfocitaris (NK i T), que estan restringides per CD1d (*CD1d-restricted T cells*) (Godfrey et al., 2010).

3) Limfòcits $T\gamma\delta$: Al igual que els limfòcits $T\alpha\beta$ convencionals, s'originen al timus però a l'estadi de doble negatiu on s'armen amb TCRs constituïts per cadenes γ i δ amb un repertori molt restringit (les regions variables de les cadenes γ i δ son molt poc polimòrfiques) i reconeixen antígens de naturalesa no peptídica, com les cèl·lules NKT. Tenen per tant molta menys variabilitat clonal que les cèl·lules $T\alpha\beta$ (veure apartat 1.2.1.2; II), i a diferència d'aquestes la seva resposta és molt més ràpida, amb menys expansió clonal, i no es troben preferentment als òrgans limfoides, sinó a les mucoses o la pell (Vantourout and Hayday, 2013).

1.1.2 Receptors de la immunitat innata

Els receptors del sistema innat que trobem en forma soluble als fluids corporals o a la superfície dels diferents tipus cel·lulars innats s'anomenen PRRs (*pattern recognition receptors*) i estan especialitzats en el reconeixement d'estructures o patrons moleculars altament conservats i compartits per un ampli espectre de microorganismes patogènics: els anomenats PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) o MAMPs (*microbe-associated molecular patterns*), com ara el lipopolisacàrid (LPS) o els β -glucans presents a les parets de bacteries i fongs (respectivament), o les cadenes de RNA característiques de determinats virus. Més recentment s'ha comprovat que els PRRs també estan capacitats per al reconeixement dels anomenats DAMPs (*danger-associated molecular patterns*) o estructures del propi individu (alterades o no) que s'alliberen durant els processos de dany tissular, com per exemple la proteïna HMGB1, les proteïnes de xoc tèrmic (hsp), l'àcid hialurònic, els cristalls d'urat, etc (Tang et al., 2012). D'aquesta manera els PRRs son components essencials per al manteniment de la prèviament esmentada homeòstasi general de l'individu enfront agressions no només exògenes sinó també endògenes. Els PRRs s'agrupen en diferents famílies estructurals de les quals només parlarem d'algunes de les més importants com son: receptors tipus Toll, receptors tipus RIG, receptors tipus NOD, receptors tipus lectina i receptors tipus *scavenger*.

1. Receptors tipus Toll

Els receptors tipus Toll (*Toll-like receptors*; TLRs) van ser descoberts inicialment en *Drosophila melanogaster* (Lemaitre et al., 1996), i més tard a mamífers (ratolins) i van ser motiu de la concessió del Premi Nobel l'any 2011 als seus descobridors Jules A. Hoffman i Bruce Breutler. Han estat els PRR més estudiats i es consideren els principals receptors de patògens. A dia d'avui, s'han reconegut fins a 10 membres en humans i 12 en ratolí (Kumar et al., 2011). Els

TLR1, 2, 4, 5 i 6 estan expressats principalment a la membrana citoplasmàtica i reconeixen PAMPs derivats de bacteries, virus, fongs i protozous (**Taula I**). Com a membres destacats hi ha el TLR2, el qual desenvolupa un rol important en la defensa davant fongs pel seu reconeixement de β -glucans, el principal component present a les parets fúngiques, i el TLR4 que pel contrari és fonamental en la detecció del LPS, present en altes concentracions a les parets de bacteries gram-negatives i principal causant del xoc sèptic per bacteries (Van Amersfoort et al., 2003). Per altra banda, els TLR3, 7, 8 i 9 es troben exclusivament expressats a membranes de vesícules endocítiques i reconeixen àcids nucleics derivats de virus i bacteries (**Taula I**) (Kumar et al., 2011).

A nivell estructural, els TLR són glicoproteïnes tipus I de membrana i estan formats per una part extracel·lular amb dominis rics en repeticions de leucines (*leucine rich repeats*, LRRs) necessaris per al reconeixement dels PAMPs, i una part citoplasmàtica amb domini Toll/receptor interleucina-1 (TIR) indispensable per la senyalització

TLR and (co-receptors)	Cellular localization	TLR ligands
TLR1/2	Cell surface	Triacyl lipopeptides
TLR2 (Dectin-1, C-type lectin)	Cell surface	Peptidoglycan, lipoarabinomannan, hemagglutinin, phospholipomannan, glycosylphosphatidyl inositol mucin, zymosan
TLR3	Endosome	ssRNA virus, dsRNA virus, respiratory syncytial virus, murine cytomegalovirus
TLR4 (MD2, CD14, LBP)	Cell surface	Lipopolysaccharide, mannan, glycoinositolphospholipids, envelope and fusion proteins from mammary tumor virus and respiratory syncytial virus, respectively, endogenous oxidized phospholipids produced after H5N1 avian influenza virus infection, pneumolysin from <i>streptococcus pneumoniae</i> , paclitaxel.
TLR5	Cell surface	Flagellin from flagellated bacteria
TLR6/2 (CD36)	Cell surface	Diacyl lipopeptides from mycoplasma, lipoteichoic acid
TLR7	Endolysosome	ssRNA viruses, purine analog compounds (imidazoquinolines). RNA from bacteria from group B streptococcus
TLR8 (only in human)	Endolysosome	ssRNA from RNA virus, purine analog compounds (imidazoquinolines).
TLR9	Endolysosome	dsDNA viruses herpes simplex virus and murine cytomegalovirus, CpG motifs from bacteria and viruses, hemozoin malaria parasite
TLR11 (only in mouse)	Cell surface	Uropathogenic bacteria, profilin-like molecule from <i>Toxoplasma gondii</i>

Taula I. Receptors TLR i els seus lligands. Kumar H et al, 2011.

intracel·lular, i a la qual se li acoblen molècules transductores de senyals com MyD88, TRIF (TICAM-1) i TRAM (Kumar et al., 2011). El reclutament d'aquestes proteïnes per part del domini TIR activarà la cascada de senyalització de proteïnes cinases (*mitogen associated protein kinase*; MAPK) i factors de transcripció com NF- κ B i IRF3/7, que entre d'altres efectes generarà la producció de citocines proinflamatòries, la secreció d'interferó tipus I i l'increment d'expressió de molècules MHC, d'adhesió i co-estimuladores.

2. Receptors tipus RIG

La família de receptors citoplasmàtics tipus RIG (*RIG-I-like receptors*; RLRs) està formada per tres membres: RIG-I, MDA5 i LGP2. Els tres membres contenen dominis DExD/H-box helicasa a la seva part extracel·lular que els permeten reconèixer el RNA viral al citoplasma de cèl·lules infectades per virus RNA. RIG-I i MDA5 presenten dominis intracel·lulars de reclutament de caspases (CARDs) essencials per la senyalització cel·lular posterior al reconeixement; per altra banda LGP2 no presenta aquest domini, però s'ha demostrat que actua com a modulador positiu de RIG-I i MDA5 (Satoh et al., 2010). La cascada de senyalització iniciada pels RLRs

provocarà 1) la secreció de citocines inflamatòries per al reclutament de DC i macròfags, i 2) la secreció d'interferó a nivell autocrí i paracrí amb la posterior activació de gens específics sensibles a interferó. Es donarà llavors un estat cel·lular antiviral caracteritzat per la inhibició de la replicació viral, la inducció d'apoptosi en cèl·lules infectades, l'increment de la capacitat lítica de les NK, la sobre-expressió de molècules MHC de classe I i l'activació de diversos components de la resposta adaptativa (Kumar et al., 2011).

3. Receptors tipus NOD

Els receptors tipus NOD (*NOD-like receptors*; NLRs) també es troben localitzats al citoplasma i són considerats clau en el reconeixement de productes bacterians intracel·lulars (ex. peptidglicà) i senyals de perill (ex. ATP o glucosa extracel·lulars, cristalls d'urat monosòdic, pirofosfat càlcic, alumina o colesterol; irritants ambientals com silica, asbest o irradiació UV) (Mogensen, 2009). Aquesta família consta de 23 membres en humans i 34 en ratolí, i estan formats per dos dominis: el domini carboxi-terminal NOD consisteix en diverses regions LRRs i és el responsable de reconèixer PAMPs o DAMPs; per altra banda el domini NH₂-terminal CARD és el responsable de la senyalització.

En el moment del reconeixement dels PAMPs, s'indueix la producció de citocines inflamatòries o l'activació de l'inflamasoma a través de NF- κ B o MAPK (Kumar et al., 2011). Els membres més estudiats són NOD-1 i NOD-2, els quals reconeixen molècules derivades de la síntesis i degradació del peptidglicà de les bactèries Gram positives (Kumar et al., 2011).

4. Receptors tipus lectina C

Els receptors tipus lectina C (*C-type lectin receptors*; CLR) formen una família de receptors transmembrana caracteritzats per la capacitat de reconèixer carbohidrats presents en virus, bactèries i fongs. Els CLR poden estimular la producció de citocines inflamatòries o inhibir els complexos formats per TLRs (Takeuchi and Akira, 2010). Exemples representatius d'aquest grup serien els receptors dectin-1 i dectin-2 presents a la superfície de DCs i macròfags. Aquests s'activen en resposta al reconeixement de β -glucans, i en sinèrgia amb TLR2 i TLR4 (Gantner et al., 2003; Ferwerda et al., 2008), secreten IL-12 i IL-23 modulant la resposta de les cèl·lules T i conferint protecció enfront la infecció per *Candida Albicans* (Robinson et al., 2009). Conseqüentment la deficiència de dectin-1 en macròfags es correlaciona amb una major susceptibilitat a la infecció per aquest fong patogènic (Taylor et al., 2007).

Altres exemples de CLR serien MINCLE (*macrophage C-type lectin*) el qual reconeix fongs com *Malassezia* i *Candida* així com cèl·lules necròtiques, i CLEC9A que s'expressa a DCs CD8⁺ de la melsa i també reconeix cèl·lules necròtiques. Com a resultat, es secretaran citocines inflamatòries per combatre la infecció o l'eliminació de cossos apoptòtics (Geijtenbeek and Gringhuis, 2009).

5. Receptors tipus Scavenger

Els receptors *scavenger* (*scavenger receptor*; SR) van ser caracteritzats per primer cop per Goldstein i Brown l'any 1979 (Brown et al., 1979; Brown and Goldstein, 1979). Inicialment es van descriure com a receptors de membrana dels macròfags capaços d'unir i internalitzar lipoproteïnes oxidades de baixa densitat (oxLDL), i per tant estretament relacionades amb l'arteriosclerosi. Més tard, es va veure que eren receptors altament promiscus amb la capacitat de reconèixer una gran varietat de molècules pròpies modificades (*altered self*) englobades dins del concepte de DAMPs. Per altra banda, també poden unir-se a un gran nombre de PAMPs com el LPS, el LTA, o als β -glucans (Vera et al., 2009; Sarrias et al., 2007; Canton et al., 2013). Per tant, son en gran part responsables de l'homeòstasi general de l'individu facilitant el reconeixement i l'eliminació de molècules no desitjades, tant endògenes com exògenes

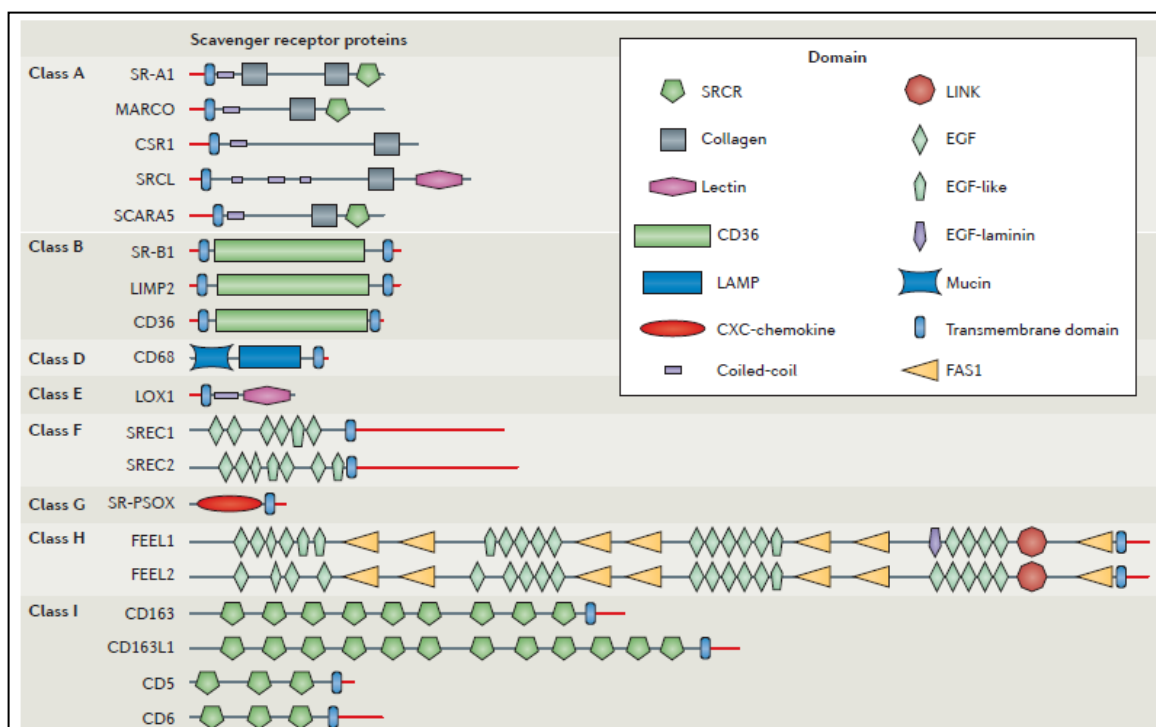


Figura 1.2. Nova classificació dels receptors tipus scavenger. Canton J et al, 2013.

No obstant això, aquest no és l'únic rol que compleixen, ja que estan implicats en d'altres funcions com el transport de lípids, com a txaperones en el transport d'altres proteïnes, en la modulació de senyals limfocitàries o reforçant els contactes adhesius entre cèl·lules de la immunitat innata i adaptativa (Canton et al., 2013). Es troben expressats principalment en cèl·lules mieloides, però també en limfòcits T o epitelis tubulars, com és el cas de CD5 i CD6, i HAVCR1/TIM-1, respectivament. A nivell estructural, hi ha una gran diversitat entre els seus membres, el que ha fet classificar-los recentment per un comitè internacional d'experts en 9 grups diferents d'acord amb l'estructura dels seus dominis extracel·lulars (Canton et al., 2013) (Fig. 1.2):

Classe A: Contenen dominis de tipus col·lagen amb triple hèlix, i a més poden contenir un domini scavenger ric en cisteïnes (*scavenger cysteine-rich domain*; SRCR) o un domini lectina tipus C (CLEC). Com a membres destacats d'aquest grup hi trobem SR-A1, MARCO (*macrophage receptor with collagenous structure*), CSR1 (*cellular stress response protein* o SCARA3), SRCL (*scavenger receptor with C-type lectin*) i SCARA5.

Classe B: SR-B1, LIMP2 i CD36 són els tres membres que formen aquest grup i es caracteritzen per la presència d'un únic i voluptuós domini CD36.

Classe C: Es troben exclusivament a *Drosophila melanogaster* (Lazzaro, 2005).

Classe D: L'únic membre d'aquest grup és CD68, i conté un domini tipus mucina i un domini LAMP (*lysosome-associated membrane glycoprotein*).

Classe E: LOX1 (*lectin-like oxidized LDL receptor 1*) presenta un únic domini CLEC que li permet unir oxLDL, acLDL i cèl·lules apoptòtiques, i degut a la seva expressió en plaquetes, s'ha vist que la deficiència d'aquest receptor comporta una reducció de l'activació i agregació plaquetària (Marwali et al., 2007).

Classe F: Els dos membres d'aquest grup SREC1 i SREC2 (*scavenger receptor expressed by endothelial cells*) presenten dominis EGF i EGF-like (*epidermal growth factor*), i tenen la particularitat d'estar expressats en cèl·lules epitelials i no en cèl·lules mieloides.

Classe G: El membre representatiu d'aquest grup és SR-PSOX (*scavenger receptor for phosphatidylserine and oxidized low-density lipoprotein* o CXCL16) i presenta un gran domini CXC de quimiocines.

Classe H: Un sorprenentment llarg domini extracel·lular format per dominis EGF, EGF-like, LINK (*hyaluronan-binding*) i FAS1 (*fasciclin 1*) es el que caracteritza FEEL1 i FEEL2 (*fasciclin EGF-like laminin-type EGF-like and link domain-containing scavenger receptor 1 o 2*), els dos membres de classe H.

Classe I: El tret distintiu i comú dels quatre membres d'aquest grup és la presència de múltiples dominis SRCR en tàndem. CD163 ha estat estudiat més extensament, i s'ha vist que la seva expressió està especialment incrementada en macròfags polaritzats a M2, convertint-se en un marcador d'aquest tipus cel·lular. CD5 i CD6, per la seva banda, s'expressen principalment en cèl·lules de llinatge limfoide. Fins fa poc no estaven considerats com a SR tot i la presència de dominis SRCR, però va ser la descoberta que ambdós podien unir PAMPs presents en les parets fúngiques o bacterianes, respectivament, el que els va fer incloure en la classificació (Sarrias et al.,

2007; Vera et al., 2009). Aquests dos receptors es tractaran més extensament a l'apartat 1.2.2 Receptors de la immunitat adaptativa.

Recentment s'ha proposat una nova nomenclatura per als receptors SR (**Fig. 1.3**) (Prabhudas et al., 2014). En aquesta, es mostren primer les sigles SR corresponents a scavenger receptor, seguides per un guió i una lletra, la qual indicarà la classe de SR (A-I). A continuació un primer número representarà el tipus de molècula dins la classe (el número està basat en l'ordre en què les molècules van ser identificades), i un segon número precedit d'un punt indicarà les diferents variants generades per *splicing* alternatiu (ex. 1.1, 1.2). En aquest darrer cas, les variants amb més longitud aminoacídica rebrien els primers números de la llista.

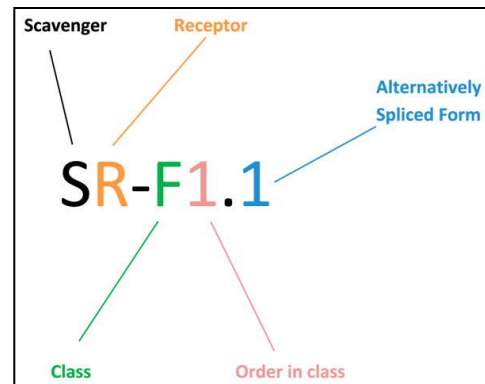


Figura 1.3. Nova nomenclatura dels receptors tipus *scavenger*. PrabhuDas M et al, 2014.

1.2 El sistema immunitari adaptatiu

El sistema adaptatiu és el més recent evolutivament ja que només es troba als vertebrats, i està especialment desenvolupat en mamífers. Es tracta d'un sistema de resposta més lent (necessita dies per estar plenament actiu) però més específic que el sistema innat ja que s'adapta contra components característics i específics d'un tipus concret de patògen. Es tracta d'una resposta molt específica que no protegeix enfront d'altres patògens similars als que hagin activat la resposta inflamatòria. Encara que de resposta lenta, el sistema adaptatiu guarda memòria del primer contacte amb l'agent patogènic, i per tant és més ràpid i eficient en contactes posteriors. Les cèl·lules responsables d'aquestes respostes són els limfòcits T i B (**Fig. 1.1**), cèl·lules derivades de progenitors hematopoètics comuns a les cèl·lules mieloides que acaben el seu procés maduratiu al timus i al moll de l'os, respectivament. Ambdós tipus de limfòcits es caracteritzen per presentar receptors que a diferència dels PRRs de la immunitat innata, tenen una distribució clonotípica (són característics d'una cèl·lula i de la seva clona descendent) i reconeixen amb alta especificitat antígens concrets i no compartits entre diferents patògens. Tant els receptors de les cèl·lules T (*T cell receptor*, TCR) com els de les cèl·lules B (*B cell receptor*, BCR) es troben expressats només en aquests tipus cel·lulars i només després de ser sotmesos a processos de reordenament i recombinació gènica, ja que no s'expressen tal i com estan disposats a la línia germinal. És el reconeixement d'antígens per aquests receptors el que posa en marxa la resposta dels limfòcits, que es manifesta a través de la producció d'anticossos per part de les cèl·lules B i la secreció de citocines o la inducció de citotoxicitat per part de les cèl·lules T.

1.2.1 Cèl·lules del sistema immunitari adaptatiu

1.2.1.1 Limfòcits B

La principal característica dels limfòcits B és la seva capacitat d'expressar molècules d'anticossos o immunoglobulines (Ig) primer a la seva membrana (formant el receptor de reconeixement d'antígens de les cèl·lules B o BCR), i després produir-los/secretar-los en forma soluble com a conseqüència del reconeixement i activació per antígens específics d'un determinat patogen.

I. El receptor de cèl·lules B (BCR)

Les cèl·lules B madures expressen a la seva membrana diferents isotips d'immunoglobulines o BCR segons el seu estadi maduratiu i funcional, IgM i/o IgD. Aquest BCR o immunoglobulina de membrana (mIg) està constituït per dues cadenes pesants (H, *heavy*) iguals entre sí i dues cadenes lleugeres (L, *light*) també idèntiques entre sí. Les cadenes H i L consten de repeticions de dominis immunoglobulínics (4 o 5 en el cas de les H i 3 en el de les L) i estan unides entre sí per ponts disulfur. Els dominis més aminoterminals tant de les cadenes H com L son de tipus variable (V_H i V_L) i son responsables del reconeixement específic d'antígens, mentre que la resta de dominis son de tipus constant (CH i CL) i tenen d'altres funcions estructurals o efectores. El BCR té una curta cua citoplasmàtica sense activitat enzimàtica, però per a la seva funció transductora de senyals s'associa a un heterodimer de molècules transmembrana invariants de tipus immunoglobulínic com son les cadenes $Ig\alpha/CD79a$ i $Ig\beta/CD79b$ que presenten motius d'activació tipus ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activatory motif*) a la seva porció intracitoplasmàtica (Treanor, 2012).

L'activació dels limfòcits B madurs s'inicia quan la mIg o BCR reconeix i uneix l'antigen de forma altament específica i amb alta afinitat, provocant l'agregació del receptor mentre les subunitats $Ig\alpha/Ig\beta$ transmeten les senyals a l'interior cel·lular, fruit de la ràpida fosforilació en qüestió de segons dels seus motius ITAM per tirosina cinases de la família Src (Lyn, Blk i Fyn), però també Syk i Btk. Això iniciarà la formació del signalosoma, compost pel BCR, les cinases mencionades, l'acoblament de molècules accessòries com CD19, proteïnes adaptadores com BLNK, així com proteïnes de senyalització amb o sense activitat enzimàtica com PLC γ 2, PI3K i Vav. Els resultats d'aquesta activació es traduiran en canvis en el metabolisme cel·lular, l'expressió gènica i la reorganització del citoesquelet que tindran efectes en la supervivència, la tolerància (anergia), l'apoptosi, la proliferació i la diferenciació en cèl·lules B productores d'anticossos o de memòria (Harwood and Batista, 2010).

Un cop passat el procés de selecció, les cèl·lules B immadures migraran a la perifèria en direcció a la melsa, en un estadi conegut com a cèl·lula B transicional, el qual està caracteritzat per una alta expressió de IgM i de IgD (**Fig 1.4**). A la melsa, ocuparan dos nínxols diferents que les portarà a madurar en dos subtipus de cèl·lula B diferents. Les cèl·lules que resideixin a la zona marginal maduraran a cèl·lula B de la zona marginal (MZ), les quals perdran part de l'expressió de IgD i en canvi seran CD21 i CD27 positives. Per altra banda, la majoria de cèl·lules aniran als fol·licles limfoides on maduraran a cèl·lules B fol·liculars (FC) i es caracteritzaran per la seva alta expressió de IgD i baixa expressió de IgM, així com per l'expressió dels marcadors CD21 i CD23 (**Fig 1.4**). Les cèl·lules B FC madures migraran cap als centres germinals dels principals òrgans limfoides, la melsa i els LN, on s'establiran a la espera de la captació o presentació d'antígens per part de les APC (Nutt et al., 2015; Pieper et al., 2013).

Aquest procés maduratiu es dona al llarg de la vida de l'adult i s'anomena B-2, d'aquí a que globalment s'anomeni cèl·lules B-2 a tots aquells subtipus de cèl·lules B generats per aquesta via. No obstant, també hi ha el procés conegut com B1 que donarà lloc a les cèl·lules B1, principalment localitzades a cavitats seroses (la pleura i el peritoneu) i que a la vegada es divideixen en CD5⁺ (B1a) i CD5⁻ (B1b). Aquestes cèl·lules, considerades "cèl·lules B innates" es generen a partir de cèl·lules mare embrionàries principalment durant el desenvolupament fetal i neonatal, i al contrari de les cèl·lules B-2, s'autorenovaran i mantindran per divisió cel·lular mitòtica. Els seus BCR no tenen pràcticament variabilitat clonotípica, però en canvi són molt ràpides produint anticossos polireactius i de baixa afinitat de tipus IgM i generant la primera resposta enfront patògens invasors, tot i que en determinades ocasions se les ha relacionat amb reaccions autoimmunitàries (Tangye, 2013).

III. Activació de les cèl·lules B

Les cèl·lules B tenen la capacitat de reconèixer a través del seu BCR tant antígens solubles com presents a les membranes cel·lulars. Per un costat, les cèl·lules B MZ que s'activen davant antígens presents al torrent sanguini de manera soluble es convertiran en cèl·lules plasmàtiques de vida curta, les quals iniciaran la secreció d'anticossos. Per altra banda, les cèl·lules B FC presents als centres germinals en la majoria de casos necessitaran de la captació de l'antigen presentat per les cèl·lules fol·liculars dendrítiques (FDC, *Follicular Dendritic Cells*) i de la cooperació de les cèl·lules CD4⁺ (Nutt et al., 2015) (**Fig 1.4**).

En aquests casos, un cop la cèl·lula B s'hagi trobat un antigen present en una superfície cel·lular, formarà una sinapsis immunològica (SI) i s'activarà. Tot i que, com s'explica més endavant, es produirà una reorganització del citoesquelet (veure apartat 1.2.1.2; IV La sinapsis immunològica), a diferència d'un limfòcit T que necessita de la presentació d'un pèptid unit a molècules MHC de classe I o II, la cèl·lula B és capaç de reconèixer antígens directament presents a les superfícies cel·lulars a través del seu BCR. S'ha descrit que a la SI la cèl·lula B allibera un conjunt d'hidrolases per a facilitar l'alliberament dels antígens cel·lulars (Yuseff et

al., 2011), el que provoca que es produeixi la lisis de l'antigen, almenys parcialment, a la pròpia SI i permet que els pèptids resultants siguin captats directament per les molècules MHC de les pròpies cèl·lules B, les quals podran actuar també com APC per als limfòcits T (Yuseff et al., 2013). Si no és lisat directament a membrana, la unió del BCR a l'antigen produeix la

internalització del complex a l'interior cel·lular a través de lisosomes, on es processarà en diferents pèptids que seran presentats a les cèl·lules T a través de molècules MHC de classe II. Si la cèl·lula T s'activa en resposta al reconeixement del pèptid, secretarà citocines com IL-4 i IL-21, i expressarà la molècula de superfície CD40L que s'unirà al CD40 present a la

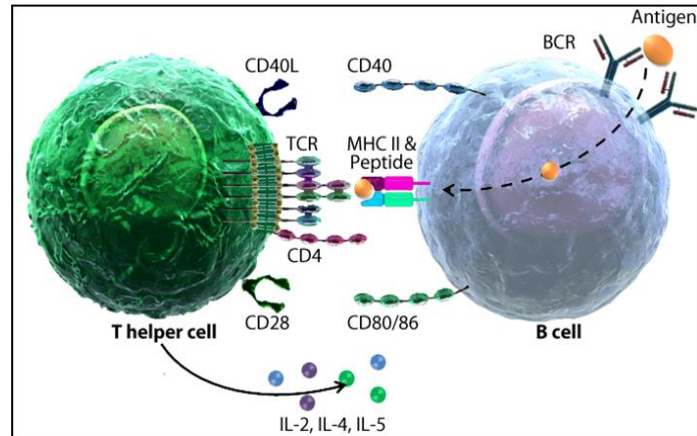


Figura 1.5. Esquema representatiu de l'activació d'un limfòcit B a través d'un limfòcit T. Kwek SS et al, 2012.

membrana de les cèl·lules B, produint els fenòmens de proliferació, canvi de classe d'immunoglobulina (*immunoglobulin class switching*) i hipermutació somàtica (Crotty, 2015) (**Fig 1.5**).

Les cèl·lules B FC resultants d'aquesta activació seran cèl·lules B plasmàtiques de vida llarga (secretores d'anticossos específics contra l'antigen presentat) o cèl·lules B memòria, cèl·lules quiescents de llarga vida i responsables de les respostes d'anticossos secundàries durant la reexposició a l'antigen (**Fig. 1.4**). Els anticossos s'uniran als antígens solubles o cel·lulars i serviran com a senyal per atraure neutròfils, macròfags i DCs per a la seva eliminació o bé (si són de la classe apropiada) per activar el sistema del complement.

1.2.1.2 Limfòcits T

Els limfòcits T són cèl·lules centrals de la immunitat adaptativa, no només per la seva capacitat de dirigir respostes efectores enfront antígens, sinó també per la de regular les respostes efectores d'altres components del sistema adaptatiu (limfòcits B) i del sistema innat (macròfags, DCs). A la vegada són cèl·lules que depenen de les APC, les quals els hi presenten via molècules MHC antígens de naturalesa peptídica prèviament processats, així com senyals accessòries coestimuladores (via lligament de receptors de membrana o via alliberament de citocines) necessàries per a la seva activació i transformació en cèl·lules T efectores.

Degut a la naturalesa dels objectius d'aquesta tesi, en els propers apartats es tractarà en detall els esdeveniments intracel·lulars derivats de la seva activació, la seva maduració al timus, la seva migració i manteniment a la perifèria, els subtipus cel·lulars principals que les conformen així com molècules adaptadores més importants per la seva activació.

I. El receptor de cèl·lules T (TCR)

Les cèl·lules T, per a dur a terme la seva funció de reconeixement d'antígens disposen d'un receptor específic (TCR) que es genera durant la seva maduració al timus. Aquest receptor és un heterodímer de cadenes $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$ amb dominis de tipus immunoglobulina N-terminals variables (generats per recombinació gènica i encarregats del reconeixement de pèptids específics) i C-terminals constants o invariables.

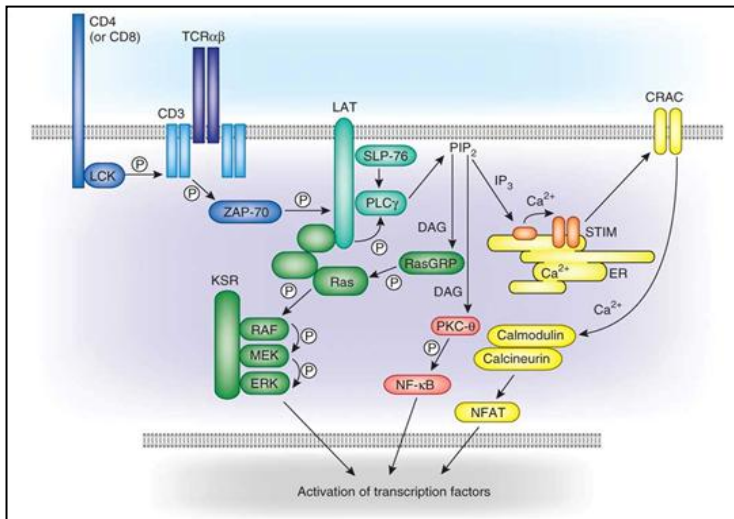


Figura 1.6. Esquema de la cascada de senyalització del TCR. Morris GP i Allen PM, 2012.

Els TCRs $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$ es troben a la superfície dels limfòcits T on s'associen amb les subunitats CD3 (ϵ , γ , δ i ζ) proveïdes de diversos motius tirosina susceptibles de ser fosforilats ITAM. Quan es produeix el reconeixement via TCR d'un antigen presentat per una APC a un timòcit o limfòcit T, les cadenes CD3 ζ són fosforilades per la cinasa Lck, provocant el reclutament i l'activació de la tirosincinasa ZAP-70, que a la

vegada fosforilarà la proteïna adaptadora LAT (*Linker for the Activation of T cells*). LAT serà utilitzat com a ancoratge per a reclutar pròximes a la membrana citoplasmàtica les proteïnes SLP-76 i PLC γ i així formar el complex proteic conegut com a *LAT signalosome*, a partir del qual s'iniciaran diferents vies de senyalització com l'activació de les MAPK, l'activació de PKC- θ i NF- κ B i l'alliberació de calci emmagatzemat al reticle endoplasmàtic del citosol, induint en última instància l'activació de diferents factors de transcripció que portaran a l'activació, supervivència i proliferació cel·lular (Fig. 1.6) (Hogquist and Jameson, 2014; Morris and Allen, 2012).

II. Desenvolupament i maduració de limfòcits T al timus

Formació del TCR

El procés maduratiu dels limfòcits T té lloc al timus a partir de l'arribada al còrtex tímic de progenitors hematopoètics provinents de la medulla òssia coneguts com a CLP (*common-lymphoid progenitor*). Aquest procés té com a objectiu l'expressió per part dels timòcits d'un TCR completament funcional i la posterior selecció positiva o negativa dels limfòcits T immadurs abans de sortir cap la perifèria. En el moment d'arribar al timus els progenitors limfoides perden el potencial per convertir-se en cèl·lules B, i comencen a expressar diferents marcadors característics de cada estadi maduratiu. El primer estadi és el de timòcit doble-negatiu (DN; CD4⁻CD8⁻), que a la vegada consta de 4 sub-estadis successius (DN1-DN4) al final dels quals s'acabarà expressant un pre-TCR, encara incomplet i no funcional. Als estadis

DN1 (CD44⁺CD25⁻) i DN2 (CD44⁺CD25⁺) encara no hi ha evidència de la formació de les cadenes del TCR, és durant els estadis DN3 (CD44⁻CD25⁺) i DN4 (CD44⁻CD25⁻) quan començarà a expressar-se el pre-TCR (Germain, 2002). A l'estadi DN3 apareixen les cadenes invariables pre-T α (cadenes α surrogades o falses) que s'associaran a cadenes variables β fruit de la recombinació de segments VDJ per part de proteïnes Rag1 i Rag2 activadores de la recombinació, així com a les subunitats CD3. Una vegada s'ha constituït amb èxit aquest pre-TCR (pas de DN3 a DN4) els timòcits patiran un procés de divisió que servirà per a que els segments VDJ del locus de la cadena TCR α es recombinin entre si i s'expressi aquesta, desplaçant llavors la pre-T α per a formar un TCR $\alpha\beta$ madur i funcional (Germain, 2002).

Maduració dels timòcits: selecció positiva i negativa

En el moment en que els timòcits ja presenten un TCR $\alpha\beta$ madur, comencen també a expressar seqüencialment les molècules co-receptores CD8 i CD4, de manera que passen de l'estadi DN4 a CD8⁺ immadur (CD8⁺TCR β ⁻CD24⁺) (McDonagh and Bell, 1995; Xiong et al., 2011), i seguidament a doble-positiu (DP; CD8⁺CD4⁺). És al mateix còrtex on les cèl·lules DP es trobaran amb cèl·lules DCs i epitelials tímiques (TECs), les quals actuaran com a APC iniciant una sèrie de contactes transitoris però repetitius dels complexos MHC:pèptid amb els TCRs (Ebert et al., 2008). Segons la interacció TCR-MHC:pèptid hi ha tres destins diferents: a) mort per abandonament (*death by neglect*), b) selecció negativa i c) selecció positiva. Com s'ha explicat prèviament, cada cèl·lula DP disposa d'un TCR únic i exclusiu amb una afinitat

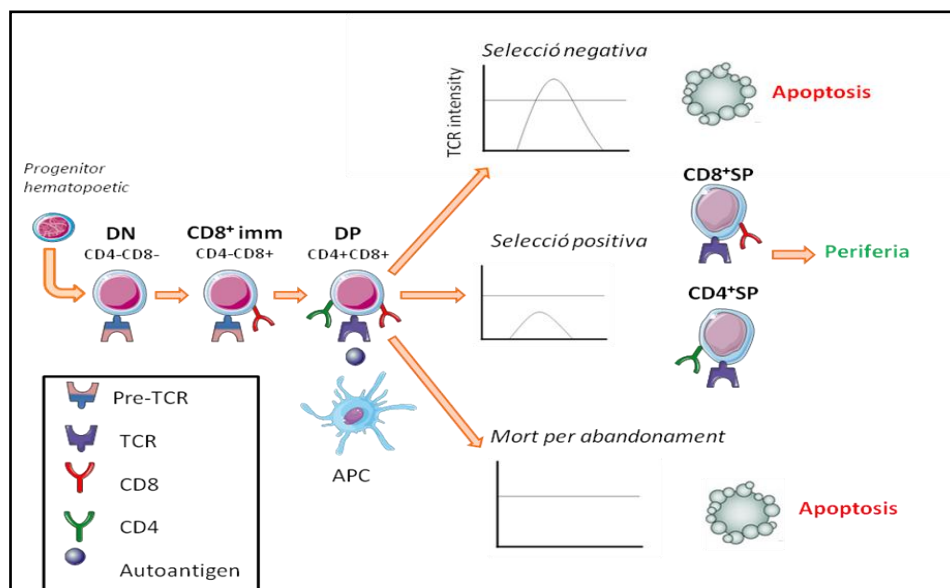


Figura 1.7. Maduració i selecció de cèl·lules T al timus.

específica per un determinat lligand peptídic. Al còrtex, les TECs presentaran a les cèl·lules DP una selecció de pèptids propis (autoantígens) presents en teixits de l'hoste i transcrits pel gen AIRE (Gallo et al., 2013). Si el TCR d'un timòcit DP no es capaç de reconèixer cap pèptid propi, no rep senyals de supervivència i llavors entra en apoptosi pel fenomen de mort per abandonament. Si l'afinitat del TCR per un dels pèptids propis és molt alta, la intensitat de senyal generada a través del TCR serà conseqüentment molt alta i la cèl·lula entrarà en

apoptosi en el procés conegut com selecció negativa. Per altra banda, si l'afinitat és baixa (però no nul·la) s'iniciaran senyals de supervivència que permetran que la cèl·lula continuï madurant, i que per tant aquesta es seleccioni positivament (**Fig 1.7**). Aquesta selecció positiva comporta la pèrdua d'un dels dos co-receptors (o CD4 o CD8), esdevenint una cèl·lula madura CD4⁺SP (CD4⁺ *single-positive*; CD4⁺CD8⁻) o CD8⁺SP (CD8⁺ *single-positive*; CD8⁺TCR⁺CD24⁻) (Hogquist et al., 2005). Aquestes cèl·lules SP migraran a la perifèria per a formar el repertori de cèl·lules T dels teixits limfoides secundaris de l'hoste.

Generació de cèl·lules T reguladores naturals (nTreg)

Durant el procés maduratiu al timus no només es generen limfòcits T convencionals (amb TCRαβ) sinó que també ho fan limfòcits de tipus innat com són els limfòcits Tγδ (durant els estadis DN2 i DN3), i els limfòcits NKT invariants (iNKT o *invariant Natural killer T cell*; durant l'estadi DP). Com s'ha mencionat anteriorment, ambdós tipus cel·lulars reconeixen antígens de naturalesa no peptídica (gluco-lipídica) presentats per molècules similars als MHC, però dels quals no s'entrarà en més detall. No obstant, al timus també es genera un tipus molt important de limfòcits com són els limfòcits T reguladors naturals (nTreg; *natural regulatory T cell*), els responsables del fenomen de la tolerància natural als autoantígens (Hsieh et al., 2012; Hogquist et al., 2005).

Les primeres evidències de l'existència d'un subtipus cel·lular T amb un paper antiinflamatori o promotor de tolerància es van donar arrel de realitzar timectomies neonatals en ratolins (als tres dies després del naixement) i observar que aquests desenvolupaven un síndrome agut d'autoimmunitat caracteritzat per una alta presència d'anticossos anti-òrgan específics (Sakaguchi et al., 1982). La interpretació d'aquests resultats va ser que al timus no només es generaven limfòcits T reactius sinó també d'altres amb un efecte supressor. Un experiment determinant va ser transferir cèl·lules CD4⁺CD5^{lo} soles o en combinació amb cèl·lules CD4⁺CD5^{hi} en ratolins *nude* mancats de cèl·lules T, el que va resultar en una inducció d'un síndrome autoimmune en el primer grup, però absent en el segon (Sakaguchi et al., 1985). Més endavant es van caracteritzar aquestes cèl·lules CD4⁺CD5^{hi} per la seva expressió del marcador d'activació CD25 i del factor de transcripció *forkhead box P3* (FoxP3) ja que humans amb la mutació en aquest gen desenvolupaven un síndrome autoimmune IPEX (immuno-desregulació, poliendocrinopatia i enteropatia, lligat al cromosoma X) (Bennett et al., 2001). Per tant, aquestes cèl·lules actualment es caracteritzen com a CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ i formen al voltant del 5% de cèl·lules CD4⁺SP al timus i el 10% de limfòcits T CD4⁺ de la perifèria.

Tot i que a dia d'avui encara es discuteix com es generen exactament les cèl·lules Treg al timus, sí s'ha demostrat que ho fan durant el procés de selecció a partir de cèl·lules CD4⁺ immadures. Entre les cèl·lules CD4⁺SP, aquelles portadores de TCRs de més alta afinitat per autoantígens patiran un conjunt de canvis cel·lulars, entre ells l'expressió de FoxP3, que les convertirà en nTregs (Moran et al., 2011; Hsieh et al., 2012) (**Fig. 1.7**). Un cop generades, les cèl·lules nTreg migren a la perifèria i s'estableixen als principals òrgans limfoides perifèrics (melsa i LN), des de on posteriorment migraran al focus d'infecció i/o inflamació per exercir la

seva funció. Passats més de 30 anys des de les primeres evidències, avui en dia se sap molt més sobre la seva supervivència i com duen a terme el seu rol immunosupressor.

Aquestes cèl·lules són altament dependents de la IL-2 per la seva supervivència, citocina secretada pels limfòcits T activats que fa que les

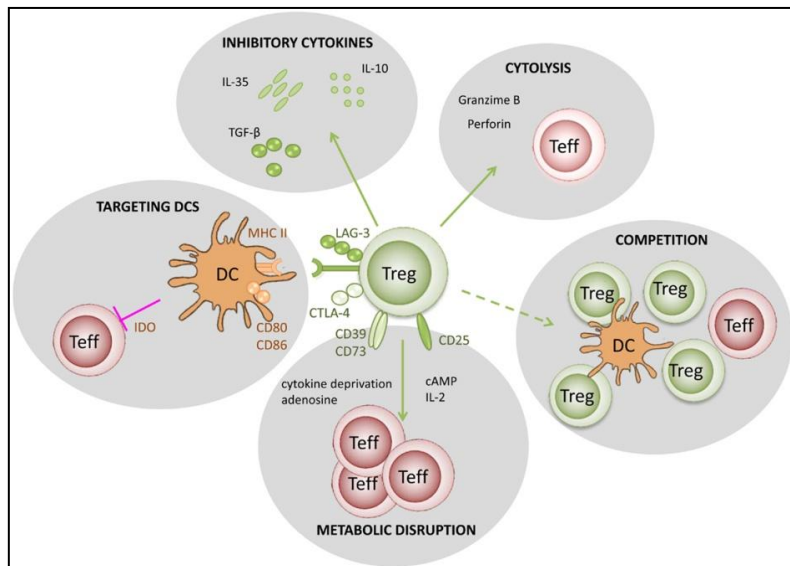


Figura 1.8. Funcions reguladores de les cèl·lules T reguladores. Caridade M et al. 2013.

Treg no s'expandeixen en absència d'una resposta immunitària activa, i a la vegada que competeixen per la IL-2 amb les cèl·lules T efectores. A més, també tenen la capacitat de respondre directament a través de PAMPs detectats als TLR de la seva superfície (Sutmuller et al., 2007, 2006). Respecte els seus mecanismes supressors, està descrit que principalment actuen a través de 1) la competició amb les cèl·lules efectores per entrar en contacte amb les DC i per la IL-2 disponible a l'entorn, 2) la secreció de IL-10, TGFβ o IL-35 (citocines antiinflamatòries) al focus d'infecció, 3) la unió del seu receptor CTLA-4 al CD80/86 de les DC inhibint les funcions proinflamatòries d'aquesta última, 4) la inducció a les APC a produir enzims (IDO) (indoleamina 2,3 dioxigenasa) que consumeixin aminoàcids essencials (triptòfan) per les cèl·lules T efectores en proliferació, i 5) l'eliminació de les pròpies DC o cèl·lules T efectores per alliberament de granzimes (Caridade et al., 2013) (**Fig. 1.8**). Tot i que només representen un 10-15% del total de limfòcits T CD4⁺ en perifèria, ha quedat demostrat que el seu paper immunosupressor és indispensable tant per la homeòstasi de les respostes immunitàries (tornada a la situació d'equilibri inicial prèvia a l'entrada de l'antigen), com pel manteniment de la tolerància fisiològica als autoantígens (Long and Buckner, 2011), encara que la seva funció pot ser alterada en situacions patològiques induïdes per certes infeccions (virals, parasítiques, etc.) i càncers (Mougiakakos et al., 2010).

III. Homeòstasi limfocitària a la perifèria

Cèl·lules naïve

Un cop les cèl·lules CD8⁺SP i CD4⁺SP han estat seleccionades, aquestes maduren i migren a la perifèria per formar part del repertori de limfòcits T de l'individu i convertir-se en cèl·lules naïve o verges CD8⁺ i CD4⁺, caracteritzades per l'expressió de marcadors de *homing* (CD44⁺ CD62L⁺) que les dirigeixen cap als teixits limfoides secundaris, la melsa i els LN. Certes evidències suggereixen que aquestes cèl·lules naïve no són quiescents, sinó que mantenen un cert nivell d'activació sostingut per contacte amb molècules MHC de classe I o II presents en

cèl·lules APC. Així, s'ha vist per un costat que ambdós subtipus cel·lulars ($CD8^+$ i $CD4^+$) presenten uns nivells basals de fosforilació parcial de la cadena TCR/CD3 ζ , i per un altre que cèl·lules $CD4^+$ naïve d'un ratolí transgènic que expressa la proteïna fluorescent GFP quan es dona la transcripció del gen *Nr4a1* (Nur77; indicador de la intensitat del senyal del TCR), expressen nivells basals de Nur77-GFP. No obstant, ambdós senyals desapareixen ràpidament quan a les cèl·lules $CD8^+$ i $CD4^+$ naïve se'ls retira el contacte *in vivo* de molècules MHC de classe I o II (Hogquist and Jameson, 2014). Per tant, les cèl·lules naïve a perifèria mantindrien una certa proliferació i activació homeostàtica degut al seu reconeixement d'autoantígens via molècules de classe I i II, i aparentment seria la secreció autocrina i intermitent de IL-7 resultant d'aquesta interacció el que mantindria la seva supervivència (Kimura et al., 2012).

Dins d'aquest repertori, no obstant, les cèl·lules T mostren un ventall d'afinitats degut a la variabilitat dels seus TCR. Un dels marcadors que ha resultat fiable per a determinar la reactivitat d'un limfòcit T naïve és el receptor de membrana CD5, del qual se'n parlarà més extensament a l'apartat 1.2.2.1. Així, quanta més expressió de CD5, més afinitat per l'autoantigen, sent les cèl·lules naïve $CD5^{hi}$ més autoreactives que les $CD5^{lo}$ (Hogquist and Jameson, 2014). Recentment s'ha observat que les cèl·lules més autoreactives $CD5^{hi}$ responen amb més intensitat i rapidesa davant un antígen extern, i per tant s'ha introduït el concepte que la reactivitat per autoantígens adquirida al timus és el que determinarà la intensitat de la resposta davant antígens externs (Fulton et al., 2015; Mandl et al., 2013). Curiosament, aquestes cèl·lules $CD5^{hi}$ són més dependents de IL-2, el que provoca que es limiti la seva expansió durant una resposta immunitària primària, i per tant, un possible fenomen autoimmunitari (Persaud et al., 2014).

Cèl·lules efectores/memòria innata

Dins el repertori de limfòcits T $CD4^+$ i $CD8^+$ de ratolins no immunitzats es troben també cèl·lules que segons l'expressió dels marcadors CD44 i CD62L les podem classificar com a efectora/memòria (T_{EM} , $CD44^+CD62L^-$) i memòria central (T_{CM} , $CD44^+CD62L^+$) (també anomenades cèl·lules de memòria innata). Tot i que no es coneix el mecanisme ni el detonant de la seva generació, aquestes cèl·lules mostren una expressió de CD5 i de Nur77 més alta que una cèl·lula naïve, indicant que la seva autoreactivitat és major. Es creu que són cèl·lules amb alta reactivitat que han estat activades per autoantígens dins d'un ambient controlat, i que per això mostren un fenotip efector/memòria (Chang et al., 2014; Sprent and Surh, 2011). Més fàcil d'explicar és la seva presència després d'una infecció (Masopust et al., 2004; Arens and Schoenberger, 2010), o en casos on hi ha una limfopènia i els pocs limfòcits que hi ha proliferen per restablir la homeòstasi cel·lular, adaptant un fenotip efector/memòria en un procés conegut com proliferació homeostàtica (Jameson et al., 2015).

IV. Activació d'una cèl·lula T

La sinapsis immunològica

L'activació d'un limfòcit T s'inicia quan durant la seva estada als òrgans limfoides secundaris es troba amb una DC o cèl·lula B que, actuant com a APC, li presenta a través del complex MHC de classe I o II un pèptid per el qual és reactiu (ja sigui un autoantigen o un antigen extern). En aquest punt, el limfòcit reorganitza el seu citoesquelet d'actina mitjançant el centre organitzador de microtúbuls (MTOC) i permet la formació al punt de contacte cèl·lula T-APC d'un complex supramolecular d'activació (SMAC) també conegut com sinapsis immunològica (SI) (**Fig. 1.9**).

La SI és una estructura la finalitat del qual és establir i mantenir el contacte T-APC, així com concentrar les molècules de membrana co-estimuladores o accessorïes implicades en l'activació del TCR en un únic punt per optimitzar-ne la unió als seus lligands presents en l'APC. Inicialment, les molècules TCR d'un limfòcit T es troben formant microclusters per tota la seva membrana cel·lular. En qüestió de minuts a partir del contacte TCR-MHC:pèptid, els microclústers de TCRs dispersos juntament amb les molècules co-estimuladores que els

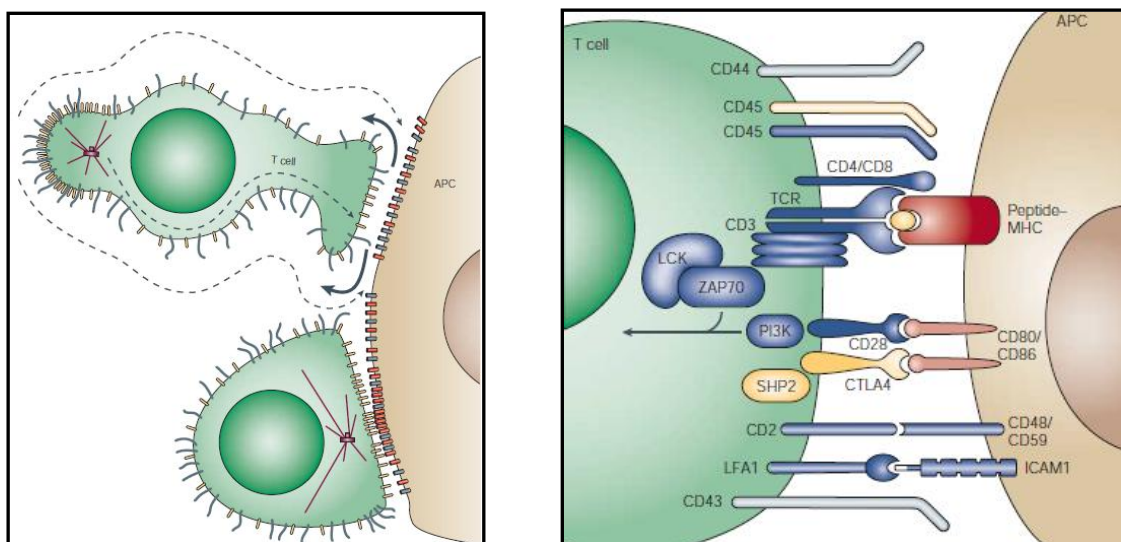


Figura 1.9. Formació de la sinapsis immunològica i principals molècules involucrades en l'activació d'un limfòcit T. Huppa JB i Davis MM, 2003.

acompanyen es concentren per mitjà d'interaccions guiades pel citoesquelet a diferents zones del SMAC: el TCR juntament amb molècules reguladores com CD28 i CTLA-4 i la proteïna quinasa C- θ (PKC- θ) ho fan a la zona central del SMAC (cSMAC); les molècules d'adhesió com LFA-1 i el seu lligand ICAM-1 ho fan a una zona immediatament perifèrica SMAC (pSMAC), i les molècules més grans i voluptuoses, com ho serien CD43 i CD45 ho fan en una zona encara més distal (Huppa and Davis, 2003) (**Fig. 1.9**). Aquesta estructura resulta altament estable, ja que s'ha documentat que els contactes entre limfòcits T i APCs en la SI es mantenen durant hores.

Polarització de cèl·lules naïve

El reconeixent d'un antigen específic durant la resposta immunitària produirà l'activació de la cèl·lula naïve i la seva subsegüent diferenciació o polarització cap a diferents tipus funcionals de limfòcits efectors en funció del tipus d'agent patògen i de l'ambient de citocines generat al lloc d'activació per cèl·lules principalment del sistema innat. D'aquesta manera, la formació de la SI resultarà en l'activació i la proliferació cel·lular, però també en la "professionalització" de la cèl·lula naïve en un determinat subtipus funcional de cèl·lula T.

Follicular-helper (Tfh): Aquestes cèl·lules CD4⁺, descobertes fa poc més de 10 anys, resideixen principalment als centres germinals dels òrgans limfoides juntament amb les cèl·lules B FC. Aquestes cèl·lules T expressen el receptor de quimiocines CXCR5 que les permet respondre a la quimiocina CXCL13 i migrar als centres germinals. En resposta a IL-6 i IL-21, expressen el factor de transcripció Bcl6 que és determinant per la generació d'aquest llinatge i que és un factor antagonista/repressor de Blimp-1, el qual està estretament lligat a la generació de Th1, Th2 i Th17 (veure a continuació). Les cèl·lules Tfh secretaran principalment IL-21, la qual ajudarà a la supervivència i el manteniment de les cèl·lules B FC (Crotty, 2011) (**Fig 1.10**).

T-helper 1 (Th1): Quan una cèl·lula CD4⁺ forma una SI amb una DC del subtipus CD8α⁺, amb una alta probabilitat aquesta es polaritzarà cap a CD4⁺ helper tipus 1 (Th1). La detecció de PAMPs a través dels PRRs de la DC provocarà que aquesta secreti IL-12, que a la vegada induirà les cèl·lules NK a produir IFN-γ, ambdues citocines crítiques i determinants per iniciar l'activació del factor de transcripció T-bet, el qual afavorirà la polarització cap a Th1 i inhibirà la polarització cap a Th2 o Th17 (**Fig 1.10**). Així l'activació de la CD4⁺ naïve en aquest

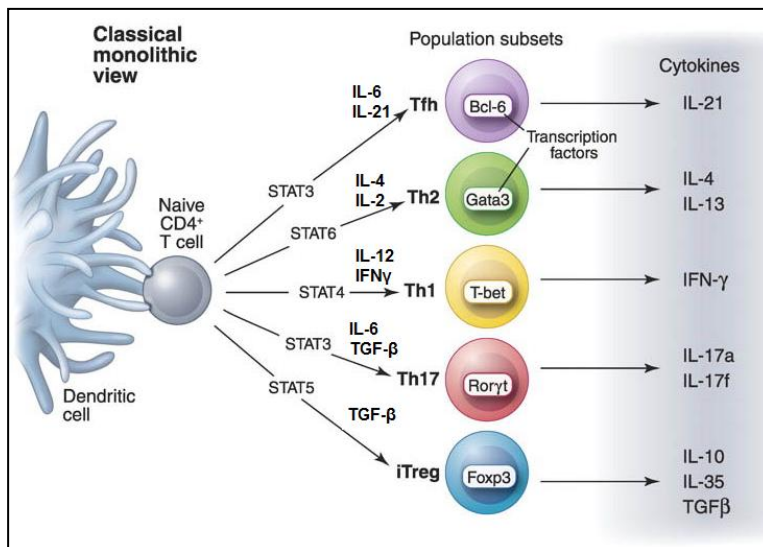


Figura 1.10. Generació dels diferents subtipus de cèl·lules T CD4+.

Adaptat de National Institute of Health (NIH).

context generarà una cèl·lula CD4⁺Th1 capaç de secretar per un costat més IFN-γ, el que provocarà canvis d'isotip a les cèl·lules B per secretar anticossos tipus IgG, però també més IL-2, que promourà l'expansió de cèl·lules CD8⁺ citotòxiques (CTL; veure més endavant) i el manteniment de Tregs (Luckheeram et al., 2012).

Les cèl·lules Th1 estan estretament relacionades amb l'eliminació de patògens intracel·lulars i amb l'autoimmunitat òrgan específica. A través de la secreció d'IFN-γ, per un costat, les cèl·lules citotòxiques s'activaran i lisan cèl·lules alterades (infectades, canceroses, etc), i per l'altre s'induirà la

transcripció de gens regulats per interferó en cèl·lules fagocítiques de la immunitat innata, el que accelerarà i facilitarà l'eliminació del patògen o la cèl·lula infectada. També s'ha descrit que les cèl·lules Th1 tenen un paper rellevant en l'eliminació de *Candida albicans*, on la secreció de IFN- γ és indispensable per a la seva eliminació (Kullberg et al., 1993; Netea et al., 2003).

T-helper 2 (Th2): Els factors determinants per la polarització de CD4⁺ naïve a CD4⁺Th2 són la presència de IL-4 i IL-2, ja que a través de la IL-4 s'augmentarà l'expressió del regulador a Th2, GATA3. També de manera indirecta la secreció de IL-6 per les DCs CD8 α ⁻ (entre d'altres) afavorirà la diferenciació a Th2, ja que la unió al seu receptor induirà un augment en la secreció de IL-4 (**Fig 1.10**). A diferència de les Th1, les cèl·lules Th2 inicien respostes inflamatòries davant paràsits extracel·lulars, com els helmints, i juguen un paper molt important en la inducció i manteniment de l'asma així com d'altres al·lèrgies. A través de la secreció de IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13 i IL-25 provoquen un canvi d'isotip de les cèl·lules B cap a IgE, i un augment dels receptors de IgE en cèl·lules de la immunitat innata (mastòcits, eosinòfils) que induiran a l'alliberació de grànuls citolítics en el focus de la inflamació (Luckheeram et al., 2012).

T-helper 17 (Th17): La IL-6, IL-21, IL-23 i TGF- β són les principals citocines involucrades en la diferenciació cap a Th17, sent el regulador d'aquest llinatge el factor de transcripció ROR γ t (**Fig 1.10**). Es poden distingir tres passos en el procés de diferenciació: un primer de diferenciació mediat per TGF- β i IL-6, un segon d'amplificació mitjançat per IL-21, i un últim d'estabilització governat per IL-23 (Luckheeram et al., 2012).

El TGF- β ha resultat ser la citocina crítica per la diferenciació a Th17 (Veldhoen et al., 2006). Tot i això, la via de senyalització del TGF- β també juga un paper fonamental en el desenvolupament de Treg induïdes (iTreg; veure més endavant) que tenen efectes antagònics de les Th17. Per tant, seran concentracions baixes de TGF- β juntament amb la presència de IL-6 les que induiran la diferenciació a Th17 (no a iTreg), la producció de IL-21 i la sobreexpressió del receptor de IL-23 (Luckheeram et al., 2012).

Les cèl·lules Th17 són responsables, juntament amb les Th1, de la resposta contra bacteries extracel·lulars i fongs, a la vegada que també poden estar involucrades en la generació de fenòmens autoimmunes. Les citocines principals que secreten, IL-17A i IL-17F, s'uneixen al mateix receptor el qual està expressat en diversos teixits, com ara el teixit hematopoètic, la pell, els pulmons o l'intestí i per tant actuen no només sobre el sistema immunitari. Principalment, la unió de IL-17 al seu receptor induïx la secreció de IL-6, IL-1 β i TNF α (entre d'altres), afavorint l'activació i quimiotaxis de cèl·lules de la immunitat innata al focus d'inflamació (Luckheeram et al., 2012).

Tregs induïbles (iTreg): Les Tregs induïbles (iTregs) són cèl·lules Treg CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ que s'han generat a partir de cèl·lules CD4⁺ naïve a la perifèria, al contrari que les nTreg que provenen del timus (veure apartat 1.2.1.2; II.). Serà la sobreexpressió de FoxP3 el que diferenciarà i mantindrà les iTregs en un context amb altes concentracions de

TGF- β , ja que en cas de nivells baixos d'aquesta citocina (juntament amb IL-6) induirà la diferenciació cap a Th17 (Luckheeram et al., 2012) (**Fig 1.10**).

Així com la generació de nTreg al timus està determinada per l'afinitat del TCR, la inducció de iTregs és més complexa. Tot i que encara hi ha molts punts que no estan clars, està documentat que aquestes es poden generar com a resposta tant en un context de tolerància com d'inflamació. S'ha descrit que en un context on no hi ha una òptima co-estimulació (com administrant un AcMo anti-CD4 bloquejant però no citotòxic) es genera un major nombre de iTregs (Cobbold et al., 2004), o que aquestes també s'indueixen per controlar la proliferació homeostàtica, com es demostra per transferència de cèl·lules CD4⁺ naïve de ratolins TCR-monoclonals en hostes Rag^{-/-} o Rag^{+/-} (Shen et al., 2005). Per altra banda, també està descrita la generació de iTregs en models d'inflamació crònica com en models d'asma o colitis (Schmitt and Williams, 2013) o en fenòmens d'autoimmunitat (von Herrath and Harrison, 2003). Gottschalk i col·laboradors també van demostrar de manera rellevant que la potència, la densitat i la duració de la interacció TCR:MHC eren factors que influïen en la generació de iTregs (Gottschalk et al., 2010).

Tot i que la funció última tant de les nTreg com de les iTreg és la regulació de la resposta immunitària a través de la inducció d'una resposta antiinflamatòria per diferents mecanismes (veure apartat 1.2.1.2; II.), la inducció de iTreg dona lloc a tres subtipus diferents: les Treg-1 (Tr1) secretores de IL-10, les *T helper 3* (Th3) secretores de TGF- β i, recentment descrites, les CD8⁺Treg secretores tant de IL-10 com TGF- β i generades a partir de cèl·lules CD8⁺ (Mills, 2004).

Limfòcits T citotòxics (*cytotoxic T lymphocyte*; CTL): Els limfòcits T citotòxics (o CTL) són cèl·lules CD8⁺ naïve a les quals les APC els hi han presentat un antigen exogen i s'han activat, i a diferència de les CD4⁺, la seva funció no serà la de secretar citocines per activar la immunitat innata ni les cèl·lules B, sinó que el seu rol serà el d'eliminar les cèl·lules infectades que expressin l'antigen que les ha activat. Per aquesta raó, són especialment eficaces en l'eliminació de cèl·lules infectades per virus i en l'eliminació de cèl·lules tumorals que expressin determinats pèptids antigènics (Barry and Bleackley, 2002). Tenen principalment dues estratègies per destruir les cèl·lules diana. Per un costat, al detectar una cèl·lula diana que expressi l'antigen reactiu, sobreexpressaran a la seva membrana la molècula FASL, (*FAS ligand*; FAS/CD95 es un membre de la família de receptors de mort) que al unir-se a les molècules FAS expressades a la superfície de les cèl·lules diana induiran aquestes a entrar en apoptosi a través de l'activació de caspases (Barry and Bleackley, 2002). Per altra banda, les CTL també seran capaces d'exocitar grànuls de granzima B que provocaran la lisis de la cèl·lula diana (Barry and Bleackley, 2002). Juntament amb les NK, formen un grup de cèl·lules altament especialitzades en la lisis directa de cèl·lules diana infectades.

1.2.2 Receptors limfocitaris accessoris

Apart dels principals dos receptors descrits, el TCR i el BCR, trobem a la membrana dels limfòcits una sèrie de receptors anomenats accessoris amb funcions principalment adhesives i/o senyalitzadores. Entre els del darrer grup hi ha receptors la funció dels quals és modular positivament el senyal dels receptors principals (co-estimuladors), mentre que d'altres ho fan negativament (inhibitoris). Aquests receptors accessoris s'anomenen col·lectivament com a *immune check points* i juguen un paper fonamental durant les respostes immunitàries ja que serà el balanç de senyals positives i negatives transmises el que farà que una cèl·lula T o B s'activi, proliferi i es diferenciï de manera adequada cap a un tipus efector o altra.

Les molècules accessòries senyalitzadores més estudiades inclouen CD28, PD-1/PD-1L, CTLA-4, CD80 i CD86, totes elles pertanyents a la superfamília de les immunoglobulines. CD80 i CD86 s'expressen a la superfície de les APC i modulen l'activitat de cèl·lules CD4⁺ i CD8⁺, per mitjà de la seva interacció amb molècules expressades constitutivament com CD28, o de forma induïble un cop activades, com CTLA-4. Tant CD28 com CTLA-4 poden unir-se a CD80 i CD86, encara que CTLA-4 ho fa amb més afinitat. La interacció de CD28 amb CD80/CD86 iniciarà una cascada de senyalització co-estimuladora del senyal, i en canvi la de CTLA-4 portarà a una inhibició del senyal d'activació. La competició pels mateixos lligands establirà un balanç entre les dues molècules, ambdues necessàries per a una correcta activació cel·lular (Ford et al., 2014). No obstant, apart de les molècules mencionades, altres receptors co-estimuladors (CD27, OX40, GITR, CD40L, etc.) i inhibidors (B7-1, CD160, LAIR1, etc) han estat relacionats amb aquest procés (Chen and Flies, 2013) (**Fig. 1.11**).

Dos receptors limfocitaris poc mencionats en aquest aspecte però que cada vegada sembla que tenen un paper rellevant en aquest procés són els receptors tipus *scavenger* CD5 i CD6 (**Fig. 1.2**), l'estudi dels quals el nostre grup està especialment interessat des de fa temps. Es tracta de dos glicoproteïnes de membrana limfocitàries de tipus I, de 67kDa i 105-130 KDa, respectivament, altament homologues i que pertanyen a la superfamília SRCR (SRCR-SF; veure apartat 1.1.2). Ambdós gens es troben junts i contigus al mateix locus cromosòmic (chr11q22 en humans i chr9 en ratolí), el que ha portat a pensar que probablement deriven d'una duplicació cromosòmica d'un gen ancestral (Lecomte et al., 1996; Padilla et al., 2000).

1.2.2.1 El receptor limfocitari CD5

CD5 va ser un dels primers receptors limfocitaris descrits gràcies a la tecnologia dels anticossos monoclonals (AcMos) on va ser anomenat inicialment com a Lyt-1, englobat dins del que es coneixia com determinants al·loantigènics de la membrana cel·lular (*Cell Membrane Alloantigenic Determinants*; CMAD) els quals es van utilitzar per classificar diferents subpoblacions funcionals de limfòcits T i B (Ledbetter et al., 1980). No va ser fins el primer *International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens* celebrat a París el 1982 quan Lyt-1 va passar a anomenar-se CD5.

A. Estructura gènica

El gen CD5 es troba situat al cromosoma 11 (cromosoma 9 en ratolí), ocupa 24.5Kb i està format per 11 exons. Els exons 3, 5 i 6 codifiquen cada un dels tres dominis extracel·lulars SRCR, la regió transmembrana esta codificada per l'exó 7, i la regió intracel·lular pels exons 8, 9 i 10 (Padilla et al., 2000). Per altra banda, així com a CD6 se li han descrit variants generades per processament (*splicing*) alternatiu del seu mRNA (Castro et al., 2007; Bowen et al., 1997), a CD5 se li coneix una única variant expressada exclusivament a les cèl·lules B (Renaudineau et al., 2005). Aquesta isoforma és el resultat de la utilització d'un exó 1 alternatiu situat a 20 kb de l'exó 2 en direcció 5' i consisteix en una forma truncada de CD5 que queda retinguda al citoplasma i que competeix per la transcripció de la forma CD5 completa, regulant d'aquesta manera l'expressió de CD5 de membrana en cèl·lules B.

B. Expressió tissular

Als primers estudis on es van caracteritzar els AcMos que anaven contra CD5 (OKT-1 i Leu-1), es van adonar que aquests s'unien al 95-100% de les cèl·lules T de sang perifèrica, a un subtipus de timòcits, a cèl·lules de leucèmies limfocítiques cròniques B (B-CLL) però no a limfòcits B, i a cèl·lules de leucèmies limfocítiques cròniques T (T-CLL; *T cell chronic lymphocytic leukemia*) però a no cèl·lules T de leucèmies limfocítiques agudes (Reinherz et al., 1979; Wang et al., 1980). CD5 es va descriure llavors com un antigen de maduració dels limfòcits T, i durant molts anys (encara ara) s'ha utilitzat com a marcador de cèl·lules T.

A dia d'avui se sap que una petita subpoblació de cèl·lules B madures (anomenada B1a) també expressen CD5, tot i que és en les cèl·lules T on es troben els nivells més alts d'aquest

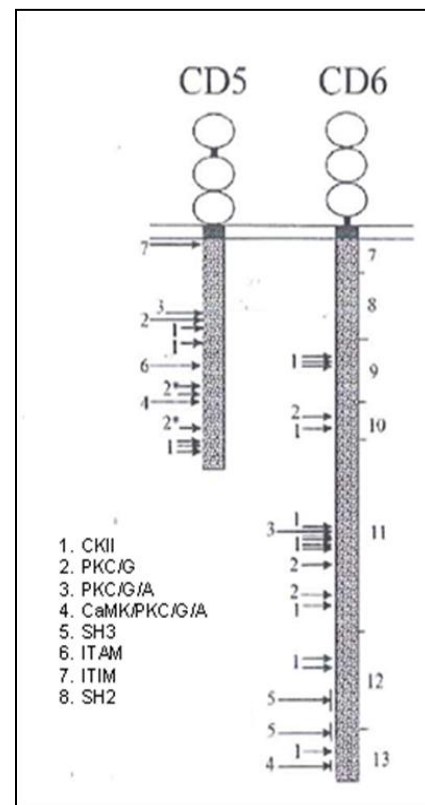


Figura 1.12. Residus d'unió de CD5 i CD6 a proteïnes intracel·lulars. CKII (Casein kinase II), PKC (Protein kinase C), CamK (Ca²⁺/calmodulin dependet kinase), ITAM and ITIM (immunoreceptor base activatory or inhibitory motif, respectivament). Adaptat de Vila J et al, 2000.

receptor. L'expressió de CD5 comença als primers estadis immadurs del timus de manera dirigida i acompanyant la formació del pre-TCR, per tant la seva expressió va en augment des de DN a DP, sobreexpressant-se a SP durant la selecció positiva, on el nivell de la seva expressió vindrà determinat per l'afinitat del TCR (Azzam et al., 1998). En cèl·lules T perifèriques la seva expressió és més elevada en CD4⁺Tαβ, seguida per les CD8⁺Tαβ i finalment per les Tγδ (Cron et al., 1989), tot i que característicament les Tγδ de l'intestí són CD5⁻ (Mizoguchi et al., 2003).

Pel que fa a les cèl·lules B1a (CD5⁺CD23⁻IgM^{hi}IgD^{lo}), són un subtipus de cèl·lula B principalment localitzat al peritoneu i la pleura en ratolins i al moll d'os a humans. Tenen una vida llarga, però a diferència de les cèl·lules B convencionals (B2) presenten una baixa variabilitat als seus BCR. Aquest tret les converteix en les majors productores d'anticossos naturals IgM polireactius, els quals constituïran, juntament amb la immunitat innata, una de les primeres defenses de l'organisme enfront dels patògens (Berland and Wortis, 2002). Degut a la naturalesa polireactiva dels seus anticossos, no obstant, se les ha vist incrementades en determinades malalties autoimmunitàries (Plater-Zyberk et al., 1985; Smith and Olson, 1990; Muñoz et al., 1991).

Cal destacar que cèl·lules amb fenotip regulador com les Treg o les B reguladores (Breg o B10, capaces de secretar IL-10) tenen una major expressió de CD5 que les cèl·lules T convencionals o les B1a, respectivament (Ordoñez-Rueda et al., 2009; Matsushita et al., 2008). De fet, inicialment les Treg se les va distingir per ser CD5^{hi}, i no va ser fins més tard que se les va caracteritzar per l'expressió de FoxP3 (Sakaguchi et al., 1985).

C. Lligands

Tot i la llarga llista d'estudis publicats sobre CD5, encara no s'ha descobert ni caracteritzat un lligand endogen fiable. S'ha descrit, no obstant, la seva unió a receptors expressats només en cèl·lules B com CD72 (Van de Velde et al., 1991), la regió IgV_H (Pospisil et al., 2000) i gp200 (Haas and Estes, 2001), a receptors expressats a cèl·lules B i T com gp40-80 (Biancone et al., 1996; Bikah et al., 1998), a receptors àmpliament distribuïts com gp150 (Calvo et al., 1999) i fins i tot al propi CD5 (Brown and Lacey, 2010) (**Fig. 1.13**). La informació relativa a aquestes interaccions és poc convincent, ja que han estat pobrament caracteritzades i hi hagut problemes per part d'altres grups a l'hora d'intentar replicar els resultats, apart que alguns d'ells només explicarien les interaccions entre cèl·lula T-T i cèl·lula T-B, però no en canvi entre cèl·lula T-DC o T-macròfag, per exemple. Curiosament, també s'ha descrit la seva interacció amb lligands exògens presents a patògens. Sobre aquest tema se'n parlarà més endavant (veure apartat 1.2.2.1; I.).

D. Regió citoplasmàtica

La cua citoplasmàtica encarregada de la funció senyalitzadora, i per tant inhibidora, de CD5 conté 94 aminoàcids. Tot i que es troba mancada d'activitat enzimàtica intrínseca, conté residus Ser (11), Thr (4) i Tyr (4) susceptibles de ser fosforilats per Ser/Thr cinases intracel·lulars com la proteïna cinasa C (PKC), cinasa dependent de Calci/calmodulina tipus II (*Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II*), i la Casein cinasa 2 (*Casein kinase 2; CK2*) (Bauch et al., 1998; Calvo et al., 1998; Vilà et al., 2001a), així com també per Tyr cinases com Lck y Fyn (Bamberger et al., 2011; Vilà et al., 2001a). La fosforilació d'aquests residus vindrà seguida per la generació de senyals bioquímics com l'activació de la fosfolipasa C específica de fosfatidilcolina (*phosphatidylcholine-specific phospholipase C*) (Simarro et al., 1997), l'esfingomielinasa àcida (*acidic sphingomyelinase*), la proteïna cinasa C (PKC)- ζ , la via de MAPK, així com la cinasa NH2 terminal c-Jun (JNK) (Simarro et al., 1999) (**Fig. 1.13**).

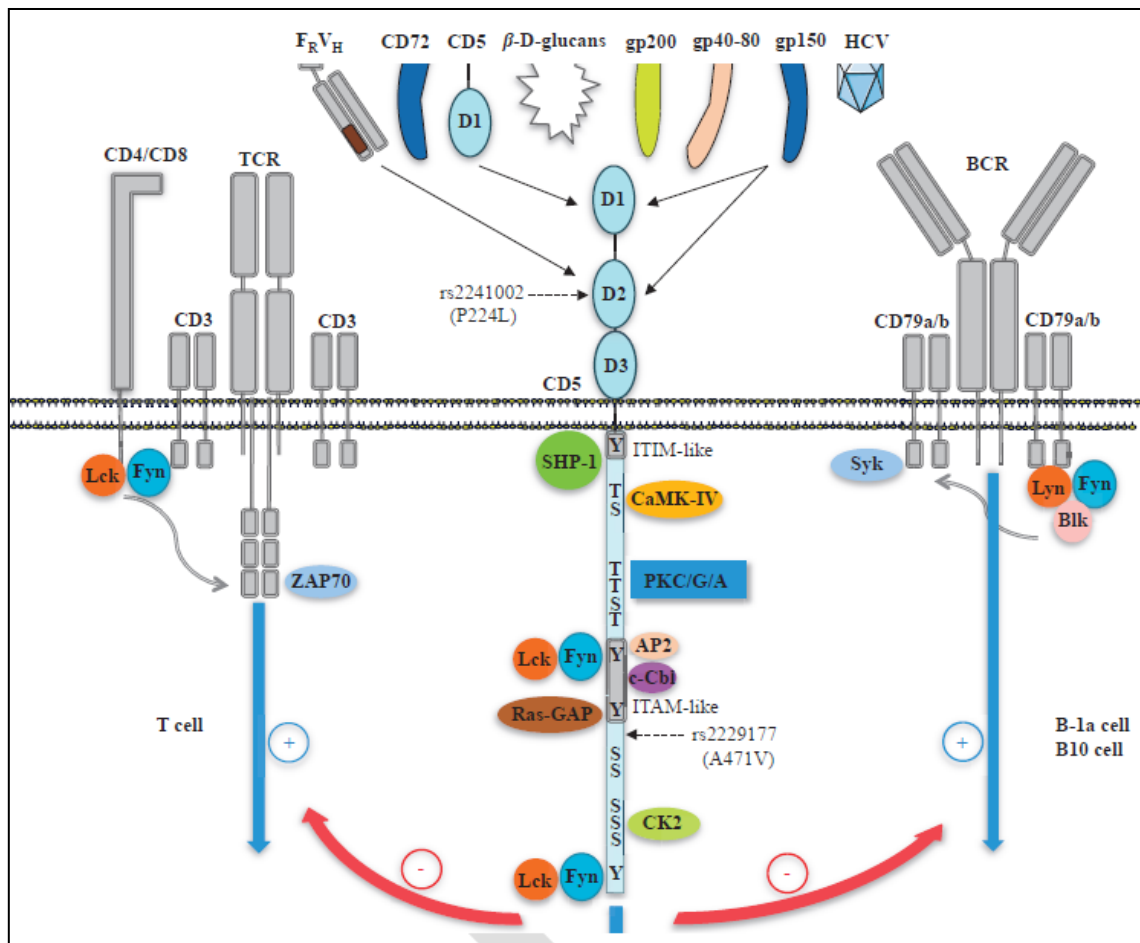


Figura 1.13. Esquema de les principals interaccions extracel·lulars i intracel·lulars de CD5. Tirosina (Y), Serina (S). Consuegra-Fernández et al., 2015.

La presència de dominis pseudo-ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*) i pseudo-ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activatory motif*) (Lozano et al., 2000) ha ajudat a explicar l'efecte immunomodulador negatiu de CD5, especialment en el segon cas. Es va descriure que la Tyr378 del domini pseudo-ITIM era necessària per la unió de la proteïna

fosfatasa SHP-1 (*Src Homology región 2 domain containing phosphates*) (Perez-Villar et al., 1999), però al contrari del que es va pensar inicialment, aquesta no va resultar ser la principal moduladora de l'efecte inhibidor de CD5. Utilitzant una forma quimèrica sense el domini pseudo-ITIM es va demostrar que CD5 mantenia el seu efecte inhibidor (Gary-Gouy et al., 2000), així que es va pensar que aquest efecte podia estar modulats pel domini pseudo-ITAM.

Apart de la ja esmentada Tyr378, al domini citoplasmàtic existeixen tres tirosines que es fosforilen després de l'activació del TCR: Tyr429 i Tyr 441 presents al domini pseudo-ITAM (Gary-Gouy et al., 2000; Vilà et al., 2001) i Tyr463, situada just C-terminal del lloc d'interacció amb CK2 (Calvo et al., 1998). Cal destacar que un article recent on es muten alternativament les tres tirosines resalta la importància de la Tyr429 per damunt les altres dues en l'efecte inhibidor de CD5, i suggereix per tant que a nivell funcional el domini pseudo-ITAM es comportaria com un ITIM (Mier-Aguilar et al., 2015). El domini pseudo-ITAM serveix com a punt d'ancoratge per mediadors com Lck, Fyn, Ras-GAP (proteïna activadora GTPasa) i c-Cbl, aquesta última aparentment involucrada de manera directa també en l'efecte inhibidor de CD5 (Dennehy et al., 1997; Roa et al., 2013).

E. Funcions

Modulació de l'activació de cèl·lules T i B

Els primers estudis duts a terme *in vitro* i amb AcMos van atribuir a CD5 un rol co-estimulador. Observacions com que el tractament de cèl·lules T humanes amb AcMo anti-CD5 induïssin un augment de la proliferació (depenent de la presència de monòcits), de la secreció de citocines, i de l'alliberació de calci intracel·lular, així com el fet que CD5 fos la segona senyal necessària juntament amb CD3 per activar cèl·lules en estat *resting*, va portar a la rotunda conclusió que CD5 actuava com a co-estimulador a l'activació T (Alberola-Illa et al., 1992; Ceuppens & Baroja, 1986; Hollander et al., 1981; Imboden, June, McCutcheon, & Ledbetter, 1990; Verwilghen et al., 1993). No obstant, la generació de ratolins CD5^{-/-} va trencar els esquemes i va posar en evidència els resultats experimentals *in vitro* generats fins al moment. Al estimular-los amb anti-CD3 sol o en combinació amb anti-CD4, els timòcits CD5^{-/-} presentaven una major alliberació de calci intracel·lular, un augment en la proliferació i en la fosforilació de proteïnes de la cascada de senyalització del TCR com PLC- γ 1, TCR ζ , LAT i Vav (Tarakhovsky et al., 1995). De manera similar, l'estimulació de cèl·lules B1 CD5^{-/-} a través del BCR amb AcMo anti-IgM va incrementar la mobilització de calci i la proliferació cel·lular (Bikah et al., 1996).

Posteriorment, altres estudis han demostrat que CD5 es un inhibidor de l'activació. Mitjançant cèl·lules CD5-negatives transfectades amb una proteïna CD5 fluorescent s'ha vist que durant la formació de la SI, CD5 co-localitza al centre d'aquesta juntament amb el complex TCR/CD3 (Brossard et al., 2003). D'acord amb aquest estudi, CD5 no afecta ni els nivells d'expressió de CD3 ni els contactes T-APC, i en canvi sí que els nivells de CD5 es correlacionen amb més inhibició de la fosforilació i d'alliberació de calci intracel·lular. Aquest estudi senyala que CD5

no té una funció en l'estabilització de la sinapsis sinó que el seu rol es centra en la modulació de l'activació de la cèl·lula T.

Maduració de cèl·lules T

La selecció de cèl·lules T al timus és un procés on la intensitat del senyal del TCR és un factor determinant. Donada la capacitat de CD5 per modular aquesta senyal era previsible que CD5 tingués un paper rellevant durant aquest procés. Els mateixos autors que van presentar el ratolí $CD5^{-/-}$ van demostrar, que tot i que les poblacions T d'aquests animals no es veiessin alterades (Tarakhovsky et al., 1994), quan es creuava aquesta soca amb ratolins transgènics TCR monoclonals el resultat era una dràstica disminució de les poblacions SP del timus, indicant que CD5 modulava el llindar d'activació dels timòcits per evitar la seva entrada en apoptosi (Tarakhovsky et al., 1995). Més tard es va demostrar que CD5 regulava negativament la selecció de cèl·lules $CD4^{+}SP$ (Peña-Rossi et al., 1999), i que l'expressió d'aquest s'establí al timus en funció de la intensitat de la senyal rebuda pel TCR, o en altres paraules, en funció de l'afinitat de les cèl·lules T per autoantígens, tal i com es va demostrar observant l'expressió de CD5 en diferents ratolins transgènics per TCRs de diferents afinitats (Azzam et al., 2001, 1998). Per tant, l'efecte inhibitori de CD5 és més necessari en cèl·lules amb alta afinitat per evitar ser seleccionades negativament. D'aquesta manera, l'expressió de CD5 es troba augmentada en timòcits amb TCRs d'alta afinitat per autoantígens, i no en canvi en cèl·lules amb menys afinitat per autoantígens.

Arrel d'aquesta descoberta s'ha utilitzat CD5 com a marcador fiable de la reactivitat de les cèl·lules T, sent les cèl·lules $CD5^{hi}$ més reactives que les $CD5^{lo}$. Curiosament, ha resultat que la alta autoreactivitat de les cèl·lules naïve $CD5^{hi}$ també les fa ser les més preparades i efectives davant una invasió per patògens, ja que la seva resposta proliferativa i secreció de citocines és més ràpida que en cèl·lules naïve $CD5^{lo}$ (Fulton et al., 2014).

Tolerància

Per la seva capacitat de regular l'activació de les cèl·lules T, CD5 se l'ha associat sovint amb la inducció de tolerància. En el cas de les Treg, se les va caracteritzar inicialment com $CD5^{hi}$ degut a la seva alta expressió de CD5 (Sakaguchi et al., 1985). No obstant, quan es van estudiar els ratolins $CD5^{-/-}$ es va observar un increment de Tregs al timus i a la perifèria (Ordoñez-Rueda et al., 2009), que a més quan es va avaluar la seva capacitat supressora es va veure que eren capaces d'inhibir la proliferació de cèl·lules naïve $CD4^{+}CD25^{-}$ amb tant o més eficàcia que les Treg $CD5^{+/+}$ (Dasu et al., 2008). En línia amb aquestes observacions, un estudi publicat recentment demostra que l'expressió de CD5 impedeix la formació de iTreg a la perifèria, ja que aparentment CD5 inhibeix el factor de transcripció mTOR, indispensable per a la generació de iTregs (Henderson et al., 2015).

Utilitzant el model de encefalomièlitis al·lèrgica experimental (EAE) induïda per MOG (*myelin oligodendrocyte glycoprotein*) per estudiar la capacitat de les DC per induir tolerància a la perifèria, Hawiger i col·laboradors van veure que les cèl·lules T de ratolins que havien estat

sensibilitzats prèviament amb MOG, havien adquirit tolerància i no s'activaven *in vivo* davant una segona estimulació amb l'autoantigen. Curiosament, van veure que la majoria de cèl·lules T havien adquirit un fenotip CD5^{hi} després de la primera administració de l'autoantigen, i que la tolerància adquirida es perdia quan l'experiment es repetia en ratolins CD5^{-/-} (Hawiger et al., 2004). Stamou i col·laboradors, pel seu costat, també van descriure que ratolins transgènics expressant la nucleoproteïna com a autoantigen en baixes dosis i de manera crònica, i per tant forçant el sistema immune a generar tolerància cap a ella, induïen les seves cèl·lules T a adquirir un fenotip CD5^{hi} que les convertia en cèl·lules resistents a l'activació amb l'antigen (Stamou et al., 2003).

Per altra banda, la interacció CD5-CK2 es va demostrar que era necessària per al model de tolerància de la EAE descrit. A baixes dosis de l'autoantigen MOG, aquest model provoca un fenomen autoimmunitari semblant a la esclerosi múltiple en humans, no obstant a altes dosis o en segones administracions de MOG (Hawiger et al., 2004) la severitat de la malaltia es redueix considerablement degut a que s'indueix tolerància a la perifèria. Els autors van demostrar que mentre que en animals CD5^{+/+} s'indueix tolerància, en animals deficient per la molècula completa de CD5 (CD5^{-/-}) o la regió de CD5 d'unió a CK2 (CD5-CK2) continuaven provocant una reacció autoimmunitària (Sestero et al., 2012). Arrel d'aquestes observacions, els autors han suggerit que la interacció CD5-CK2 està implicada en la inducció de la tolerància.

Supervivència

CD5 també desenvolupa un paper important en la supervivència de cèl·lules T i B1a. En el cas de les cèl·lules T, es va veure *in vivo* que, al contrari del que s'esperava, els ratolins CD5^{-/-} cursaven amb un fenomen autoimmunitari d'EAE menys sever que els CD5^{+/+} (Axtell et al., 2004), i per altra banda que tot i que els ratolins CD5^{-/-} endarrerien significativament el creixement tumoral, passats els dies el tumor remetia igual que en els ratolins CD5^{+/+} (Tabbekh et al., 2011). Ambdós fenòmens es van explicar per una sobreactivació seguida d'apoptosi (*Activation Induced Cell Death*; AICD) de les cèl·lules T CD5^{-/-} (Axtell et al., 2004; Friedlein et al., 2007; Tabbekh et al., 2011), tot i que el mecanisme pel qual CD5 indueix la supervivència no està encara clar. No obstant, la cascada PI3K/Akt sembla estar involucrada en la supervivència de timòcits mitjançada per CD5, així com CK2. Aparentment, aquestes vies de senyalització induïrien l'expressió de molècules de supervivència (BCL-2 i BCL-XL) o inhibirien proteïnes proapoptòtiques (caspases i Bid) (Soldevila, Raman, and Lozano 2011). A més, recentment s'ha publicat que la Tyr429 del domini pseudo-ITAM també jugaria un paper rellevant en la inducció de supervivència a través de CD5 (Mier-Aguilar et al., 2015)

En el cas de les cèl·lules B, està descrit que CD5 protegeix de l'apoptosi estimulant la producció de IL-10 després de l'activació del BCR inhibint la mobilització de Calci que portaria a la mort cel·lular (Gary-Gouy et al., 2002). D'aquesta manera, el CD5 de membrana mantindria la supervivència i la homeòstasi de cèl·lules B1a que d'altra banda serien susceptibles a l'apoptosi induïda per activació cel·lular (Soldevila et al., 2011).

F. Paper de CD5 en Autoimmunitat

Degut a les seves propietats immunomoduladors, a CD5 també se l'ha relacionat amb fenòmens autoimmunitaris. El número de cèl·lules B1a CD5⁺, productores naturals d'anticossos polireactius, s'ha trobat incrementat en diverses patologies autoimmunes com l'artritis reumatoide, el lupus eritematós sistèmic, la diabetis dependent d'insulina, la tiroïditis de Grave o el síndrome d'Sjögren (Plater-Zyberk et al., 1985; Smith and Olson, 1990; Muñoz et al., 1991; Iwatani et al., 1989; Dauphinée et al., 1988), així com en la infecció pel virus de la hepatitis C (Zuckerman et al., 2002). Curiosament, també s'ha trobat incrementat una forma soluble de CD5 (sCD5) al sèrum de pacients amb síndrome d'Sjögren (Ramos-Casals et al., 2001). Tot i que aquesta forma soluble es troba també en baixes concentracions al sèrum d'individus sans, aparentment degut a una proteòlisis del CD5 després de l'activació cel·lular (Calvo et al., 1999), la seva funció encara es desconeix. Una hipòtesi que s'ha plantejat es que aquest sCD5 circulant interaccionaria amb el lligand natural de CD5 a l'organisme i actuaria com un *decoy receptor*, impeding d'aquesta manera la interacció de CD5 amb el seu lligand a la perifèria per regular la resposta immunitària, com s'ha demostrat recentment en un animal transgènic que expressa altres concentracions de sCD5 (Fenutría et al., 2014).

Per altra banda, també s'ha descrit que l'expressió de CD5 inhibeix la inducció de Treg en perifèria a través de l'activació del factor de transcripció mTOR (Henderson et al., 2015), el que per altra banda facilita la generació de cèl·lules T Th17, un subtipus cel·lular estretament relacionat amb l'aparició de fenòmens autoimmunitaris. Així, l'estimulació de cèl·lules T humanes amb CD5 induïx la generació de cèl·lules Th17 *in vitro* (de Wit et al., 2011), mecanisme aparentment mediat per la interacció CD5-CK2 (Sestero et al., 2012; McGuire et al., 2014).

G. Paper de CD5 en la resposta immunitària contra el càncer

En un estudi on es van aïllar cèl·lules CD8⁺ infiltrants de tumor (*tumour-infiltrating lymphocytes*; TILs) i cèl·lules de la sang d'un pacient amb càncer de pulmó, es van adonar que els TILs extrets del pulmó presentaven menors nivells de CD5 a la seva superfície que les cèl·lules extretes de la sang (Dorothee et al., 2005). De manera remarcable, l'entrada de calci i l'activitat citolítica dels TILs era molt superior en comparació amb els altres limfòcits. Aquestes dades es van confirmar per un costat quan els mateixos autors van demostrar que animals CD5^{-/-} tenien una capacitat antitumoral incrementada (Mami-Chouaib et al., 2010), així com en un model animal del nostre laboratori que expressa elevades quantitats de sCD5, bloquejant la unió de CD5 al seu lligand, i presenta un creixement tumoral més lent (Fenutría et al., 2014). No obstant, també s'ha vist que una reducció de CD5 compromet la supervivència cel·lular, ja que la incrementada activitat antitumoral en animals CD5^{-/-} es temporal degut a la conseqüent inducció de fenòmens d'AICD (Mami-Chouaib et al., 2010). Aquestes dades indicarien que, modulant la seva expressió de CD5, les cèl·lules T son capaces d'optimitzar la seva activitat antitumoral. Així, serà el balanç d'expressió entre poc CD5 i més eficàcia però més mortalitat, i

més CD5 amb menys reactivitat però més supervivència el que determinarà l'adequada resposta de la cèl·lula T.

Per altra banda, fa anys es va descriure que l'expressió de CD5 és característica de diversos tipus de leucèmies cròniques de cèl·lules B, el que l'ha convertit en un dels marcadors de diagnòstic de la malaltia (Matutes et al., 1994; Lydyard et al., 1999). Aquest fet s'explicaria per l'estreta relació entre l'expressió de CD5 i l'adquisició del fenotip de cèl·lula B-CLL leucèmica, ja que CD5 té un efecte en la supervivència de les cèl·lules B1 a través de la secreció autocrina de IL-10 i la inhibició de reguladors de l'apoptosi, entre d'altres, que les faria més resistents a la mort cel·lular (Gary-Gouy et al., 2002, 2007).

H. Polimorfismes genètics

L'existència de polimorfismes tant a la regió extracel·lular com citoplasmàtica de CD5 s'ha descrit en algunes espècies de mamífers (De Jager et al., 2009; McKenzie and Potter, 1979; Carnero-Montoro et al., 2012). Hi ha dues variants que es troben presents en alta freqüència en individus caucàsics: el polimorfisme d'un únic nucleòtid (SNP, *single nucleotide polymorphism*) rs2241002 que implica una substitució de Pro per Leu a la posició 224 del domini extracel·lular D2, i el SNP rs2229177 on el canvi es d'Ala a Val a la posició 471 just C-terminal respecte del motiu pseudo-ITAM. Curiosament, s'ha descrit que la substitució rs2229177 ha estat seleccionada per pressió evolutiva a Àsia i Amèrica, on la majoria d'individus presenten Val en comptes de l'Ala ancestral (**Fig. 1.14**). La raó per aquesta selecció és encara desconeguda,

però cal destacar que l'influència de CD5 en l'activació i proliferació limfocitària en individus portadors d'una o altre variant és significativament diferent. Els portadors de la variant Val471 presenten major activació de MAPK i secreció de citocines en cèl·lules T humanes o línies cel·lulars transfectades exposades a

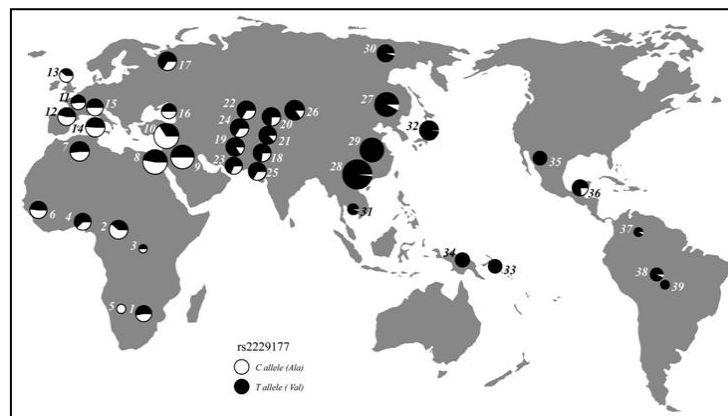


Figura 1.14. Distribució mundial del polimorfisme de CD5 rs2229177. Blanc: Al·lel C (Alanina). Negre: Al·lel T (Valina). Adaptat de Carnero-Montoro et al, 2012.

AcMos anti-CD5 (Carnero-Montoro et al., 2012), però en canvi mostren respostes limfoproliferatives induïdes per AcMos anti-CD3 inferiors als individus Ala471 (Cenit et al., 2014).

I. Paper de CD5 com receptor de patògens

Tot i no haver-se caracteritzat un lligand endogen clar per a CD5, sí que se li han descrit lligands exògens associats a patògens, com ho són el virus de la hepatitis C (Sarhan et al., 2012) i els β -glucans presents a la paret dels fongs (Vera et al., 2009). Utilitzant una forma

recombinant soluble de CD5 (rshCD5), el nostre laboratori va demostrar que CD5 no només podia unir-se sinó també agregar fongs patogènics (*Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*) i saprofítics (*Saccharomyces Pombe*), i que aquesta interacció tenia rellevància funcional ja que la unió de CD5 a β -glucans produïa activació de MAPK i alliberació de citocines. Per altra banda, també es va demostrar el potencial terapèutic de CD5, ja que una única administració de proteïna CD5 humana soluble recombinant (rshCD5) millorava significativament la supervivència de ratolins CD1 en un xoc sèptic induït per zymosan, un compost fúngic ric en β -glucans (Vera et al., 2009). Aquesta descoberta va posicionar CD5 com a potencial teràpia en futurs casos de sèpsi fúngica. No obstant, tot i que la soca CD1 es la més utilitzada per la indústria farmacèutica per a testar nous fàrmacs, mai s'ha demostrat si l'administració de rshCD5 a una altra soca de ratolí tindria el mateix efecte, ni tampoc quin és el rol que CD5 desenvolupa com a receptor de molècules fúngiques ni quines implicacions funcionals té aquesta interacció.

1.2.2.2 El receptor limfocitari CD6

CD6 és un receptor que té una alta homologia amb CD5, ja que comparteixen localització cromosòmica, estructura molecular i patró d'expressió tissular. No obstant, a diferència del que succeeix amb CD5, es tracta d'una molècula limfocitària encara relativament poc estudiada i no es disposa d'informació ben contrastada sobre el seu paper funcional *in vivo*. La manca de models *in vivo* posa en evidència aquest fet, ja que tots els experiments realitzats per a estudiar la funció d'aquest receptor s'han fet en condicions *in vitro*.

A. Estructura gènica

El gen CD6 es troba situat al cromosoma 11q13 (al cromosoma 9 en ratolí) i consta de 13 exons, ocupant una longitud de 48.7Kb a la seqüència d'ADN. Els primers 6 exons representen la part extracel·lular, i corresponen els exons 3-5 a cada un dels tres dominis SRCR. La seva regió transmembrana està codificada per l'exó 7, i els exons del 8 al 13 codifiquen per la seva cua citoplasmàtica (Tsuge et al., 1985; Bowen et al., 1997). A dia d'avui, s'ha descrit que l'expressió del gen *CD6* està sota el control transcripcional dels factors de transcripció RUNX1, RUNX3 i Ets1 (Arman et al., 2009), tot i que les dades indiquen que també hi ha altres factors implicats encara per determinar.

B. Expressió tissular

Com s'ha mencionat prèviament, CD6 comparteix expressió amb CD5 a la membrana de timòcits, cèl·lules T madures i cèl·lules B1a (Martínez et al., 2011). De manera similar a CD5, s'ha vist que l'expressió de CD6 s'incrementa durant la maduració tímica, i que aquest increment és especialment marcat en cèl·lules DP entrant en selecció positiva tal i com es mostra per la co-expressió de CD6 i el marcador de selecció tímica CD69 tant en timòcits humans com de ratolí (Singer et al., 2002). Com CD5, la seva expressió és màxima en cèl·lules CD4⁺SP del timus, seguida per les cèl·lules CD8⁺SP.

Apart d'aquestes cèl·lules, també s'ha descrit la presència de CD6 a la membrana del subtipus de cèl·lules NK més abundants a la perifèria ($CD56^{dim}CD16^+$), el qual estaria directament involucrat en la secreció de certes citocines i quimiocines, però no en l'alliberació de grànuls citolítics (Braun et al., 2011). A diferència de CD5, l'expressió de CD6 també s'ha descrit en determinats progenitors hematopoètics, concretament a la superfície de cèl·lules $CD34^+$ $\rho 123^{med/lo}$ presents a la medul·la òssia i la sang humanes (Cortés et al., 1999). Un altre estudi demostra que a més CD6 i el seu lligand CD166/ALCAM també es troben expressats en determinades regions del sistema nerviós, especialment en nervis del sistema simpàtic i parasimpàtic (Konno et al., 2001).

Cal destacar que, al contrari que CD5, l'expressió de CD6 no s'ha associat a cèl·lules amb fenotip regulador sinó més aviat al contrari, ja que s'ha descrit que les cèl·lules Treg humanes tindrien un fenotip $CD6^{lo/neg}$ (Garcia Santana et al., 2014).

C. Lligands

Tot i disposar de menys informació que CD5, a diferència d'aquest últim, a CD6 sí se li ha assignat un lligand ben caracteritzat i validat per diferents grups. Es tracta de la molècula d'adhesió CD166/ALCAM (*Activated Leucocyte Adhesion Molecule*), una proteïna de la superfamília de les immunoglobulines expressada a la membrana d'una gran varietat de tipus cel·lulars com són cèl·lules mononuclears de la melsa, nòduls limfàtics i amígdala, hepatòcits, cèl·lules epitelials de diferents òrgans inclòs el timus (TECs), medul·la òssia, neurones i microglia, macròfags, DC, cèl·lules endotelials, limfòcits T i B activats, etc (Bowen et al., 1995; Whitney et al., 1995a; Konno et al., 2001; Patel et al., 1995). La interacció entre ambdues proteïnes es dona a través del domini extracel·lular de CD6 més proper a la membrana (D3) i el domini més amino-terminal de CD166/ALCAM (Whitney et al., 1995a). Recentment s'ha cristal·litzat l'estructura del complex format pels tres dominis extracel·lulars de CD6 amb els dos dominis N-terminal d'ALCAM i s'ha pogut determinar que és a través dels residus 43-364 que es dona la interacció tant en humans, ratolí com rata (Chappell et al., 2015) (**Fig. 1.15**)

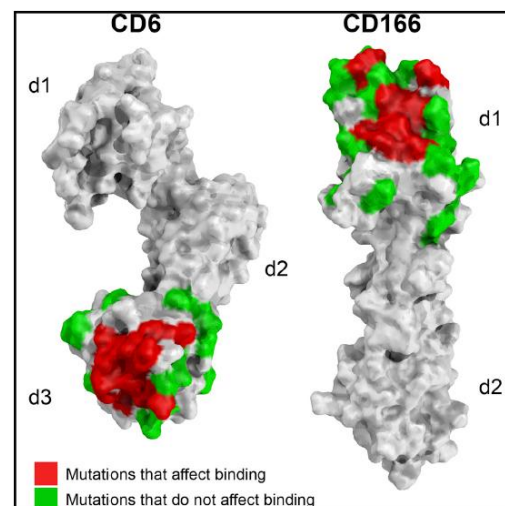


Figura 1.15. Estructura tridimensional de CD6 i el seu lligand CD166/ALCAM. Chappell P et al. 2015

D. Regió citoplasmàtica

La cua citoplasmàtica de CD6 és molt més llarga en comparació amb la de CD5, ja que consta de 244 aminoàcids en humans i 243 en ratolí. Els primers experiments estimulants amb AcMos anti-CD3, sol o en combinació amb anti-CD2 o anti-CD4, van revelar que la cua citoplasmàtica

de CD6 es fosforilava en resposta a aquests estímuls (Wee et al., 1993), i que l'estimulació conjunta amb anti-CD3 i anti-CD6 donava lloc a un increment en la proliferació cel·lular (Osorio et al., 1994, 1998). No obstant, les primeres interaccions proteiques amb la regió intracel·lular de CD6 no es van descriure fins al 2003 quan experiments de co-precipitació amb CD6 de rata van demostrar que aquest s'unia a diferents famílies de Tyr cinases com les Src-cinases (Lck i Fyn), les Syk (ZAP-70) i les Tec cinases (Itk) (Castro et al., 2003), el qual explicava els fenòmens anteriors de fosforilació de CD6 en resposta a l'activació de la cèl·lula T (Wee et al., 1993). Estudis posteriors van demostrar també l'activació de Erk1/2 i p38 MAPK en cèl·lules T induïda per diferents AcMos anti-CD6, la qual era dependent de l'activació de tirosina cinases Lck i Fyn (Ibanez et al., 2006).

La regió intracel·lular de CD6 no només conté residus Tyr susceptibles de ser fosforilats, sinó que també presenta residus Ser i Thr que poden ser substrat de Ser/Thr cinases com la PKC i la CK2, en concret dos agrupacions (*clusters*) d'aquest tipus de residus s'ha vist recentment que són necessaris també per l'activació de MAPKs induïda via lligament de CD6 (Bonet et al., 2013).

Les conseqüències resultants de la fosforilació de residus Tyr o Ser/Thr són el reclutament de proteïnes transmissores de senyals intracel·lulars. No obstant, tot i les possibilitats que ofereix la llarga cua citoplasmàtica de CD6, a dia d'avui poques proteïnes han estat descrites que interactuïn directament amb CD6. Per un costat, i tot ser independent de fosforilació, la proteïna adaptadora Syntenin-1 sembla que s'uniria a CD6 per, aparentment, encaixar aquest al

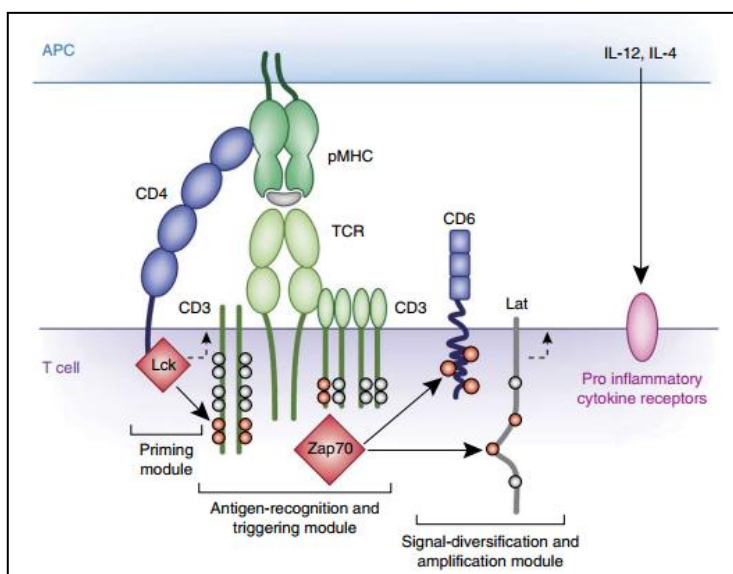


Figura 1.16. CD6 a la membrana cel·lular. Malissen B et al, 2014.

citoesquelet durant la formació de la SI (Gimferrer et al., 2005). Per altra banda també es va descriure la unió de CD6 a la proteïna activadora SLP-76 (Hassan et al., 2006), la qual té una gran rellevància en l'activació T donat que al ser reclutada per ZAP-70 formarà el complex d'activació amb LAT i PLCγ conegut com a LAT *signalosome*, encarregat d'iniciar la cascada de senyalització a través de MAPK i l'alliberació de calci

(Morris and Allen, 2012). Els autors d'aquest article van suggerir que la unió de SLP-76 a CD6 probablement conduiria CD6 a formar part de la cascada de senyalització ZAP-70/SLP-76/LAT, no obstant un article publicat recentment on es mostra l'interactoma de ZAP-70, SLP-76 i LAT, mostra que inesperadament CD6 actuaria com a transmissor de senyals d'activació

independent de LAT, i que això explicaria perquè ratolins deficientes per LAT presenten certs nivells d'activació que porten a fenòmens autoimmunitaris (**Fig. 1.16**) (Roncagalli et al., 2010, 2014).

E. Isoformes de CD6

A dia d'avui, s'han descrit 5 isoformes de CD6 generades per processament o *splicing* alternatiu de l'RNAm que impliquen canvis en la seva cua citoplasmàtica (Robinson et al., 1995; Bowen et al., 1997). Es van observar diferències entre elles en el patró de fosforilació de tirosines associada a l'estimulació amb anti-CD3, però no en canvi en l'alliberació de calci a conseqüència de lligar CD3 i CD6 (Kobarg et al., 1997).

Per altra banda també s'ha descrit una variant on no es transcriu l'exó 5, el qual genera una forma de CD6 mancada del domini SRCR-D3 d'unió a CD166/ALCAM (CD6 Δ d3) (Castro et al., 2007). Els autors remarquen que AcMos anti-CD3 més anti-CD6, però no anti-CD3 sol, indueixen la generació d'aquesta variant. Com que aparentment el domini D3 de CD6 es necessari per la localització d'aquest a la SI (Oliveira et al., 2011) postulen que la variant completa de CD6 seria necessària per uns primers contactes, però que un cop CD6 lligat i la cèl·lula T activada portaria a un mecanisme de *feed-back* negatiu on es transcriuria llavors la variant CD6 Δ d3, la qual mantindria la funció de la seva cua citoplasmàtica però no la seva capacitat d'unir-se a CD166/ALCAM a la membrana cel·lular.

F. Funcions

Tot i que el rol últim de CD6 en la resposta immunitària encara està per determinar, alguns estudis publicats en condicions *in vitro* han suggerit o establert alguns aspectes funcionals on CD6 podria estar involucrat.

Modulació de l'activació de cèl·lules T

La descoberta a principis dels anys 90 que davant una estimulació de cèl·lules T humanes amb AcMos anti-CD3 es fosforilaven tirosines de la cua citoplasmàtica de CD6 va indicar que aquest últim podia estar involucrat en l'activació induïda pel TCR, com es va demostrar posteriorment co-estimulant amb AcMos anti-CD6 i veient com aquest potenciava la senyal del TCR. Més tard estudis de co-immunoprecipitació van revelar que CD6 co-precipita amb el TCR i co-localitza amb ell al centre de la SI durant l'activació cel·lular on es donarà la seva interacció amb CD166/ALCAM (Gimferrer et al., 2004).

La unió de CD6 a CD166/ALCAM ha resultat tenir una gran rellevància per a la proliferació de les cèl·lules T induïda per APCs, com ho demostren diversos estudis que han abordat aquest aspecte a través del bloqueig d'aquesta unió. En un article on es tracten limfòcits de sang humana amb AcMos anti-CD3, l'addició d'una forma soluble de CD6 humà (rshCD6) al cultiu provoca una disminució de la proliferació d'un 40-50% (Gimferrer et al., 2004). També s'ha descrit que les Galectines 1 i 3, de la família de lectines, tenen la capacitat d'unir-se per una banda a CD6 i per altra també a CD166/ALCAM, i que en un cultiu amb cèl·lules T humanes la

presència d'aquestes inhibeix la proliferació induïda per APC carregades amb superantigen SEB (*Staphylococcus aureus* Enterotoxin B) (Escoda-Ferran et al., 2014). Per altra banda, Zimmerman i col·laboradors també van demostrar que la presència d'AcMos anti-CD6 o de la proteïna soluble CD166/ALCAM-Fc disminuïen de manera contundent la proliferació de cèl·lules T humanes estimulades amb DC carregades amb el superantigen SEB, i que a més la interacció entre CD6-CD166/ALCAM no només era important en els primers contactes, sinó també en una resposta que s'allargava dies (Zimmerman et al., 2006). No obstant, una revisió publicada recentment sobre CD6 destaca un punt rellevant de l'anterior estudi: tot i que la disminució de la proliferació va ser significativa en totes les condicions, la magnitud no va ser la mateixa. Així, els lligands que s'unien directament a CD6 (AcMos no bloquejants anti-CD6 o la proteïna recombinant ALCAM) abolien completament la proliferació, mentre que els que s'unien a ALCAM (AcMos anti-ALCAM o la proteïna rshCD6) la disminuïen en un 50-60% (Santos et al., 2015). Aparentment, doncs, la magnitud en la inhibició de la proliferació no és la mateixa si el lligand interacciona amb CD6 o no.

El conjunt de publicacions analitzades fins el moment posen de manifest el rol co-estimulador de CD6 en l'activació de les cèl·lules T. Tot i això, curiosament en el mateix article on es descriu per primer cop la unió de la proteïna activadora SLP-76 a CD6 (Hassan et al., 2006), també s'observen uns resultats inesperats pel que fa a l'acció moduladora de CD6, tal i com senyala la mateixa revisió mencionada anteriorment (Santos et al., 2015). En un experiment utilitzant hibridomes mancats de CD6 i transfectats amb formes silvestres (*wild-type*, WT) o mutades de CD6, es va veure que aquests últims secretaven més IL-2 en resposta al contacte amb APC que cèl·lules transfectades amb la proteïna CD6 silvestre. Tot i que l'explicació aparent va ser l'impediment de la unió de SLP-76 a CD6, inesperadament els hibridomes que no s'havien transfectat i no presentaven CD6 van ser els que més IL-2 van secretar en condicions subòptimes de ratios T:APC, inclús més que els propis CD6 WT (Hassan et al., 2006). Així, aparentment, en determinades condicions l'absència de CD6 pot comportar una secreció major d'IL-2 al contacte amb APCs.

Va ser el grup d'Alex Carmo qui va aportar també evidències a favor de que CD6 actuaria com a modulador negatiu i no com a co-estimulador de l'activació. En experiments amb cèl·lules T humanes transfectades amb CD6 de rata van veure que les cèl·lules CD6^{hi} alliberaven menys Ca²⁺ intracel·lular que les CD6^{lo} quan s'activaven (Oliveira et al., 2011). A més, aparentment, aquest efecte era independent de la presència de CD6 al centre de la SI, i també independent de la unió a CD166/ALCAM tal i com es va demostrar transfectant amb una variant sense el domini 3 d'unió a CD166/ALCAM (CD6 Δ d3) i observant que aquesta continuava inhibint l'alliberació de Ca²⁺. La publicació d'aquest article, doncs, ha posat en dubte el rol co-estimulador de CD6 i encara esta per veure si CD6 en un context *in vivo* actuaria com co-estimulador, com a inhibidor, o amb una funció dual depenent de les circumstàncies i l'entorn.

Maduració de cèl·lules T

Un únic estudi ha suggerit que CD6 podria estar involucrat en la maduració de les cèl·lules T al timus, ja que els autors van observar que l'expressió de CD6 augmentava al llarg dels estadis maduratius, sent mínima la expressió a DN i màxima a CD4⁺SP, i en menor mesura, a les cèl·lules CD8⁺SP (Singer et al., 2002). Tot i que aquesta observació no seria suficient per arribar a tal hipòtesi, els autors destaquen que CD6 es sobreexpressa en cèl·lules DP CD69⁺ entrant en selecció positiva, i que l'expressió de CD6 també es troba elevada en timòcits resistents a l'apoptosi. No obstant, si CD6 desenvolupa un rol important durant un procés de tanta rellevància com la selecció dels timòcits encara queda per demostrar.

Supervivència

El rol de CD6 en la supervivència cel·lular s'ha descrit mitjançant diversos procediments experimentals. Per un costat, l'expressió de CD6 es troba incrementada en timòcits resistents a l'apoptosi *in vitro* (Singer et al., 2002), i per altra banda l'apoptosi induïda en cèl·lules B leucèmiques a través de l'estimulació amb AcMos anti-IgM es rescata amb la presència de AcMos anti-CD6 degut a la disminució de la proteïna pro-apoptòtica BAX (Osorio et al., 1997). Un altre estudi demostra que les galectines són capaces d'induir apoptosi en cèl·lules T en contacte amb APC, però que aquesta apoptosi s'inhibeix quan CD6 es troba present i amb la seva cua citoplasmàtica íntegra (Escoda-Ferran et al., 2014).

Els mecanismes pels quals CD6 podria activar molècules antiapoptòtiques encara es desconeix, i tot i que CD6 presenta serines/treonines susceptibles de ser el substrat de la proteïna CK2, i aquesta podria estar involucrada com passa amb CD5 (Bonet et al., 2013; Axtell et al., 2006), es necessita més recerca per confirmar si aquesta o altres proteïnes estarien involucrades.

G. Paper de CD6 en Autoimmunitat

Degut al rol indiscutible que CD6 té en la modulació de l'activació (tant si finalment es reconeix com a co-estimulador o inhibidor), no és d'estranyar que se'l trobi relacionat amb alguns fenòmens autoimmunitaris.

La descoberta de la seva estreta relació amb la malaltia de l'esclerosi múltiple (EM) ha estat probablement una de les revelacions més rellevant. Un primer estudi ja va senyalar que CD166/ALCAM es troba expressat a la barrera hematoencefàlica i que és aparentment responsable de la migració de leucòcits de la sang a teixits nerviosos, ja que el bloqueig de CD166/ALCAM impedia el transvasament de limfòcits CD4⁺ en un model murí de EAE, endarreriria l'aparició de la malaltia i reduïa els símptomes clínics (Cayrol et al., 2008). Tot i que no es va apuntar directament a CD6 en aquest estudi, un any més tard es van publicar els resultats d'un treball on es van analitzar els genomes d'un alt nombre de pacients amb EM i controls sans, i on es van identificar tres gens de susceptibilitat per a la malaltia, entre ells CD6 (De Jager et al., 2009). L'al·lel de risc per CD6 consisteix en un canvi d'un únic nucleòtid (C a G) a l'intró 1 (rs17824933), el que provoca que en pacients portadors es redueixi la utilització

de l'exó 5 codificant pel domini 3 d'unió a CD166/ALCAM, i que per tant augmenti la proporció de l'isoforma CD6 Δ d3 (Kofler et al., 2011). S'ha vist que la proliferació en cèl·lules portadores de la mutació es troba reduïda davant l'activació amb AcMos anti-CD3 i anti-CD28, proliferació que encara es redueix més quan s'afegeix anti-CD6 al cultiu. Curiosament, les cèl·lules amb l'al·lel susceptible de generar autoimmunitat són aparentment menys reactives que les cèl·lules de pacients sans. Un altre estudi realitzat a la població basca ha identificat un haplotip format per dos SNP al D2 de CD6 (rs11230563, R225W; rs2074225, A257V) que també s'associa a EM i que produeix alteracions en l'expressió de CD6 a diferents tipus limfocitaris. Concretament, els individus portadors de l'haplotip protector (R-A) presentaven una major expressió de CD6 en limfòcits CD4⁺ naïve, CD8⁺ naïve, CD4⁺ i CD8⁺ T_{CM} i NKT (Swaminathan et al., 2013).

Per altra banda, en un estudi en pacients d'artritis reumatoide que havien estat tractats amb TNF α a Dinamarca, es va detectar una associació entre una inserció de 19 parells de bases a l'últim intró de CD6 i una millor resposta al tractament (Krintel et al., 2012). Al igual que passa amb CD5, també es van detectar nivells de CD6 soluble (sCD6) al sèrum de pacients amb Síndrome d'Sjögren (Ramos-Casals et al., 2001).

El primer AcMo anti-CD6 (T-12) enfocat a teràpia es va utilitzar als anys 80 per depleccionar cèl·lules T i evitar la reacció de rebuig en models de transplantament d'òrgans (*Graft versus host disease*) (Reinherz et al., 1982). Tot i els resultats preliminars positius, no es va aconseguir l'efecte desitjat degut a la reacció de cèl·lules T negatives per CD6 presents a la sang i que no eren eliminades a través de l'anticòs. Per raons similars un estudi clínic en pacients amb EM tractats amb el AcMo T-12 va fracassar, ja que tot i la disminució de cèl·lules CD6⁺ durant els primers dies, la reacció de les cèl·lules CD6⁻ i la posterior reaparició de cèl·lules CD6⁺ va portar a parar l'estudi sense una conclusió definitiva (Hafler et al., 1986). No obstant, actualment hi ha alguns tractaments sota investigació clínic amb un nou anticòs humanitzat contra el domini D1 de CD6 (T1h o Itolizumab) enfocats a pacients amb Artritis Reumatoide (AR) on sembla que els seus efectes són més prometedors. Un estudi preliminar amb pacients amb AR va demostrar que l'Itolizumab en baixes dosis (0.4mg/kg) contribuïa a una millora clínic del 20% en 11 dels 13 pacients (ACR \geq 20; *American College of Rheumatology*), i fins a un 70% en 3 de 11 pacients (ACR \geq 70) (Rodriguez et al., 2012). En un estudi clínic més gran de fase II, es va combinar l'administració de Itolizumab amb Metotrexat, i tot i que es va observar que la majoria de pacients presentaven efectes adversos lleus derivats de l'administració de l'anticòs (principalment febre i tos), a les 12 setmanes es va detectar que el 50% dels pacients presentaven una ACR \geq 20 (Chopra et al., 2015). Donats els resultats esperançadors que es deriven de l'administració de Itolizumab, ja s'han iniciat estudis en pacients amb psoriasis i s'ha proposat d'administrar-ho també en pacients amb Síndrome d'Sjögren (Krupashankar et al., 2014; Le Dantec et al., 2013). Les primeres dades en pacients amb psoriasis han demostrat una certa eficàcia del tractament, tot i que encara són necessaris més estudis per optimitzar la dosi o una possible teràpia combinada amb altres fàrmacs.

Cal destacar que tot i les perspectives que aporta CD6 com a diana terapèutica, actualment no es coneix com aquests AcMos modulen l'activitat d'aquest receptor ni com estan influenciant la resposta immunitària. La desconeixença sobre el rol biològic de CD6 dificulta optimitzar les teràpies actuals utilitzant una sòlida base teòrica, al igual que limita les opcions de generar nous AcMos amb diferent espectre d'acció per manca d'una hipòtesi de treball. És per això que, ara més que mai, és necessària la generació de models *in vivo* per a poder determinar la funció de CD6 en el context de la resposta immunitària.

H. Paper de CD6 en la resposta immunitària contra el càncer

Un dels primers tipus cel·lulars on es va descriure CD6 gràcies a l'anticòs T12.1 va ser, juntament amb les cèl·lules T, en cèl·lules B de leucèmies limfocítiques cròniques (Kamoun et al., 1981). I és que CD6 s'ha convertit en un marcador d'aquest tipus de leucèmies (excepte en aquelles que comporten una deleció al cromosoma 11 on s'expressa CD6 (Sembries et al., 1999)), tot i que la seva expressió no es correlacioni amb la progressió de la malaltia. De fet, CD6 protegeix aquestes cèl·lules B de la mort induïda per activació, tal i com es va veure al estimular-les en cultiu amb AcMos anti-IgM i anti-CD6 (Osorio et al., 1997).

S'ha descrit un primer estudi exploratori amb Itolizumab en pacients amb leucèmies limfocítiques cròniques B (Izquierdo Cano et al., 2014). Tot i els resultats esperançadors que es deriven de l'administració de 12 dosis de l'anticòs amb lleus efectes secundaris i certa millora clínica, es necessiten dades més sòlides amb més individus i dosis per poder determinar si l'Itolizumab té realment un efecte terapèutic rellevant en aquests pacients.

I. Paper de CD6 com receptor de patògens

De manera similar com s'ha descrit a CD5, CD6 també és capaç d'unir determinats PAMPs a través dels seus dominis extracel·lulars. Estudis del nostre laboratori han demostrat que la proteïna soluble humana CD6 (rshCD6) té la capacitat d'unir i agregar bacteries tant Gram positives (*Staphylococcus aureus*) com negatives (*Escherichia Coli*), efecte per altra banda no observat en CD5 (Sarrias et al., 2007). A més, es va determinar que la unió de rshCD6 al LPS estava dins el mateix marge d'afinitat que CD14, el principal receptor de LPS a cèl·lules mieloides (macròfags), i que la unió del LPS al CD6 de membrana induïa l'activació de la MAPK Erk1/2. Amb una important rellevància a nivell terapèutic, es va veure que una única administració de rshCD6 a ratolins amb un xoc sèptic induït per LPS aconseguia augmentar la supervivència dels animals així com reduir els nivells de citocines inflamatòries en sang.

2. Hipòtesi de treball i Objectius

L'objectiu general de la present Tesi és aprofundir en el paper funcional que juguen dos receptors limfocitaris altament homòlegs, CD5 i CD6, en les respostes immunitàries amb la finalitat d'entreveure les bases moleculars de les possibles aplicacions d'aquestes molècules com a dianes terapèutiques en processos patològics d'origen immunitari.

La base teòrica per a tal objectiu ve donada pel fet que ambdues són glicoproteïnes transmembrana transductores de senyals intracel·lulars i que estan físicament associades al receptor clonotípic específic d'antigen present als limfòcits T (TCR) i B1a (BCR). Per tant, estan bé posicionades i adaptades per modular les senyals d'activació i diferenciació generades per aquests receptors d'antigen. Aquesta idea ha estat validada en el cas de CD5 gràcies a l'estudi de models animals genèticament modificats (CD5 *knockouts*), els quals demostren que un receptor inicialment considerat com a co-estimulador a partir de dades experimentals obtingudes *in vitro* (mitjançant principalment l'ús d'AcMos) és en realitat un modulador negatiu o inhibidor del TCR/BCR, i per tant un "*immune check point*" de l'activació limfocitària. En el cas de CD6, a data d'avui es disposa d'informació *in vitro* principalment a través de l'ús d'AcMos ja que fins al moment no han estat disponibles models animals que permetin establir d'una manera definitiva i inequívoca el seu paper funcional *in vivo*. La major part de les dades *in vitro* reportades fins al moment li atribueixen un paper co-estimulador, tot i que estudis recents aporten dades en sentit contrari. Per resoldre aquesta i d'altres qüestions el nostre grup ha desenvolupat, dintre del marc del projecte col·laboratiu internacional KOMP (*Knockout Mouse Project*), i per primera vegada, una línia de ratolins genèticament modificats deficients per a l'expressió de CD6 (*knockout*).

Els objectius específics del present treball de Tesi es concreten en:

- Caracteritzar fenotípicament i funcionalment la nova línia de ratolins deficients per a CD6 (*knockout*) tant en condicions normals como d'agressió biològica
- Establir analogies fenotípiques i funcionals entre els nous ratolins CD6 *knockout* i els prèviament descrits CD5 *knockouts*.

3. Materials i mètodes

3.1 Ratolins

Els ratolins silvestres o *wild-type* (WT) CD1 i C57BL/6 (Charles River) van estar en aclimatació durant dues setmanes a l'estabulari després de la seva arribada. Els ratolins CD5^{-/-} en fons C57BL/6 van ser proveïts pel Dr. Chander Raman (Departament de Medicina y Microbiologia, Universitat d'Alabama, Birmingham, AL) (Tarakhovsky et al., 1994). En tots els experiments, es van utilitzar animals CD5^{+/-} germans obtinguts de creuaments CD5^{+/-} amb CD5^{+/-}. Els ratolins TCR transgènics OT-I (Clarke et al., 2000) i Marilyn (Scott et al., 2000) en fons C57BL/6 es van creuar amb animals CD6^{-/-} al CIPHE (*Centre d'Immunophénomique*; Marsella, França) i la comprovació del seu genotip es va fer per PCR. La soca OT-I produeix cèl·lules T CD8⁺ amb un únic tipus de TCR restringit per MHC de classe-I i específic per l'ovoal·búmina, i la soca Marilyn cèl·lules T CD4⁺ amb un TCR restringit per MHC classe-II i específic per l'antigen masculí HY. Tots els ratolins utilitzats pels diferents experiments tenien una edat compresa entre 8-12 setmanes.

3.1.1 Generació d'un animal deficient en CD6

La soca de ratolins C57BL/6 deficient per a CD6 (CD6^{-/-}) va ser generada en el marc del *Knock-out Mouse Project Repository* (KOMP; número de projecte CSD69138). La línia de cèl·lules mare embrionàries JM8A (Embrionic Stem cell; cèl·lules ES) utilitzades per la generació dels ratolins deriva de la soca de ratolí C57BL/6, però l'al·lel Agouti s'ha modificat per corregir la mutació que els dona el color negre característic (a/a). Per tant, els ratolins generats a partir d'aquestes cèl·lules seran de color marró i heterozigots per l'al·lel Agouti (A/a en comptes de a/a).

Per a la generació de ratolins CD6^{-/-} es va dissenyar en primer lloc una construcció gènica que contenia les seqüències 5' del gen CD6 corresponents als exons 1 i 2, i les seqüències 3' corresponents als exons del 7 al 9. Entre aquestes seqüències i substituint els exons del 3 al 6, es va introduir (entre d'altres) un gen reporter (*lacZ*) i un marcador de selecció (neomicina). Per mitjà d'electroporació, es va introduir la mencionada construcció a les cèl·lules JM8A per a que s'integrés en la regió homòloga del DNA de les cèl·lules ES JM8A per recombinació homòloga. Passats uns dies, es va afegir neomicina al medi per seleccionar les cèl·lules resistents, i per tant aquelles que havien integrat satisfactòriament la construcció portadora de la mutació (deleció i inserció) al gen CD6. Es va fer un anàlisi per PCR amb primers *forward* (5'-ACGCTTGAGAAATAATGCAGGAAGGC-3') i *reverse* (5'-CACACCTCCCCCTGAACCTGAAA-3') per comprovar que els clons de cèl·lules ES JM8A resistents a la neomicina efectivament fossin portadores del gen CD6 mutat, i a continuació es va microinjectar un d'ells en blastocists de 6 dies provinents de femelles C57BL/6 (a/a). Després de la microinjecció, de 6 a 7 blastocists van ser transferits a una femella per a la seva gestació. Com que les cèl·lules ES

portadores de la mutació al gen CD6 no van ser introduïdes a nivell germinal, la seva contribució al teixit dels blastocists hostes serà parcial, i com a resultat les cries seran quimeres. El percentatge de quimerisme es pot determinar en funció del color del pèl, marró i negre. Per aconseguir un animal on la mutació es transmeti des de la línia germinal, el següent pas va ser creuar els mascles quimeres amb femelles C57BL/6N (a/a). En aquest punt es van seleccionar les cries tant marrons com negres i es va fer un genotipat per PCR. La clona ES Cd6_B01 va produir una femella heterozigota, la qual es va creuar amb un mascle C57BL/6 i va donar lloc a dues cries heterozigotes per CD6 (CD6^{+/-}), un mascle i una femella que van ser enviats a l'estabulari *specific-pathogen-free* (SPF) de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona per entrecreuar-se entre si i iniciar la colònia. Les cries resultants d'aquest creuament (F₁) podien ser CD6^{+/+}, CD6^{+/-} o CD6^{-/-}. Un cop analitzada la F₁ (veure a continuació), es van agafar per un costat mascles i femelles CD6^{+/+} i es van posar en creuament, i per l'altra, mascles i femelles CD6^{-/-} per a generar una colònia de ratolins CD6^{-/-} i de germans CD6^{+/+}, respectivament.

3.1.2 Genotipat d'animals *knock-out* i disseny de creuaments

Per determinar el genotip dels animals CD5^{-/-} i CD6^{-/-}, es va extraure sang de les cries al moment del deslletament (21 dies) a través de la vena mandibular i, posteriorment a una lisis d'eritròcits (*RBC lysis buffer*, eBioscience), es va rentar amb solució de rentat (veure següent apartat) i es va bloquejar durant 20 min (veure següent apartat). A continuació es va fer un marcatge amb anticossos anti-CD3 i anti-CD5/anti-CD6 conjugats amb diferents fluorocroms durant 20 min a 4°C, es va fer un rentat i es van llegir les mostres amb un citòmetre FACS Canto II. El subseqüent anàlisi es va realitzar amb el software FlowJo v8.7. Es va gatejar en cèl·lules CD3⁺, i l'absència de CD6 en una mostra control sense anticòs (FMO, *Fluorescence Minus One*) es va utilitzar com a criteri per a la selecció d'animals CD6^{-/-} portadors de la delecció en ambdós al·lels. Per a diferenciar entre animals CD6^{+/+} i CD6^{+/-}, es va tenir en compte la mitjana de fluorescència (*mean fluorescence intensity*; MFI) de CD6. Utilitzant un animal C57BL/6 com a control, els animals amb una fluorescència similar o igual al animal control es van considerar CD6^{+/+}, i els animals amb una MFI d'aproximadament la meitat es van considerar CD6^{+/-}.

3.2 Citometria de flux

3.2.1 Anticossos

Els clons i la procedència dels AcMos utilitzats per l'anàlisi per citometria de l'expressió dels diferents marcadors limfocitaris i leucocitaris al llarg d'aquesta tesi van ser els següents: CD5 (53-7.3), CD4 (RM4-5), CD8α (53-6.7), CD24 (M1/69), TCR-Vα2 (B20.1TCR-Vβ6 (RR4-7), TCR-Vβ6 (RR4-7), TCRγ (GL-3) i TCRβ (H57-597), CD45.1 (A20), CD45.2 (104) i c-kit/CD117 (2B8) de BD Biosciences; CD62L (MEL-14), CD44 (IM7), CD69 (H1.2F3), CD3 (145.2C11), FoxP3 (3G3), de TONBO Bioscience; CD25 (PC61.5), CD19 (6D5), CD161 (PK136), CD6

(OX129), CD34 (MEC14.7), Sca-1 (E13-161.7), FcγRII/III (93) i CD135 (A2F10) de BioLegend; and Nur77 (12.14) de eBioscience. Aquests AcMos van ser utilitzats conjugats a diferents fluorocroms (veure Taula II) per facilitar l'anàlisi simultani de diferents marcadors cel·lulars. La viabilitat es va mesurar utilitzant una sonda de viabilitat violeta o vermella (LIVE/DEAD Viability, Life Technologies).

3.2.2 Estudi de poblacions limfocitàries en ratolins CD6^{-/-}

Per al fenotipat i caracterització de les poblacions dels ratolins CD6^{-/-} es van estudiar els principals òrgans limfoides tant primaris (timus, moll d'os) com secundaris (melsa i nòduls limfàtics inguinals, axil·lars i braquials). Es van recollir els òrgans en tampó fosfat salí (*phosphate buffered solution*; PBS) enriquit amb sèrum boví fetal (*fetal bovine serum*; FBS) al 2-5%, i en el cas de la melsa es va tractar durant 30 min a 37°C amb col·lagenasa (1mg/mL; Roche) i DNAsa (0.1mg/mL; Roche). A continuació, es van disgregar les melses i els nòduls limfàtics (LN) a través d'un filtre de 40 µm (*Cell strainer 40µm Nylon*, Biologix) amb l'ajut d'un èmbol de xeringa de 2 mL i es va recollir la suspensió cel·lular en falcons de 45 o 15 mL, respectivament. Es va rentar amb PBS/FBS 2-5% i resuspendre la melsa en 10 mL i els nòduls limfàtics en 2 mL. En el cas de la melsa, s'havia fet prèviament una lisi d'eritròcits amb 1 mL de *1x RBC lysis buffer* (eBioscience) durant 3 min. Per al comptatge cel·lular, es va fer una dilució 1/20 de les suspensions cel·lulars i es van afegir 10 µL en una càmera de comptatge de plàstic (KOVA 10 *chamber*, HYCOR Biomedical). Després del comptatge, es va ajustar i separar 1x10⁶ cèl·lules per al seu marcatge amb anticossos conjugats per citometria. Abans del marcatge, les cèl·lules es van incubar amb una solució de bloqueig amb l'anticòs anti-CD16/32 (2.4G2; TONBO Bioscience) en PBS/FBS 2% o bé amb PBS-FBS 10% per evitar unions inespecífiques, i posteriorment es va fer una incubació amb el mix corresponent d'anticossos durant 30 min a 4°C. Passat aquest temps, es van fer dos rentats i es va procedir a la lectura de les mostres al citòmetre.

El protocol de processament del timus va ser com el descrit, però degut a l'alta concentració cel·lular les suspensions cel·lulars es resuspenien en 15 mL de PBS/FBS 2% abans del comptatge.

En el cas de tincions intracel·lulars per a marcadors nuclears (FoxP3 i Nur77) es van seguir les instruccions donades pel fabricant dels kits utilitzats per a fixar i permeabilitzar les cèl·lules (*Transcription factor Fix/Perm*, TONBO Bioscience). Breument, a continuació del marcatge de superfície amb els corresponents AcMos es va rentar i es va fixar/permeabilitzar les cèl·lules amb la solució proveïda pel fabricant durant 30 min i es va rentar i bloquejar durant 15 min amb PBS-FBS 5%. Es va rentar i es va incubar l'anticòs intracel·lular durant 30-60 min.

Les principals combinacions (panels) d'AcMos i fluorocroms per a l'estudi de les poblacions d'origen limfoide a cadascun dels teixits dels ratolins CD6^{-/-} i CD6^{+/+} es mostren a la **Taula II**. Concretament es van utilitzar panels per analitzar els progenitors hematopoètics al moll d'os (panels 1-3), estudi que es va realitzar en col·laboració amb les Dres. Maria Luisa Gaspar i

Isabel Cortegano (Centro Nacional de Microbiología, Instituto Carlos III, Majadahonda, Madrid), així com les poblacions tímiques majoritàries i la selecció al timus (panel 4), les poblacions limfocitàries majoritàries en melsa i LN (panel 5), les poblacions NK, NKT, TCR $\gamma\delta$, TCR $\alpha\beta$ i Treg en tots tres òrgans (panels 6 i 7), i l'expressió de Nur77 (panel 8-9).

Taula II. Panels d'AcMos utilitzats per l'anàlisi dels ratolins CD6^{-/-}

Panel	Laser Violeta (405nm)	Laser Blau (488nm)				Laser Vermell (633 nm)	
	450/50 Pacific Blue	530/30 FITC	585/42 PE	670LP Percp-Cy5.5	780/60 PE-Cy7	660/20 APC	780/60 APC-Cy7
1	CD34	FcgRII/III	CD6		Sca-1	CD135	CD117
2	CD141		CD150		Sca-1		CD117
3	CD11b/Mac1	Gr1	F4/80		Sca-1		CD117
4	CD69	CD24	CD8	TCR β	CD5	CD4	Viabilitat
5	CD8	CD44	CD19	CD3	CD4	CD62L	Viabilitat
6	CD8	CD4	NK 1.1	TCR β	TCR γ	CD3	Viabilitat
7	Viabilitat	CD4	FoxP3	CD8	CD5	CD25	
8	Viabilitat	Nur77	CD6	CD8	CD5	CD4	
9	Viabilitat	Nur77	CD8	CD44	CD4	CD62L	

3.2.3 Estudi de poblacions limfocitàries en animals CD6^{-/-} i transgènics per diferents TCR

Aquests ratolins es van analitzar al laboratori dels Drs. Marie i Bernard Malissen al CIML (*Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy*, França). El procediment per tractar els òrgans va ser el mateix descrit més amunt, excepte que per al comptatge es va utilitzar un comptador automàtic (Nexcelom).

Les mostres es van llegir en un citòmetre FACS LSR II de quatre làsers, el que va permetre ampliar el panel d'anticossos i fluorocroms. Els anticossos conjugats en aquest cas van ser: Per al timus anti-CD5 BV421, anti-CD4 BV650, anti-CD8 BV711, anti-CD69 APC, anti-CD3 APC-Cy7, anti-CD24 PE-Cy5; i per la perifèria anti-CD5 BV421, anti-CD4 BV650, anti-CD8 BV711, anti-CD62L APC, anti-CD3 APC-Cy7, anti-CD19 PE-Cy5, anti-CD44 PE-Cy7. Per a determinar les cèl·lules portadores del transgen pel TCR es va utilitzar en el cas dels ratolins OT-I un anticòs anti-TCR-V α .2 FITC i en el cas dels ratolins Marilyn un anti-TCR-V β .6 PE.

3.3 Estudis immunoquímics

3.3.1 Anàlisi de l'alliberació de calci intracel·lular

3.3.1.1 Estudi de calci per microscòpia

La mesura dels nivells de Ca^{2+} intracel·lular utilitzant un microscopi de fluorescència es va fer en col·laboració amb el grup del Dr. Rubén Vicente (Universitat Pompeu Fabra, Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona). Es van carregar 8×10^5 cèl·lules de timus o melsa – processades com s'ha descrit anteriorment – amb $4,5 \mu\text{M}$ de Fura-2 AM (Molecular Probes) durant 30 min a 37°C en contacte amb làmines de vidre tractades prèviament amb poli-L-lisina per immobilitzar les cèl·lules. A continuació es van disposar les cèl·lules en un portaobjectes per la seva lectura al microscopi de fluorescència (Olympus IX70). Es va començar a enregistrar a $t=0$ i les cèl·lules van estar dos minuts en medi sense calci. Als 2 min es va afegir l'anticòs anti-CD3 (clona 145.2C11; BD Pharmingen) i es va seguir enregistant durant 10 min. Al minut 12 es va afegir un anticòs secundari anti-IgG de hàmsster armeni (Jackson Immune Research) i es va continuar enregistant durant 10 min més. Els increments de calci estan representats com el ratio de fluorescència emesa (a 510 nm) després de l'excitació a 340 i 380 nm, relatiu al ratio mesurat abans d'estimular les cèl·lules (Fura-2 ratio 340/380). Tots els experiments es van dur a terme a temperatura ambient (TA), i les cèl·lules es van mantenir en una solució que contenia 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.2 mM CaCl_2 , 0.5 mM MgCl_2 , 5 mM glucosa, 10 mM HEPES (300 mosmol/l) ajustada a pH 7.4 amb Tris.

3.3.1.2 Estudi de calci per citometria

La mesura per citometria de flux dels nivells de Ca^{2+} intracel·lular es va fer al laboratori dels Drs. Bernard i Marie Malissen (CIML, França). En primer lloc es van preparar 100 mL de solució salina de Hank (Hank's balanced salt solution; HBSS) lliure de Ca^{2+} i Mg^{2+} enriquit amb 0.1% BSA, 25mM HEPES, 1 mM Ca^{2+} i 1 mM Mg^{2+} . Es va deixar en agitació i es va cobrir la solució amb parafilm per evitar l'oxidació. A continuació es van processar els timus i melses com s'ha descrit prèviament, però després del contacte les cèl·lules es van resuspendre en HBSS i es van extraure 2.5×10^6 cèl·lules per l'assaig, les quals es van passar a tubs de citometria. Es va rentar afegint 2 mL d'HBSS i centrifugar a 1500 rpm, i es van resuspendre les cèl·lules en 250 μL que contenien 2.5 μL de Indo-1 (dilució 1/100 de l'stock 2.5mM; Molecular Probes). Es va incubar durant 20 min a 37°C . Després, es va rentar un altre cop i es van resuspendre les cèl·lules en 200 μL d'un còctel d'AcMos que contenia anti-CD4 PE i anti-CD8 APC, i es va incubar 10 min a TA. Per acabar la tinció, es va rentar i resuspendre les cèl·lules en 100 μL d'HBSS. Per a la lectura i adquisició de mostres es va utilitzar un citometre FACS LSR II. El protocol d'estimulació va ser lleugerament diferent al aplicat a l'estudi de calci per microscòpia. En el cas dels timòcits, es va enregistrar durant 30 s, es van afegir 2.5 μg d'AcMo anti-CD3 (145.2C11) biotinat i es va enregistrar durant 4.5 min, moment en que es va fer afegir estreptavidina (SAv) a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Pierce). Per a l'estimulació d'esplenòcits, en canvi, es van

afegir els 2.5 µg d'anti-CD3 biotinat abans d'adquirir la mostra al citòmetre, seguidament es va enregistrar durant 1 min i es va afegir SAV.

3.3.2 Anàlisi per Immunoblot de molècules senyalitzadores intracel·lulars

Estimulació cel·lular

Es van estimular timòcits amb anti-CD3 sol o en combinació amb anti-CD4 i es va avaluar la fosforilació de proteïnes intracel·lulars en general i específiques de la via del TCR. Per a l'extracció i processament del timus i la melsa es va seguir el protocol descrit prèviament, amb l'excepció que els òrgans es van mantenir i tractar amb medi RPMI sol (no complet, veure annex) i a TA. Un cop realitzat el comptatge, es van separar de 15 a 30x10⁶ cèl·lules per punt d'estimulació i es van recollir en diferents tubs de citometria. Es van mesurar tres punts per a cada genotip CD6^{+/+} o CD6^{-/-}: t=0 o sense estimulació, t=2 min i t=5 min. Es van rentar els tubs afegint 2 mL de medi RPMI i centrifugant a 1500 rpm a TA. Després del rentat, es va extreure el medi per aspiració però no es va resuspendre, sinó que es van afegir directament 2.5, 5 o 10 µg d'AcMo anti-CD3 biotinat, excepte en la condició t=0 o sense estimular, i segons la condició experimental, també 10 µg d'AcMo anti-CD4 biotinat. Acte seguit, es va donar un cop de vòrtex als tubs i es van mantenir en un bany a 37°C. A partir d'aquest moment, es van afegir 50 µL de medi RPMI i 50 µL de SAV i es va esperar fins als 2 o 5 min. Per aturar la reacció es van afegir 100 µl de solució de lisis (veure annex) i es va mantenir en gel durant 10 min. A partir d'aquest moment, es van processar les mostres en gel per evitar la degradació proteica.

Preparació de llisats totals

A continuació es van passar les mostres a tubs *ependorfs*, es van centrifugar a 14.000 rpm, 5 min a 4°C, i el sobrenedant es va traspasar a un tub nou, de manera que nuclis i DNA cel·lular es quedessin concentrats a la part inferior de l'*ependorf*. La mesura de la concentració proteica es va realitzar mitjançant el mètode de Bradford, es va calcular el volum necessari per recollir 60µg de proteïna i seguidament es va traspasar a *ependorfs* nous que contenien tampó de *Laemli*, els quals es van mantenir a la campana de gasos, destapats, durant 15 min. Passat aquest temps, es van bullir les mostres a 100°C durant 5 min, es va fer un *spin* a la centrífuga a 14.000 rpm per fer baixar les gotes de vapor, i es van portar les mostres per a carregar al gel.

Preparació de gels SDS-PAGE

Per aquest propòsit es va utilitzar el sistema Mini Protean II (Bio-Rad) fent servir gels d'acrilamida al 8% seguint les instruccions del fabricant (per a més informació consultar http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_5535.pdf). Breument, primer es van unir els dos vidres i es van ajuntar amb el suport, es van afegir 40 mL de solució *lower* i una mica d'aigua destil·lada amb l'ajut d'una pipeta Pasteur per evitar la formació de bombolles. Es va deixar polimeritzar la solució durant 1 h, i seguidament es va retirar l'aigua, es

van muntar les pintes i es van afegir uns 10 mL de solució *stacking*, el qual es va deixar polimeritzar durant 45 min.

Càrrega del gel i migració proteica

Un cop el gel polimeritzat al seu suport, es van retirar les pinces i es va netejar cada carril amb l'ajuda d'una xeringa i solució *running* per fer sortir les bombolles que s'haguessin quedat. Al primer carril es va afegir el marcador i a continuació es van carregar fins a 100 µL de les mostres. Als carrils que quedaven buits es va afegir tampó de *Laemli* 1x. Un cop finalitzat, es va posar el voltatge a 150 V durant una hora per a que les mostres passessin la part de *stacking*. Passada la hora, es va augmentar el voltatge a 200 V i es va deixar que les proteïnes migressin durant 2 h 30 min.

Transferència

Per a la transferència es va utilitzar el sistema Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad) seguint les instruccions del fabricant (per a més informació consultar http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_2895.pdf). Breument, es va agafar un paper *whatman* i es van tallar dos parts iguals de 20x15 cm. A continuació, es va extraure el gel del suport amb les proteïnes ja migrades i es va tallar a una mida de 15.5 x 13 cm. Es va activar la membrana de nitrocel·lulosa (Thermofisher) submergint-la durant 30s en metanol, i a continuació es va rentar amb aigua destil·lada i en agitació durant 10 min. Finalment es va muntar el suport de transferència, es van eliminar les bombolles, i es va omplir la cubeta on es va col·locar el suport amb solució de transferència. Es va posar el voltatge a 40 V i es va deixar durant 2 h.

Western Blot

Un cop les proteïnes transferides a la membrana, aquesta es va bloquejar aquesta amb BSA o llet desnatada al 5% (*nonfat dry milk*, Cell Signalling), depenent del que necessités l'anticòs, durant 1 h. Passat aquest temps, es va afegir directament l'anticòs desitjat i es va incubar el temps optimitzat per cadascú dels anticòssos utilitzats: anti-fosfo-Tyr totals (p-Tyr; clona 4G10; Millipore), anti-fosfo-Zap-70 Y319/Syk Y352 (p-ZAP-70; policlona; Cell Signalling), anti-fosfo-p44/42 MAPK T202/Y204 (pERK; clona E10; Cell Signalling), anti-fosfo-SLP-76 Y128 (BD Pharmingen), anti-fosfo-SLP-76 S376 (Cell Signalling), anti-fosfo-PLCγ Y783 (Cell Signalling) i anti-fosfo-Lck Y505 (Cell Signalling); anti-SLP-76 (policlona; Cell Signalling), anti-Vav (clona B-6; BD Pharmingen) i anti-p44/42 MAPK (policlona; Cell Signalling). Passat el temps d'incubació, es va rentar tres cops en agitació amb PBS Tween 0.01%, i a continuació es van afegir els anticòssos secundaris conjugats a fluorocroms CF680 i CF770 (Sigma). Finalitzada la incubació, es va rentar tres cops amb PBS Tween 0.01% i es va llegir en un escàner de dos colors per infrarojos utilitzant el software Odyssey. En el cas de aprofitar la membrana per un segon marcatge, es va deixar aquesta en solució *stripping* (Thermofisher) durant 30 min en agitació, es va rentar tres cops, i es va bloquejar 30 min abans d'afegir el següent anticòs.

3.3.2 Anàlisi per citometria de molècules senyalitzadores intracel·lulars

Per a la tinció intracel·lular de fosfo-ERK (p-ERK), les cèl·lules es van estimular com s'ha descrit prèviament. No obstant, en comptes d'afegir TNE 2x per obtenir els llisats totals, les cèl·lules es van retirar, rentar i marcar amb anticossos anti-CD4 APC i anti-CD8 FITC per a citometria de flux com s'ha descrit anteriorment. Passats 30 min d'incubació, les cèl·lules es van fixar i permeabilitzar, i es van incubar amb el mateix anticòs primari anti-pERK utilitzat per al Western Blot. Es va incubar 1 h, es va rentar, i seguidament es va incubar amb un anticòs secundari anti-IgG de ratolí conjugat a PE (Biolegend). Passats 30 min, es va rentar amb PBS/FBS 2% i es van llegir les mostres al citòmetre.

3.4 Cultius cel·lulars

Donat que els cultius cel·lulars s'han de mantenir en condicions estèrils, la melsa i LN dels animals CD1 i C57BL/6 genèticament modificats o no, es van extraure sota campana a l'estabulari de la Facultat de Medicina (UB) i es van mantenir en medi RPMI (LONZA) complet (10% FBS, 10 mM HEPES, 1 mM Sodium pyruvat, 50 μ M β -Mercaptoethanol, Penicilina-Glutamina-Streptamicina en gel). El processament dels òrgans es va fer seguint el protocol descrit prèviament, però sota campana de flux laminar.

3.4.1 Estudi de la secreció de citocines d'esplenòcits

Els esplenòcits obtinguts es van sembrar per triplicat en una placa de 48 pous a la concentració final de 6×10^6 cel/mL en medi RPMI complet i es van incubar amb Zymosan (20 μ g/mL, Sigma), LPS (1 μ g/mL, Sigma) o LTA (10 μ g/mL, Sigma) segons condició experimental i experiment. Es va deixar sempre com a control negatiu un pou amb esplenòcits sense estímuls per tenir el nivell basal de citocines i es va considerar com a $t=0$. Passades 2, 4 o 18 h (segons experiment) es van recollir els sobrenedants i es van utilitzar 50 μ L per a analitzar les citocines IL-6, IL-10, IFN- γ o TNF- α (segons experiment) amb el kit d'ELISA corresponent (Bioscience) seguint les instruccions del fabricant. Les mostres es van llegir en un espectrofotòmetre (Gen5 1.09, Epoch, Biotek) a una longitud d'ona de 450 nm amb un factor de correcció de 620 nm.

3.4.2 Estudi de la proliferació de cèl·lules T aïllades

Es va realitzar un estudi per avaluar la proliferació de cèl·lules T aïllades de teixits limfoides secundaris (melsa i LN) en presència i absència de CD6 després d'una estimulació a través del TCR amb anti-CD3 sol o en combinació amb anti-CD28.

Sensibilització de la placa amb anti-CD3

El dia abans a l'experiment, es va agafar una placa de 96 pous i fons pla (Jetbiofil). Sota campana de flux laminar, es va preparar en PBS estèril les diferents concentracions d'anti-CD3 purificat (clona 145.2C11; TONBO Bioscience), les quals depenent de l'experiment eren de 0.1,

0.5, 1 o 5 µg/mL. Es va precintat la placa amb parafilm i es va deixar a 4°C durant tota la nit (O/N).

Separació de cèl·lules T perifèriques CD4⁺ i CD8⁺ per selecció negativa

Per als estudis d'activació i proliferació es van utilitzar cèl·lules T CD4⁺ i CD8⁺ de teixits limfoides secundaris, aïllades per selecció negativa mitjançant el kit *Dynabeads Untouched mouse T cells* (Life Technologies) seguint les instruccions del fabricant. Breument, després del processat i comptatge, es van ajustar les cèl·lules a 1×10^8 cel/mL en solució d'aïllament (veure annex), i es va transferir la quantitat desitjada de cèl·lules per l'assaig en tubs de 15 mL (Falcon). A continuació es va afegir directament FBS 5% per bloquejar així com el mix d'anticossos proveïts pel fabricant contra tots els tipus cel·lulars excepte les cèl·lules T. Es van incubar els anticossos 20 min a 4°C, i seguidament es va rentar afegint 10 mL de solució d'aïllament i centrifugant a 1500 rpm. Es va resuspendre en el volum adequat de *Mouse Depletion Dynabeads* i es van incubar en rotació durant 15 min a TA, permetent que aquestes s'unissin als anticossos units prèviament a les cèl·lules per descartar. Tot seguit, es va afegir *Isolation buffer* i es van col·locar els tubs Falcon en un iman proveït pel fabricant (*DynaMag; Life Technologies*) durant 2 min per tub. Durant aquest temps, les *Dynabeads* juntament amb les cèl·lules per descartar eren atretes per l'imat als laterals, deixant lliure el sobrenedant amb cèl·lules T CD4⁺ i CD8⁺. La puresa del procediment va variar del 87 al 96% segons el dia, tal i com es va comprovar per citometria de flux.

Marcatge amb Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)

Per al marcatge amb CFSE, primer es van rentar les cèl·lules amb PBS 1x a 4°C. A continuació es van resuspendre a una concentració de 1×10^6 cel/mL en PBS enriquit amb 5% FBS, i es va afegir el CFSE a una concentració final de 0.5 µM (CFSE, Life Technologies). Es va invertir el tub repetidament per assegurar una correcta dissolució i es va incubar 15 min a TA i protegit de la llum. Passat aquest temps, es van rentar les cèl·lules un primer cop amb PBS 1X/FBS 5%, i un segon cop amb medi RPMI complet. A l'últim pas es va ajustar a una concentració de 1×10^6 cel/mL.

Inducció de proliferació cel·lular

Abans d'afegir les cèl·lules marcades amb CFSE per a estudiar la proliferació, es va retirar el PBS present a la placa utilitzat per a la sensibilització amb anti-CD3 amb una pipeta multi-canal, i es va realitzar un rentat per eliminar qualsevol excés d'anticòs afegint més PBS estèril i retirant-lo posteriorment. Tot seguit, es van afegir 1×10^5 cèl·lules T marcades amb CFSE i resuspeses en medi RPMI complet, i si es volia determinar la proliferació induïda per anti-CD3 i anti-CD28, s'afegia també anti-CD28 soluble (clona 37.51; TONBO Bioscience) a una concentració de 1 µg/mL i es deixava en cultiu durant 72 h.

Marcatge i lectura cel·lular

Passades 72 h es va comprovar al microscopi la morfologia de les cèl·lules i la formació de clústers per confirmar que s'havia dut a terme una expansió cel·lular. A continuació es van tenyir les cèl·lules amb anti-CD4 APC, anti-CD8 PE i control de viabilitat APC-Cy7 en placa seguint el procediment descrit anteriorment, però augmentant la velocitat de centrifugació dels rentats de 1500 a 1800 rpm. Per determinar el percentatge de cèl·lules proliferants, es va establir el control negatiu de CFSE utilitzant cèl·lules sense estimular que no s'havien dividit i que presentaven la intensitat màxima de CFSE. Es va considerar que totes les cèl·lules amb una intensitat menor de CFSE (CFSE^{lo}) havien proliferat.

3.5 Estudis *in vivo*

3.5.1 Proliferació (BrdU)

Timus

Per a mesurar la proliferació al timus *in vivo*, es va utilitzar el kit BrdU (FITC BrdU Flow kit; BD Pharmingen). Es va injectar via i.p. 1 mg per animal de la solució BrdU proveïda pel fabricant, i passades 2 o 6 h, segons metodologia, es van sacrificar els animals i es van processar i preparar per tenyir els timus com s'ha descrit prèviament. En aquest cas, la combinació d'anticossos i fluorocroms utilitzada va ser la següent: anti-CD4 PE-Cy7, anti-CD8 APC, anti-CD69 eFluor450, anti-TCR β Percp-Cy5.5, anti-CD24 PE, anti-BrdU FITC i control de viabilitat APC-Cy7. Es va analitzar i es van considerar com a cèl·lules que havien proliferat les cèl·lules BrdU⁺.

Teixits limfoides secundaris

En aquest cas es va utilitzar BrdU liofilitzat (Sigma) que es va pesar i es va afegir a l'aigua de beure dels animals estabulats a una concentració de 0.8 mg/mL (Parretta et al., 2008) durant 7 dies. L'aigua es va renovar cada 2 dies. Passat aquest temps es van sacrificar els animals, es va extraure la melsa i els LN i es van tenyir amb la següent combinació d'anticossos: anti-CD4 PE-Cy7, anti-CD8 PE, anti-CD44 Percp-Cy5.5, anti-CD62L APC, anti-BrdU FITC i control de viabilitat eFluor450. Es va analitzar i es van considerar com a cèl·lules que havien proliferat les cèl·lules BrdU⁺.

3.5.2 Apoptosi

La mesura de l'apoptosi al timus es va dur a terme amb el kit Annexin/7AAD (Immunostep). Després de tenyir els timòcits amb els anticossos conjugats per citometria, es van resuspendre les cèl·lules en 400 μ L de tampó d'Annexina proveït pel fabricant, i es van afegir 10 μ L del vial stock d'Annexina i 10 μ L de 7AAD. Passats 15 min d'incubació a TA, es va procedir a l'adquisició de les mostres al citòmetre de flux. A efectes pràctics, no es va distingir entre

apoptosis immediata i tardana, sinó que es van considerar cèl·lules apoptòtiques aquelles cèl·lules Annexin⁺/7AAD⁺ i Annexin⁺/7AAD⁻.

3.5.3 Resposta a un antigen dependent de cèl·lules T

Es van utilitzar femelles CD6^{+/+} i CD6^{-/-} de 8-10 setmanes, i es van immunitzar una primera vegada via i.p. amb 50 µg de l'haptè TNP (Trinitrofenil) conjugat a KLH (*Keyhole Limpet hemocyanin*) en 400 µL de PBS i adjuvant complet de Freund (*complete freund adjuvant*, CFA) a dia 0. Es va recollir sèrum dels animals a dia 0 i a dia 7 a través de la vena mandibular. A dia 14 es va recollir el sèrum i es va administrar una segona immunització via i.p. amb 50 µg de TNP-KLH sense CFA. L'última extracció i sacrifici dels animals es va fer a dia 21 post-primerà immunització.

Els nivells d'anticossos específics per TNP es van determinar per ELISA. Breument, les plaques es van sensibilitzar O/N amb 3 µg/mL de TNP₁₈-BSA (Biosearch Technologies) diluït en PBS, després es va rentar amb PBS 0.05% Tween 20 i bloquejar amb PBS enriquit amb 2% BSA durant 1 h a 37°C. A continuació es va dur a terme una corba de titulació del sèrum per a cada anticòs i es va seleccionar la millor dilució (1/500), es van agafar 100 µL de sèrum i es van incubar a la placa durant 1 h a TA. Per determinar els nivells dels diferents isotips d'anticossos anti-TNP al sèrum es van utilitzar anticossos biotinats d'ovella anti-IgM, -IgG1, -IgG2b, -IgG2c i -IgG3 (Jackson Immunoresearch Laboratories) i es van incubar durant 1 h a TA. Després de tres rentats, es va afegir el conjugat d'estreptavidina conjugant a β-peroxidasa (SAv-POD (Roche Diagnostics) durant 30 min a TA, i a continuació es va revelar amb 100 µL de TMB (Tetrametilbenzidina, BD Bioscience) durant 30 min a TA protegit de llum. Per aturar la reacció es van afegir 100 µL d'àcid sulfúric 0.5 M a cada pou. L'absorbància es va mesurar en un lector d'ELISA a una densitat de 450 nm.

3.6 Quimeres competitives de moll d'os

Aquest experiment es va dur a terme amb la col·laboració dels Drs. Marie i Bernard Malissen (CIML, Marsella, França). Per a l'experiment, es van utilitzar com a hostes/receptors ratolins transgènics de 8 setmanes deficients per la cadena epsilon de CD3 (CD3-ε^{Δ5/Δ5}) disponibles al CIPHE (*Centre d'Immunophénomique*) de Marsella. Aquests ratolins tenen un bloqueig de la maduració tímica a l'estadi DN3, i en conseqüència presenten una absència total de cèl·lules T madures en perifèria (Malissen et al., 1995). Per buidar el moll d'os dels ratolins hostes CD3-ε^{Δ5/Δ5} i afavorir la reconstitució amb les cèl·lules dels ratolins donants, es van irradiar els ratolins amb una única dosi de 300 rads. Per a l'extracció del moll d'os dels ratolins donadors CD45.1 i CD45.2 silvestres o WT (WT45.1 i WT45.2), i CD45.2 deficients per CD6 (KO45.2), es va seguir el següent protocol. Es van recollir a l'estabulari les dues tíbies i els dos fèmurs en condicions estèrils, i es van mantenir a TA en PBS 1x. Al laboratori, sota campana, es va extraure l'excés de múscul i es van submergir els ossos nets en etanol al 70% durant 1 min. A continuació es van tallar les dues puntes de cada os i es va introduir una xeringa amb agulla de

25G carregada amb medi RPMI complementat amb 3% FBS i 25 nM HEPES. Es va pressionar per un extrem per expulsar el moll d'os i es va recollir en una placa de Petri, fent-lo passar tot seguit per un filtre de 100 µm i recollint-lo en un tub de 45 mL (Falcon). Seguidament es va centrifugar i aspirar el sobrenedant, i es van afegir 3 mL de solució de lisis (descriu anteriorment) durant 3 min. Després de rentar i contar, es va ajustar la concentració a 20×10^6 cel/mL, i a continuació es va retirar la concentració adequada per als següents grups: 4×10^6 cèl·lules al grup WT45.1 o KO45.2 sols, i 2×10^6 de cèl·lules WT45.1 amb 2×10^6 de WT45.2 o KO45.2 (segons grups). Seguint aquest protocol, es va injectar per via intravenosa (i.v.) un total de 4×10^6 cèl·lules per animal. Paral·lelament, es va fer una tinció amb anti-CD45.1 i anti-CD45.2 de les mescles injectades als dos grups experimentals (WT45.1/WT45.2 i WT45.1/KO45.2) per comprovar el percentatge de cèl·lules real injectats als animals hosts. Les quimeres es van mantenir en antibiòtic (0.2% Bactrim; Roche) durant les 12 setmanes que va durar la reconstitució, punt en el qual es van sacrificar i es van analitzar els diferents òrgans limfoides.

Per a l'anàlisi per citometria, apart dels marcadors habituals es van afegir els AcMos anti-CD45.1 i anti-CD45.2 per poder discernir entre les cèl·lules dels ratolins donadors. Els resultats gràfics estan expressats en forma de ratio de percentatge de cèl·lules CD45.2 dividit entre el percentatge de cèl·lules CD45.1. En aquest cas les mostres es van llegir en un FACS LSR II de 4 làsers.

3.7 Models animals de malaltia

3.7.1 Model de xoc sèptic induït per zymosan

Es va dur a terme un model de xoc sèptic de zymosan seguint la metodologia prèviament descrita (Genovese et al., 2004). Primer es van pesar els ratolins un dia abans de l'administració de zymosan (lot BCBF4509V, Sigma) per ajustar la dosi del compost d'acord al seu tamany. Es va pesar i dissoldre el zymosan en solució salina, i es va injectar el volum calculat als animals via intraperitoneal (i.p.). Durant els tres primers dies (fase aguda) es va fer un seguiment dels animals dos cops per dia per injectar 0.1mg/kg de Buprenorfina (RB Pharmaceuticals) per mitigar el dolor, controlar la mortalitat, pesar-los i valorar paràmetres clínics. La medicació dels paràmetres clínics es va fer a cegues entre dues persones i es va valorar la gravetat puntuant del 0 al 3 els següents paràmetres, sent 0 l'absència de símptoma i 3 el valor més greu de cada paràmetre: pèl eriçat, letargia, conjuntivitis i diarrea. Aquests valors es troben representats com la mitjana dels quatre paràmetres per cada animal, juntament amb la \pm SEM. Cada paràmetre es mesurava individualment, i quan un animal cursava amb valor màxim de 3 en un o més paràmetres, es practicava l'eutanàsia amb una sobredosis d'isoflurà (Esteve) i comptabilitzava com a mort.

En el cas dels experiments amb animals CD1 i C57BL/6, es va injectar 25 µg de rshCD5 a diferents temps. En l'experiment on s'injecta també IFN γ murí recombinant (rmIFN γ , Genscript),

es van administrar 5 ng de la citocina recombinant. Per a la determinació de citocines en sèrum, s'extreia la sang per punció cardíaca i es practicava l'eutanasia dels animals amb sobredosi d'isofluorà.

Per a l'anàlisi de les citocines es va utilitzar els kit *Cytokine Mouse 10-Plex Panel* (LifeTechnologies) el qual permet avaluar 10 citocines diferents (GM-CSF, IFN γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12 (p40p70) i TNF α) en la mateixa mostra. Es va seguir el protocol proveït per el fabricant.

3.7.2 Model d'artritis induïda per col·lagen (CIA)

La inducció del model va ser dut a terme en col·laboració amb el grup dels Drs. Jesús Merino i Ramón Merino (Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria, CSIC-UC-SODERCAN, Santander) seguint protocols prèviament establerts (Postigo et al., 2012). Es van utilitzar ratolins mascles de 8-12 setmanes i es van immunitzar un sol cop amb 150 μ g de col·lagen de pollastre de tipus II dissolt a una concentració de 2 mg/mL en 0.05M d'àcid acètic, i emulsionat amb adjuvant complet de Freund (CFA) amb 4 mg/mL de *Mycobacterium tuberculosis* (Chondrex) en un volum final de 150 μ L. L'avaluació clínica de l'artritis es va dur a terme setmanalment d'acord a uns valors de 0 a 3: 0= sense inflamació (articulació normal); 1= inflamació detectable i/o eritema; 2=inflamació en >1 articulació; 3=inflamació a tota la pota i/o anquilosis. Es va mesurar cada pota i sumar els seus valors, amb un valor màxim de 12 per animal. La quantificació d'anticossos anti-col·làgen es va fer mitjançant ELISA i la mesura de les citocines a través de PCR quantitativa a temps real (qPCR), com es descriu a continuació.

ELISA

Per la valoració dels nivells d'anticossos anti-col·lagen tipus II (CII) presents al sèrum de ratolins immunitzats es van incubar plaques d'ELISA (Maxisorb; Nunc, Wiesbaden, Germany) O/N a 4°C amb CII a 1 μ g/ml, 100 μ L/pouet (*Immunization Grade Bovine Type II Collagen Solution*, Chondrex, Inc), utilitzant una solució específica per afavorir la unió a la placa (solució aquosa amb Tris-HCl 0.05 M, pH 7.5 y NaCl 0.2 M). Després de rentar amb PNT, les plaques van ser incubades durant almenys 2 h amb solució de bloqueig (PNT-1%BSA) per evitar les unions inespecífiques, i després de rentar altre cop amb PNT, es van afegir els sèrums experimentals (100 μ L/pouet) que van ser analitzats per duplicat en un rang de dilucions 1:1000. Com a control positiu i per a la creació de la recta patró, es van utilitzar un pool de sèrums analitzats prèviament amb nivells elevats d'anticossos anti-CII. Després de 3 h d'incubació a TA, les plaques prèviament rentades es van incubar durant 3 h amb anticossos específics anti-IgG1 murina conjugats a fosfatasa alcalina (Sigma). La reacció enzimàtica es va valorar afegint 100 μ L/pouet d'una dilució de pNPP (*4-nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate*, Sigma) com a substrat per la fosfatasa alcalina, utilitzant un equip Multiskan® FC (Thermo Scientific) amb un filtre de 405 nm.

Extracció de RNA

Al moment del sacrifici dels ratolins, es van extraure les potes i es van congelar per a dur a terme estudis de RNA. Posteriorment, les potes congelades es van triturar amb l'ajuda d'un morter de porcellana (Fisher Scientific) i uns 200 mg de teixit es van mesclar amb 1 mL de Trizol (Invitrogen), deixant actuar durant 15 min a TA i centrifugant posteriorment en fred a 13.000 rpm durant 8 min. Després de la centrifugació, es va recollir la fracció líquida i es van afegir 200 µL de cloroform (*Chloroform*, ≥99.8%, A.C.S. reagent; Sigma) per cada mL de Trizol inicial, agitant vigorosament i deixant actuar uns 2-3 min a TA. A continuació es van centrifugar les mostres a 13.000 rpm durant 20 min obtenint tres fases. Es va recollir la fase superior transparent, i es van afegir 500 µL de isopropanol (Sigma) per cada mL de Trizol inicial. Es va deixar actuar durant 10 min a TA i es va centrifugar a 13.000 rpm, 10 min a 4°C obtenint d'aquesta manera un pelet blanquinós que contenia el RNA pur. Després de descartar el sobrenedant es va afegir 1 mL d'etanol fred al 75% en H₂O DEPC (dietil pyrocarbonada) centrifugant altre vegada a 8.000 rpm, 5 min a 4°C. En aquest punt es va eliminar completament l'etanol, i el pelet es va resuspendre en 20-30 µL de H₂O DEPC, lliure de RNases. La seva concentració es va determinar per densitat òptica a 260 nm amb un espectofotòmetre (Nanodrop 2000, Thermo Scientific).

Obtenció del cDNA

El RNA es va utilitzar com a motllo per la conversió a cDNA mitjançant retrotranscripció inversa a través del protocol aconsellat per l'enzim *Super Script® II reverse transcriptase* (Invitrogen). El procés es va dur a terme en tres fases, arribant a un volum total de 20 µL per mostra. Inicialment es van mesclar 5 µg de RNA, 2 µL de primers (Invitrogen) i 1 µL de nucleòtids dNTPs a 10 mM (Bioline), i es van portar fins a un volum de 12 µL amb H₂O miliQ estèril. Aquesta mescla es va escalfar a 65°C durant 5 min per afavorir la unió dels primers al RNA. A continuació es van afegir 4 µL per mostra de solució de primera cadena (*First-strand Buffer 5X*), 2 µL de DTT (ditiotreitol) i 1 µL d'inhibidor de RNases (*RNaseOUT Ribonuclease inhibitor*, Invitrogen), mantenint la mescla a 25°C durant 2 min. Finalment es va afegir 1 µL de l'enzim transcriptasa inversa (*SuperScript® II Reverse transcriptase*, Invitrogen), i aquesta mescla completa va ser amplificada en un termociclador (VERITI, Applied biosystems) amb el següent protocol: 25°C-10'; 42°C-50'; 70°C-15' i manteniment a 10°C.

qPCR

A partir del cDNA obtingut es va realitzar un estudi d'expressió de citocines a nivell articular utilitzant la tècnica de qPCR. Per a dur a terme l'anàlisi, es van utilitzar sondes TaqMan específiques per diferents citocines (IL-1β, IL-6, IL-17A, IFNγ, TNFα, TGFβ) conjugades al fluorocrom FAM (Applied biosystems), i en tots els casos es va amplificar paral·lelament el gen de la GAPDH utilitzant una sonda específica TaqMan (Eurogentec) conjugada al fluorocrom HEX. Independentment de la citocina analitzada, el protocol a seguir va ser similar al descrit a continuació. Es van utilitzar per reacció en un volum final de 22 µL: 1-2 µL de cDNA (250-500

ng), 11 µL de solució (*Premix Ex Taq 2X*, TAKARA), 1,1 µL de la sonda de la citocina a analitzar (Sonda 20X, Applied Biosystems) y 0,6 µL de GAPDH (de un pool de cebadors a 7.5 µM y sonda a 1.5 µM, arribant als 22 µL amb H₂O miliQ estèril. A partir d'aquesta mescla, es van sembrar duplicats de 10 µL en plaques de 96 pous que es van cobrir amb una coberta adhesiva transparent (*ABsolute QPCR Seal*, Thermo Scientific). Utilitzant un equip detector de fluorescència per a qPCR (MX3005P, Stratagene), es van sotmetre al següent protocol d'amplificació, estandarditzat per sondes TaqMan: 2'-50°C; 10'-95°C i 40-45 cicles (15''-95°C, 1'- 60°C). Els resultats es van analitzar utilitzant el software MxPro-3005P amb el mètode $\Delta\Delta C_t$, representant l'expressió gènica relativa de cada una de les citocines, normalitzada amb a l'expressió de GAPDH.

Les sondes utilitzades per a determinar la quantitat de RNA de les citocines van ser les següents: IL-1 β : Mm00434228_m1, IL-6: Mm00446190_m1, IL-17a: Mm00439619_m1, TNF α : Mm00443258_m1, IFN γ : Mm00801778_m1, TGF β 1: Mm00441724_m1, Tbet: Mm00450960_m, IL10: Mm01288386_m1, IL2: Mm00434256_m1, FoxP3: Mm00475162_m1.

3.7.3 Model de càncer heterotòpic (B16)

La línia cel·lular tumoral B16 es va fer créixer en cultiu en medi DMEM (Invitrogen) complementat amb 10% FCS i 100UI/mL de penicil·lina/estreptomicina en una atmosfera al 5% de CO₂. Els stocks d'aquestes línies es van mantenir a -80°C en FCS inactivat amb 10% DMSO. En el procés de descongelat es va afegir ràpidament medi de cultiu al criotub per diluir el DMSO i evitar la seva citotoxicitat a TA. A continuació es va centrifugar ràpidament 5 min a 1000 rpm i resuspendre en el medi de cultiu esmentat. Després que les cèl·lules arribessin a una bona confluència, les cèl·lules adherides van ser tripsinitzades amb Tripsina al 1X en PBS durant 2 min a 37°C. A continuació es van comptar per ajustar a la concentració desitjada.

Per avaluar el creixement del tumor es van injectar 5x10⁴ cèl·lules via subcutània (s.c.) a la part dorsal inferior dreta dels ratolins anestesiats amb Isoflurà (Esteve) utilitzant una agulla de 23G. Cada dos dies es va mesurar el creixement del tumor *in vivo* mesurant el seu diàmetre amb un peu de rei (*Vernier calliper*, Sigma). Un cop adquirit un determinat diàmetre per dos o més individus (20mm màxim aproximadament), els ratolins van ser eutanitzats amb Isoflurà, es van extraure els tumors i es van pesar en una balança (WNT-500, Coventry Scale).

3.7.4 Model d'infecció mono/poli-bacteriana

El model d'infecció polimicrobiana intraabdominal per lligació i punció del cec de l'intestí (*cecal ligation and puncture*; CLP) es va realitzar segons un mètode prèviament descrit (Rittirsch et al., 2009). Primer es van anestesiar els ratolins amb ketamina (Imalgéne 1000) i xilacina (Rompun). Després de desinfectar l'àrea abdominal amb un rentat amb etanol al 70%, es va realitzar una incisió (1 cm) per sota el diafragma en el costat abdominal esquerra. Es va aïllar el cec de l'intestí, es va lligar i es va perforar dues vegades amb una agulla de 21G. Després de pressionar suaument per alliberar una petita quantitat de matèria fecal, el cec es va retornar al

abdomen i es van cosir el múscul i la pell amb una agulla especialment dissenyada pel procés (*Black braided silk nonabsorbable surgical spool suture 4-0*, Harvard Apparatus). Els ratolins van rebre 0.05 mg/kg de Buprenorfina (RB Pharmaceuticals) just abans de fer la CLP i cada 12 h post-operació. Els animals control es van tractar de la mateixa manera però sense realitzar la lligació/punció de l'intestí. La supervivència es va monitoritzar diàriament durant un període de 1 setmana.

3.8 Anàlisi estadístic

Per analitzar les dades obtingudes en el diferents experiments es va utilitzar el programa GraphPad Prism v5.0. Els tests estadístics indicats per a cada experiment es van realitzar amb tots amb aquest programa.

4. Resultats

4.1 Anàlisi de les implicacions fenotípiques i funcionals de les interaccions mitjançades per CD6: generació i estudi d'un model murí deficient (*knockout*) per a CD6

4.1.1 Generació d'una línia de ratolins deficients en CD6

Per a estudiar la rellevància de CD6 i les seves interaccions moleculars en la maduració i funció de les cèl·lules T, es va generar una línia de ratolins C57BL/6 deficients per a CD6 (CD6 *knockout* o CD6^{-/-}) de tipus convencional (no condicional). Tal i com es descriu a l'apartat de Metodologia, mitjançant tècniques convencionals de recombinació gènica amb cèl·lules mare embrionàries (ES) es va induir una deleció dels exons del 3 al 6, corresponents als tres dominis extracel·lulars i a la regió *stalk* que precedeix immediatament a la regió transmembrana (**Fig. 4.1A**). Cèl·lules ES portadores de l'esmentada deleció es van implantar primer a blastocists i després a femelles pseudo-prenyades C57BL/6 (a/a). Els ratolins quimèrics resultants es van creuar novament amb ratolins C57BL/6 (a/a) per seleccionar aquells que portaven la deleció a la línia germinal i la transmetien a la seva descendència. Així es van obtenir inicialment un mascle i una femella CD6^{+/-}, els quals es van posar a creuar entre ells per obtenir ratolins homozigots CD6^{-/-} així com germans CD6^{+/+} que permetessin establir línies estables d'ambdós tipus de ratolins. Una vegada aconseguida aquesta fita, es va fer un anàlisi comparatiu de l'expressió de CD6 en animals homo- o heterocigots per l'al·lel delecionat i silvestre (CD6^{+/+}, CD6^{+/-} i CD6^{-/-}). Com es pot observar a la **Fig. 4.1B**, l'anàlisi per citometria de flux de limfòcits madurs perifèrics (nòduls limfàtics) va demostrar una correlació directa entre la càrrega gènica i els nivells d'expressió de CD6 a la membrana cel·lular, essent nuls a ratolins CD6^{-/-} i intermedis a CD6^{+/-} en relació als seus germans CD6^{+/+}. Una vegada comprovat també que els ratolins CD6^{-/-} eren fèrtils, no presentaven cap anormalitat a nivell físic i es comportaven com els seus germans CD6^{+/+} es va procedir al seu anàlisi fenotípic i funcional comparatiu.

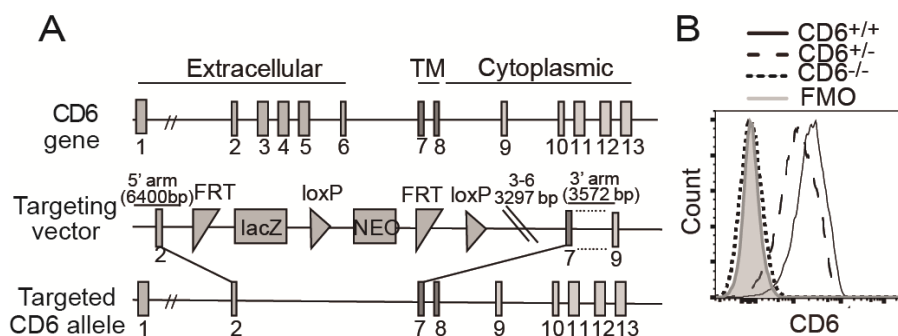


Figura 4.1. Generació d'un ratolí deficient de CD6. **A)** Representació esquemàtica del gen *cd6*, el vector diana i l'al·lel resultant de la modificació gènica. Es van eliminar els exons 3 al 6 corresponents a la part extracel·lular dels dominis SRCR i la regió *stalk*. **B)** Anàlisi per citometria de flux de cèl·lules CD3+CD19- provinents de nòduls limfàtics de ratolins germans CD6^{+/+} (línia sòlida), CD6^{+/-} (línia ratllada) i CD6^{-/-} (línia puntejada), marcades per l'expressió de CD6 (mAb OX-129) o bé control sense marcar (*fluorescence minus one*; FMO).

4.1.1.1 Estudi fenotípic de les principals poblacions limfocitàries en ratolins deficients en CD6

A nivell de números absoluts, els ratolins CD6^{-/-} presentaven una cel·lularitat normal i comparable a la dels seus germans CD6^{+/+}, pel que fa tant a nivell de moll d'os com de timus, melsa i LN, indicant que l'absència de CD6 no comportava defectes quantitats rellevants al sistema hematopoètic i limfoide a nivell general (**Fig. 4.2**).

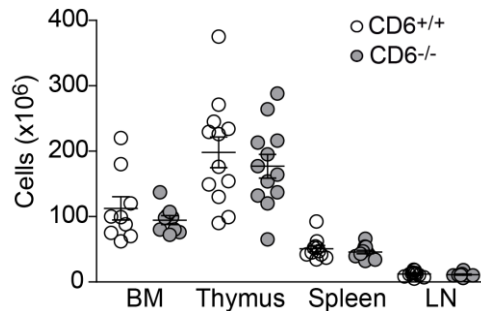


Figura 4.2. L'absència de CD6 no modifica la cel·lularitat total als diferents òrgans limfoides centrals i perifèrics. Nombre total de cèl·lules a moll d'os (bone marrow, BM), timus, melsa (spleen) i nòduls limfàtics (LN) d'animals CD6^{+/+} i CD6^{-/-}. Cada punt representa un ratolí individual amb la mitjana ± SEM.

4.1.1.1.1 Moll d'os

S'ha descrit prèviament que progenitors hematopoètics pluripotents molt immadurs (CD34⁺rho123^{med/low}) expressen a la seva superfície no només CD166/ALCAM sinó també la pròpia molècula CD6 (Cortés et al., 1999). Aquesta expressió els hi permet establir interaccions homo- i/o hetero-típiques amb cèl·lules estromals positives per a CD166/ALCAM que serien rellevants per a una correcta nidació i funció hematopoètica (Shiozawa and Taichman, 2014). A la vista d'aquest precedents es va decidir realitzar un estudi de totes les series hematopoètiques en ratolins CD6^{+/+} i CD6^{-/-} per avaluar possibles canvis quantitats provocats per l'absència de CD6. Per altra banda, també es va estudiar en detall l'expressió de CD6 als diferents progenitors.

En col·laboració amb les Dres. Maria Luisa Gaspar i Isabel Cortegano (*Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid*) es van estudiar les diferents poblacions hematopoètiques agrupant-les segons uns marcatges indicadors de diferents estadis de diferenciació (**Fig. 4.3**). Així, es van estudiar les cèl·lules més immadures comunes als diferents llinatges (**Fig. 4.3A.I**) que inclouen els LT-HSC (*long-term hematopoietic stem cell*; CD34^{lo/-}CD135⁻), ST-HSC (*short-term hematopoietic stem cell*; CD34⁺CD135⁻), MPP (*multi-potent progenitor*; CD34⁺CD135⁺) i CLP (*common-lymphoid progenitor*; Lin⁻Sca1⁺c-kit^{dull}). Al mateix nivell que els CLP, es trobaven els precursors del llinatge mieloide i dels megacariòcits, els CMP (*common-myeloid progenitor*; CD34⁺CD16/32⁻) (**Fig. 4.3A.II**). Els CMP es poden diferenciar a la vegada en GMP (*granulocyte-macrophage progenitor*; CD34⁺CD16/32⁺) i MEP (*megakaryocyte-erythrocyte progenitors*; CD34⁻CD16/32⁻). En un tercer grup es trobaven les cèl·lules mieloides que migraran a perifèria (**Fig. 4.3A.III**) com ara monòcits, basòfils, eosinòfils, macròfags i neutròfils, i que es distingiran segons els marcadors Gr-1, CD115, Mac1/CD11b i F4/80 (Chow et al., 2011). Finalment l'últim grup estaria format per megacariòcits o MK

(CD150⁺CD41⁺) provinents de les MEP (**Fig. 4.3A.IV**). Tal i com mostra la **Fig. 4.3B**, no es van observar diferències en els diferents subtipus de progenitors entre ratolins CD6^{+/+} i CD6^{-/-}, a excepció de les cèl·lules de llinatge mioelode Gr1⁺CD115⁺ i Mac1⁺, les quals donaran lloc a un posterior estadi maduratiu corresponent a les cèl·lules mioeloides supressores i als macròfags, respectivament.

A l'estudi de l'expressió de CD6 no es va detectar cap progenitor hematopoètic immadur (c-kit^{hi}Sca-1⁺) que presentés uns nivells detectables de CD6 a la seva superfície, a excepció de la població de CLP, on prop del 30% de les cèl·lules eren CD6⁺ (**Fig. 4.3C**). En aquest cas, aparentment l'expressió de CD6 podria correspondre al precursor de les cèl·lules T CD4⁺ i CD8⁺ a la medul·la (Geerman et al., 2015).

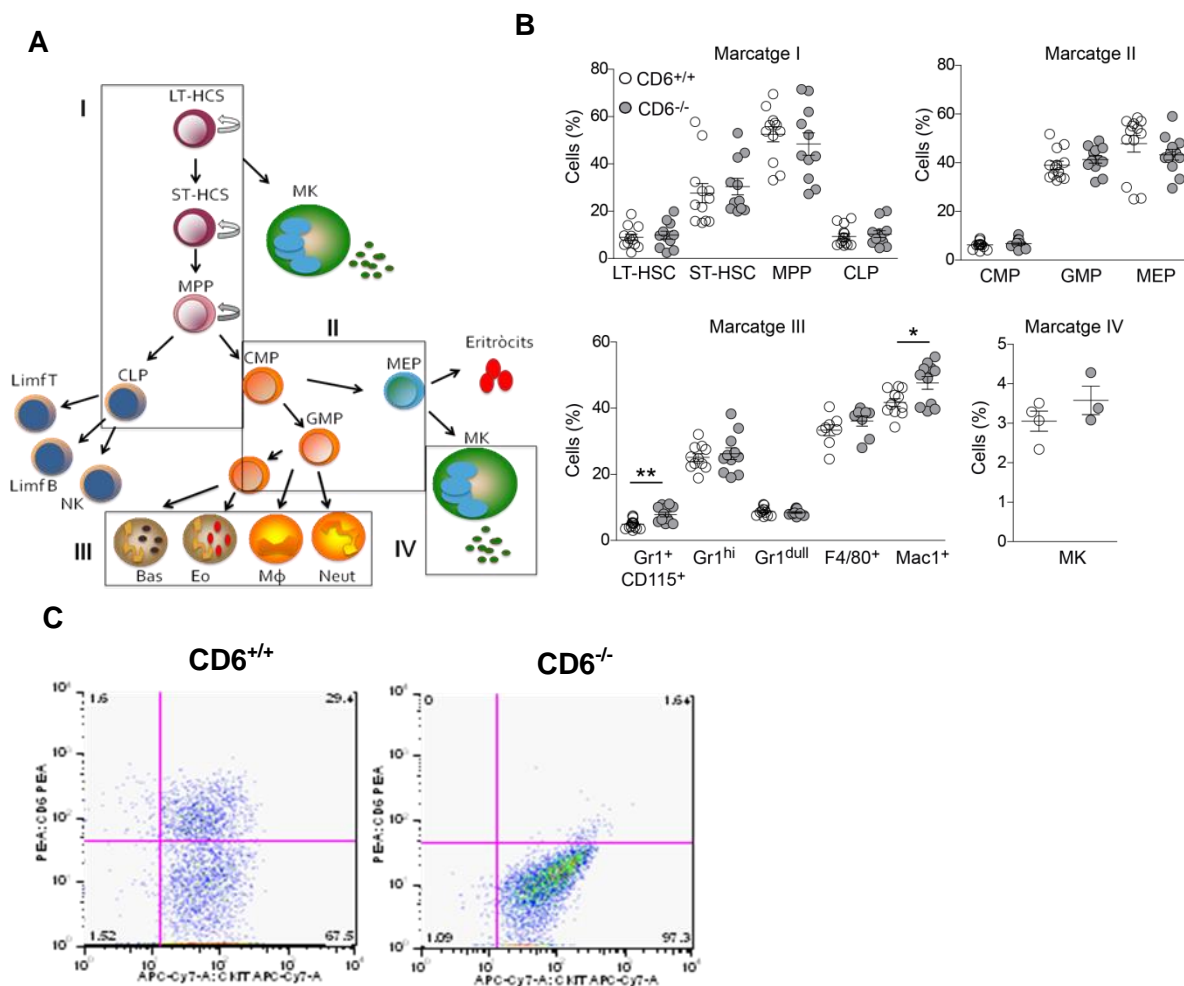


Figura 4.3. Canvis en progenitors hematopoètics en absència de CD6. A) Esquema dels quatre marcatges utilitzats equivalents a diferents estadis maduratius de la hematopoesi al moll de l'òs. Es mostren LT-HSC (*long-term hematopoietic stem cell*; CD34⁺CD135⁺), ST-HSC (*short-term hematopoietic stem cell*; CD34⁺CD135⁺), MPP (*multi-potent progenitor*; CD34⁺CD135⁺), CLP (*common-lymphoid progenitor*; Lin-Sca1⁺c-kit^{dull}), CMP (*common-myeloid progenitor*; CD34⁺CD16/32⁺), GMP (*granulocyte-macrophage progenitor*; CD34⁺CD16/32⁺) i MEP (*megakaryocyte-erythrocyte progenitors*; CD34⁺CD16/32⁺), Bas (basòfils), Eo (eosinòfils), Mφ (macròfags), Neut (neutròfils) i MK (megacariòcit; CD150⁺CD41⁺). **B)** Freqüències dels diferents marcatges i subtipus de progenitors hematopoètics descrits a A) al moll de l'òs de ratolins CD6^{+/+} (cercle blanc) i CD6^{-/-} (cercle gris). **C)** Expressió de CD6 en cèl·lules prèviament seleccionades per Lin⁺Sca-1⁺ i c-kit^{hi}. Es mostra la població CLP c-kit^{dull} en ratolins CD6^{+/+} (esquerra) i CD6^{-/-} (dreta). *p<0.05, **p<0.01 (unpaired t-test).

4.1.1.1.2 Timus

L'estudi dels diferents estadis maduratius al timus va revelar que els ratolins $CD6^{-/-}$ presentaven una disminució en el percentatge de cèl·lules CD4 simple positives ($CD4^+CD8^-$ *single positive* o $CD4^+SP$) respecte els $CD6^{+/+}$, però en canvi no mostraven canvis significatius en el de cèl·lules

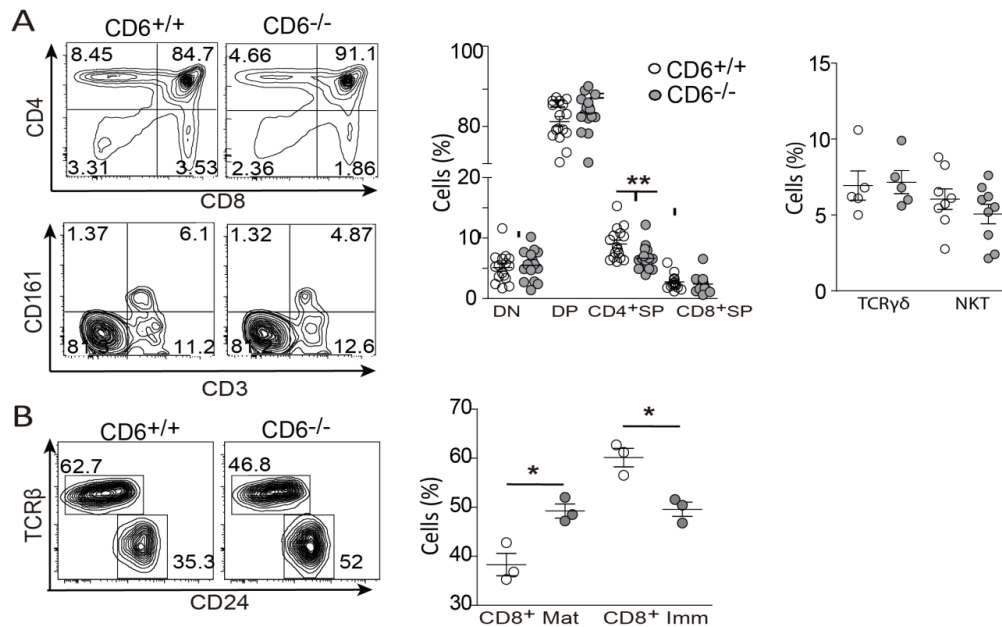


Figura 4.4. CD6 està implicat en la maduració de les cèl·lules T al timus. A) Esquerra, contour plots representatius de cèl·lules vives del timus tenyides amb AcMos anti-CD4 i anti-CD8 (panel superior). Dins de les cèl·lules $CD4^+CD8^-$ es va fer un subanàlisi per l'expressió dels marcadors CD161 i CD3 (panel inferior). Els números als quadrants representen la freqüència de cada població. **Dreta**, percentatge de les principals poblacions de timòcits d'animals $CD6^{+/+}$ (blanc) i $CD6^{-/-}$ (gris): DN ($CD4^-CD8^-$), DP ($CD4^+CD8^+$), $CD4^+SP$ ($CD4^+CD8^-$), $CD8^+SP$ ($CD4^-CD8^+$), $T\gamma\delta$ ($TCR\beta^+TCR\delta^+$) i NKT ($CD161^+CD3^+$). S'indica la mitjana \pm SEM. **B) Esquerra**, Contour plot representatius de timòcits $CD8^+$ de ratolins $CD6^{+/+}$ i $CD6^{-/-}$ marcats amb AcMos anti-TCR β i anti-CD24. **Dreta**, Percentatge de timòcits $CD8^+$ madurs ($CD8^+TCR\beta^+CD24^-$) i $CD8^+$ immadurs ($CD8^+TCR\beta^+CD24^+$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (unpaired t-test);).

$CD8^-$ simple positives ($CD4^-CD8^+$ o $CD8^+SP$), doble positives ($CD4^+CD8^+$; DP) o doble negatives ($CD4^-CD8^-$; DN) (**Fig. 4.4A**). Tampoc es van veure diferències significatives entre les poblacions de cèl·lules $T\gamma\delta$ ni NKT (**Fig. 4.4A**). Tot i que els percentatges de $CD8^+SP$ *a priori* no es veien afectats per l'absència de CD6, un estudi més detallat va revelar que els animals $CD6^{-/-}$ presentaven una disminució de la subpoblació de cèl·lules $CD8^+SP$ madures ($CD4^-CD8^+TCR\beta^+CD24^-$, $CD8^+SP$ Mat) i un augment de les $CD8^+SP$ immadures ($CD4^-CD8^+TCR\beta^+CD24^+$, $CD8^+SP$ Imm) comparats amb els ratolins $CD6^{+/+}$ (**Fig. 4.4B**). Amb aquests resultats es va fer evident que els animals $CD6^{-/-}$ presentaven una disminució de cèl·lules $CD4^+$ i $CD8^+$ que ja havien passat el procés de selecció en comparació amb animals $CD6^{+/+}$.

El marcador de superfície CD69 està estretament relacionat amb la selecció tímica ja que la seva expressió augmenta en cèl·lules DP en procés de selecció positiva i es manté temporalment en aquelles cèl·lules CD4⁺SP i CD8⁺SP que han estat seleccionades positivament. Tal i com es pot comprovar a la **Fig. 4.5A**, l'expressió de CD6 es correlaciona amb la de CD69 i per tant també augmenta en cèl·lules DP entrant en selecció positiva (DP TCRβ⁺CD69⁺) d'una manera molt similar a com s'ha descrit per a la molècula homòloga CD5 (Azzam et al., 1998). Aquesta dada ha fet que s'hagi proposat que CD6 podria estar involucrat en la supervivència dels timòcits, així com en la regulació del llindar d'activació del propi TCR (Singer et al., 2002). Quan es va estudiar el percentatge de cèl·lules DP entrant en selecció positiva no es van observar diferències entre les dues línies de ratolins, indicant que l'absència de CD6 no és un impediment per entrar en selecció (**Fig. 4.5B**).

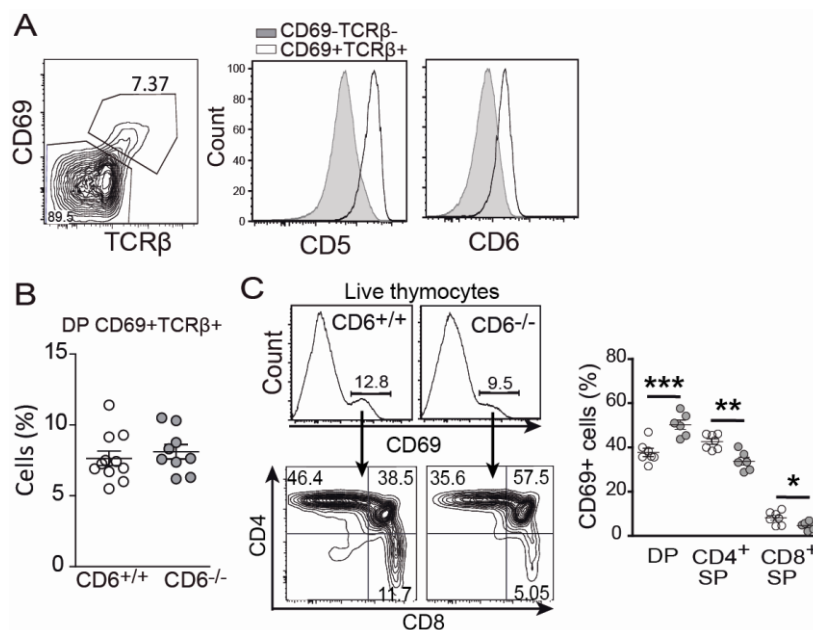


Figura 4.5. CD6 regula el pas de timòcits immadurs (DP) a madurs (SP). **A) Esquerra**, Contour plot representatiu de timòcits DP tenyits amb AcMos anti-CD69 i anti-TCRβ. **Dreta**, Histogrames representant l'expressió de CD5 i CD6 en timòcits DP no seleccionats (CD69⁻TCRβ⁻; línia gris) i seleccionats (CD69⁺TCRβ⁺; línia negra). **B)** Percentatge de timòcits DP entrant en selecció (CD69⁺TCRβ⁺) de ratolins CD6^{+/+} i CD6^{-/-}. **C) Esquerra**, Histogrames i contour plots representatius de l'estratègia d'anàlisi utilitzada pel estudi de timòcits DP i SP (panel inferior) dintre de la població CD69⁺ (panel superior). **Dreta**, Percentatge (mitjana ±SEM) de timòcits CD69⁺ amb fenotip DP i SP de ratolins CD6^{+/+} (blanc) i CD6^{-/-} (gris). *p<0.05, **p<0.01 (Unpaired t-test).

No obstant això, quan es van analitzar els percentatges de cèl·lules DP i SP dintre de la subpoblació de cèl·lules CD69 positives del timus es va observar un increment estadísticament significatiu de cèl·lules CD69⁺DP als ratolins CD6^{-/-} en comparació amb els CD6^{+/+} (50.3±2.1 vs 37.7±1.8), amb la conseqüent reducció de cèl·lules CD69⁺CD4⁺SP (33.7±1.7 vs 42.6±1.3) i CD69⁺CD8⁺SP (4.6±0.7 vs 8.1±1.1) (**Fig. 4.5C**). Aquesta estratègia facilita la discriminació de cèl·lules DP entrant en selecció positiva i les SP que recentment han estat seleccionades, i ens va permetre concloure que l'absència de CD6 interfereix el pas de cèl·lula DP (immadura) a SP (madura) durant el procés de selecció, i per tant reforcen la hipòtesis que CD6 estaria

involucrat en un procés de gran rellevància com ho és la maduració i selecció (positiva) de cèl·lules T al timus.

4.1.1.1.3 Teixits limfoides secundaris

A continuació es va estudiar si aquest aparent defecte en la maduració tímica afectava a les diferents poblacions limfoides als òrgans perifèrics. Així, no es van detectar diferències significatives entre ratolins CD6^{+/+} i CD6^{-/-} pel que fa a les freqüències de limfòcits B (CD19⁺) i de limfòcits T (CD4⁺ i CD8⁺) tant a melsa com a LN (**Fig. 4.6A**). De manera similar, tampoc es van observar diferències en les sub-poblacions NK, NKT i T $\gamma\delta$ entre els ratolins CD6^{+/+} i CD6^{-/-} (**Fig. 4.6B**).

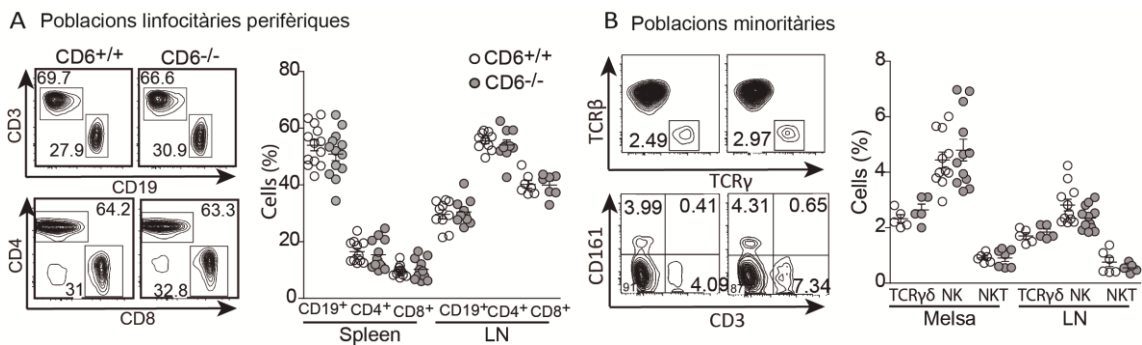
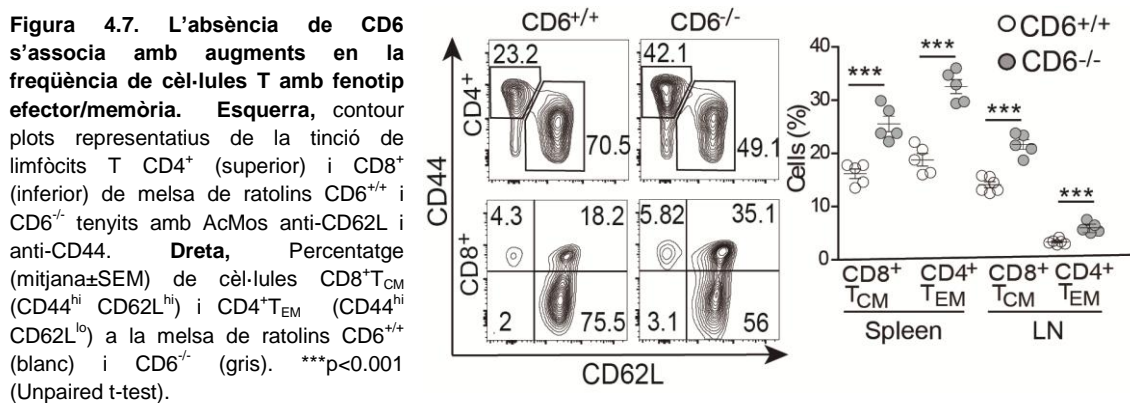


Figura 4.6. L'absència de CD6 no altera les principals poblacions limfocitàries perifèriques. A) Esquerra, contour plot representatiu de cèl·lules vives de la melsa tenyides amb AcMos anti-CD3 i anti-CD19 (panel superior), pel posterior anàlisi de cèl·lules CD3⁺CD19⁻ amb AcMos anti-CD4 i anti-CD8 (panel inferior). Els números indiquen la freqüència de cada població. **Dreta,** dot plot mostrant el percentatge (mitjana \pm SEM) de les principals poblacions en melsa i LN d'animals CD6^{+/+} (blanc) i CD6^{-/-} (gris). **B) Esquerra,** contour plots representatius de cèl·lules CD3⁺CD19⁻ marcades amb AcMos anti-TCR β i anti-TCR γ (panel superior) i cèl·lules CD3⁺CD19⁻CD4⁻CD8⁻ marcades amb AcMos anti-CD161 i anti-CD3. Els números indiquen la freqüència de cèl·lules NK (CD161⁺CD3⁺) i NKT (CD161⁺CD3⁺). **Dreta,** dot plot representant el percentatge de cèl·lules TCR $\gamma\delta$, NK i NKT de ratolins CD6^{+/+} (blanc) i CD6^{-/-} (gris) tant a melsa com a LN.

No obstant, quan es va estudiar la freqüència de cèl·lules de memòria central (T_{CM}; CD44^{hi}CD62L^{hi}) i cèl·lules efectores/memòria (T_{EM}; CD44^{hi}CD62L^{lo}) es va apreciar un increment estadísticament significatiu tant de cèl·lules CD8⁺T_{CM} com de CD4⁺T_{EM} en els ratolins CD6^{-/-} en comparació amb els CD6^{+/+} (**Fig. 4.7**).



Per a determinar si l'increment en les cèl·lules $CD8^+T_{CM}$ i $CD4^+T_{EM}$ observat en els ratolins $CD6^{-/-}$ era degut a fenòmens de proliferació homeostàtica (Jameson et al., 2015) com a conseqüència d'una disminució del flux de sortida de cèl·lules $CD4^+SP$ i $CD8^+SP$ del timus, es va avaluar la proliferació *in vivo* de cèl·lules $CD8^+T_{CM}$ i $CD4^+T_{EM}$ a través de la incorporació de BrdU durant una setmana. Així es va poder comprovar que tant a melsa com als nòduls limfàtics les cèl·lules $CD8^+T_{CM}$ i $CD4^+T_{EM}$ dels ratolins $CD6^{-/-}$ van incorporar menys BrdU i per tant van proliferar menys que les dels $CD6^{+/+}$ (**Fig 4.8**), fet que aniria en contra d'un augment en la proliferació homeostàtica. Per tant, l'increment abans esmentat podria correspondre més aviat a un major ràtio de conversió a $CD4^+T_{EM}$ i $CD8^+T_{CM}$ de les cèl·lules T naïve del ratolins $CD6^{-/-}$ respecte dels $CD6^{+/+}$.

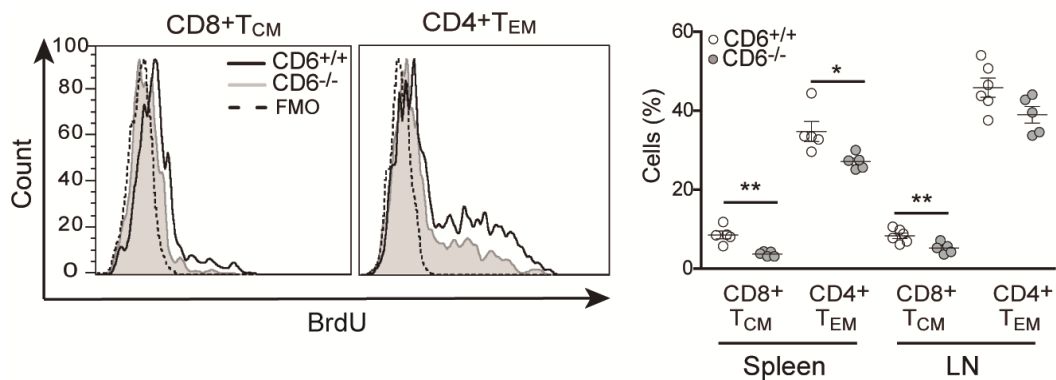


Figura 4.8. Proliferació disminuïda de cèl·lules T_{CM} i T_{EM} en absència de CD6. A) Esquerra, histograma representatiu de cèl·lules $CD8^+T_{CM}$ i $CD4^+T_{EM}$ BrdU positives a LN de ratolins $CD6^{+/+}$ (línia negra) i $CD6^{-/-}$ (línia gris) que van rebre BrdU durant 1 setmana. FMO representa cèl·lules sense tenyir per BrdU. **Dreta**, percentatges (mitjana±SEM) de cèl·lules $CD8^+T_{CM}$ i $CD4^+T_{EM}$ BrdU positives en melsa i LN d'animals $CD6^{+/+}$ i $CD6^{-/-}$. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ (Unpaired t-test).

Un factor que determina la conversió de cèl·lules verges (naïve) a cèl·lules de memòria innata és l'afinitat i/o l'activació dels seus TCR davant autoantígens, així que ens vam preguntar si les cèl·lules T dels ratolins $CD6^{-/-}$ tenien en general TCRs amb afinitats diferents que les dels ratolins $CD6^{+/+}$. Per abordar aquesta qüestió es va analitzar a cèl·lules T naïve ($CD44^{lo}$) el nivell d'expressió del factor de transcripció Nur77, el qual és indicatiu fiable de la intensitat del senyal del TCR (Moran et al., 2011). L'anàlisi per citometria d'aquest marcador va revelar que les cèl·lules naïve $CD8^+CD44^{lo}$ i $CD4^+CD44^{lo}$ de LN presentaven nivells lleugerament menors encara que no estadísticament significatius de Nur77 a ratolins $CD6^{-/-}$ que a $CD6^{+/+}$ (**Fig. 4.9**). Aquesta dada indicaria que, possiblement, en absència de CD6 s'han seleccionat al timus uns clons amb menor afinitat o intensitat de resposta en comparació amb aquelles cèl·lules que

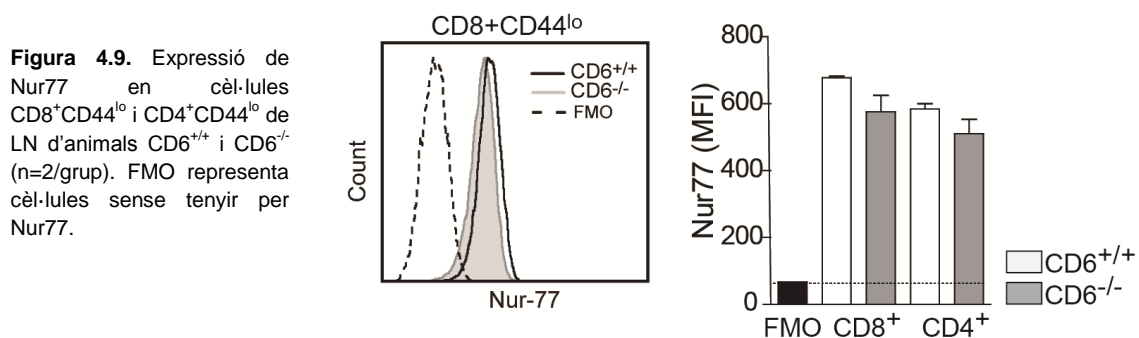


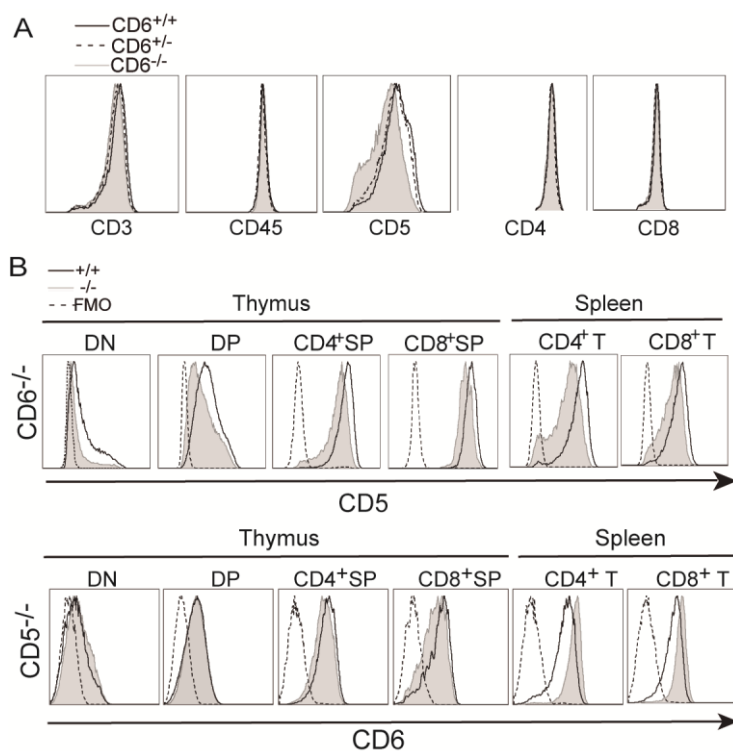
Figura 4.9. Expressió de Nur77 en cèl·lules $CD8^+CD44^{lo}$ i $CD4^+CD44^{lo}$ de LN d'animals $CD6^{+/+}$ i $CD6^{-/-}$ (n=2/grup). FMO representa cèl·lules sense tenyir per Nur77.

presenten CD6 a la seva membrana.

Donada l'associació física reportada del CD6 amb el complex TCR/CD3 i les molècules accessòries que l'envolten (Gimferrer et al., 2004), es va voler determinar si l'absència de CD6 afectava l'expressió a membrana d'algun d'aquests receptors. L'anàlisi de cèl·lules T de LN no va mostrar una expressió diferent de CD3, CD4, CD45 o CD8 entre els ratolins $CD6^{-/-}$ i $CD6^{+/+}$. No obstant això, sí que es van observar diferències pel que fa a l'expressió de CD5, essent aquesta inferior en els animals $CD6^{-/-}$ que en el seus germans $CD6^{+/+}$ (**Fig. 4.10A**). Un estudi més detallat va revelar que la reducció de CD5 es donava ja en els timòcits més immadurs DN, i que aquest defecte es mantenia al llarg de la maduració dels timòcits i en cèl·lules T madures $CD4^+$ i $CD8^+$ en perifèria (**Fig. 4.10B**; panel superior). Arrel d'aquestes observacions, va sorgir la pregunta de si en absència de CD5 també s'observaria una disminució de CD6. Curiosament, quan es va estudiar l'expressió de CD6 en timòcits i cèl·lules T madures d'animals $CD5^{-/-}$, es va observar l'efecte invers (**Fig. 4.10B**; panel inferior). L'absència de CD5 va comportar una lleugera disminució de l'expressió de CD6 en timòcits madurs $CD4^+SP$ i $CD8^+SP$, però en canvi un augment en cèl·lules T madures de perifèria. La interpretació preliminar d'aquests resultats es que existeix una regulació creuada de l'expressió dels dos receptors a nivell central i perifèric fins ara desconeguda.

Figura 4.10. Canvis en l'expressió de CD5 i CD6 en ratolins $CD6^{-/-}$ i $CD5^{-/-}$, respectivament.

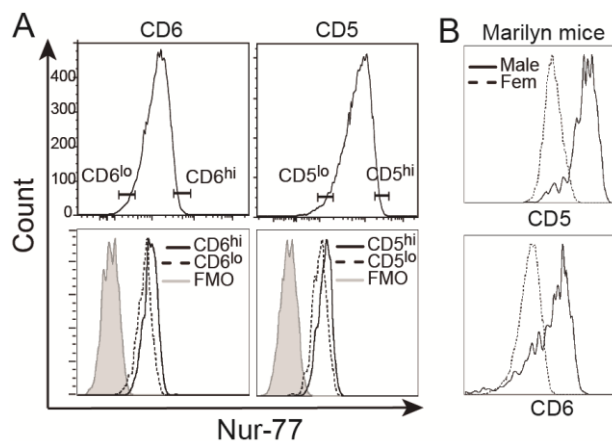
A) Histogrames amb l'expressió de diversos receptors de superfície de cèl·lules T en animals $CD6^{+/+}$ (línia negra), $CD6^{+/-}$ (línia discontinua) i $CD6^{-/-}$ (línia gris). **B)** Histogrames representant l'expressió de CD5 a timus i melsa d'animals $CD6^{-/-}$ (panel superior), i l'expressió de CD6 d'animals $CD5^{-/-}$ (panel inferior). Es mostren animals $+/+$ (línia negra) i $-/-$ (línia gris) per a cada genotip. FMO (línia discontinua) representa una tinció sense CD5 o CD6, segons panel.



Està demostrat que en les cèl·lules més autoreactives circulants en perifèria, l'expressió de CD5 s'ajusta durant la selecció positiva al timus i es troba augmentada de forma proporcional a l'afinitat del TCR (Azzam et al., 1998, 2001). Així, cèl·lules T perifèriques $CD5^{hi}$ són més autoreactives i presenten nivells més alts de Nur77 que les $CD5^{lo}$ (Fulton et al., 2015). Donat que fins el moment els resultats obtinguts mostren una maduració anormal de les cèl·lules T en

absència de CD6, ens vam preguntar si, al igual que succeeix amb CD5, CD6 es trobaria augmentat en les cèl·lules més autoreactives. Per abordar aquesta qüestió, es van seleccionar les cèl·lules T de ratolins CD6^{+/+} amb expressió alta (CD6^{hi}) o baixa (CD6^{lo}) de CD6 i es va comparar l'expressió de Nur77 en ambdues (**Fig 4.11A**). Així, es va observar que les cèl·lules CD6^{hi} tenien una expressió incrementada de Nur77 en comparació amb les CD6^{lo}, indicant que CD6 es troba sobreexpressat en les cèl·lules naïve CD44^{lo} més autoreactives, de forma anàloga al que passa amb CD5. Utilitzant una aproximació diferent, es van analitzar també cèl·lules T dels ratolins transgènics Marilyn que expressen un únic tipus de TCR restringit per MHC classe-II i reactiu contra l'antigen masculí HY (Moran et al., 2011). A conseqüència d'això, durant la maduració al timus, els timòcits DP TCR transgènics de les femelles Marilyn són seleccionats positivament, mentre que els dels mascles pateixen una forta selecció negativa (fruit del reconeixement amb alta afinitat de l'autoantigen HY) i per tant presenten un nombre molt baix de cèl·lules CD4⁺ a perifèria sotmeses a forts processos d'anèrgia per evitar autoreactivitat. Esta descrit que CD5 es sobreexpressa en processos anèrgics en un intent de la cèl·lula de frenar la seva activació (Kassiotis et al., 2003; Stamou et al., 2003), i es va voler comprovar si l'expressió de CD6 també variava en condicions anèrgiques comparant l'expressió dels dos receptors en cèl·lules T de mascles femelles Marilyn.

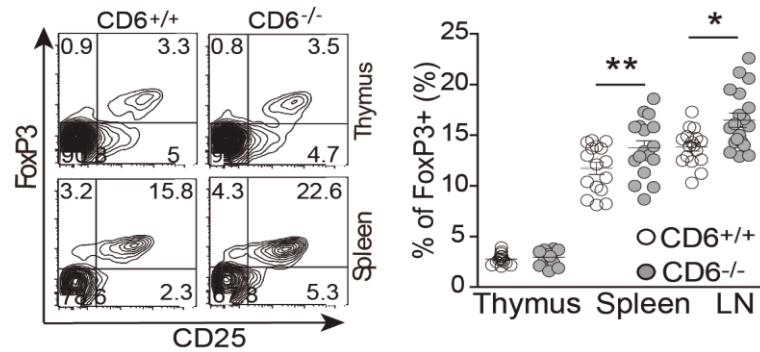
Figura 4.11. L'expressió de CD6 es troba augmentada en les cèl·lules T més reactives i anèrgiques . A) Panel superior, Histogrames mostrant l'expressió de CD6 (esquerra) i CD5 (dreta) a cèl·lules T CD8⁺ LN de ratolins silvestres (CD6^{+/+}). **Panel inferior,** Histogrames mostrant l'expressió de Nur77 al 5-6% de cèl·lules CD8⁺ de perifèria LN més positives (hi) o menys positives (lo) per els marcadors CD6 i CD5 analitzades al panel superior. Per a cada receptor, les cèl·lules hi es mostren amb un línia negra i les lo amb línia discontinua. FMO representa una tinció sense Nur77. **B)** Histogrames mostrant l'expressió de CD5 (panel superior) i CD6 (panel inferior) a cèl·lules T CD4⁺ de ratolins mascles (línia contínua) i femelles (línia discontinua) de la soca TCR transgènica Marilyn.



Tal i com mostra la **Fig. 4.11B**, les cèl·lules T CD4⁺ dels mascles Marilyn presentaven a la seva superfície nivells més elevats tant de CD5 com de CD6 en comparació amb les femelles. Per tant, l'expressió de CD6 es troba augmentada en les cèl·lules més autoreactives i en cèl·lules anèrgiques, el que seria compatible amb una potencial funció reguladora negativa de la senyalització via TCR per part de CD6.

Com es comenta a la introducció d'aquesta tesi, un altre subtipus de cèl·lules T fortament regulat durant el procés de selecció tímica i que intervé en la homeòstasis i regulació de les respostes immunitàries perifèriques enfront autoantígens (tolerància) o antígens forans són les cèl·lules T reguladores (Treg). Atenent a la seva funció reguladora negativa de la senyalització via TCR, s'ha descrit que ratolins $CD5^{-/-}$ presenten una freqüència augmentada de cèl·lules Treg ($CD4^{+}CD25^{+}FoxP3^{+}$) tant al timus com a la perifèria (Ordoñez-Rueda et al., 2009). Un

Figura 4.12. CD6 regula la generació de cèl·lules T amb fenotip regulador. Esquerra, contour plot mostrant l'expressió dels marcadors CD25 i FoxP3 a cèl·lules T $CD4^{+}$ de timus i melsa de ratolins $CD6^{+/+}$ i $CD6^{-/-}$. Dreta, Freqüències de cèl·lules Treg ($CD4^{+}CD25^{+}FoxP3^{+}$) a timus, melsa i LN d'animals $CD6^{+/+}$ (blanc) i $CD6^{-/-}$ (gris). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (unpaired t-test).



anàlisi similar fet amb els nostres ratolins $CD6^{-/-}$ no va demostrar increments significatius en la freqüència de Treg al timus en comparació als seus germans $CD6^{+/+}$ (Fig. 4.12). No obstant això, tant a melsa com a LN sí que es van poder observar increments estadísticament significatius d'aquest subtipus cel·lular als ratolins $CD6^{-/-}$ (Fig. 4.12). Això suggeriria que CD6 jugaria un cert paper més rellevant en la inducció de cèl·lules Treg a la perifèria (iTreg, o Treg induïbles) que al timus (nTreg, o Treg naturals).

4.1.1.2 Estudi funcional de cèl·lules T deficientes en CD6

4.1.1.2.1 Mobilització de calci intracel·lular

Després d'estudiar la distribució de les diferents poblacions limfocitàries i haver detectat un procés maduratiu anormal en el timus dels ratolins $CD6^{-/-}$, es va estudiar la resposta de

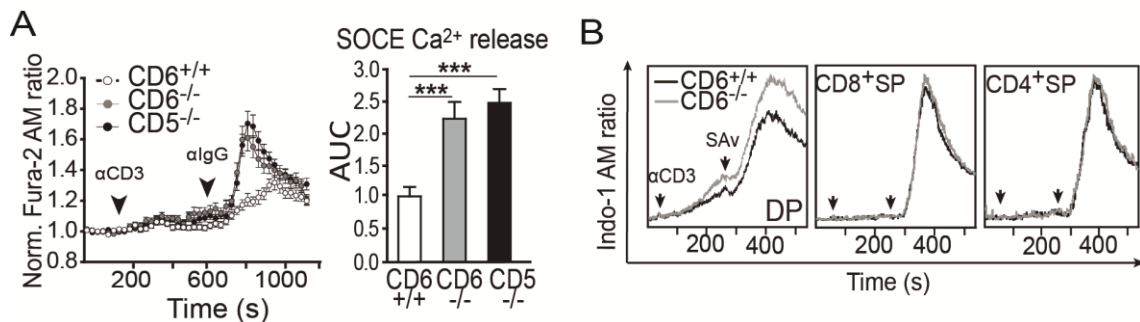


Figura 4.13. La deficiència de CD6 dona lloc a fluxos de Ca^{2+} augmentats en timòcits immadurs activats via CD3. **A)** Esquerra, Anàlisi per microscòpia de fluorescència de l'alliberació de Ca^{2+} emmagatzemat (*store operated calcium release*, SOCE) en resposta a l'estimulació amb AcMo anti-CD3 (145.2C11) seguida d'un entrecreuament amb anti-IgG, en timòcits marcats amb Fura-2 AM d'animals $CD6^{+/+}$ ($n=199$ cèl·lules, blanc), $CD6^{-/-}$ ($n=188$ cèl·lules, gris) i $CD5^{-/-}$ ($n=198$ cèl·lules, negre) ($N=4$ animals/genotip). **Dreta**, SOCE representat com la mitja \pm SEM de l'àrea sota la corba (*Area under the curve*, AUC). *** $p < 0.001$ (unpaired t-test). **B)** Anàlisi per citometria del flux de Ca^{2+} intracel·lular en timòcits DP, $CD8^{+}SP$ i $CD4^{+}SP$ marcats amb Indo-1 AM d'animals $CD6^{+/+}$ (negre) i $CD6^{-/-}$ (gris) després de l'estimulació amb AcMo anti-CD3 biotinat seguida d'entrecreuament amb Streptavidina (SAV). Les dades són representatives de tres experiments independents realitzats.

l'activació a través del TCR en timòcits en absència de CD6. El primer paràmetre que es va avaluar van ser els canvis en la concentració intracel·lular de Ca^{2+} després de l'estimulació amb AcMo anti-CD3. Com a control intern per a l'experiment, es van utilitzar ratolins $CD5^{-/-}$ ja que esta descrit que els timòcits d'aquesta soca son hiperreactius a l'estimulació via CD3, la qual cosa dona lloc a nivells de Ca^{2+} intracel·lular superiors als observats a ratolins silvestres ($CD5^{+/+}$) (Tarakhovsky et al., 1995).

Els resultats obtinguts amb microscòpia de fluorescència van demostrar com els timòcits dels ratolins $CD6^{-/-}$ presentaven un increment de Ca^{2+} intracel·lular davant l'estimulació via CD3 molt superior respecte els $CD6^{+/+}$ (**Fig. 4.13A**). A més, aquest increment generat per la deficiència de CD6 era de similar magnitud al observat a la deficiència de CD5, indicant que ambdós receptors podrien compartir una funció moduladora negativa del senyal transmès pel TCR en cèl·lules T immadures del timus. No obstant, a través de la microscòpia de fluorescència no es possible identificar quin tipus cel·lular concret és responsable del fenomen observat al timus. Per abordar aquesta qüestió es va estudiar la mobilització de Ca^{2+} intracel·lular a les diferents subpoblacions timocítiques mitjançant citometria de flux. Els resultats obtinguts amb aquesta tècnica van permetre no només validar les dades de microscòpia, sinó també demostrar que les diferències entre ratolins $CD6^{+/+}$ i $CD6^{-/-}$ es donaven a nivell de cèl·lules immadures DP, però no de cèl·lules més madures $CD4^{+}SP$ o $CD8^{+}SP$ tant del timus (**Fig 4.13B**) com de la perifèria (dades no presentades).

Donat que la deficiència de CD5 fa els timòcits $CD5^{-/-}$ hiper-reactius davant una estimulació amb anti-CD3, i que per altra banda s'ha observat que els ratolins $CD6^{-/-}$ expressen nivells reduïts de CD5 (**Fig. 4.10**), es va realitzar un experiment per a descartar que els nivells de Ca^{2+} incrementats en ratolins $CD6^{-/-}$ fossin deguts a la expressió disminuïda de CD5 que presenten els seus limfòcits T i no a l'absència de CD6. Amb aquest propòsit, es van utilitzar ratolins $CD5$ heterozigots ($CD5^{+/-}$) els quals tenen una expressió normal de CD6 però una disminució parcial de l'expressió de CD5 molt semblant a la observada en els ratolins $CD6^{-/-}$ (**Fig. 14A**, esquerra). Tal i com mostra la **Fig. 14A**, els ratolins $CD5^{+/-}$ presentaven uns nivells intracel·lulars de Ca^{2+} després d'una estimulació via CD3 comparables als de ratolins $CD6^{+/+}$ o $CD5^{+/+}$, i inferiors als

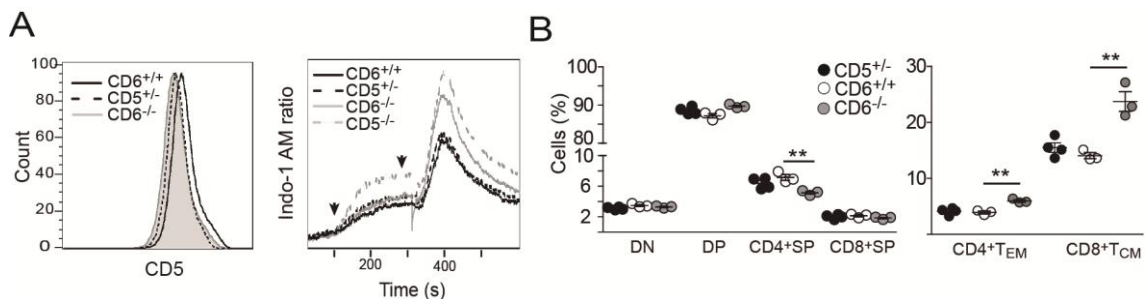


Figura 14. L'absència de CD6 és responsable dels canvis fenotípics i bioquímics dels ratolins $CD6^{-/-}$. A) Esquerra: Expressió de CD5 en timòcits DP de ratolins $CD6^{+/+}$ (línea negra), $CD5^{+/-}$ (línea discontinua) i $CD6^{-/-}$ (línea gris). **Dreta:** Monitorització del nivells de Ca^{2+} intracel·lular segons es descriu a Fig.13B en timòcits DP de ratolins $CD6^{+/+}$ (línea negra), $CD5^{+/-}$ (línea discontinua negra), $CD6^{-/-}$ (línea gris) i $CD5^{-/-}$ (línea discontinua gris). Experiment representatiu de dos experiments realitzats. **B)** Freqüències de les principals poblacions tímiques (**esquerra**) i de poblacions perifèriques $CD4^{+}$ i $CD8^{+}$ naïve i memòria a LN (**dreta**) de ratolins $CD5^{+/-}$ (negre), $CD6^{+/+}$ (blanc), i $CD6^{-/-}$ (gris). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ (unpaired t-test).

observats a ratolins CD6^{-/-} i CD5^{-/-}. Aquestes dades permeten excloure l'expressió reduïda de CD5 als limfòcits de ratolins CD6^{-/-} com a responsable dels canvis observats als nivells de Ca²⁺ als timòcits d'aquests animals. Igualment, també es va poder comprovar que els ratolins CD5^{+/-} no presentaven alteracions en les principals poblacions tímiques ni en les cèl·lules CD8⁺T_{CM} ni CD4⁺T_{EM} perifèriques (**Fig. 14B**), excloent la deficiència parcial de CD5 com a responsable dels canvis observats en aquestes poblacions a ratolins CD6^{-/-}.

4.1.1.2 Anàlisi de fosforilació de proteïnes senyalitzadores intracel·lulars

Per aprofundir en l'estudi dels possibles mecanismes pels quals CD6 contribueix a la modulació de la senyal del TCR, es va analitzar la fosforilació de diverses proteïnes implicades en la transmissió de dita senyal després de l'estimulació via CD3. Degut a les diferències observades a nivell de la mobilització de Ca²⁺ entre timus i perifèria, es va decidir avaluar la fosforilació de proteïnes de la cascada del TCR en timòcits.

Es van estimular timòcits CD6^{+/+} i CD6^{-/-} durant 2 i 5 min amb AcMo anti-CD3 sol o en combinació amb AcMo anti-CD4 i es van analitzar les fosfoproteïnes de lisats cel·lulars totals per Western Blot. Un primer anàlisi amb un anticòs anti-fosfotirosines va revelar que, en contrast amb les grans diferències observades en la mobilització de Ca²⁺, el patró de fosfotirosines dels timòcits CD6^{-/-} va resultar molt similar al dels CD6^{+/+} i no es van apreciar diferències destacables en cap de les diferents bandes fosforilades (**Fig. 4.15**). En segona

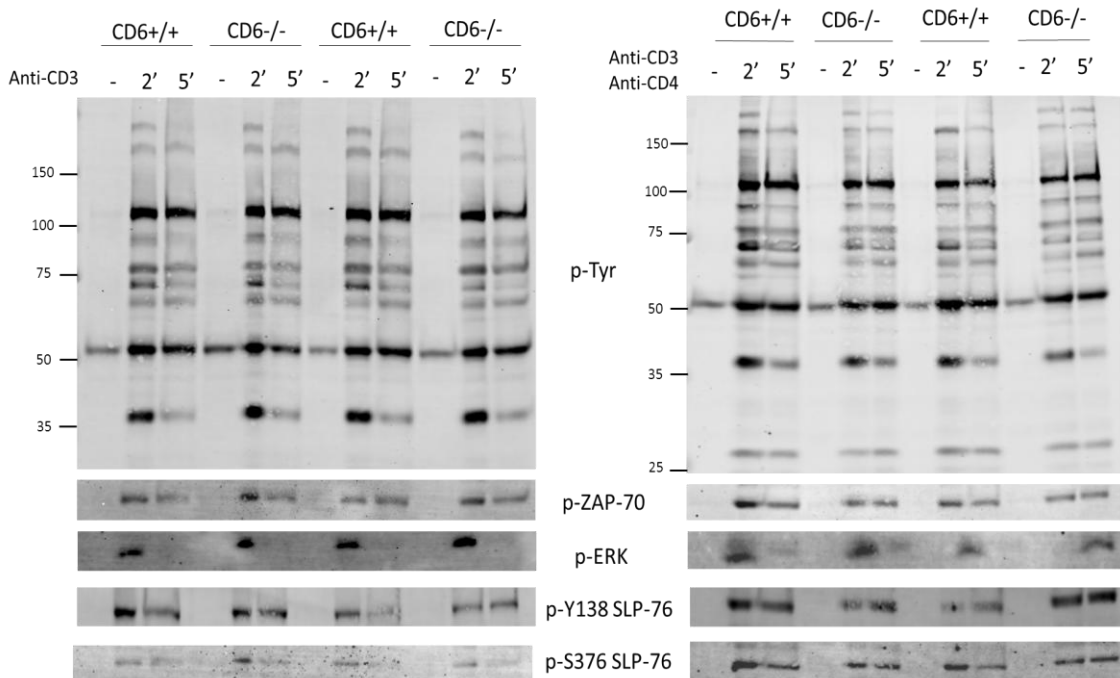
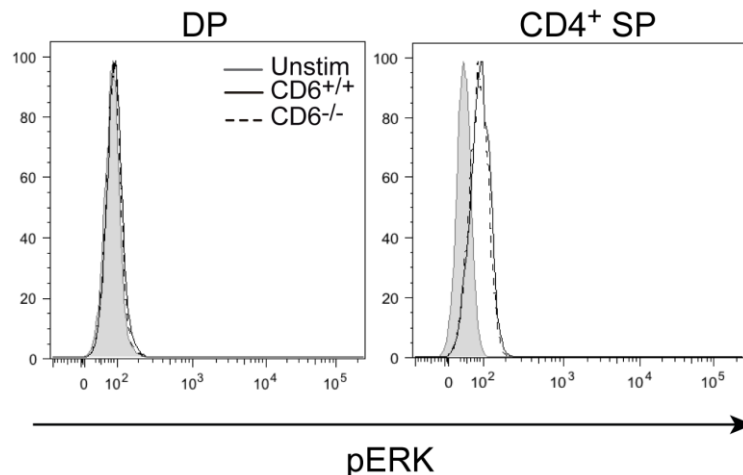


Figura 4.15. Anàlisi comparatiu de la inducció de fosfoproteïnes via CD3 a timòcits de ratolins CD6^{-/-} i CD6^{+/+}. Immunoblot representatiu d'una estimulació amb AcMo anti-CD3 sol (**esquerra**) o en combinació amb anti-CD4 (**dreta**) de timòcits totals d'animals CD6^{+/+} i CD6^{-/-} (n=2). Es van incubar les cèl·lules breument a 4°C amb 3 µg d'anti-CD3 i 3 µg d' anti-CD4 biotinats, i seguidament es van estimular a 37°C amb Streptavidina durant 2 i 5 min. Es van lliurar les cèl·lules i es van carregar al gel de SDS-PAGE 60µg de proteïna per pou. Després de la transferència, es va incubar la membrana amb anticossos anti-fosfotirosines totals (p-Tyr; clona 4G10), anti-fosfotirosines 319/352 de ZAP-70 (p-ZAP-70), anti-pT202 i pY204 de MAPK p44/42 (p-ERK clona E10), i anti-pY128 i anti-pS376 de SLP-76.

instància es va estudiar la fosforilació de proteïnes senyalitzadores específiques per descartar que possibles diferències quantitatives o qualitatives haguessin pogut passar desapercebudes. Així, es va decidir analitzar la fosforilació de ZAP-70 i SLP-76 donat que són de les primeres proteïnes presents en la cascada de senyalització del TCR (Morris and Allen, 2012), i per tant indispensables per a una correcta activació d'aquest, i que s'ha descrit que SLP-76 interacciona amb CD6 després de l'estimulació del TCR (Roncagalli et al., 2014). A més, es va incloure l'anàlisi de la fosforilació de la MAPK ERK (p44/42) degut a que l'augment de fosforilació d'aquesta proteïna està estretament lligat amb un augment de Ca^{2+} . Degut a una certa variabilitat inter-individual, l'anàlisi de cap de les esmentades proteïnes no va mostrar grans diferències en el seu nivell de fosforilació entre ratolins $CD6^{+/+}$ i $CD6^{-/-}$ en resposta a l'estimulació tant amb anti-CD3 sol com combinat amb anti-CD4, a 2 i 5 min (**Fig. 4.15**). Resultats similars es van obtenir en l'estudi de la proteïna PLC γ (dades no presentades). No obstant això, l'observació detallada dels resultats va permetre evidenciar un canvi subtil i encara pendent de confirmació en la cinètica de fosforilació de SLP-76 que es va veure lleugerament endarrerida en el cas del ratolins $CD6^{-/-}$, especialment després de l'estimulació combinada amb anti-CD3 i anti-CD4.

Davant els resultats en timòcits indicant una major mobilització de Ca^{2+} en ratolins $CD6^{-/-}$ sense que fossin acompanyats de canvis importants en la fosforilació de les molècules senyalitzadores abans esmentades, es va pensar en la possibilitat que aquests darrers canvis estiguessin emmascarats o atenuats per una població específica i/o minoritària del timus. De fet, les diferències a nivell de la mobilització de Ca^{2+} es van veure únicament en la població DP, però la magnitud de dita mobilització va ser molt més petita que en les cèl·lules $CD4^+SP$ i $CD8^+SP$ (de 0.08 a 0.12 en les DP *versus* 0.1 en repòs fins a 0.4 en les SP). Per tant, es podria donar el cas que l'absència de canvis evidents en la fosforilació en les cèl·lules SP estigués emmascarant possibles diferències menors a nivell de cèl·lules DP. Conseqüentment, es va canviar el sistema de detecció amb immunoblot per el de tinció intracel·lular i anàlisi per citometria de flux i així poder distingir entre les cèl·lules DP i $CD4^+SP$. Com es pot observar a la **Fig. 4.16**, l'estimulació dels timòcits totals amb AcMo anti-CD3 i posterior fixació,

Figura 4.16. Fosforilació de la proteïna ERK induïda via CD3 en absència de CD6. Es van estimular timòcits de ratolins $CD6^{+/+}$ (línia contínua) i $CD6^{-/-}$ (línia discontinua) amb 5 μ g d'AcMo anti-CD3 soluble i posterior entrecruament amb SAV. Es va fer una tinció de superfície amb anti-CD4 APC i anti-CD8 FITC i després es van fixar, permeabilitzar i tenyir amb anti-p44/42 (pERK) seguit d'un anticòs anti-Fc de ratolí conjugat a PE. Es mostra també cèl·lules sense estimular (Unstimulated; línia amb fons gris).

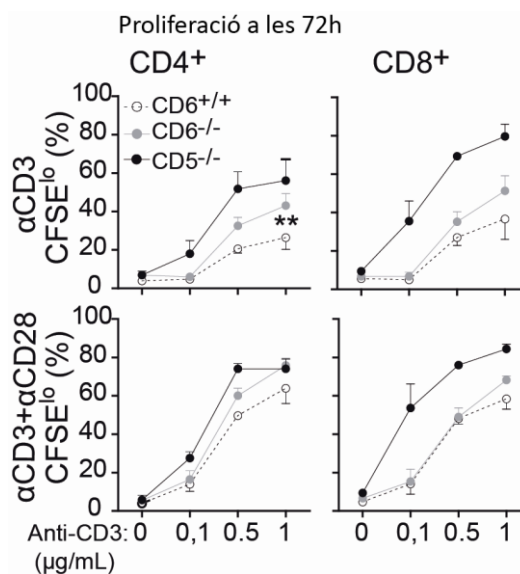


permeabilització i tinció seqüencial amb un anticòs anti-pERK i anti-Fc de ratolí conjugat a PE no va revelar diferències significatives entre ratolins CD6^{-/-} i CD6^{+/+} a nivell de DP i CD4⁺SP. No obstant, es va poder comprovar que en el cas de les CD4⁺SP hi havia un increment de pERK post-estimulació, mentre que a les DP era de molt menor magnitud i pràcticament indetectable, validant la hipòtesi abans plantejada. D'aquesta manera considerem que la baixa senyal de fosforilació en les cèl·lules DP no ens permet excloure definitivament l'existència de diferències de senyalització i per tant d'hiper-reativitat a l'estimulació via TCR en absència de CD6.

4.1.1.2.3 Estudi de proliferació *in vitro* de cèl·lules T madures perifèriques

Tot i que l'estudi de la mobilització de Ca²⁺ no va mostrar diferències en les cèl·lules T CD4⁺ i CD8⁺ perifèriques dels ratolins CD6^{-/-} comparat amb els CD6^{+/+}, es va decidir estudiar la resposta proliferativa post-estimulació via TCR de cèl·lules T mancades de CD6. En aquests experiments, cèl·lules T CD4⁺ o CD8⁺ purificades (de melsa o LN) per selecció magnètica i marcades amb CFSE, es van estimular durant 72 h amb diferents concentracions d'AcMo anti-CD3 unit a plàstic sol o en combinació amb una concentració fixa (1 µg/mL) d'AcMo anti-CD28 soluble. A nivell general, es va observar una tendència de les cèl·lules T CD6^{-/-} a proliferar més que les CD6^{+/+}, tot i que la significança estadística es va obtenir només en les cèl·lules CD4⁺ i en condicions d'absència de co-estimulació amb anti-CD28 (**Fig. 4.17**). En qualsevol cas, la magnitud de l'increment en la proliferació no va ser tan gran com l'observat per a cèl·lules T de ratolins CD5^{-/-}, que es van incloure com a control positiu per la seva reconeguda hiperreactivitat a l'estimulació via TCR (**Fig. 4.17**).

Figura 4.17. La deficiència de CD6 comporta increments en la proliferació de cèl·lules T perifèriques estimulades via CD3. Es van aïllar cèl·lules T CD4⁺ o CD8⁺ de melsa per selecció magnètica i, una vegada marcades amb CFSE, es van estimular durant 72 h amb diferents concentracions d'AcMo anti-CD3 unit a placa, sol (panel superior) o en combinació amb anti-CD28 soluble (1µg/mL; panel inferior). Després es van marcar amb AcMos anti-CD4 i anti-CD8 conjugats per l'anàlisi per citometria de flux del nivell de tinció per CFSE. Els gràfics indiquen el percentatge (mitjana±SEM) de cèl·lules CD4⁺ (esquerra) i CD8⁺ (dreta) proliferants (CFSE^{lo}). Es mostren les dades acumulades de diferents experiments amb animals CD6^{+/+} (N=4-7 per punt, línia discontinua) i CD6^{-/-} (N=4-7 per punt, línia gris), i animals CD5^{-/-} (N=3, línia negra). (Two-way ANOVA entre els genotips CD6^{+/+} i CD6^{-/-}, **p<0.01).



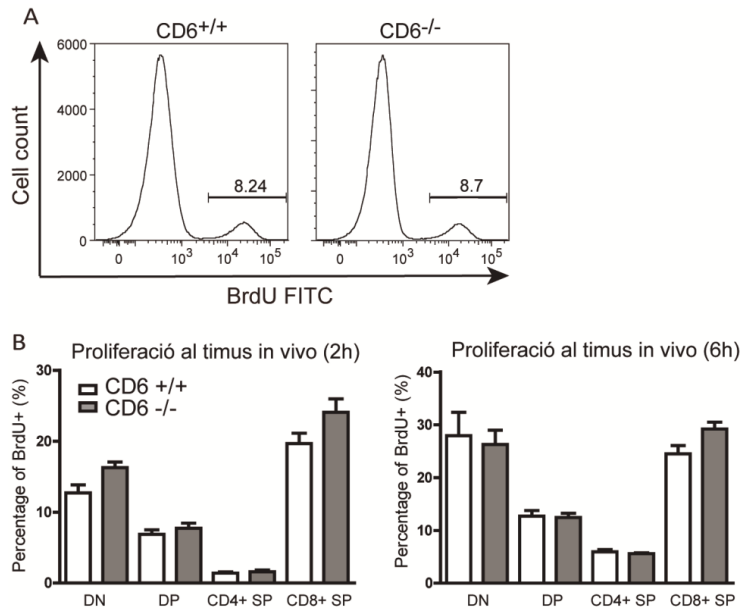
4.1.1.2.4 Estudi de proliferació *in vivo* de timòcits

Donat que les cèl·lules del timus cultivades *ex vivo* amb AcMo anti-CD3 tenen una alta taxa de mortalitat que dificulta l'anàlisi de la seva proliferació, es va estudiar aquesta *in vivo* mesurant

la incorporació de BrdU. Així, es va fer una injecció i.p. única de BrdU i es va deixar incorporar durant 2 o 6 h abans del sacrifici dels animals i el processament dels timus. A continuació es va fer primer un marcatge en superfície per CD4 i CD8 i després intracel·lular per BrdU per determinar la freqüència de les diferents poblacions de cèl·lules tímiques BrdU⁺ per citometria de flux. Tal i com es pot apreciar a la **Fig. 4.18A** no es van observar diferències entre ratolins CD6^{-/-} i CD6^{+/+} pel que fa a la freqüència de cèl·lules DP BrdU⁺. De manera similar, tampoc es

Figura 4.18. L'absència de CD6 no afecta la proliferació *in vivo* de les diferents subpoblacions tímiques.

A) Es van injectar via i.p. ratolins CD6^{+/+} i CD6^{-/-} amb 1 mg de BrdU. Passades 2 o 6 h, es van sacrificar els animals i els timòcits totals es van tenyir en superfície amb AcMos anti-CD4 i anti-CD8 conjugats a diferents fluorocroms i intracel·lularment amb anti-BrdU pel seu anàlisi per citometria de flux. Es mostra un experiment representatiu del percentatge de cèl·lules BrdU⁺ en la població DP a les 2h post-injecció de BrdU. **B)** Diagrama de barres mostrant el percentatge (mitjana \pm SEM) d'incorporació de BrdU a diferents subpoblacions del timus d'animals CD6^{+/+} (blanc; N=4) i CD6^{-/-} (gris; N=4) a les 2 h (esquerra) o 6 h (dreta) post-injecció de BrdU.



van veure diferències estadísticament significatives entre els animals CD6^{+/+} i CD6^{-/-} per a la resta de poblacions tímiques, ni a les 2 h ni quan el temps d'incorporació de BrdU es va allargar fins a 6 h (**Fig. 4.18B**).

4.1.1.2.5 Resposta d'anticossos *in vivo* enfront a antígens T-dependents

Per avaluar si la presència de CD6 en les cèl·lules T és necessària per a una correcta col·laboració entre les cèl·lules T-B durant les respostes immunitàries *in vivo*, es va analitzar la resposta d'anticossos davant d'antígens T-dependents. Amb aquest propòsit es va fer una

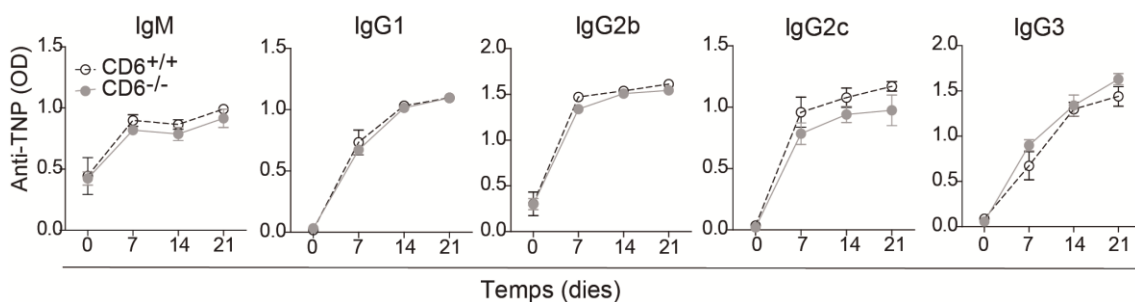


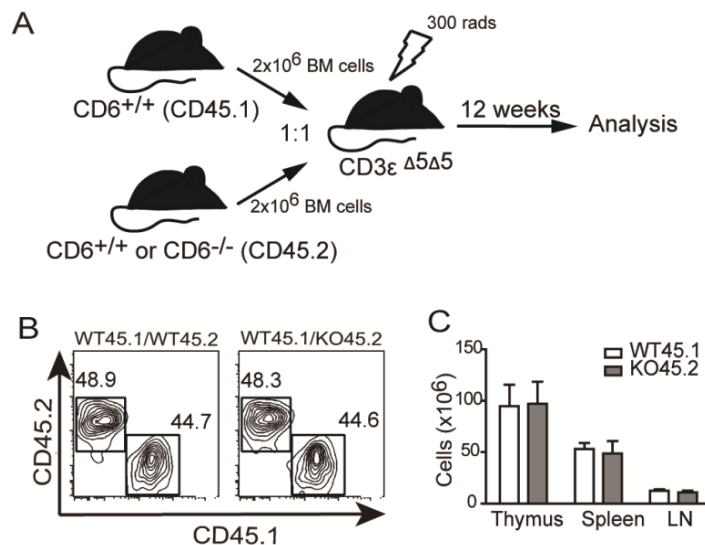
Figura 4.19. Els ratolins CD6^{-/-} tenen una resposta d'anticossos normal enfront antígens T-dependents. Es van immunitzar animals CD6^{+/+} (cercles blancs; N=4) i CD6^{-/-} (cercles grisos; N=5) a dia 0 i dia 14 amb 50 μ g de TNP-KLH amb o sense CFA, respectivament, a la base de la cua. Cada 7 dies es va extraure sang i es van analitzar els nivells en sèrum de les diferents classes i subclases d'anticossos anti-TNP per ELISA. Els resultats s'expressen com mesura de la OD a 450 nm.

primera immunització a dia 0 dels animals $CD6^{+/+}$ i $CD6^{-/-}$ amb 50 μ g de l'haptè TNP conjugat a la proteïna *carrier* KLH en presència de CFA i una segona a dia 14 però sense CFA. L'anàlisi per ELISA dels nivells d'anticossos anti-TNP a dies 7, 14 i 21 no va revelar diferències estadísticament significatives entre els ratolins $CD6^{-/-}$ i $CD6^{+/+}$ per la pràctica totalitat de classes i subclasses d'immunoglobulines (IgM, IgG1, IgG2b, IgG2c, IgG3) estudiades (**Fig. 4.19**), amb l'excepció d'IgG2c (un isotip relacionat amb respostes Th1) que va mostrar una tendència a la baixa en ratolins $CD6^{-/-}$. Tot i aquesta dada, els resultats globals indicarien que les respostes d'anticossos resultants de la col·laboració T-B estarien relativament ben conservades en absència d'expressió de CD6.

4.1.1.2.6 Anàlisi de quimeres competitives de medul·la òssia

Per abordar la qüestió sobre si els defectes trobats a ratolins $CD6^{-/-}$ en la maduració dels timòcits eren intrínsecs d'aquest tipus cel·lular i no depenien de factors estromals o microambientals, es va dur a terme un experiment de quimeres de medul·la òssia on es van fer competir cèl·lules $CD6^{+/+}$ (CD45.1 o CD45.2) i $CD6^{-/-}$ (CD45.2) des dels primers estadis maduratius en un ratolí hoste deficient per a cèl·lules T (**Fig. 4.20A**). El que s'esperava es que injectant el mateix nombre de cèl·lules d'ambdós genotips hi hagués una reducció de la freqüència de cèl·lules $CD6^{-/-}$ després de la selecció. Amb aquesta idea, es van injectar a parts iguals medul·la òssia de ratolins $CD6^{+/+}$ (WT45.1) i $CD6^{-/-}$ (KO45.2) a ratolins hostes deficients per la cadena CD3 ϵ (CD3- $\epsilon^{\Delta 5/\Delta 5}$) els quals estan mancats de cèl·lules T en perifèria ja que tenen un bloqueig maduratiu a nivell de DN3 (Malissen et al., 1995). En un grup experimental control apart, es van injectar medul·la òssia de ratolins silvestres $CD6^{+/+}$ dels genotips CD45.1 i CD45.2 (WT45.1 i WT45.2) i es va comprovar per citometria de flux que les mescles injectades en aquest cas i el anterior estaven a dia 0 en una proporció 1:1 (**Fig. 4.20B**). Passades les 12 setmanes necessàries per a una bona reconstitució dels òrgans limfoides centrals i perifèrics amb cèl·lules T, es van sacrificar els animals i es va estudiar la relació entre els marcadors

Figura 4.20. La reconstitució dels òrgans limfoides a les 12 setmanes a partir de cèl·lules hematopoètiques $CD6^{+/+}$ i $CD6^{-/-}$ no mostra diferències. A) Esquema del protocol d'inducció de quimeres competitives de moll d'os utilitzat. Breument, es van injectar 2×10^6 cèl·lules del moll de l'os (*bone marrow*, BM cells) d'animals $CD6^{+/+}$ (WTCD45.1) i animals $CD6^{-/-}$ (KOCD45.2) via intravenosa a animals receptors CD3 ϵ KO, prèviament irradiats amb una única dosi de 300 rads. A les 12 setmanes es van sacrificar els animals i es van analitzar el timus, la melsa i els nòduls limfàtics (LN). B) Anàlisi de la mescla de cèl·lules de BM que es va injectar en el grup WTCD45.1-WTCD45.2 (Esquerra) o al grup WTCD45.1-KOCD45.2 C) Números absoluts dels tres òrgans en animals control que havien estat injectats amb 4×10^6 cèl·lules de BM només d'animals WTCD45.1 (N=3, blanc) o només de KOCD45.2 (N=3, gris). Es mostra la mitja \pm SEM.



CD45.1 i CD45.2 per citometria de flux. La possibilitat que els ratolins CD6^{-/-} tinguessin problemes de reconstitució es va descartar ja que no es van veure diferències en els números cel·lulars totals a timus, melsa i LN dels grups control injectats només amb cèl·lules WT45.2 o KO45.2 (**Fig. 4.20C**).

Pel que fa als grups quimeres de cèl·lules CD6^{+/+} (CD45.1) i CD6^{-/-} (CD45.2), es van observar diferències significatives tant a nivell central com perifèric (**Fig. 4.21**). Tot i que el genotip CD45.2 va mostrar una inesperada avantatge enfront el CD45.1 en el grup control (WT45.1/WT45.2), aquesta es va reduir en el grup WT45.1/KO45.2 ja que els timus d'aquests ratolins quimeres van mostrar una reducció significativa de la freqüència de cèl·lules CD4⁺SP i CD8⁺SP KO45.2, indicant que la deficiència de CD6 afectava el procés de selecció positiva de les cèl·lules T immadures (DP) cap a madures (SP) (**Fig. 4.21A**). Aquesta reducció va ser més important a les cèl·lules T madures de perifèria on els ratios CD45.2/CD45.1 entre grups van ser encara més diferents (**Fig. 4.21B**; esquerra). Com a evidència que el defecte maduratiu era intrínsec i només afectava a les cèl·lules T, es va poder comprovar que la població de cèl·lules B perifèriques CD6^{-/-} no es van veure afectada i no va patir canvis quantitius respecte de les CD6^{+/+} (**Fig. 4.21B**; dreta).

Els experiments de quimeres de moll d'os competitives també ens van permetre validar les alteracions quantitatives de poblacions perifèriques de cèl·lules T efectores/memòria i reguladores durant els anàlisis inicials dels ratolins CD6^{-/-} (**Fig. 4.7** i **Fig. 4.12**). Així, tot i haver menys cèl·lules CD6^{-/-} CD4⁺ i CD8⁺ a melsa i LN, es va poder observar també una major

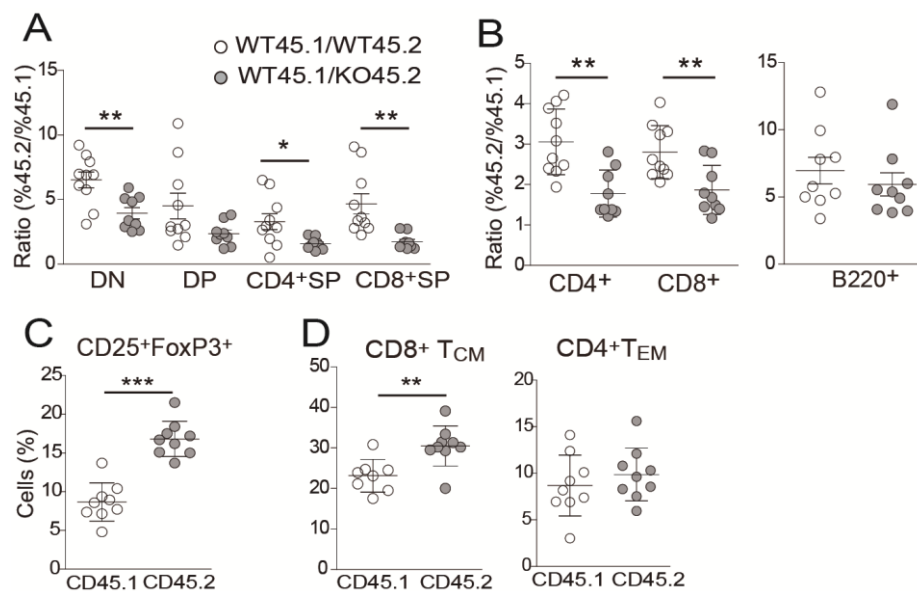


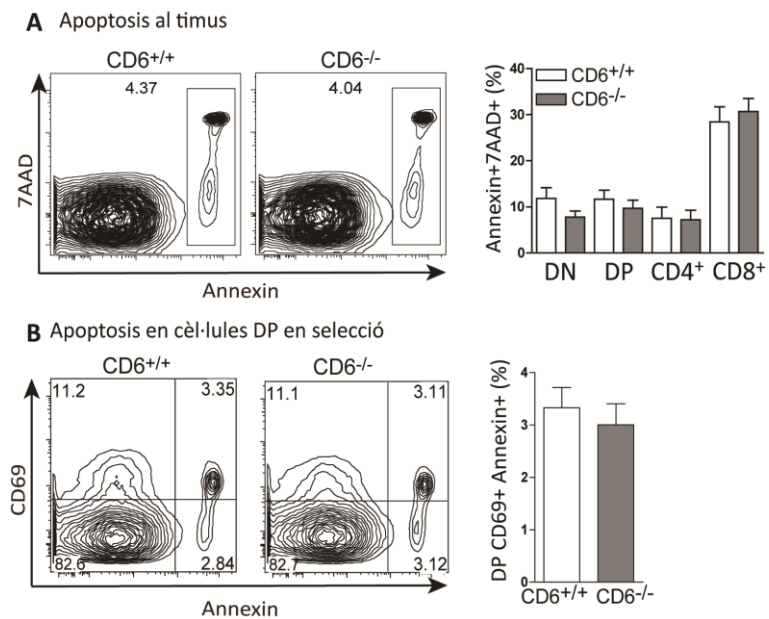
Figura 4.21. Les alteracions en els compartiments T centrals i perifèrics en absència de CD6 són cel·lularment intrínsecs. **A**) Ratio (mitjana±SEM) entre el percentatge de cèl·lules CD45.2⁺ i CD45.1⁺ de les principals poblacions de timòcits d'un grup control CD6^{+/+}CD45.1/CD6^{+/+}CD45.2 (WT45.1/WT45.2; cercles blancs), i de CD6^{+/+}CD45.1/CD6^{-/-}CD45.2⁺ (WT45.1/KO45.2; cercles grisos). **B**) Ratio en els mateixos animals i calculat com a A de cèl·lules T (esquerra) i B (dreta) dels LN. **C** i **D**) Percentatge de cèl·lules CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺, CD8⁺T_{CM} i CD4⁺T_{EM} CD45.1⁺ i CD45.2⁺ en els LN del grup experimental WT45.1/KO45.2. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 (unpaired t-test;).

frequència de cèl·lules CD6^{-/-} Tregs i CD8⁺T_{CM} en comparació amb les cèl·lules CD6^{+/+}, indicant que aquests canvis observats eren dependents de l'absència de CD6 i no del microambient on es desenvolupen (**Fig. 4.21C-D**).

4.1.1.2.7 Estudi de l'apoptosi en timus de ratolins CD6^{-/-}

Donada la disminució de poblacions CD4⁺SP i CD8⁺SP observada a ratolins CD6^{-/-} es va decidir analitzar els nivells d'apoptosi a les diferents poblacions tímiques. Les dades obtingudes fins al moment indicaven que l'absència de CD6 comportava una hiperreactivitat dels timòcits DP a l'estimulació via TCR, que podria traduir-se en una sobreactivació durant el reconeixement d'autoantígens presentats per les TECs per damunt el llindar de selecció positiva i fer-los entrar en apoptosi. D'acord amb aquesta idea, es va fer un marcatge habitual per CD4 i CD8 combinant amb una tinció d'Annexina i 7AAD pel seu posterior anàlisi per citometria de flux. Com es pot observar a la **Fig. 4.22A**, els resultats obtinguts no van permetre detectar diferències estadísticament significatives en els nivells d'apoptosi (Annexina⁺7AAD⁻ i Annexina⁺7AAD⁺) entre els ratolins CD6^{+/+} i CD6^{-/-} en cap de les poblacions tímiques (DN, DP, CD4⁺SP i CD8⁺SP). Tampoc es van detectar diferències entre ambdós tipus de ratolins durant l'anàlisi d'apoptosi en cèl·lules DP CD69⁺ sotmeses a selecció positiva (**Fig. 4.22B**).

Figura 4.22. Apoptosi al timus en absència de CD6. **A) Esquerra**, contour plots representatius de la mesura de l'apoptosi a timòcits totals d'animals CD6^{+/+} i CD6^{-/-} mitjançant marcatge amb Annexina i 7AAD. Es va considerar com a cèl·lules apoptòtiques les Annexina⁺7AAD⁻ i les Annexina⁺7AAD⁺. **Dreta**, percentatge (mitjana±SEM) cèl·lules apoptòtiques a les principals poblacions limfocitàries d'animals CD6^{+/+} (N=8) i CD6^{-/-} (N=8). **B) Esquerra**, contour plot il·lustratiu de la tinció de timòcits DP de ratolins CD6^{+/+} i CD6^{-/-} per CD69 i Annexina. **Dreta**, Percentatge de timòcits DP CD69⁺ i Annexina⁺ a ratolins CD6^{+/+} (N=3) i CD6^{-/-} (N=3).



4.1.1.2.8 Estudi de la deficiència de CD6 en ratolins TCR transgènics

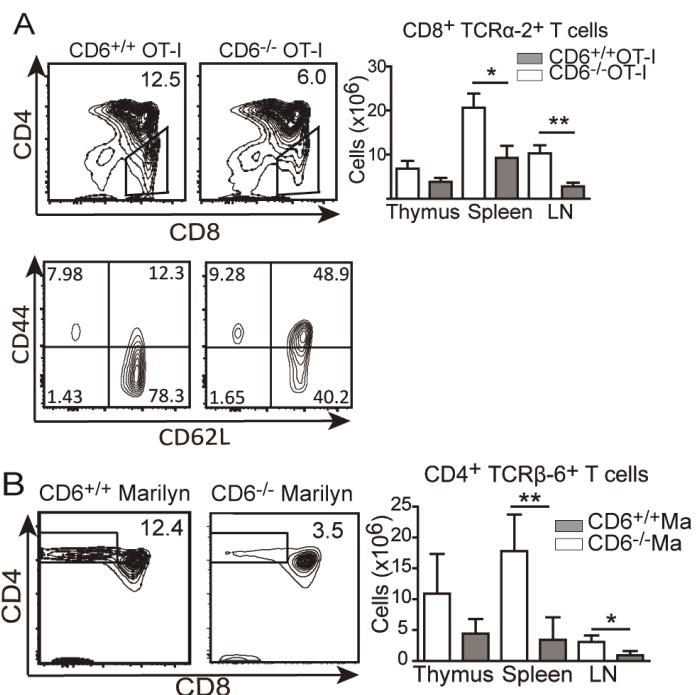
Donada l'alta taxa d'apoptosi al timus, existeix un sistema altament eficaç de fagocitosi de cèl·lules apoptòtiques per part dels macròfags residents que dificulta la detecció fiable d'increments o reduccions d'aquesta taxa *in vivo* (Henson and Hume, 2006). Per tant, es va considerar utilitzar una altra aproximació per a validar si l'absència de CD6 estava regulant el llindar per entrar en selecció negativa a través de la modulació de la senyal del TCR. Així, es

van creuar els ratolins CD6^{-/-} amb ratolins transgènics portadors de TCR específics per un determinat pèptid.

Concretament, es van creuar amb la soca de ratolins OT-I que expressen cèl·lules T amb un TCR restringit per classe-I (CD8⁺) i específic del pèptid SIINFEKL de l'ovoalbumina, i amb la soca Marilyn que expressen cèl·lules T amb un TCR restringit per MHC classe-II (CD4⁺) i específic per l'antigen masculí HY. En aquests ratolins, donat el seu fons Rag^{-/-} o Rag^{+/-}, totes o gran part de les cèl·lules T tindran un TCR amb la mateixa especificitat, per tant seran monoclonals i no policlonals com les soques comuns no transgèniques. En el cas dels ratolins Marilyn, els timòcits DP dels mascles (però no de les femelles) tenen l'oportunitat de reconèixer l'autoantigen masculí HY amb alta afinitat i són seleccionats negativament, entrant en apoptosi i, per tant, provocant un dèficit quasi absolut de cèl·lules CD4⁺SP al timus i també a perifèria. Per altra banda, les cèl·lules TCR transgèniques de femelles Marilyn no tenen l'oportunitat de reconèixer l'antigen HY masculí com a propi (no l'expressen) i no patiran processos de selecció negativa, presentant nombres normals de cèl·lules CD4⁺SP a timus i perifèria. La hipòtesi de treball per d'estudiar ambdues soques de transgènics era que si CD6 modula negativament la senyalització del TCR a l'estadi de DP, l'absència de CD6 i del seu efecte inhibidor de l'activació produirà un increment de la selecció negativa. Amb aquesta idea es van comparar les poblacions de cèl·lules T d'animals CD6^{-/-} OT-I i CD6^{-/-} Marilyn amb animals germans CD6^{+/+} OT-I i CD6^{+/+} Marilyn, respectivament. Tal i com s'esperava, els ratolins CD6^{-/-} OT-I TCR transgènics van veure significativament disminuïdes les seves poblacions de cèl·lules CD8⁺SP del timus i la perifèria (**Fig. 4.23A**; panel superior). A més a més cal destacar que també es va observar un augment de fins quasi el 50% de cèl·lules CD8⁺T_{CM} en els animals CD6^{-/-} OT-I però no en els CD6^{+/+} OT-I (**Fig. 4.23A**; panel inferior). Pel que fa als ratolins transgènics CD6^{-/-}

Figura 4.23. CD6 estableix el llindar d'activació per a la selecció de cèl·lules T.

A) Esquerra, dot plot d'un timus d'un ratolí transgènic CD6^{+/+}OT-I (esquerra) i un CD6^{-/-}OT-I (dreta), els nombres als quadrants indiquen la freqüència de cèl·lules CD8⁺. Dreta, nombres absoluts de cèl·lules CD8⁺ TCRα-2⁺ en animals CD6^{+/+}OT-I (blanc) i CD6^{-/-}OT-I (gris) als diferents òrgans limfoides (N=4/genotip). Panel inferior, dot plot il·lustrant el percentatge de cèl·lules CD8⁺TCM (CD44^{hi}CD62L^{hi}) en ratolins CD6^{+/+}OT-I i CD6^{-/-}OT-I **B)** Esquerra, dot plot representatiu d'un timus d'un animal transgènic CD6^{+/+}Marilyn i un animal CD6^{-/-}Marilyn femella, els nombres als quadrants indiquen la freqüència de cèl·lules CD4⁺ SP. Dreta: Nombres absoluts de cèl·lules T CD4⁺ TCRβ-6⁺ als diferents òrgans limfoides en animals femelles (N=4/genotip). Les línies verticals indiquen ±SEM. (unpaired t-test; *p<0.05, **p<0.01).



Marilyn femelles, també es va veure significativament disminuïda la població en aquest cas de cèl·lules CD4⁺SP tant a timus com a perifèria (**Fig. 4.23B**). Totes aquestes dades permeten recolzar de forma contundent que CD6 té un rol rellevant en el procés de selecció tímica, a través de la modulació de la senyal del TCR.

4.1.2 Implicacions funcionals de la deficiència de CD6 en models de malaltia

A la vista dels canvis fenotípics detectats a nivell central i perifèric en ratolins amb expressió deficient de CD6 es va decidir explorar les conseqüències funcionals dels mateixos en resposta a la inducció a diferents situacions d'agressió biològica com són models experimentals d'autoimmunitat, càncer i infecció.

4.1.2.1 Implicacions funcionals de la deficiència de CD6 en autoimmunitat

Per determinar si la deficiència de CD6 condicionava l'aparició o la severitat de fenòmens autoimmunitaris, es va dur a terme un conegut model murí d'artritis reumatoide com és el de l'artritis induïda per col·lagen de pollastre com a autoantigen per la cua del ratolí juntament amb *Mycobacterium tuberculosis* que actuarà com a adjuvant, iniciant-se d'aquesta manera una resposta inflamatòria autoimmunitària contra el propi col·lagen del ratolí present a les articulacions. La severitat clínica i la incidència de CIA es va avaluar durant 8 setmanes a partir de la

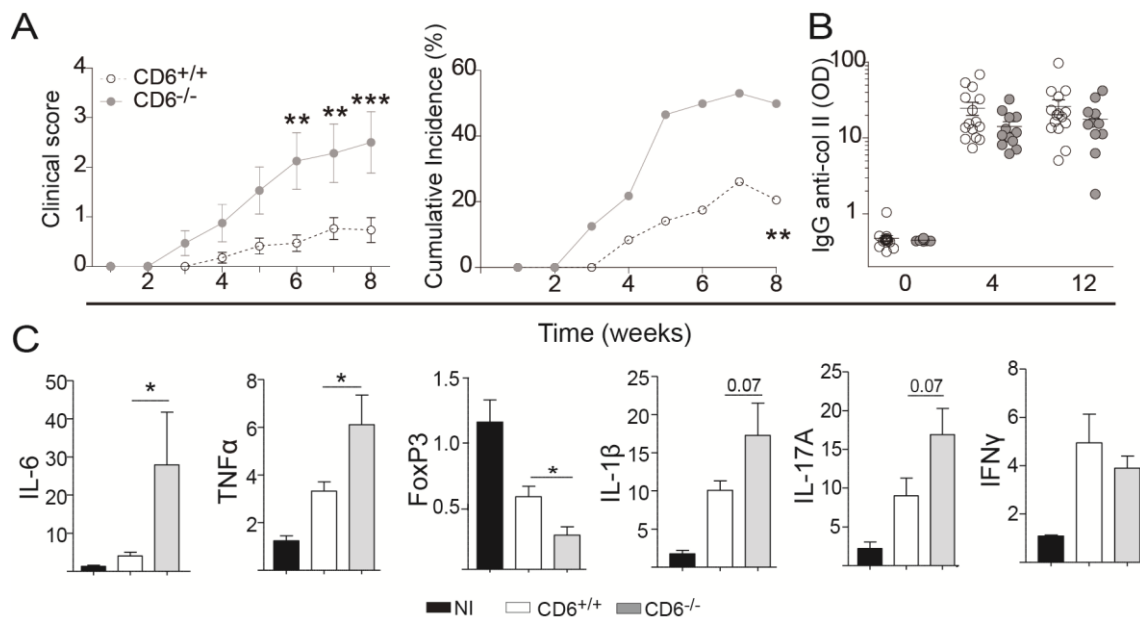


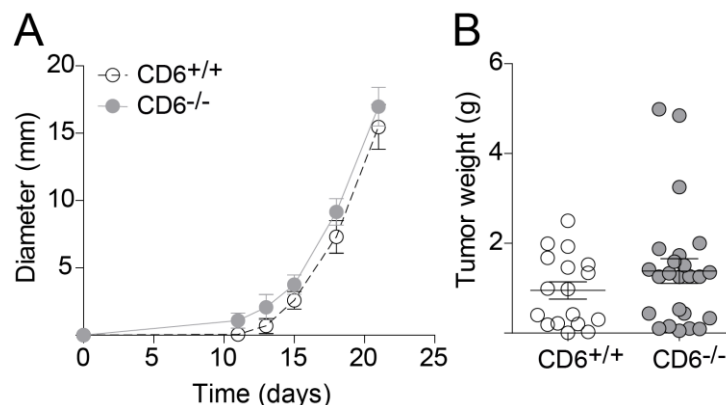
Figura 4.24. L'absència de CD6 cursa amb una clínica més severa i més incidència d'artritis induïda per col·lagen (CIA). **A**) Ratolins CD6^{+/+} (cercles blancs; N=34) i CD6^{-/-} (cercles grisos; N=34) es van immunitzar amb col·lagen de pollastre tipus II juntament amb CFA i *Mycobacterium tuberculosis*, i l'artritis es va avaluar durant 8 setmanes. Esquerra, mesura de la severitat de la malaltia a nivell clínic mesurat com a score clínic (mitjana \pm SEM) a diferents punts post-immunització. Dreta, incidència acumulada expressada com el número d'animals afectats en un moment determinat post-immunització. **B**) Mesura dels nivells d'anticossos IgG anti-col·lagen tipus II presents al sèrum d'animals CD6^{+/+} i CD6^{-/-} a diferents temps durant el curs de la malaltia. **C**) Anàlisi de diferents citocines per qPCR a partir del mRNA extret de les articulacions afectades (NI; ratolí CD6^{+/+} no immunitzat). (Two-way ANOVA test seguit de Bonferroni post-test; Unpaired t-test. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

inoculació. Encara que el fons genètic C57BL/6 no és l'ideal (és més resistent a la inducció d'artritis que el fons DBA) (Postigo et al., 2011, 2012) els resultats que s'il·lustren a la **Fig. 4.24A** van mostrar que els animals $CD6^{-/-}$ cursaven amb una clínica més precoç, més severa i amb una incidència acumulada major en comparació amb ratolins $CD6^{+/+}$. Per altra banda, no es va observar una correlació entre la severitat i els nivells d'anticossos anti-col·lagen presents en sèrum (**Fig. 4.24B**). Es va analitzar amb més detall la resposta inflamatòria local a través de l'anàlisi per RT-PCR de diferents citocines i factors de transcripció a les articulacions afectades. Els resultats van revelar un clar increment en els ratolins $CD6^{-/-}$ de les citocines proinflamatòries IL-6, TNF α , IL-1 β i IL-17A, essent l'increment estadísticament significatiu en el cas de les dues primeres i gairebé significatiu en el cas de les dues últimes (**Fig. 4.24C**). No es van veure diferències significatives en els nivells de IFN- γ , mentre que l'expressió de FoxP3 es va veure significativament disminuïda en el cas dels ratolins $CD6^{-/-}$ en comparació amb els $CD6^{+/+}$.

4.1.2.2 Implicacions funcionals de la deficiència de CD6 en càncer

Es va utilitzar un model de melanoma no ortotòpic per avaluar si l'absència de CD6 comportava una diferent resposta contra el càncer de manera similar a com ho feia en models d'autoimmunitat. El model escollit va consistir en injectar subcutàniament al dors dels ratolins $CD6^{+/+}$ i $CD6^{-/-}$ 5×10^4 cèl·lules tumorals isogèniques (de la línia cel·lular de melanoma B16, derivat de ratolins C57BL/6) i monitoritzar el creixement tumoral a través de mesures del diàmetre realitzades cada dos dies. A diferència de les dades obtingudes en el model d'autoimmunitat, en aquest cas no es van observar diferències significatives en el creixement del tumor al llarg dels 21 dies que va durar l'experiment (**Fig. 25A**). En concordança amb això, una mesura més exacta com és el pes dels tumors a dia de punt final de l'experiment tampoc va ser diferent entre ratolins $CD6^{-/-}$ i $CD6^{+/+}$ (**Fig. 25B**).

Figura 25. L'absència de CD6 no altera el creixement tumoral de cèl·lules de melanoma B16. A) Es van injectar 5×10^4 cèl·lules B16 via s.c. en ratolins $CD6^{+/+}$ (N=17; cercles buits) i $CD6^{-/-}$ (N=25; cercles grisos) anestesiats amb Isoflurà. Cada dos dies es va mesurar el diàmetre del tumor, fins arribar a una mida d'uns 20mm on es van sacrificar els animals. **B)** Pes dels tumors extrets a dia 21.



4.1.2.3 Implicacions funcionals de la deficiència de CD6 en infecció

Un altre context apart de l'autoimmunitat i el càncer on la resposta immunitària de l'organisme s'activa és en el cas de les infeccions. Per tant, es va voler comprovar si CD6 tenia una efecte en la resposta immunitària davant infeccions. Donada la publicació prèvia per part del nostre laboratori de la capacitat del CD6 de membrana d'unir-se i senyalar la presència de PAMPs

bacterians (tant Gram-positius com Gram-negatius) (Sarrias et al., 2007; Martínez-Florensa et al., 2014), es va analitzar la resposta de ratolins $CD6^{-/-}$ en el model de xoc sèptic per infecció polimicrobiana induïda per lligadura i punció cecal (*cecal ligation and puncture*; CLP) (Rittirsch et al., 2009). Aquest model es basa en anestesiàr l'animal i realitzar una delicada operació on es punxa el cec de l'intestí per alliberar una petita quantitat de matèria fecal al peritoneu i així induir una infecció aguda intrabdominal que porta a un quadre de sepsis greu amb síndrome de resposta inflamatòria sistèmica (SIRS, *Systemic Inflammatory Response Syndrome*), seguit de fallida multiorgànica i mort en 24-72 h. Seguint aquest procediment, es va monitoritzar durant un període de 7 dies la supervivència en ratolins $CD6^{+/+}$ i $CD6^{-/-}$ sotmesos a CLP. Com es pot observar a la **Fig. 4.26A.**, el percentatge de supervivència dels animals $CD6^{-/-}$ va ser significativament menor que el dels $CD6^{+/+}$. Així, a les 24 h post-CLP la supervivència en els animals $CD6^{-/-}$ era del 0% mentre que en els ratolins $CD6^{+/+}$ era del 50-60%, indicant una major susceptibilitat per part dels primers enfront el procés infecciós.

Davant l'aparent sensibilitat dels ratolins $CD6^{-/-}$ a la sèpsi induïda per bacteries, ens vam preguntar si l'administració de la proteïna $CD6$ soluble (rshCD6) seria capaç de rescatar la supervivència en els ratolins $CD6^{-/-}$. Amb aquest propòsit es va practicar la CLP a dos grups d'animals $CD6^{-/-}$: a un se li va injectar rshCD6 1 h post-CLP i a l'altre solució salina, i es va seguir la supervivència al llarg de 7 dies. Tal i com mostra la **Fig. 4.26B.**, l'administració terapèutica de la proteïna rshCD6 va augmentar d'una manera estadísticament significativa la supervivència dels animals tractats fins a un 50-60% als 7 dies, mentre que als que van rebre solució salina va ser del 0% a les 48 h post-CLP.

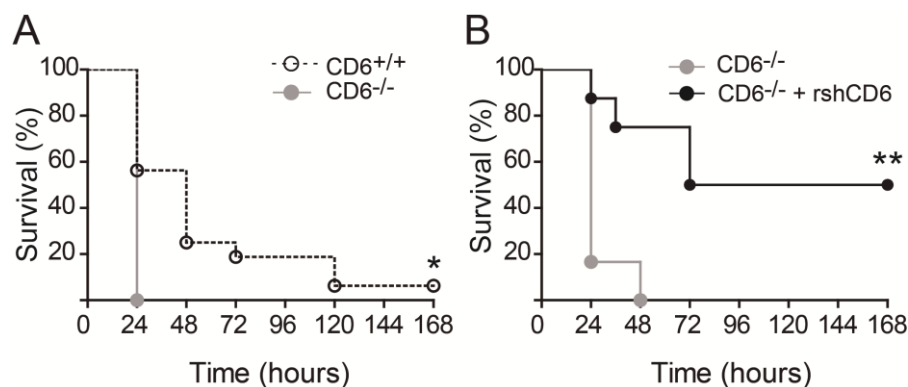


Figura 4.26. Els animals deficients per $CD6$ són més sensibles al xoc sèptic induït per CLP. **A)** Corba de supervivència d'animals $CD6^{+/+}$ (línea discontinua; N=10) i $CD6^{-/-}$ (línea gris; N=5) post-inducció de CLP. **B)** Corba de supervivència d'animals $CD6^{-/-}$ post-inducció de CLP tractats via i.v. amb solució salina (línea gris; N=6) o amb rshCD6 (1.25 mg/kg) a +1 h post-operació CLP (línea negra; N=8). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Mantel-Cox test).

4.2. Rellevància de l'expressió de CD5 en la resposta inflamatòria *in vivo* induïda per β -glucans

Prèviament s'havia descrit al nostre laboratori la unió de CD5 tant soluble com de membrana a β -glucans, un component essencial i molt conservat de les parets fúngiques, tant de soques patogèniques (p.ex. *Candida albicans* i *Cryptococcus neoformans*) com saprofitiques (p.ex. *Saccharomyces Pombe*) (Vera et al., 2009). Per avaluar el paper de la unió de β -glucans al receptor CD5 de membrana *in vivo*, es va decidir estudiar la resposta de ratolins deficients en CD5 disponibles al nostre laboratori en un model de xoc sèptic similar al induït per fongs. Per abordar aquest objectiu es va posar a punt el model ZIGI (*zymosan-induced generalized inflammation*) o d'inflamació generalitzada induïda per zymosan (Genovese et al., 2004; Volman et al., 2005), un compost ric en β -glucans al qual se li ha descrit la unió a CD5 (Vera et al., 2009).

4.2.1 Estudi comparatiu de la resposta inflamatòria *in vivo* i *in vitro* induïda per zymosan en ratolins C57BL/6 i CD1

Donat que els nostres ratolins deficients per a CD5 han estat generats en la soca C57BL/6 i que aquest model ZIGI es va descriure en ratolins de la soca CD1, es va fer primer un estudi comparatiu del model ZIGI en les dues soques esmentades. En primer lloc es van injectar ratolins CD1 i C57BL/6 amb dosis creixents però úniques de zymosan (100, 300, 500, 700, 800 i 1000 mg/kg) via i.p. i es va estudiar la supervivència dels diferents grups d'animals al llarg de 15 dies. Les dades obtingudes van revelar que els ratolins C57BL/6 eren més sensibles al xoc sèptic induït per zymosan, ja que en dosis baixes del compost ja s'observava mortalitat en aquesta soca i no en canvi en els ratolins CD1 (Fig. 4.28A). En vista d'aquests resultats es va considerar que la dosi de 750 mg/kg de zymosan que proporcionava supervivències dels animals al voltant del 50% era l'idònia per a prosseguir els nostres estudis. Com es pot

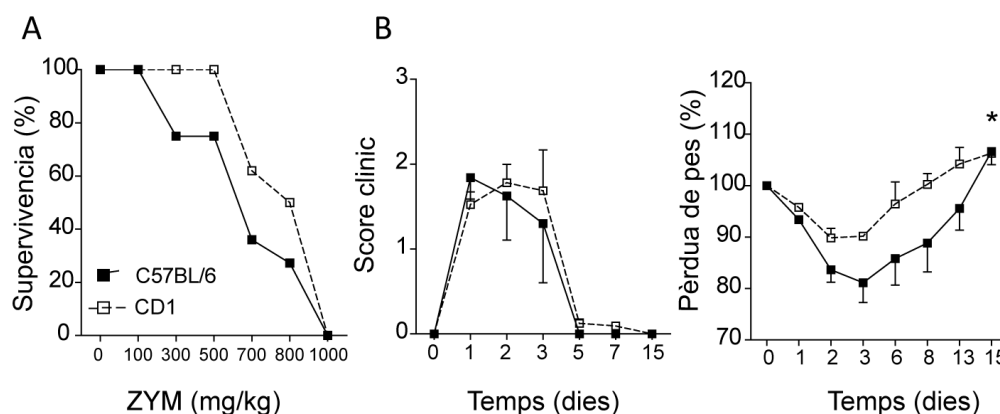
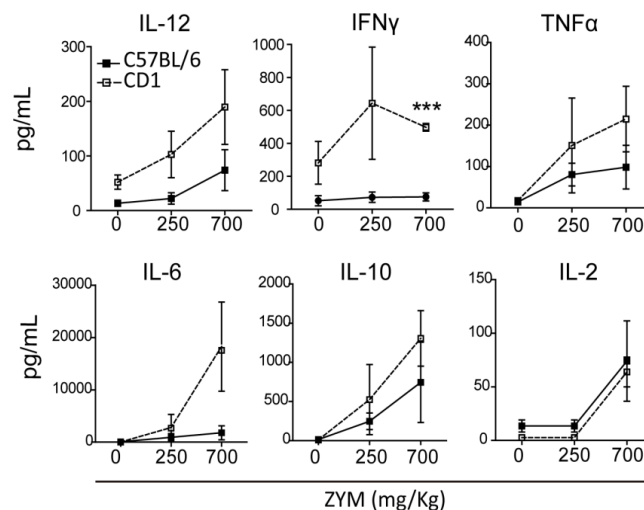


Figura 4.28. Els ratolins C57BL/6 són més sensibles al xoc sèptic induït per zymosan que els ratolins CD1. **A)** Es van injectar ratolins CD1 (N=5; blanc) i C57BL/6 (N=5; negre) amb diferents dosis de zymosan (ZYM; mg/kg) i es va monitoritzar la supervivència al llarg de 15 dies. El gràfic mostra la supervivència final de cada grup a dia 15. **B)** Grups de ratolins CD1 (N=10) i C57BL/6 (N=9) van ser injectats amb una única dosi de 750mg/kg de ZYM. Es van avaluar l'score clínic dels animals (valors de 0 a 3, sent 0 absència de símptomes i 3 símptomes de gravetat) i la pèrdua de pes durant 15 dies. La pèrdua de pes respecte el pes inicial es va calcular com pes a dia X*100/pes dia 0 (gr). El gràfic mostra la mitjana \pm SEM. *p<0.05 (Wilcoxon test).

comprovar a la **Fig. 4.28B**, l'administració d'una única dosi de 750 mg/kg no va produir diferències significatives entre les dues soques de ratolins pel que fa a un paràmetre relativament subjectiu com és l'avaluació clínica, però sí en canvi a la pèrdua de pes durant els 15 dies següents a la inducció del xoc (els animals C57BL/6 van perdre fins a un 12% més de pes que els animals CD1).

Les dades en la supervivència i pèrdua de pes suggerien que la resposta inflamatòria de les dues soques davant el zymosan podria ser també diferent. Per avaluar aquest paràmetre es van determinar els nivells de citocines en sèrum de cada soca en resposta a dosis subòptimes (250 mg/kg) i òptimes (750 mg/kg) de zymosan. Els resultats obtinguts després de sacrificar els animals a les 18 h post-injecció de zymosan (**Fig. 4.29**) van mostrar una inesperada però clara tendència dels ratolins C57BL/6 a generar una resposta citocínica disminuïda en comparació amb els animals CD1. Concretament, es van detectar nivells més baixos de citocines proinflamatòries com TNF- α , IL-12, IL-6 i IFN- γ . No obstant, les diferències observades només van arribar a ser estadísticament significatives en el cas del IFN- γ , que va mostrar nivells clarament inferiors en els ratolins C57BL/6.

Figura 4.29. Els ratolins C57BL/6 cursen amb una menor resposta inflamatòria *in vivo* que els ratolins CD1 davant el xoc sèptic induït per zymosan. Es van injectar ratolins CD1 (línia discontinua) i C57BL/6 (línia contínua) amb dues dosis de ZYM diferents, 250 i 750mg/kg (N=5/grup). A les 18 h es va practicar l'eutanàsia als animals i es van mesurar les citocines al sèrum. Al gràfic s'indica la mitjana \pm SEM. ***p<0.001 (unpaired t-test).



A la vista de les diferències observades *in vivo* en els nivells sèrics de citocines, es va considerar oportú estudiar la resposta inflamatòria *in vitro* per confirmar si les diferències entre les dues soques de ratolins eren intrínseques a nivell cel·lular. Amb aquest objectiu, es van obtenir esplenòcits d'animals CD1 i C57BL/6 i després d'incubar-los en presència de zymosan (20 μ g/mL) per diferents períodes de temps (2, 4, i 18 h) es van determinar els nivells de diferents citocines als sobrenedants del cultiu. Com es mostra a la **Fig. 4.30**, no es van observar diferències en la secreció de IL-6 però sí en la d'altres citocines tant proinflamatòries (TNF- α , IFN- γ) com antiinflamatòries (IL-10), i sempre al temps d'incubació més llarg (18 h). Concretament, als ratolins C57BL/6 es van detectar nivells significativament més elevats de TNF- α i IL-10 i més baixos de IFN- γ que els detectats als CD1. De totes aquestes diferències,

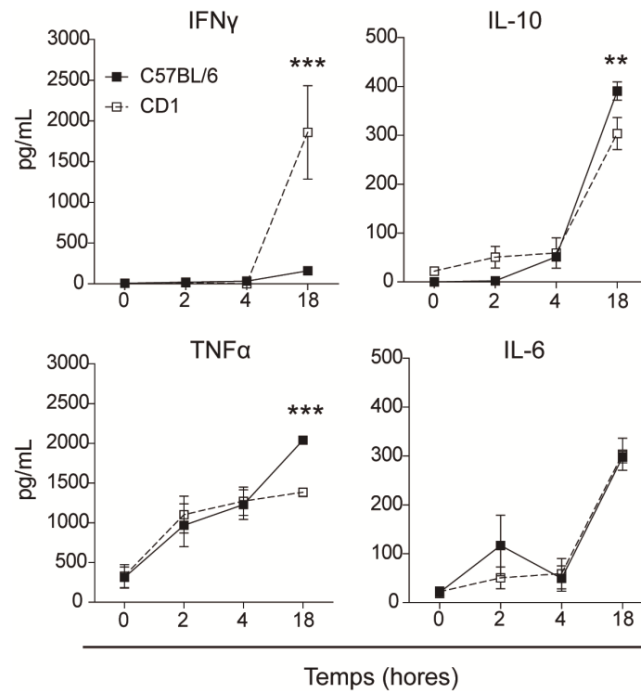
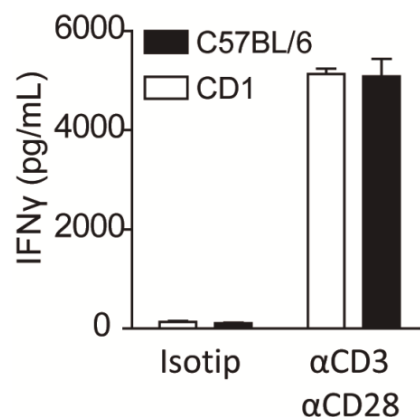


Figura 4.30. Els ratolins C57BL/6 secreten nivells inferiors d'IFN- γ que els CD1 després d'una exposició a zymosan. Esplenòcits de ratolins CD1 i C57BL/6 es van cultivar en presència de ZYM a 20 μ g/mL. A les 2, 4 i 18 h es van mesurar els nivells de citocines per ELISA als sobrenadants de cultiu. Es mostra la mitjana \pm SEM de triplicats d'un experiment representatiu de dos realitzats. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (unpaired t-test).

les més remarcables i consistents van ser les referides a IFN- γ que a més eren consistents amb les observades als experiments *in vivo* anteriorment descrits d'inducció de ZIGI.

Donada la importància de l'IFN- γ en la resposta davant fongs patògens com *Candida albicans* (Netea et al., 2015), es va profunditzar en l'estudi d'aquesta citocina. Les principals cèl·lules productores d'IFN- γ de l'organisme són les cèl·lules NK i els limfòcits T CD4⁺, però s'ha descrit que la secreció per part de les NK es dona durant les primeres 2-6 h mentre que les cèl·lules T necessiten més temps per a la seva producció (Reefman et al., 2010). Donades les grans diferències observades a les 18 h en els cultius *ex vivo*, es va pensar en la possibilitat que les cèl·lules T dels animals C57BL/6 fossin deficientes en la producció i secreció d'IFN- γ . Per descartar aquesta possibilitat, es van exposar esplenòcits d'animals CD1 i C57BL/6 a un estímul específic per a cèl·lules T com són dosis òptimes d'AcMos anti-CD3 i anti-CD28 (1

Figura 4.31. Els esplenòcits de ratolins C57BL/6 i CD1 secreten quantitats similars d'IFN γ en resposta a un estímul específic per a cèl·lules T. Es van cultivar esplenòcits de ratolins CD1 (barres blanques) i C57BL/6 (barres negres) amb AcMos anti-CD3 i anti-CD28 en forma soluble (1 μ g/mL). A les 18 h es van mesurar els nivells d'IFN γ per ELISA als sobrenadants de cultiu. (N=1; mostres tractades en triplicat) Es mostra la mitjana \pm SEM de triplicats d'un experiment representatiu de dos realitzats.



µg/mL cadascun) i es van recollir els sobrenedants dels cultius a les 18 h per a mesurar els nivells d'IFN-γ. En aquest cas, tot i les clares diferències observades en resposta al zymosan entre les dues soques, la secreció d'IFN-γ després de l'estimulació directe de les cèl·lules T no va ser diferent entre animals CD1 i C57BL/6 (**Fig. 4.31**). Aquestes dades, juntament amb l'increment de IL-12 observat *in vivo* en el model de ZIGI (**Fig. 4.29**), van fer pensar en una probable deficiència en la producció d'IFN-γ per part de les cèl·lules del sistema innat en els ratolins C57BL/6 en comparació als CD1.

Una possible explicació als resultats obtinguts fins al moment era que hi hagués una expressió i/o funció deficient dels principals receptors de β-glucans descrits fins a data d'avui en animals C57BL/6 respecte els CD1: Dectin-1 (Brown et al., 2002), TLR2 (Netea et al., 2004) o CD5 (Vera et al., 2009). No obstant això, es va decidir explorar primer si la menor producció d'IFN-γ també es produïa al exposar esplenòcits d'animals C57BL/6 a PAMPS la composició dels quals no inclou β-glucans. Concretament es van exposar a l'àcid lipoteicoic (LTA) i al lipo-polisacàrid (LPS), ambdós presents a la natura a les parets de bacteries gram positives i negatives, respectivament. El LTA és estructuralment diferent als β-glucans però també s'uneix a TLR2, en canvi el LPS es un PAMP reconegut per el TLR4, al qual no se li ha descrit la unió a β-glucans. Com es pot observar a la **Fig. 4.32**, els resultats de l'experiment van revelar que tots tres PAMPs (Zymosan, LTA i LPS) generaven una menor secreció d'IFN-γ per part dels esplenòcits de ratolins C57BL/6 comparats amb els CD1. Això indicaria que la deficient producció d'IFN-γ no és específica per a Zymosan i els seus receptors, ja que altres lligands de diferents receptors del sistema innat (TLRs) també induïrien la mateixa resposta. Per tant, les diferències entre soques no estarien tant a nivell de detecció per part dels receptors de la immunitat innata, sinó probablement en la transmissió dels senyals derivats de la unió d'aquests amb els seus lligands (PAMPs).

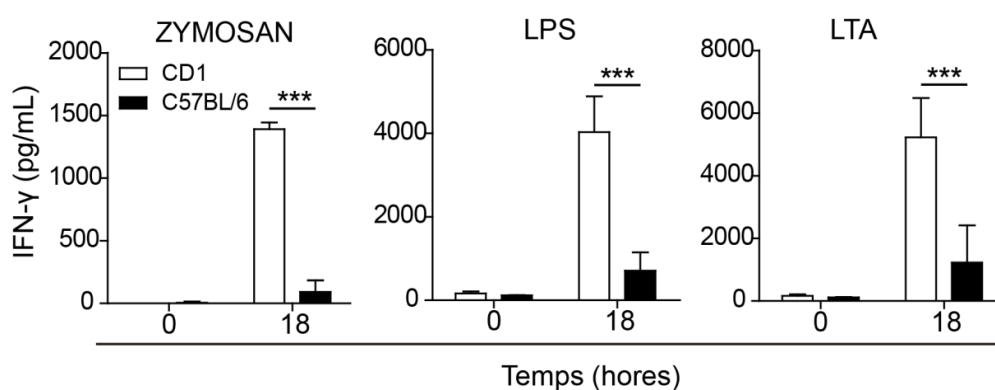


Figura 4.32. La menor secreció d'IFNγ dels ratolins C57BL/6 no és específica dels β-glucans. Es van cultivar esplenòcits de ratolins CD1 i C57BL/6 en presència o absència de zymosan (20µg/mL), LPS (1µg/mL) o LTA (10µg/mL). A les 18 h es van mesurar els nivells d'IFNγ per ELISA als sobrenedants de cultiu. Es mostra la mitjana ± SEM de triplicats de un experiment sobre un total de dos realitzats. ***p<0.001 (unpaired t-test).

4.2.2 Eficàcia de l'administració de rshCD5 enfront ZIGI en animals C57BL/6 i CD1

En el mateix treball on es demostra la unió de CD5 a diferents espècies de fongs a través dels β -glucans, també es descriu el potencial profilàctic/terapèutic de l'administració de la proteïna rshCD5 en el model de ZIGI (Vera et al., 2009). Una única dosi de rshCD5 augmentava significativament la supervivència de ratolins als quals se'ls hi havia administrat zymosan per provocar un quadre similar al xoc sèptic. En aquest estudi es van fer servir ratolins CD1, i donades les diferències abans esmentades entre aquesta soca i la de ratolins C57BL/6 en resposta al zymosan, ens vam preguntar si l'administració de rshCD5 també tindria la mateixa eficàcia en ambdues soques.

Amb aquest propòsit, es van injectar ratolins C57BL/6 amb una dosi única de la proteïna rshCD5 (25 μ g, i.p.) a diferents temps abans (-1h) o després (+1h, +3h o +6h) de l'administració de zymosan (750mg/kg, i.p.), i es va valorar l'efecte sobre la supervivència. Com mostra la **Fig. 4.33A**, no es va observar una millora significativa en cap dels tractaments, ja que ni l'administració profilàctica ni les administracions terapèutiques a +1, +3 o +6 hores després de la inducció del xoc van aconseguir augmentar la supervivència de manera estadísticament significativa. Per a descartar que no es tractés d'un problema en el lot de la proteïna rshCD5 o del zymosan, es va decidir reproduir en paral·lel les dades ja publicades en ratolins CD1. En aquest cas, l'administració profilàctica de rshCD5 va endarrerir considerablement la mort provocada pel xoc sèptic als ratolins CD1, mentre que l'administració terapèutica va recuperar completament la supervivència dels animals d'aquest grup (**Fig. 4.33B**).

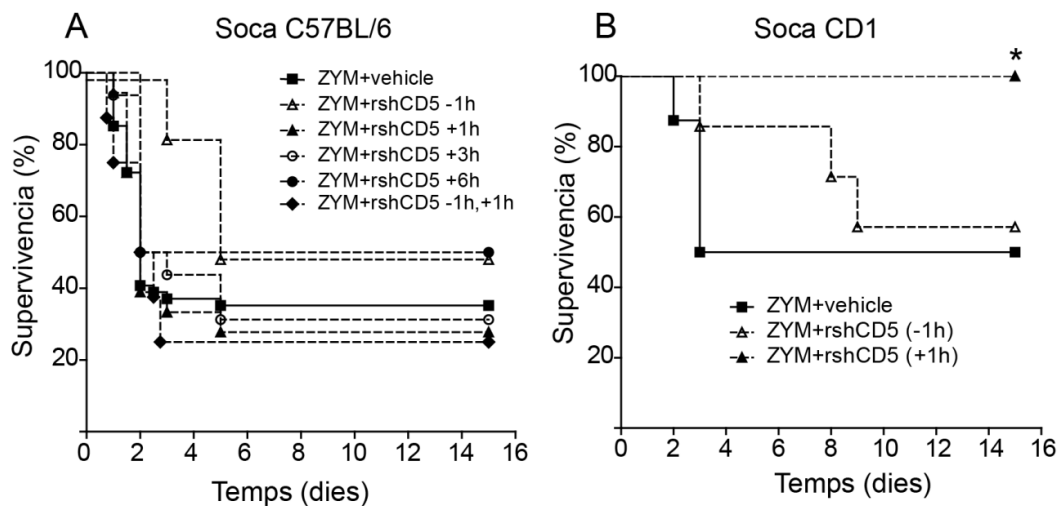


Figura 4.33. L'efecte terapèutic de l'administració de rshCD5 és efectiu en ratolins CD1 però no en C57BL/6. A) Diferents grups de ratolins C57BL/6 (N=9/grup) es van tractar amb una única dosi de 25 μ g i.p. de rshCD5 (línies puntejades) 1h abans (-1h) o bé 1h (+1h), 3h (+3h) o 6h (+6h) després de la inducció del xoc sèptic amb zymosan (700mg/kg, i.p.). Un grup es va tractar amb dues dosis de rshCD5 1h abans i 1h després (-1h,+1h), i un grup control es va tractar amb ZYM i solució salina (línia contínua). **B)** Es van tractar diferents grups de ratolins CD1 (N=7/grup) amb una única dosi de rshCD5 1h abans (-1h) i 1h després (+1h) de la inducció del xoc sèptic amb una única dosi de ZYM 750mg/kg. Un grup control es va punxar amb ZYM i amb solució salina (quadrat negre, línia contínua). *p>0.05 Mantel-Cox test.

Donada la menor secreció d'IFN- γ observada en ratolins C57BL/6 en comparació als CD1, ens vam preguntar si aquesta era la causant de la major sensibilitat dels ratolins C57BL/6 i de la pèrdua de l'efecte terapèutic de la proteïna rshCD5. Per avaluar-ho, es van injectar ratolins C57BL/6 amb una dosi de 750mg/kg de zymosan, i 1 h més tard es van tractar amb 5 ng d'IFN- γ murí recombinant (rmIFN- γ) sol o en combinació amb rshCD5, i es va monitoritzar la supervivència. Com es mostra a la **Fig. 4.34A**, l'administració únicament de rmIFN- γ va augmentar significativament la supervivència dels animals, passant d'un 10 a un 40%. Però encara més contundent van ser els resultats obtinguts en el grup tractat amb la combinació de rmIFN- γ i rshCD5, ja que en aquest grup la supervivència va ser del 100%. L'administració d'IFN- γ va millorar, a més, els paràmetres clínics derivats del xoc sèptic en aquests animals (**Fig. 4.34B**). Aquestes dades indiquen que la major susceptibilitat dels ratolins C57BL/6 al xoc sèptic per zymosan és causada per la menor resposta de secreció d'IFN- γ , i que l'efecte terapèutic de rshCD5 és efectiu en aquesta soca quan es dona combinat amb IFN- γ .

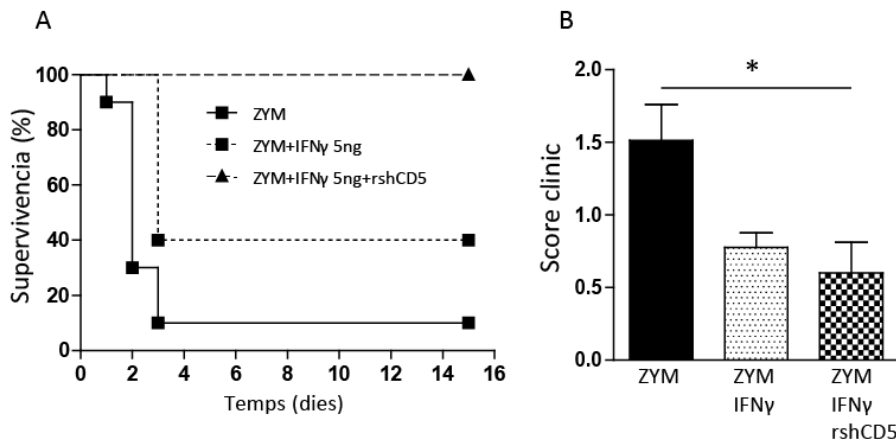


Figura 4.34. L'efecte terapèutic de l'administració de rshCD5 es recupera en ratolins C57BL/6 després de tractar amb IFN- γ soluble **A)** Ratolins C57BL/6 (N=5/grup) se'ls va induir un xoc sèptic per zymosan (700mg/kg), i 1 h més tard se'ls va tractar amb salí (línia contínua, amb IFN- γ sol (5ng; quadrat, línia discontinua) o bé amb IFN- γ més rshCD5 (25 μ g; triangle, línia discontinua). **B)** Mitjana de l'score clínic als tres grups experimentals tractats a A) 1 dia post-administració de zymosan. *p<0.05 (unpaired t-test).

4.2.3 Paper del CD5 de membrana en el model de ZIGI

Per avaluar si la unió de CD5 de membrana als β -glucans té implicacions biològiques en la resposta inflamatòria induïda per aquests, es van utilitzar els animals CD5^{+/+} i CD5^{-/-}, disponibles en fons C57BL/6. Per tant, es va tenir en compte la informació obtinguda fins al moment i donada la major susceptibilitat al model de ZIGI observada en aquesta soca, es van estudiar dues dosis diferents per representar concentracions baixes i altes de zymosan. Així, es van injectar via i.p. animals CD5^{+/+} i CD5^{-/-} amb 250 o 750 mg/kg de zymosan, i es van monitoritzar durant 15 dies paràmetres com la supervivència, la severitat clínica i la pèrdua de pes (**Fig. 4.35**). Els resultats obtinguts no van mostrar diferències estadísticament significatives

en cap dels paràmetres estudiats entre les dues línies de ratolins C57BL/6, suggerint que la deficiència de CD5 de membrana o bé no és suficientment rellevant en la resposta inflamatòria a β -glucans com per influir en la supervivència dels animals, o bé que aquestes influències no tenen oportunitat a produir-se en un model de sèpsi tan agut com és el de ZIGI en ratolins de la soca C57BL/6.

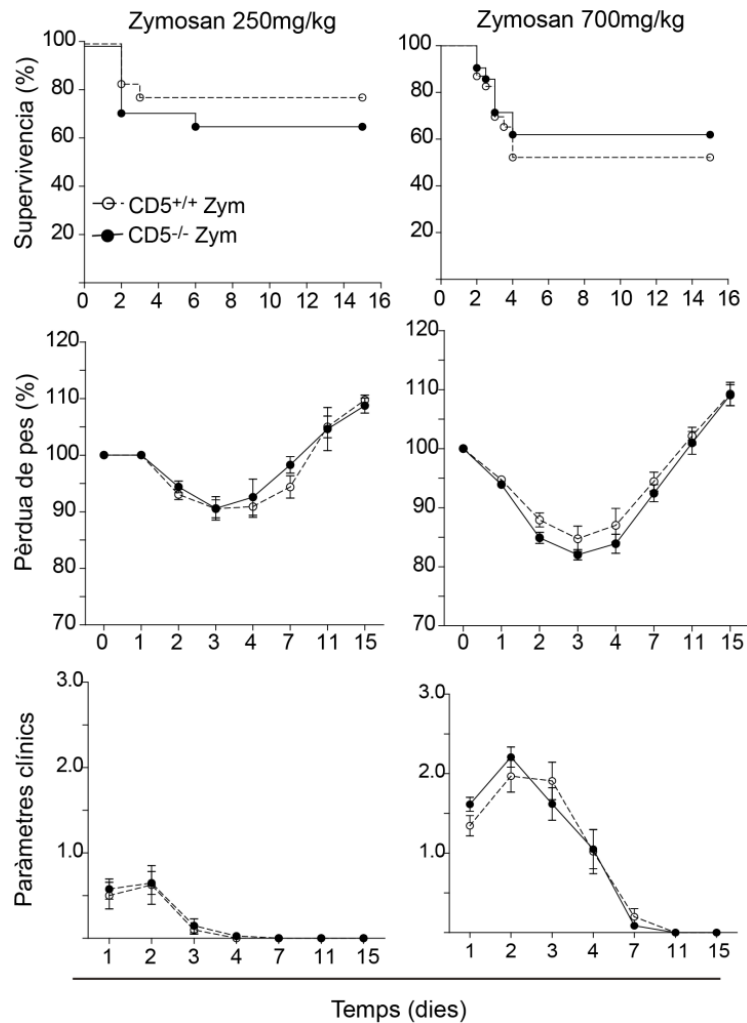


Figura 4.35. La deficiència de CD5 no afecta la clínica en un xoc sèptic induït per zymosan. Es van injectar animals CD5^{+/+} (línia discontinua) i CD5^{-/-} (línia contínua) amb una dosi de 250mg/kg (N=20) o de 700mg/kg (N=18-20) i es va valorar la supervivència, l'score clínic i la pèrdua de pes (pèrdua=pes x 100/pes dia 0) al llarg de 15 dies. Els símbols indiquen la mitjana de cada grup amb \pm SEM.

5. Discussió

En aquesta tesi doctoral s'han estudiat dues molècules de rellevància demostrada en l'activació de les cèl·lules T com ho són CD5 i CD6. Per la seva banda, CD5 ha estat, i és, una molècula característica de cèl·lules T la qual està implicada directament en la modulació negativa de la activació a través del TCR (Soldevila et al., 2011). Des de la revelació a principis dels anys 90 que actuava com a modulador negatiu de l'activació fins a dia d'avui, una multitud de treballs s'han focalitzat en l'estudi d'aquesta molècula posicionant CD5 com un regulador necessari per la selecció, la tolerància i la supervivència de les cèl·lules T. Tot això fa que pugui ser englobada dins del concepte de molècules amb funció com *immune response check point* i en conseqüència una diana terapèutica en diferents processos de rellevància clínica (Consuegra-Fernandez et al., 2015). Pel que fa a CD6, en canvi, tot i la similitud a nivell d'expressió tissular i de localització a la membrana cel·lular que comparteix amb CD5, sorprenentment la recerca invertida des de la seva descoberta ha estat més aviat escassa, fins al punt que el rol biològic de CD6 és encara força desconegut i enigmàtic. Una de les raons per aquest desconeixement és que fins a dia d'avui no s'ha presentat cap model animal genèticament modificat (transgènic, *knockout*, etc) que faciliti l'estudi d'aquest receptor, models que ajudarien en la comprensió i millora de les teràpies actuals on CD6 es postula com a potencial diana terapèutica. La majoria de dades obtingudes fins al moment suggereixen que CD6 és un modulador de l'activació cel·lular, però al contrari que CD5, amb un efecte co-estimulador en comptes d'inhibidor. Els resultats obtinguts en aquesta tesi en els primers animals deficientes per CD6 analitzats a data d'avui, indiquen no obstant que al contrari del que s'havia pensat CD6 té un clar rol modulador negatiu del senyal del TCR durant els processos de selecció positiva/negativa al timus, i un paper en la generació i/o manteniment de determinats tipus cel·lulars T perifèrics tant en l'homeòstasi normal de les respostes immunitàries com durant les respostes a processos d'agressió biològica.

Actualment hi ha en curs estudis clínics utilitzant un AcMo anti-CD6 humanitzat (Itolizumab) per a tractar pacients amb artritis reumatoide i d'altres processos patològics de base autoimmunitària. Els resultats preliminars publicats han demostrat que l'administració de Itolizumab sol o en combinació amb el Metotrexat cursa amb una millora clínica amb efectes secundaris molt lleus (Chopra et al., 2015; Rodriguez et al., 2012). Gràcies a aquests primers resultats s'està estudiant d'administrar-lo en pacients amb psoriasis o amb síndrome d'Sjögren (Le Dantec et al., 2013; Krupashankar et al., 2014), així com ampliar la seva àrea terapèutica també al tractament de leucèmies de cèl·lules B, donat que un primer estudi també ha aportat resultats esperançadors al respecte (Izquierdo Cano et al., 2014). La disponibilitat de ratolins CD6^{-/-} com els aquí analitzats permetrà comprendre millor el rol de CD6 a les respostes immunitàries tant en condicions normal com d'agressió biològica i ajudar en la implementació i optimització de noves immunoteràpies formulant hipòtesis de treball amb bases experimentals més sòlides.

Per altra banda, tot i la importància demostrada de CD5 en l'activació limfocitària, a dia d'avui s'han dut a terme pocs estudis amb èxit on aquest receptor sigui la diana terapèutica tant en

humans com animals. A diferència d'altres moduladors negatius de l'activació com CTLA-4, el qual AcMo bloquejants d'aquesta molècula es troben en fases clíniques d'estudis amb pacients amb melanoma (Grosso and Jure-Kunkel, 2013), pel que fa a CD5 alguns estudis puntuals s'han dut a terme en lupus eritematós o diabetis dependent d'insulina amb immunoconjugats, tot i que alguns ja s'han descartat degut a la seva immunotoxicitat (Consuegra-Fernandez et al., 2015). A diferència dels immunoconjugats i AcMo anti-CD5, l'administració de la forma soluble sCD5 sembla ser que sí que presenta efectes beneficiosos en determinades situacions. Mitjançant l'ús d'animals transgènics que expressaven elevades quantitats de sCD5 en sang, el nostre laboratori va veure que la progressió d'un melanoma era més lenta en els animals transgènics que en els animals control (Fenutría et al., 2014). Aparentment, el sCD5 d'aquests animals s'uniria als lligands endògens de CD5 bloquejant la seva interacció amb CD5. Amb rellevància des d'un punt de vista clínic, aquest efecte es reproduïa al administrar repetides dosis de la proteïna recombinant soluble rshCD5 en ratolins amb melanoma (Fenutría et al., 2014). Per altra banda, en un altre treball es va veure que l'administració d'una sola dosi de rshCD5 augmentava la supervivència de ratolins en xoc sèptic causat per derivats fúngics (Vera et al., 2009). Així com en el cas de CD6 s'està avançant en l'estudi de teràpies utilitzant aquest receptor com a diana, els estudis on CD5 ha estat la diana terapèutica no han resultat gaire prometedors. No obstant, degut a la recent descoberta de la interacció de CD5 amb els β -glucans presents als fongs i pel potencial que presenta la proteïna rshCD5, s'ha decidit estudiar en més profunditat el seu efecte terapèutic en situacions de sèpsi causades per derivats fúngics així com la importància de les implicacions biològiques de la unió CD5- β -glucans.

5.1 CD6

La bibliografia científica disponible indica que CD6 té un rol rellevant en el desenvolupament i l'activació de les cèl·lules T a través de la modulació positiva (o negativa) de la senyalització del TCR, així com dels contactes T-APC. No obstant, gran part d'aquesta informació s'ha obtingut mitjançant sistemes cel·lulars *in vitro* i a través de l'ús d'anticossos monoclonals o proteïnes quimèriques que poden donar lloc a una visió distorsionada o descontextualitzada de les funcions de CD6 (Santos et al., 2015). En aquesta tesi s'ha descrit per primera vegada les conseqüències *in vivo* de la deficiència de CD6 tant en la maduració i selecció al timus com en la homeòstasi de poblacions cel·lulars T perifèriques murines.

5.1.1 CD6 com a regulador negatiu del senyal del TCR al timus

Gràcies a la caracterització de ratolins CD6^{-/-} s'ha pogut demostrar que, tot i que les poblacions de cèl·lules T i B perifèriques a nivell general no es veuen afectades en número, aquests animals presenten una disminució de cèl·lules CD4⁺SP i CD8⁺SP al timus i un increment de cèl·lules T amb fenotips efector/memòria i regulador als òrgans limfoides perifèrics. Aquestes dades s'han confirmat a través d'experiments de quimeres mixtes competitives de medulla òssia. L'estudi de la mobilització de Ca²⁺ intracel·lular induïda via TCR indica que CD6 actua com a modulador negatiu del senyal del TCR a nivell de timòcits immadurs DP, fet que es veu

acompanyat pel diferent repertori de clones T d'animals CD6^{+/+} i CD6^{-/-}, reflexat en la diferent expressió de Nur77 entre genotips. La dràstica disminució en les poblacions SP d'animals transgènics CD6^{-/-}OT-I i CD6^{-/-}Marilyn portadors de TCRs monoclonals també dona suport al fet que CD6 actua com a inhibidor del senyal del TCR al timus establint el llindar d'entrada a selecció negativa. En aquest aspecte, CD6 demostra tenir una funció paral·lela a la de CD5 com a regulador negatiu del timus, ja que l'absència d'aquest darrer també comporta una major alliberació de Ca²⁺ intracel·lular així com una disminució dels timòcits SP en ratolins transgènics portadors de TCR monoclonals CD5^{-/-} (Tarakhovsky et al., 1995).

Aquestes dades contrasten amb les obtingudes als estudis immunoquímics, els quals mostren que, almenys aparentment, l'absència de CD6 no afecta significativament la fosforilació de les proteïnes intracel·lulars estudiades de la via de senyalització del TCR, amb possible excepció de SLP-76. Aquests resultats no deixen de sorprendre degut a la consistència dels estudis de mobilització de Ca²⁺, un altre paràmetre indicador de la intensitat del senyal d'activació mitjançat via TCR. De fet, seguint el paral·lelisme amb CD5, les nostres dades també contrasten amb les reportades per a timòcits CD5^{-/-} al ser estimulats amb anti-CD3, els quals presenten fluxos de Ca²⁺ incrementats que s'acompanyen d'augment en la fosforilació de les proteïnes PLC-γ1, TCRζ, LAT i Vav (Tarakhovsky et al., 1995).

Una possible explicació per aquesta "dissociació" entre fluxos de Ca²⁺ i fosforilacions es discuteix a la secció de resultats. Com es pot comprovar, els increments de Ca²⁺ s'observen en cèl·lules DP però no SP del timus, encara que la magnitud dels nivells basals i post-estimulació de Ca²⁺ intracel·lular es molt diferent entre ambdós tipus cel·lulars (de 0.08 a 0.12 i de 0.1 a 0.4, respectivament). És possible que la magnitud de la resposta de fosforilació de proteïnes senyalitzadores també sigui diferent entre ambdós tipus cel·lulars. D'aquesta manera la major fosforilació en les cèl·lules SP d'altra banda aparentment no afectades per l'absència de CD6, emmascararia les possibles diferències en la fosforilació de les cèl·lules DP on CD6 exerceix més clarament el seu efecte regulador negatiu. Aquesta hipòtesis estaria recolzada per la mesura de la fosforilació de la proteïna Erk per citometria en resposta a anti-CD3, on s'observa un lleuger augment de p-Erk en timòcits SP CD6^{+/+} i CD6^{-/-}, però no en canvi en timòcits DP, indicatiu que la fosforilació en aquest darrer genotip és tan subtil que la sensibilitat del citòmetre no és suficient per detectar-la.

En vista d'aquests resultats, l'ús de poblacions tímiques "totals" (amb TCR policlonals d'afinitats diverses) no semblaria ser el més adient per abordar estudis immunoquímics on detectar diferències quantitatives o qualitatives en el patró de fosforilació entre ratolins CD6^{-/-} i CD6^{+/+}. L'alternativa experimental passaria en la nostra opinió per fer l'anàlisi immunoquímica, encara pendent, en animals transgènics portadors de TCR monoclonals. L'estudi immunoquímica en unes condicions on totes les cèl·lules T tinguin un mateix TCR eliminaria la variabilitat clonal i d'aquesta manera es podrien observar possibles diferències també en timòcits SP mancats de CD6. Donada la disponibilitat de ratolins transgènics CD6^{-/-} OT-I i Marilyn esta previst realitzar

aquest tipus d'estudis amb timòcits d'aquestes soques murines que esperem puguin aportar més informació pel que fa a les vies de senyalització intracel·lulars en les que intervé CD6.

Tot i això, la diferent expressió de Nur77 en cèl·lules CD6^{+/+} i CD6^{-/-} evidencia que el repertori de cèl·lules T ha estat seleccionat de manera diferent en absència de CD6, i que per tant s'han seleccionat els TCRs amb menys afinitat i que no superen el llindar d'activació per entrar en selecció negativa, per evitar fenòmens autoimmunitaris a la perifèria.

5.1.2 Paper de CD6 en la supervivència de timòcits

Tot i la funció de CD6 com a inhibidor de l'activació al timus, no es pot descartar la possibilitat que també estigui contribuint a la supervivència dels timòcits incrementant l'activitat transcripcional o post-traduccional de molècules antiapoptòtiques. La sobreexpressió de CD6 en cèl·lules DP en selecció positiva i en timòcits resistents a l'apoptosi *in vitro* (Singer et al., 2002), així com la protecció al AICD que confereixen AcMo anti-CD6 en cèl·lules B leucèmiques (Osorio et al., 1997), o el fet que es necessiti la integritat de la part citoplasmàtica de CD6 per protegir de l'apoptosi induïda per galectines (Escoda-Ferran et al., 2014), confirma que aquesta idea s'ha de tenir en consideració.

Els principals i més ben descrits reguladors de l'apoptosi són la família BCL-2, els quals inclouen membres proapoptòtics com la proteïna BH3, BAX i BAK, i membres antiapoptòtics com el propi BCL-2, el qual inhibeix BAX/BAK i evita que aquests destrueixin la membrana mitocondrial, l'alliberació del citocrom c i l'activació de caspases (Czabotar et al., 2014). Pel que fa al rol de BCL-2 al timus, tot i que Williams i col·laboradors van demostrar que la sobreexpressió de BCL-2 promovia la producció de cèl·lules T madures i inhibia la selecció negativa (Williams et al., 1998), els mateixos autors pocs anys més tard van aportar dades suggerint que la sobreexpressió de BCL-2 associada a la selecció al timus podria ser una conseqüència de la selecció positiva més que la seva causa (Williams et al., 2001). En aquest escenari de l'ou i la gallina, es fa difícil determinar si una hipotètica reducció en l'expressió de BCL-2 en absència de CD6 estaria lligada a una reducció de senyals de supervivència. Per tant, tot i que la manca de CD6 induïx apoptosi degut a un increment de la selecció negativa, no es pot descartar que CD6 actuï també com una proteïna pro-supervivència. En aquest sentit, determinar els nivells de mRNA de BAX i BCL-2 en timòcits CD6^{+/+} i CD6^{-/-} recentment estimulats amb AcMo anti-CD3 i anti-CD6 podria ajudar a resoldre si CD6 transmet també senyals de supervivència durant la selecció al timus.

5.1.3 CD6 com a regulador negatiu en perifèria

L'alliberació augmentada de Ca²⁺ intracel·lular observada en resposta a l'estimulació via CD3 de timòcits immadurs (DP) però no madurs (SP) de ratolins CD6^{-/-}, indica que CD6 és un nou regulador negatiu de la senyal del TCR i que els nivells de CD6 condicionen el llindar d'activació dels timòcits immadurs abans de ser seleccionats. Aquest efecte recorda el que té CD5 sobre la maduració i selecció dels timòcits (Soldevila et al., 2011). L'expressió de CD5 es

troba regulada durant el desenvolupament limfocitari al timus en funció de les senyals i l'afinitat del TCR, d'aquesta manera contribuint a l'ajustament fi (*fine tuning*) del senyal d'activació (Azzam et al., 1998, 2001). En conseqüència, l'expressió de membrana de CD5 en timòcits madurs i cèl·lules T perifèriques és directament proporcional a l'afinitat dels seus TCR, com es demostra pels alts nivells de Nur77 observats en cèl·lules CD5^{hi} comparades amb cèl·lules CD5^{lo} (Fulton et al., 2014). Els nivells de Nur77 estan considerats un marcador fiable de la intensitat de senyalització rebuda pel TCR (Moran et al., 2011), i d'acord als resultats obtinguts per nosaltres també es troben augmentats en cèl·lules CD6^{hi} comparades amb les CD6^{lo}, el que suggeriria també que CD6 es comportaria com un regulador negatiu del senyal del TCR en condicions d'alta afinitat.

Els dos descobriments més rellevants en referència als òrgans limfoides perifèrics en animals CD6^{-/-} són els increments significatius en la freqüència de cèl·lules T amb fenotips efector/memòria (CD8⁺T_{CM} i CD4⁺T_{EM}) i reguladors (Treg). La generació i manteniment d'ambdós genotips s'ha relacionat amb condicions d'alta intensitat de senyalització del TCR o de co-estimulació (Lanzavecchia and Sallusto, 2005), el qual estaria d'acord amb la nostra visió que CD6 actua com a modulador negatiu de la senyal del TCR. No obstant, l'increment de cèl·lules amb fenotips efector/memòria innata, és a dir en animals que no han entrat en contacte amb antígens exògens, podria ser atribuït a fenòmens de proliferació homeostàtica, també conegut com proliferació induïda per limfopènia (Jameson, 2002). En aquest cas la menor sortida de cèl·lules T madures CD4⁺SP i CD8⁺SP del timus en absència de CD6 podria estar compensada a la perifèria per una major proliferació cel·lular generant un augment de poblacions amb fenotip efector/memòria. Els resultats obtinguts de la mesura de la proliferació *in vivo* mitjançant BrdU, mostren que la proliferació de CD8⁺T_{CM} i CD4⁺T_{EM} és en realitat menor en els ratolins CD6^{-/-} en comparació amb els CD6^{+/+}. Aquestes dades van en contra d'un augment en la proliferació homeostàtica, i en canvi defensen la idea que aquestes cèl·lules adopten aquest fenotip degut a una alta intensitat en l'estimulació dels seus TCRs en resposta a autoantígens. Aquesta idea es veu recolzada pels resultats obtinguts en l'experiment de quimeres de medul·la òssia, on en un context on hi ha un flux continu i normal de cèl·lules T del timus (ja siguin CD45.1 o CD45.2), tot i haver una gran reducció de cèl·lules T CD6^{-/-}, aquestes presenten una proporció més elevada de cèl·lules CD8⁺T_{CM} i Treg en comparació amb les cèl·lules CD6^{+/+}, demostrant un cop més que la generació d'aquest fenotip es intrínsec a la deficiència cel·lular de CD6 i no depenent d'altres aspectes relacionats amb alteracions del microambient on es desenvolupen les cèl·lules T. Altres dades que recolzen aquest fet són les obtingudes per William i col·laboradors quan estudien la proliferació homeostàtica d'animals transgènics HY restringits per MHC classe-I (Kieper et al., 2004). Els autors van observar que cèl·lules CD8⁺ provinents de femelles HY no proliferaven en ser transferides a ratolins hostes, i en canvi sí ho feien les cèl·lules de ratolins HY mascles degut a que aquestes havien adoptat un fenotip memòria. Donat que les cèl·lules de ratolins HY mascles tenen una alta afinitat per autoantígens com es demostra per la seva expressió de CD5, els autors suggereixen que és l'afinitat i/o intensitat de senyal del TCR el que determina la conversió de cèl·lula naïve a

memòria. Per altra banda, el nostre laboratori ha vist que ratolins deficients per CD5 també presenten freqüències més elevades de cèl·lules T $CD8^+T_{CM}$ i $CD4^+T_{EM}$ (dades no presentades), les cèl·lules dels quals són més reactives a autoantígens degut a la manca de senyals inhibitoris de la senyalització del TCR. Tot indica doncs, que l'augment de cèl·lules T amb fenotip efector/memòria es deu a que en absència de les senyals inhibidores de CD6, la interacció amb autoantígens a perifèria provoca una resposta més intensa que genera un canvi de fenotip de cèl·lula naïve a cèl·lula efectora/memòria innata.

Pel que fa a les cèl·lules Treg, esta altament acceptat que la generació d'aquestes cèl·lules al timus (nTreg) requereix unes condicions d'alta afinitat d'interacció TCR:APC. En absència de CD6, la senyal més intensa que es transmet via TCR provoca que els timòcits DP presentin altes concentracions de Ca^{2+} intracel·lular en resposta a estímuls via CD3, el que hauria d'afavorir l'expansió de nTregs, com succeeix en ratolins deficients per a CD5 ($CD5^{-/-}$) (Ordoñez-Rueda et al., 2009). No obstant, en els ratolins $CD6^{-/-}$ no s'observa un increment de cèl·lules Treg al timus, tot i que en canvi sí que es detecta a la perifèria. Això indicaria que CD6 és rellevant en la generació de cèl·lules Treg perifèriques (iTreg) durant una resposta immunitària, i no tant durant la selecció del repertori autorreactiu al timus. En aquest sentit, semblaria que la interacció de CD6 amb ALCAM mitjançada per cèl·lules T i APC, respectivament, als òrgans limfoides secundaris tindria un paper destacat en la regulació de cèl·lules iTreg.

5.1.4 Paper de la interacció de CD6 amb CD166/ALCAM

A diferència de CD5, a qui no se li ha descrit un lligand endogen de manera fiable i reproduïble, CD6 presenta 3 dominis extracel·lulars, el més proximal dels quals interacciona amb el seu lligand CD166/ALCAM (Gimferrer et al., 2002; Osorio et al., 1995; Te Riet et al., 2014; Castro et al., 2007), el qual té una àmplia expressió en diferents tipus cel·lulars com ara DCs, TECs, cèl·lules B, macròfags, i determinats epitelis i endotelis activats (Bowen et al., 1995; Whitney et al., 1995b). A través de diferents assajos *in vitro* s'ha demostrat que la interacció CD6-CD166/ALCAM és essencial per l'estabilització de la sinapsis immunològica, així com per iniciar l'activació i la subseqüent proliferació de cèl·lules T induïda per DCs (Zimmerman et al., 2006; Hassan et al., 2004). Per altra banda, Gottschalk i col·laboradors van demostrar que la concentració de lligand així com la potencia i la duració de la interacció T-APC són factors que determinen la generació de Tregs a la perifèria (Gottschalk et al., 2010). Utilitzant animals transgènics 5C.C7 amb TCR transgènics monoclonals i pèptids lligands amb diferents afinitats, van demostrar que els pèptids amb més afinitat generaven més fàcilment Tregs, i que en pèptids amb més baixa afinitat la interrupció del contacte T-APC durant les primeres hores de cultiu portava també a un augment en la generació de cèl·lules Treg. En aquest context l'increment de cèl·lules Treg en absència de CD6 a la perifèria però no al timus es podria explicar per la dificultat de mantenir sinapsis estables i de llarga durada per la manca de la interacció CD6-CD166/ALCAM i/o per la major activació a autoantígens que presentarien determinats clons en absència de les senyals inhibidores de CD6.

Per altra banda, la interacció de CD6 amb el seu lligand també hauria de tenir rellevància al timus degut a que CD166/ALCAM es troba expressat també en cèl·lules TEC que actuen com APC d'autoantígens durant el procés de selecció positiva/negativa dels timòcits immadurs (DP). Donat això, en absència de CD6 seria plausible esperar una reducció en el nombre de cèl·lules madures a causa d'una incompleta formació de la sinapsis, seguida de la insuficient activació dels timòcits i la conseqüent mort per abandonament o *death by neglect* (Klein et al., 2009). No obstant, Ebert i col·laboradors descriuen un model on els contactes entre timòcits i TECs no es troben mantinguts per sinapsis de llarga durada, sinó que són més aviat contactes transitoris i repetits amb diferent TECs el que provoca la transcripció de NFAT en timòcits i permet la seva selecció positiva (Ebert et al., 2008). D'acord amb aquest model, la interacció CD6-CD166/ALCAM podria ser d'alguna manera no tan necessària al timus al contrari amb la rellevància que mostra a la perifèria. A favor d'aquesta hipòtesi, un article que estudia l'alliberació de Ca^{2+} en resposta a superantigens en cèl·lules humanes transfectades amb CD6 de rata, mostra que les cèl·lules CD6^{hi} tenen menor alliberació de Ca^{2+} intracel·lular que les CD6^{lo}, i que curiosament aquest efecte es manté en absència del domini SRCR-D3 d'unió a CD166/ALCAM i de la seva co-localització a la sinapsis immunològica (Oliveira et al., 2011). Aquestes dades reforçarien la hipòtesi que la unió de CD6 a ALCAM pel que fa a l'activació cel·lular seria menys necessària al timus però essencial a la perifèria.

De fet, l'efecte de CD6 a la perifèria es trobaria en balanç entre les dues funcions que se li atribueixen: la modulació negativa del TCR i l'estabilització i manteniment de la sinapsis al llarg del temps. Per tant, en el context estudiat d'absència de CD6 hi haurà una manca de senyals inhibidors de l'activació i a la vegada la formació d'una sinapsis deficient i menys estable per la falta d'interacció CD6-CD166/ALCAM. Això porta a considerar dos escenaris alternatius: que davant el contacte T-APC, l'absència de senyals negatius transmesos per CD6 faci que les cèl·lules T es sobre-activin i aquestes hiper-prolifèrin tot i la mala formació de la sinapsis, o bé que les cèl·lules es sobre-activin però en canvi degut a una deficient sinapsis aquesta activació no es tradueixi en més proliferació.

La major proliferació *in vitro* en cèl·lules T aïllades CD6^{-/-} i estimulades únicament amb AcMo anti-CD3 i anti-CD28, demostra que en unes condicions on s'estimula directament a través del TCR i sense necessitat de contacte amb cèl·lules APC ni altres molècules co-estimuladores, CD6 continua mantenint una certa funció de regulador negatiu de l'activació. Tot i això, la magnitud de la inhibició és diferent de la que exerceix en les cèl·lules immadures del timus, ja que tot i que les cèl·lules T perifèriques CD6^{-/-} proliferen més que les CD6^{+/+}, només s'arriba a la significació estadística en determinades condicions. Aquestes dades contrasten amb les observades en les cèl·lules T CD5^{-/-} utilitzades com a control, les quals sí que proliferen d'una manera superior respecte les CD6^{+/+}. Aquests resultats porten a pensar que a diferència de CD5, el paper de CD6 com a regulador negatiu a la perifèria és més discret i que en canvi potser és en la formació de la sinapsis on té més rellevància. En línia amb aquesta idea estan les dades obtingues de la proliferació *in vivo* en ratolins CD6^{+/+} i CD6^{-/-}. La mesura de la

proliferació de cèl·lules $CD8^+T_{CM}$ i $CD4^+T_{EM}$ en condicions basals al llarg d'una setmana revela que les cèl·lules $CD6^{-/-}$ proliferen inclús menys que les $CD6^{+/+}$, indicant que tot i el rol negatiu de CD6, l'absència de la interacció CD6-CD166/ALCAM i per tant l'impediment de la formació d'una sinapsis estable provoca que aquestes cèl·lules tinguin més dificultats per proliferar en condicions *in vivo*. Per tant, les interaccions CD6-CD166/ALCAM agafarien un gran pes a perifèria, el que ajudaria també a explicar la major conversió de cèl·lules naïve a memòria mencionada anteriorment. En aquest darrer cas, probablement les cèl·lules T naïve $CD6^{-/-}$ al entrar en contacte amb autoantígens presentats per APC a la perifèria reben unes senyals més intenses en absència de CD6 que faran canviar el fenotip, però per altra banda la impossibilitat de formar una bona sinapsis impedirà que aquestes proliferin més que les cèl·lules on CD6 esta present.

5.1.5 Regulació creuada entre CD5 i CD6

Els resultats presentats en aquesta tesi van en contra d'altres estudis publicats on CD6 actua com a molècula co-estimuladora en cèl·lules T humanes i de ratolí, com es dedueix per un increment en la proliferació, augments de calci intracel·lular i activació de MAPK en resposta a co-estimulació amb AcMo anti-CD3 i diferents AcMos anti-CD6 (Zimmerman et al., 2006; Hassan et al., 2004; Ibanez et al., 2006; Nair et al., 2010). En aquest punt, és important destacar que la molècula més homòloga a CD6, CD5, és a dia d'avui considerat un inhibidor de la cascada de senyalització del TCR, però en canvi els primers articles que estudiaven CD5 van presentar-lo com una molècula co-estimuladora per les mateixes raons (Gringhuis et al., 1997; Alberola-Illa et al., 1992; Ceuppens and Baroja, 1986; June et al., 1987). Va ser la generació d'un ratolí deficient en CD5 el que va convèncer la comunitat científica que aquest receptor era un regulador negatiu de la selecció i activació de cèl·lules T, curiosament amb unes evidències molt similars a les que es presenten en aquest treball (Tarakhovsky et al., 1994, 1995; Azzam et al., 1998).

Aquests dos receptors comparteixen una estructura i funcionalitat similar, però no obstant els seus dominis citoplasmàtics presenten grans diferències en llargada i composició aminoacídica. Aquestes diferències implicarien que la seva capacitat per modular la cascada de senyalització del TCR es donaria a terme a través d'interaccions cel·lulars diferents, obrint la possibilitat de diferències qualitatives i quantitatives pel que fa a la funció de cadascun. En aquest sentit, les diferents interaccions de CD5 i CD6 a nivell citoplasmàtic també han portat a considerar el primer com a regulador negatiu i el segon com a modulador positiu de la senyalització del TCR. CD5 s'uneix a molècules repressores de l'activació com SHP-1, Cbl i Ras-GAP en resposta a una estimulació a través del TCR (Pani et al., 1996; Perez-Villar et al., 1999; Carmo et al., 1999; Dennehy et al., 1998; Lozano et al., 2000), al contrari que CD6 on cap interacció amb aquestes proteïnes ha estat descrita, però que en canvi sí s'ha descrit que actua com a suport per les proteïnes associades a l'activació de cèl·lules T ZAP-70 i SLP-76 (Roncagalli et al., 2014; Hassan et al., 2006).

La reduïda expressió de CD5 en un context de deficiència de CD6 coincideix amb aquest escenari, on la manca d'una molècula co-estimuladora com CD6 es veu compensada per una reducció de senyals inhibitoris de CD5. No obstant, la inesperada sobre-expressió de CD5 en un context en absència de CD6 suggereix la situació contrària: en absència de les senyals inhibidores de CD5, l'hoste sobre-expressa CD6 per a què les seves senyals inhibidores equilibrin l'activació final de la cèl·lula T.

L'observació que la manca d'un receptor afecta l'altra evidencia que existeix una intercomunicació o regulació creuada entre CD5 i CD6, però cal destacar que el patró d'expressió de cada receptor al seu ratolí *knock-out* contrari no és la mateixa en els dos casos. En absència de CD6, l'expressió de CD5 es troba reduïda des dels estadis més immadurs al timus, ja que les cèl·lules DN CD6^{-/-} ja presenten una disminució de CD5 des del moment en que comencen a expressar-lo a membrana, disminució que es manté al llarg de la maduració i que s'observa més clarament en cèl·lules perifèriques. Aquest escenari implica una funció molt més complexa de CD6, i suggereix una hipòtesi on aquest tindria una funció dual depenent del context. Per un costat, l'expressió de CD6 seria necessària per expressar correctament CD5 a la membrana cel·lular tant en timus com en perifèria, però mentre que durant el desenvolupament al timus CD6 adoptaria un rol com a regulador negatiu compartit amb CD5, a la perifèria el seu paper com a modulador negatiu seria menys rellevant i en canvi estaria més centrat en el manteniment dels contactes T-APC i la transmissió d'altres senyals. L'increment de CD6 en un context de deficiència de CD5 explicaria l'intent de les cèl·lules T perifèriques per recuperar l'expressió de CD5 i per compensar les funcions inhibidores d'aquest en la seva absència.

Ara per ara, aquesta idea és merament especulativa. Lamentablement, les dades sobre la bioquímica de les interaccions moleculars en absència de CD6 presentades en aquest treball són encara limitades, i a més, tot i les grans diferències en l'alliberació de Ca²⁺ en timòcits CD6^{+/+} i CD6^{-/-}, sorprenentment aquestes no s'han vist acompanyades per canvis rellevants en les proteïnes estudiades de la senyalització. Aquest primer treball de caracterització d'animals CD6^{-/-} ha posat en evidència la funció que desenvolupa CD6 al timus així com l'impacte que té en el fenotip de determinades poblacions T a la perifèria. Els propers estudis haurien d'estar centrats en determinar com interacciona CD6 a nivell citoplasmàtic, i de quina manera afecta aquest l'expressió de CD5. Per una banda, seria molt útil poder tenir la informació sobre les diferents proteïnes que interaccionen amb CD5 i CD6, tal i com es va fer per ZAP-70, SLP-76 i LAT (Roncagalli et al., 2014), i per altra, també seria molt interessant la generació d'un animal doble *knock-out* pels dos receptors per estudiar com afecta el fenotip l'absència dels dos receptors.

5.1.6 CD6 en models de malaltia

Les implicacions de la deficiència de CD6 i per tant de les interaccions CD6-CD166/ALCAM es van avaluar no només en condicions basals, sinó també en diferents contextos d'agressió

biològica resultants de la pèrdua de la tolerància (autoimmunitat), del creixement de cèl·lules tumorals o de processos infecciosos.

5.1.6.1. CD6 en models d'autoimmunitat

L'avaluació dels efectes de la deficiència de CD6 en un context d'autoimmunitat com es el model d'artritis reumatoide induït per col·lagen (CIA) mostren que els ratolins CD6^{-/-} presenten quadres clínicament més exacerbats, i que la incidència de la malaltia és també major. L'anàlisi de les citocines intra-articulars revela que clarament s'està donant una resposta inflamatòria local més intensa de tipus Th1/Th17, mostrant un increment en les citocines pro-inflamatòries IL-6, TNF α , IL-1 β i IL-17A. Donats els augments en els ratolins CD6^{-/-} de dos tipus de cèl·lules T amb fenotips oposats, com ho són les cèl·lules efectores/memòria i les Treg, aquestes dades recolzarien un rol més important de les cèl·lules amb fenotip efector que en els ratolins CD6^{-/-} causarien una major inducció de la malaltia. Aquesta hipòtesis aparentment es contradiu amb els resultats de proliferació *in vivo* on cèl·lules CD6^{-/-} CD8⁺T_{CM} i CD4⁺T_{EM} proliferen menys que les CD6^{+/+}. No obstant, dades generades recentment al nostre laboratori demostren que les Tregs extretes de melses d'animals CD6^{-/-} presenten una capacitat supressora *in vitro* inferior que les Tregs CD6^{+/+} (Consuegra-Fernández M et al, dades no presentades). Per altra banda, la menor expressió de FoxP3 a les articulacions dels ratolins CD6^{-/-} immunitzats amb col·lagen seria un factor afavoridor de la diferenciació cap a Th17, ja que s'ha descrit que en determinades condicions d'inflamació les cèl·lules Treg poden canviar el seu fenotip a Th17 (Bovenschen et al., 2011). La bibliografia científica disponible descriu per un costat que la depleció mitjançant AcMo de cèl·lules CD4⁺CD25⁺ provoca una resposta inflamatòria més forta en el model de CIA (Morgan et al., 2003), i per altra Ehrenstein i col·laboradors van veure que tot i que cèl·lules CD4⁺CD25⁺ aïllades de pacients amb artritis reumatoide eren capaces de suprimir la proliferació de les cèl·lules T efectores, aquestes no podien suprimir l'alliberació de citocines de les cèl·lules T activades ni els monòcits (Ehrenstein et al., 2004). En línia amb aquesta informació, els augments de les citocines proinflamatòries pròpies de monòcits i de cèl·lules CD4⁺Th17 vistos en el model de CIA en absència de CD6 es relacionarien estretament amb la capacitat supressora disminuïda de les Treg.

A més, curiosament, també s'ha demostrat que la proteïna SLP-76 és necessària per a la correcta funcionalitat de les Treg (Schmidt et al., 2015), i que CD6 és important per al reclutament de SLP-76 a la membrana cel·lular durant l'activació limfocitària (Roncagalli et al., 2014). Per tant, tot i no disposar encara d'una dada experimental definitiva que confirmi aquesta relació, probablement no es tracti d'una major proliferació en els ratolins CD6^{-/-}, sinó un efecte causat per la menor capacitat supressora de les cèl·lules Tregs durant la inflamació.

Per altra banda, no s'observen diferències en la secreció d'anticossos anti-col·lagen, fet que també es veu reflexat per la manca de diferències en la producció d'anticossos entre animals CD6^{+/+} i CD6^{-/-} a l'assaig de resposta a antigens dependents de cèl·lules T. Aparentment,

doncs, sembla ser que les interaccions entre cèl·lules B-T estan ben conservades en absència de CD6.

5.1.6.2. CD6 en models de càncer

Les dades resultants del model de CIA contrasten amb les obtingudes en el model de melanoma. En aquest darrer cas no s'observen diferències entre animals CD6^{+/+} i CD6^{-/-} ni en el creixement del tumor ni en el pes d'aquest a punt final. Davant les dades d'autoimmunitat, on es mostra clarament una resposta inflamatòria local més intensa en el cas dels animals CD6^{-/-} (independentment del mecanisme), hom s'esperaria una resposta antitumoral també més robusta en el model de càncer, i per tant un creixement més lent del tumor. Però això no s'observa, el que porta a pensar que els mecanismes causants de la resposta autoreactiva en el model de CIA són diferents dels que es generen en la resposta al tumor, i que en el cas dels primers CD6 té una gran importància a diferència dels segons. També cal destacar que, tot i la reduïda capacitat supressora de les Treg dels ratolins CD6^{-/-}, aquests ratolins presenten al moll de l'òs freqüències més elevades de cèl·lules Gr-1^{hi}CD115⁺, les quals maduraran cap a un subtipus mieloide de caràcter supressor fortament vinculat a la regulació de respostes inflamatòries en diferents tipus de tumors (Gabrilovich and Nagaraj, 2009), i el qual podria compensar l'aparent deficiència de les cèl·lules Treg CD6-negatives.

Per aclarir aquest punt, apart de determinar els mecanismes pels quals l'absència de CD6 comporta un augment d'incidència de CIA, s'hauria d'analitzar la resposta inflamatòria dels ratolins CD6^{-/-} davant altres tipus tumorals i malalties autoimmunitàries, i estudiar la presència i els números de les cèl·lules mieloides supressores. Això permetria avaluar si l'efecte de CD6 en l'activació i funció cel·lular ve determinat segons el tipus de tumors o malaltia autoimmunitària, fet que aparentment seria plausible ja que actualment s'ha iniciat un estudi amb l'Itolizumab (AcMo anti-CD6) en pacients amb desordres limfoproliferatius i artritis reumatoide amb uns resultats que, tot i preliminars, es presenten prometedors (Izquierdo Cano et al., 2014; Rodriguez et al., 2012).

5.1.6.3. CD6 en models d'infecció

Pel que fa a les possibles conseqüències de la deficiència de CD6 en situacions d'agressió microbiana es va analitzar un model d'infecció polimicrobiana intrabdominal com és el de lligadura i punció cecal (CLP), considerat com el model *gold standard* per ser el que reproduceix amb més fidelitat la situació clínica humana (Rittirsch et al., 2009). La base teòrica darrere d'aquest plantejament ve donada per la publicació del nostre laboratori de la capacitat de CD6 soluble i de membrana de interaccionar amb PAMPs bacterians (tant de bacteris Gram-positius com Gram-negatius). Els resultats preliminars de la inducció de CLP en ratolins CD6^{+/+} i CD6^{-/-} mostren una major sensibilitat al xoc sèptic en absència de CD6 de membrana. En aquest experiment, tots els ratolins CD6^{-/-} van morir a les 24 h post inducció de la CLP, mentre que en aquest punt la supervivència dels ratolins CD6^{+/+} encara era del 50-60%. Per altra banda, es va observar una millora significativa en la supervivència de ratolins CD6^{-/-} tractats amb la proteïna

rshCD6 la qual cosa reforça la idea que CD6 és un receptor de PAMPs bacterians que neutralitza els seus efectes pro-inflamatoris, per tant amb potencials aplicacions terapèutiques.

La base de la susceptibilitat augmentada que presenten els ratolins deficientes per a CD6 davant un procés infecció sever com és el induït per la CLP podria ser multifactorial. Tot i que la mort ràpida de pacients amb sèpsi als tres dies de l'inici del xoc sèptic es dona per la forta resposta proinflamària dirigida per la secreció de citocines com IL-1 β i IL-6 per monòcits i neutròfils de la immunitat innata, paral·lelament també es desenvolupa una resposta antiinflamatòria regulada, entre altres, per les Tregs i macròfags (Hotchkiss et al., 2013). A diferència de les cèl·lules efectores que pateixen una alta mortalitat, les cèl·lules Treg són aparentment més resistents a l'apoptosi, augmentant la seva capacitat immunosupressora per intentar contrarrestar l'intens torrent de citocines alliberat per la immunitat innata. En aquest esquema, la menor capacitat supressora de les Treg CD6^{-/-} podria ser insuficient per aturar la resposta proinflamària iniciada per monòcits i neutròfils i provocaria la fulminant mort de tots els ratolins a les 24 h post CLP, mentre que una capacitat supressora normal contrarestarà la resposta inflamatòria i permetria allargar la supervivència dels animals. De totes maneres, hi ha evidències experimentals que demostren que, encara que es doni aquesta expansió de la població Treg durant els processos sèptics severos (Venet et al., 2009), les cèl·lules Treg no tindrien un paper determinant en la resposta inflamatòria i la supervivència en situacions de sepsis.

Una altra possibilitat encara pendent d'estudi es la possible expressió de CD6 en poblacions de cèl·lules mieloides relacionades amb la resposta innata a la infecció. El nostre laboratori té dades recents que demostren per primera vegada que un receptor associat a les cèl·lules T com ho és CD5 es troba expressat també en DCs convencionals però no en macròfags o DCs plasmacitoides (Carreras E et al, dades no presentades). Tenint en compte aquestes dades i donat que CD6 és més promiscu en la seva expressió que CD5 ja que s'expressa apart de les cèl·lules T i B1a també en cèl·lules NK, precursors hematopoètics i determinades regions cerebrals (Braun et al., 2011; Cortés et al., 1999; Konno et al., 2001), no es pot descartar que CD6 s'estigui expressant en cèl·lules de la immunitat innata exercint una funció com a PRR donada la seva capacitat d'unir bacteris Gram positives i negatives (Sarrias et al., 2007; Martínez-Florensa et al., 2014).

5.1.6.4. Consideracions finals

La caracterització d'un model animal deficient en CD6 ha servit per demostrar el rol com a modulador negatiu de l'activació que aquest exerceix durant el desenvolupament i maduració de les cèl·lules T, així com les implicacions *in vivo* de l'absència d'interacció de CD6-CD166/ALCAM durant la homeòstasi perifèrica (**Fig. 5.1**). Les diferències observades en models experimentals de malaltia també posen de manifest la utilitat de disposar a dia d'avui d'un ratolí deficient per CD6 per al seu estudi.

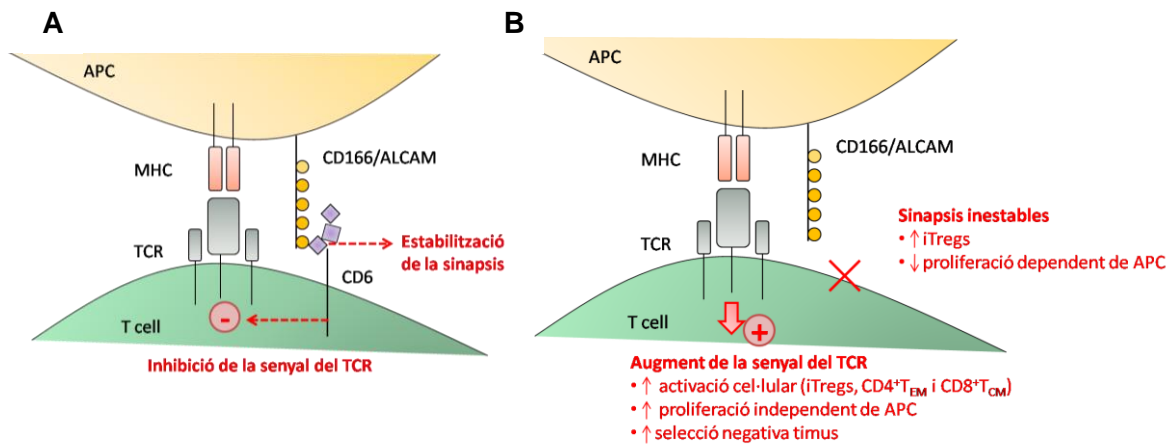


Figura 5.1. Conseqüències de l'absència de CD6.

Aquest fet cobra especial importància davant els estudis clínics que s'estan duent a terme actualment amb teràpies biològiques basades en AcMos anti-CD6. Les dades preliminars d'un estudi amb pacients amb leucèmia limfocítica crònica de cèl·lules B CD6⁺ amb un AcMo anti-CD6 (Itolizumab) revelen una millora clínica en els pacients, especialment pel que fa a la disminució d'adenopaties i esplenomegàlia (Izquierdo Cano et al., 2014). El mateix passa amb pacients amb artritis reumatoide, on l'administració de Itolizumab millora la puntuació o els paràmetres clínics ACR (*American College of Rheumatology*) relacionats amb la malaltia (Chopra et al., 2015).

Per entendre els possibles mecanismes d'acció de les immunoteràpies basades en CD6 cal tenir present que aquesta molècula presenta 3 dominis SRCR a nivell extracel·lular, el domini SRCR-D3 àmpliament estudiat per la seva interacció amb CD166/ALCAM. Del domini SRCR-D2 no hi ha pràcticament informació disponible, però en canvi s'ha vist que AcMos contra el domini SRCR-D1 protegeixen de l'apoptosi a cèl·lules de leucèmia limfocítica crònica *in vitro* (Osorio et al., 1997), i es comporten com a co-estimulador ja que augmenten la proliferació de cèl·lules T estimulades amb AcMos anti-CD3 i anti-CD28 (Osorio et al., 1998). Les dades que s'aporten en aquest treball suggereixen una funció molt complexa de CD6 quan es troba present en cèl·lules T perifèriques, i es pot hipotetitzar que CD6 manté una funció de regulador negatiu excepte quan estableix una interacció a través del seu domini SRCR-D1. Aquest fet permetria explicar per què en determinades circumstàncies CD6 se l'ha vist actuar com a co-estimulador, a la vegada que d'acord amb les nostres dades presenta un rol clarament inhibidor de l'activació. Per tant, una explicació als efectes observats es que l'Itolizumab actua com a bloquejant del domini SRCR-D1 de CD6, mantenint la funció inhibidora de CD6 i evitant les senyals de supervivència i proliferació que es deriven de la interacció d'aquest domini amb lligands endògens.

En aquest sentit, els propers estudis haurien d'estar focalitzats en clarificar els mecanismes pels quals s'observen determinats fenòmens en absència de CD6. Com prèviament s'ha discutit, discernir si l'augment de cèl·lules Treg és a causa de la manca de senyals inhibitoris de CD6 i/o de la unió d'aquest a CD166/ALCAM, ja que en el darrer cas anticossos bloquejants del domini d'interacció podrien considerar-se com una teràpia en determinades malalties inflamatòries si aconseguixen augmentar el nombre de Tregs funcionals. En aquest sentit, el nostre laboratori ha desenvolupat recentment un nou model de ratolí transgènic que expressa elevades quantitats de CD6 soluble al sèrum que s'unirà a CD166/ALCAM, impeding la interacció del CD6 de membrana. La caracterització d'aquest ratolí, amb un bloqueig funcional de la interacció amb CD166/ALCAM (*functional knock-out*) però amb un CD6 de membrana funcional, serà molt útil per a clarificar aquest i altres interrogants.

5.2 CD5

5.2.1 Implicacions terapèutiques de la unió de CD5 a β -glucans

Tot i que la majoria de casos clínics de sèpsi estan causats per bacteries Gram positives, seguides per bacteries Gram negatives, els últims informes sobre l'etiologia de la sèpsi als Estats Units posa de manifest l'increment imparable que han sofert els casos de sèpsi per fongs durant els últims anys (Martin et al., 2003), sent *Candida albicans* encara el més comú (Tortorano et al., 2012; Bougnoux et al., 2008). Això podria reflectir l'eficàcia dels tractaments actuals contra bacteries davant els tractament antifúngics que requereixen d'una llarga administració del medicament i sovint amb una alta toxicitat seguida de l'aparició de resistències (Kriengkauykiat et al., 2011). En resposta a aquest repte, s'estan estudiant noves i més eficaces teràpies per a combatre les infeccions causades per fongs (Segal and Steinbach, 2007).

Les propietats immunomoduladores de la forma soluble de CD5 (rshCD5) en situacions d'infecció fúngica es van entreveure per primer cop quan es va demostrar que aquest no només era capaç d'unir i agregar fongs a través del reconeixement dels seus β -glucans, sinó que l'administració profilàctica de la proteïna rshCD5 en el model de xoc sèptic induït per un compost fúngic ric en β -glucans com és el zymosan (ZIGI) era capaç d'augmentar la supervivència del ratolins afectats (Vera et al., 2009). Aquestes dades juntament amb les observacions que repetides dosis de rshCD5 endarrereixen el creixement de melanoma en ratolins (Fenutría et al., 2014), obren la porta a convertir aquesta proteïna en un potencial agent immunoterapèutic en diferents situacions d'alt interès clínic com són les infeccions i el càncer. En base a tot això ha estat protegit sota patent el seu ús farmacològic pel nostre grup (WO2009153336 A1; WO2012160215 A1) i ha donat lloc a un *spin-off* de la Universitat de Barcelona i el Hospital Clínic (ImmunNovative Developments) pel seu desenvolupament pre-clínic i clínic.

Un dels objectius de les primeres fases pre-clíniques és demostrar l'eficàcia del compost en estudi així com obtenir la màxima informació sobre el seu mecanisme d'acció. Els experiments on es demostra l'eficàcia de rshCD5 en el model de ZIGI es van dur a terme en ratolins de la soca CD1 (Vera et al., 2009). Aquesta soca esta considerada com a *outbred*, és a dir, que entre els diferents individus hi ha una alta heterogeneïtat genètica, raó per la qual és la soca més utilitzada per la indústria farmacèutica en determinades situacions per a testar nous compostos en fases de desenvolupament (Aulí et al., 2012; Zhang et al., 2012). No obstant, un cop validada l'eficàcia terapèutica de rshCD5 en ratolins CD1 és necessari ampliar l'estudi i avaluar el seu efecte en altres soques. En aquest sentit, es va escollir la soca de ratolí C57BL/6 degut a que la majoria de models genèticament modificats (transgènics, *knockouts*, etc) es generen en aquesta soca (Skarnes et al., 2011), amb la peculiaritat que està considerada *inbred*, degut a que per retrocreuament entre germans la variabilitat genètica entre individus és molt baixa. El segon punt que s'ha treballat en aquesta tesi fa referència a la valuació de la eficàcia de rshCD5 en aquesta soca, així com a l'estudi de les interaccions *in vivo* del CD5 de membrana amb els β -glucans a través de l'ús d'animals CD5^{+/+} i CD5^{-/-} generats també en fons C57BL/6.

En conjunt, els resultats obtinguts mostren que rshCD5 manté la seva eficàcia en els ratolins C57BL/6 quan es dona en combinació amb IFN- γ soluble, però no sol. Els primers experiments mostren que, a diferència dels ratolins CD1 on una única dosi de rshCD5 és suficient per augmentar la seva supervivència, en el cas dels ratolins C57BL/6 l'administració de la proteïna sola no és suficient. Aparentment els ratolins C57BL/6 resulten ser més sensibles al zymosan, i l'anàlisi de la resposta inflamatòria d'ambdues soques revela que existeixen grans diferències en la producció d'IFN- γ , sent els ratolins C57BL/6 deficients en la producció d'aquesta citocina en comparació amb els CD1. Curiosament, les cèl·lules T dels ratolins C57BL/6 no tenen un problema en la secreció d'IFN- γ ja que esplenòcits estimulats amb AcMos anti-CD3 i anti-CD28 són capaços de secretar quantitats d'IFN γ al mateix nivell que els ratolins CD1. No obstant això, la producció deficient d'IFN- γ als ratolins C57BL/6 no és exclusiva enfront zymosan sinó que també té lloc enfront d'altres PAMPS d'origen bacterià (LPS, PGN). Per tant, es pot raonar que el problema no es troba en la detecció de β -glucans per part de receptors com Dectin-1, TLR2 o el propi CD5, sinó probablement en la cascada de senyalització intracel·lular comuna a tots aquests receptors i a d'altres implicats en el reconeixement de PAMPs bacterians com TLR4. Com a exemple, s'han descrit polimorfismes en la via de senyalització dels receptors TLR que comporten un increment en la susceptibilitat a certs càncers o infeccions en els individus portadors (El-Omar et al., 2008). La hipòtesis de que la major sensibilitat dels ratolins C57BL/6 al xoc sèptic-*like* per ZIGI esta lligada a la deficient producció d'IFN- γ es veu confirmada quan animals tractats amb IFN- γ recombinant murí (rmIFN- γ) incrementen la seva supervivència en comparació amb el grup control. De manera remarcable i d'acord amb aquesta dada, el tractament combinat d'IFN- γ i rshCD5 resulta ser més efectiu ja que el 100% dels animals es recuperen del xoc sèptic-*like*.

Diferents treballs han descrit que una resposta T de tipus Th1 és necessària per combatre una infecció per fongs degut a la secreció d'IFN- γ que caracteritza aquest tipus cel·lular (van de Veerdonk and Netea, 2010). Ara fa uns 30 anys es va veure que la presència d'IFN- γ contribuïa a augmentar la capacitat fagocítica dels neutròfils humans (Shalaby et al., 1985), així com l'activitat microbicida dels macròfags contra diferents patògens com *Candida albicans* (Nathan et al., 1983). Aquestes primeres observacions van portar a un primer estudi utilitzant rIFN- γ soluble on els autors van veure que la seva administració conferia protecció en ratolins infectats amb *Candida albicans* (Kullberg et al., 1993). Anys més tard es van confirmar aquestes dades quan es va veure que ratolins deficients en IFN- γ eren més susceptibles a la infecció per *Candida*, així com també ho eren ratolins deficients en IL-12 o IL-18, les dues principals citocines estimuladores de la producció de IFN- γ (Balish et al., 1998; Netea et al., 2003). Utilitzant l'aproximació inversa, el grup de Gary Cox va observar que ratolins transgènics amb una forta polarització cap a una resposta Th1 i una alta producció d'IFN- γ també eren més resistents a la infecció pulmonar per *Cryptococcus neoformans*, i completament immunes a una segona infecció (Wormley et al., 2007). Per altra banda, també s'ha demostrat la importància de l'IFN- γ contra la infecció per *Aspergillus fumigatus* en un estudi on es transferien DCs madurades prèviament *in vitro* en presència del fong i s'induïa posteriorment una aspergil·losis als ratolins hostes. La secreció d'IL-12 i la polarització de cèl·lules T CD4⁺ cap a un fenotip Th1 en els ratolins hostes conferia protecció davant la infecció (Bozza et al., 2003).

En vista d'aquestes observacions és més fàcil comprendre perquè la menor secreció d'IFN- γ en ratolins C57BL/6 els fa més susceptibles al xoc sèptic. La proteïna rshCD5 s'ha demostrat capaç d'unir i agregar fongs (Vera et al., 2009), el qual facilitaria no només la reducció de la resposta proinflamatòria resultant sinó també la seva fagocitosis i eliminació per part de neutròfils i macròfags de la immunitat innata. Per tant, a diferència d'un tractament fungicida, l'administració de rshCD5 es consideraria més aviat un tractament antiinflamatori i fungistàtic, el qual no mataria el fong sinó que l'agregaria reduint la seva capacitat de disseminació (l'aglutinació és un mecanisme bàsic i senzill d'immunitat innata) aturant o retardant la infecció per donar temps a actuar a les cèl·lules fagocítiques de la immunitat innata. Per tant, qualsevol tractament fungistàtic és eficaç en una situació on la resposta immunitària de l'hoste funciona adequadament. Malauradament, els individus més susceptibles a ser infectats per fongs oportunistes normalment són aquells els quals el seu sistema immunitari es troba més afectat degut a certes malalties o per tractaments farmacològics immunosupressors (Kriengkauykiat et al., 2011). Per aquesta raó nous estudis s'estan focalitzant en modular la resposta immunitària del propi hoste.

En aquest sentit, recentment s'ha publicat un primer estudi clínic on es va administrar IFN- γ soluble en combinació amb diferents antifúngics en pacients amb candidiasis i aspergil·losis (Delsing et al., 2014). En aquest treball, dels 8 pacients tractats amb IFN- γ , 2 pacients van eradicar la infecció completament, 4 van mostrar una millora clínica, mentre que 2 van morir degut a complicacions. En general l'administració de IFN- γ es va tolerar bé; els efectes

adversos van ser en alguns casos de febre o alteracions en enzims hepàtics que es van poder solucionar amb l'administració de fàrmacs complementaris. La lectura que es fa d'aquest estudi es que, tot i que l'administració de IFN- γ ajuda en l'activitat microbicida del pacient infectat, la teràpia proposada *per se* no té l'eficàcia que es voldria. En aquest punt, els resultats obtinguts en aquesta tesi utilitzant la teràpia combinada de rshCD5 i IFN- γ en un xoc sèptic senyalen aquesta combinació com una nova proposta pel tractament de pacients amb candidiasis i aspergil·losis. Cal destacar que aparentment l'administració de rshCD5 no té toxicitat per l'organisme. Els ratolins control tractats únicament amb rshCD5 no presentaven símptomes clínics, i en un estudi en col·laboració a una empresa externa (Harlam) utilitzant primats no es va veure toxicitat de cap tipus en els animals tractats amb rshCD5 comparats amb els control (Martínez-Florensa M et al, dades no presentades). Així, l'administració de rshCD5 (amb dosis repetides de 0.3 mg/kg a dies alterns durant 2 setmanes) no va comportar canvis significatius en les poblacions limfocitàries de timus, ganglis, melsa o sang, així com tampoc va afectar la funció metabòlica, hepàtica, renal ni d'altres paràmetres bioquímics sanguinis.

Tot i el potencial que demostra tenir rshCD5 en el tractament d'infeccions fúngiques, s'ha de continuar l'estudi pre-clínic de la molècula per demostrar la seva eficàcia en altres situacions. En aquest sentit, s'està treballant actualment en el nostre grup en la posada a punt de models murins d'infecció per fongs patogènics com *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* i *Cryptococcus neoformans*, per poder avaluar l'efecte de l'administració de rshCD5 sol o en combinació amb IFN- γ durant el curs d'aquestes infeccions.

5.2.2 Implicacions funcionals de la unió de PAMPS a CD5 i CD6

A la vista dels resultats del nostre grup sobre la unió de CD5 i CD6 a fongs i bacteries, respectivament (Sarrias et al., 2007; Vera et al., 2009), el Dr. Lenz ha proposat un model pel qual la capacitat de detectar PAMPS per part de receptors limfocitaris tipus *scavenger* com CD5 i CD6 permetria adaptar la resposta de les cèl·lules T a les condicions del microambient creat durant una infecció. Durant el procés d'infecció s'alliberen autoantígens de l'organisme que combinats amb el torrent de citocines proinflamatòries que es secreten poden causar que clons T autoreactius s'activin i generin fenòmens autoimmunitaris. No obstant, la presència de PAMPS durant la infecció seria detectada per CD5/CD6, els qual transmetrien senyals inhibidores a les cèl·lules T i B1a per evitar l'activació d'aquelles clons T més reactives o la producció d'autoanticossos en grans quantitats (**Fig. 5.2A**) (Lenz, 2009). Per altra banda, la detecció de PAMPS per CD5/CD6 permetria només l'activació i expansió d'aquells clons amb una alta afinitat per l'antigen invasor, ja que aquells clons amb baixa afinitat no podrien superar el llindar d'activació mínim imposat pel senyal d'inhibició generat per CD5/CD6 (**Fig. 5.2B**) (Lenz, 2009). Així, la interacció CD5/CD6-PAMPS regularia la resposta immunitària davant infeccions, disminuint l'activació de determinats clons per evitar fenòmens autoimmunitaris però mantenint la capacitat de fer front eficaçment al patògen invasor. Aquesta idea es podria relacionar amb el fenomen d'autoimmunitat de CIA estudiat en aquesta tesi, on l'absència de CD6 es correlaciona amb una major ruptura de la tolerància enfront el col·lagen degut a la

prèvia administració de *Mycobacterium tuberculosis*, tal i com es demostra per la major incidència de la malaltia en ratolins CD6^{-/-} en comparació amb els CD6^{+/+}.

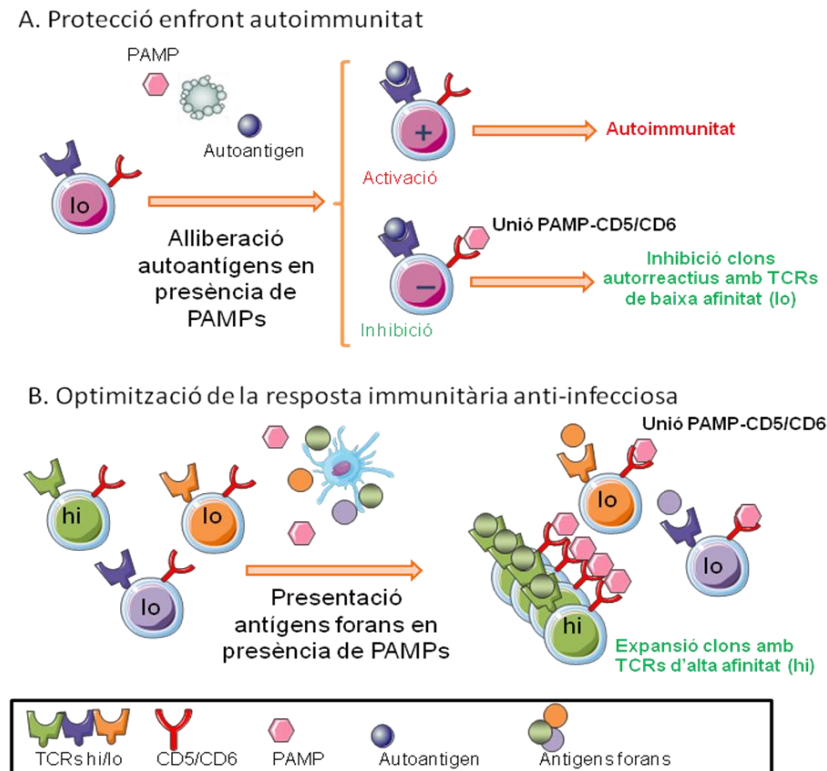


Figura 5.2. Modulació de la resposta immunitària en processos infecciosos per la unió de PAMPs a CD5 i CD6.

La hipòtesis plantejada es veuria recolzada per un costat pel precedent que les Treg no només tenen la capacitat de detectar les citocines secretades per altres cèl·lules, sinó que també poden modificar la seva resposta immune gràcies a la detecció de PAMPs pels TLRs presents a la seva superfície (Sutmuller et al., 2006), receptors estretament lligats amb la immunitat innata. Per altra banda, dades publicades recentment demostren que són les cèl·lules CD5^{hi} les més capacitades per respondre a una infecció, tal i com es demostra per un increment en l'expansió clonal així com en la reactivitat davant de citocines inflamatòries (Fulton et al., 2015).

Tot i les teories mencionades, les implicacions funcionals de la unió de CD5/CD6 a PAMPs i com aquesta interacció modula la resposta immunitària davant infeccions esta encara per resoldre. Aquest ha estat, precisament, l'últim punt que s'ha treballat en aquesta tesis.

Tal i com es va avaluar la rellevància de CD6 en processos infecciosos mitjançant una infecció polimicrobiana en ratolins CD6^{-/-}, també es va avaluar CD5 i la seva interacció amb β -glucans gràcies a ratolins CD5^{-/-} obtinguts per gentilesa del Dr. Raman (Universitat d'Alabama, Birmingham, EEUU) (Tarakhovsky et al., 1994). En aquests ratolins es va avaluar un model de sèpsi induïda per un compost ric en β -glucans, el zymosan. No obstant, i a diferència de CD6, el model de ZIGI (*zymosan induced generalized inflammation*) demostra que no hi ha

diferències en la supervivència, els paràmetres clínics o la pèrdua de pes entre ratolins CD5^{+/-} i CD5^{-/-} durant un xoc *septic-like* induït per zymosan.

És possible que el model estudiat sigui tan agut que les interaccions CD5- β -glucans no tinguin temps a actuar, o bé que realment no siguin tan rellevants en aquest procés com podria esperar-se. De tota manera, com s'ha mencionat prèviament, el nostre laboratori té dades recents que demostren per primera vegada que un receptor associat a les cèl·lules T com ho és CD5 es troba expressat també en DCs convencionals però no en macròfags o DCs plasmacitoides (Carreras E, dades no presentades). Curiosament, s'ha vist que en el mateix model de ZIGI els ratolins CD5^{-/-} secreten menys IL-12 i IL-10 *in vivo* que els ratolins CD5^{+/-}, el que porta a pensar si en un model d'infecció més llarg es veurien més clarament les conseqüències de l'absència de CD5. En aquest sentit, i com també ja s'ha mencionat, el nostre grup actualment està treballant per posar a punt models d'infecció real de més llarga durada.

Les dades aportades per aquesta tesi en aquest punt demostren que la interacció del CD5 de membrana amb els β -glucans no té un efecte destacable en la sèpsi induïda per derivats fúngics, però que no es pot descartar que tinguin un efecte en models d'infecció de més llarga durada, ja sigui pel seu hipotètic efecte com a PRR sobre la immunitat adaptativa o pel seu efecte com en les DCs.

6. Conclusions

D'acord amb els resultats obtinguts, les conclusions d'aquesta tesi són les següents:

- 1- CD6 actua com a modulador negatiu de la senyal del TCR, establint el llindar d'activació per la selecció i maduració de cèl·lules T al timus
- 2- CD6 és rellevant en la generació de les poblacions CD8⁺T_{CM}, CD4⁺T_{EM} i Treg induïdes
- 3- CD6 atenua la resposta immunitària davant reaccions autoimmunitàries disminuint la reacció proinflamatòria mitjançada per cèl·lules CD4⁺ Th17
- 4- CD6 facilita la resposta antiinfecciosa per mecanismes encara per determinar
- 5- Els ratolins C57BL/6 són més susceptibles al model de xoc sèptic per zymosan, el qual no els converteix en una bona soca per a estudiar un model d'infecció fúngica
- 6- La sensibilitat al model de xoc sèptic induït per zymosan per part dels ratolins C57BL/6 es causada per una menor secreció d'IFN- γ
- 7- La teràpia combinada de IFN- γ i rshCD5 és efectiva en ratolins C57BL/6 davant el model de xoc sèptic per zymosan
- 8- La interacció de CD5 de membrana amb els β -glucans no afecta significativament la supervivència ni la clínica en un model de xoc sèptic induït per zymosan

7. Referències

- Alberola-Ila, J., L. Places, D.A. Cantrell, J. Vives, and F. Lozano. 1992. Intracellular events involved in CD5-induced human T cell activation and proliferation. *J. Immunol.* 148:1287–93.
- Van Amersfoort, E.S., T.J.C. Van Berkel, and J. Kuiper. 2003. Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. *Clin. Microbiol. Rev.* 16:379–414.
- Arens, R., and S.P. Schoenberger. 2010. Plasticity in programming of effector and memory CD8 T-cell formation. *Immunol. Rev.* 235:190–205. doi:10.1111/j.0105-2896.2010.00899.x.
- Arman, M., N. Aguilera-Montilla, V. Mas, A. Puig-Kröger, M. Pignatelli, R. Guigó, A.-L. Corbí, and F. Lozano. 2009. The human CD6 gene is transcriptionally regulated by RUNX and Ets transcription factors in T cells. *Mol. Immunol.* 46:2226–35. doi:10.1016/j.molimm.2009.04.018.
- Aulí, M., A. Domènech, A. Andrés, M. Orta, M. Salvà, J. Descotes, and N. Prats. 2012. Multiparametric immunotoxicity screening in mice during early drug development. *Toxicol. Lett.* 214:200–208.
- Axtell, R.C., M.S. Webb, S.R. Barnum, and C. Raman. 2004. Cutting edge: critical role for CD5 in experimental autoimmune encephalomyelitis: inhibition of engagement reverses disease in mice. *J. Immunol.* 173:2928–32.
- Axtell, R.C., L. Xu, S.R. Barnum, and C. Raman. 2006. CD5-CK2 binding/activation-deficient mice are resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis: protection is associated with diminished populations of IL-17-expressing T cells in the central nervous system. *J. Immunol.* 177:8542–9.
- Azzam, H.S., J.B. DeJarnette, K. Huang, R. Emmons, C.S. Park, C.L. Sommers, D. El-Khoury, E.W. Shores, and P.E. Love. 2001. Fine tuning of TCR signaling by CD5. *J. Immunol.* 166:5464–72.
- Azzam, H.S., A. Grinberg, K. Lui, H. Shen, E.W. Shores, and P.E. Love. 1998. CD5 expression is developmentally regulated by T cell receptor (TCR) signals and TCR avidity. *J. Exp. Med.* 188:2301–11.
- Balish, E., R.D. Wagner, A. Vázquez-Torres, C. Pierson, and T. Warner. 1998. Candidiasis in interferon-gamma knockout (IFN-gamma^{-/-}) mice. *J. Infect. Dis.* 178:478–87.
- Bamberger, M., A.M. Santos, C.M. Gonçalves, M.I. Oliveira, J.R. James, A. Moreira, F. Lozano, S.J. Davis, and A.M. Carmo. 2011. A new pathway of CD5 glycoprotein-mediated T cell inhibition dependent on inhibitory phosphorylation of Fyn kinase. *J. Biol. Chem.* 286:30324–36. doi:10.1074/jbc.M111.230102.
- Barry, M., and R.C. Bleackley. 2002. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat. Rev. Immunol.* 2:401–9. doi:10.1038/nri819.
- Bauch, A., K.S. Campbell, and M. Reth. 1998. Interaction of the CD5 cytoplasmic domain with the Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase IIdelta. *Eur. J. Immunol.* 28:2167–77.
- Bennett, C.L., J. Christie, F. Ramsdell, M.E. Brunkow, P.J. Ferguson, L. Whitesell, T.E. Kelly, F.T. Saulsbury, P.F. Chance, and H.D. Ochs. 2001. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat. Genet.* 27:20–1. doi:10.1038/83713.
- Berland, R., and H.H. Wortis. 2002. Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5. *Annu. Rev. Immunol.* 20:253–300. doi:10.1146/annurev.immunol.20.100301.064833.
- Biancone, L., M.A. Bowen, A. Lim, A. Aruffo, G. Andres, and I. Stamenkovic. 1996. Identification of a novel inducible cell-surface ligand of CD5 on activated lymphocytes. *J. Exp. Med.* 184:811–9.
- Bikah, G., J. Carey, J.R. Ciallella, A. Tarakhovsky, and S. Bondada. 1996. CD5-mediated negative regulation of antigen receptor-induced growth signals in B-1 B cells. *Science.* 274:1906–9.
- Bikah, G., F.M. Lynd, A.A. Aruffo, J.A. Ledbetter, and S. Bondada. 1998. A role for CD5 in cognate interactions between T cells and B cells, and identification of a novel ligand for CD5. *Int. Immunol.* 10:1185–96.
- Bonet, L., M. Farnós, M. Martínez-Florensa, V.G. Martínez, and F. Lozano. 2013. Identification of functionally relevant phosphorylatable serine clusters in the cytoplasmic region of the human CD6 lymphocyte surface receptor. *FEBS Lett.* 587:2205–13. doi:10.1016/j.febslet.2013.05.043.
- Bougnoux, M.-E., G. Kac, P. Aegerter, C. d'Enfert, and J.-Y. Fagon. 2008. Candidemia and candiduria in critically ill patients admitted to intensive care units in France: incidence, molecular diversity, management and outcome. *Intensive Care Med.* 34:292–9. doi:10.1007/s00134-007-0865-y.
- Bovenschen, H.J., P.C. van de Kerkhof, P.E. van Erp, R. Woestenenk, I. Joosten, and H.J.P.M. Koenen. 2011. Foxp3⁺ regulatory T cells of psoriasis patients easily differentiate into IL-17A-producing cells and are found in lesional skin. *J. Invest. Dermatol.* 131:1853–60. doi:10.1038/jid.2011.139.
- Bowen, M.A., D.D. Patel, X. Li, B. Modrell, A.R. Malacko, W.C. Wang, H. Marquardt, M. Neubauer, J.M. Pesando, and U. Francke. 1995. Cloning, mapping, and characterization of activated leukocyte-cell adhesion molecule (ALCAM), a CD6 ligand. *J. Exp. Med.* 181:2213–20.
- Bowen, M.A., G.S. Whitney, M. Neubauer, G.C. Starling, D. Palmer, J. Zhang, N.J. Nowak, T.B. Shows, and A. Aruffo. 1997. Structure and chromosomal location of the human CD6 gene: detection of five human CD6 isoforms. *J. Immunol.* 158:1149–1156.
- Bozza, S., K. Perruccio, C. Montagnoli, R. Gaziano, S. Bellocchio, E. Burchielli, G. Nkwanyuo, L. Pitzurra, A. Velardi, and L. Romani. 2003. A dendritic cell vaccine against invasive aspergillosis in allogeneic hematopoietic transplantation. *Blood.* 102:3807–14.

- doi:10.1182/blood-2003-03-0748.
- Braun, M., B. Müller, D. ter Meer, S. Raffegerst, B. Simm, S. Wilde, S. Spranger, J. Ellwart, B. Mosetter, L. Umansky, T. Lerchl, D.J. Schendel, and C.S. Falk. 2011. The CD6 scavenger receptor is differentially expressed on a CD56 natural killer cell subpopulation and contributes to natural killer-derived cytokine and chemokine secretion. *J. Innate Immun.* 3:420–34. doi:10.1159/000322720.
- Brossard, C., M. Semichon, A. Trautmann, and G. Bismuth. 2003. CD5 inhibits signaling at the immunological synapse without impairing its formation. *J. Immunol.* 170:4623–9.
- Brown, G.D., P.R. Taylor, D.M. Reid, J.A. Willment, D.L. Williams, L. Martinez-Pomares, S.Y.C. Wong, and S. Gordon. 2002. Dectin-1 is a major beta-glucan receptor on macrophages. *J. Exp. Med.* 196:407–12.
- Brown, M.H., and E. Lacey. 2010. A ligand for CD5 is CD5. *J. Immunol.* 185:6068–74. doi:10.4049/jimmunol.0903823.
- Brown, M.S., and J.L. Goldstein. 1979. Receptor-mediated endocytosis: insights from the lipoprotein receptor system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76:3330–7.
- Brown, M.S., J.L. Goldstein, M. Krieger, Y.K. Ho, and R.G. Anderson. 1979. Reversible accumulation of cholesteryl esters in macrophages incubated with acetylated lipoproteins. *J. Cell Biol.* 82:597–613.
- Calvo, J., L. Places, G. Espinosa, O. Padilla, J.M. Vilà, N. Villamor, M. Ingelmo, T. Gallart, J. Vives, J. Font, and F. Lozano. 1999. Identification of a natural soluble form of human CD5. *Tissue Antigens.* 54:128–37.
- Calvo, J., J.M. Vildà, L. Places, M. Simarro, O. Padilla, D. Andreu, K.S. Campbell, C. Aussel, and F. Lozano. 1998. Human CD5 signaling and constitutive phosphorylation of C-terminal serine residues by casein kinase II. *J. Immunol.* 161:6022–9.
- Canton, J., D. Neculai, and S. Grinstein. 2013. Scavenger receptors in homeostasis and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 13:621–34. doi:10.1038/nri3515.
- Caridade, M., L. Graca, and R.M. Ribeiro. 2013. Mechanisms Underlying CD4+ Treg Immune Regulation in the Adult: From Experiments to Models. *Front. Immunol.* 4:378. doi:10.3389/fimmu.2013.00378.
- Carmo, A.M., M.A. Castro, and F.A. Arosa. 1999. CD2 and CD3 associate independently with CD5 and differentially regulate signaling through CD5 in Jurkat T cells. *J. Immunol.* 163:4238–45.
- Carnero-Montoro, E., L. Bonet, J. Engelken, T. Bielig, M. Martínez-Florensa, F. Lozano, and E. Bosch. 2012. Evolutionary and functional evidence for positive selection at the human CD5 immune receptor gene. *Mol. Biol. Evol.* 29:811–23. doi:10.1093/molbev/msr251.
- Castro, M.A.A., R.J. Nunes, M.I. Oliveira, P.A. Tavares, C. Simões, J.R. Parnes, A. Moreira, and A.M. Carmo. 2003. OX52 is the rat homologue of CD6: evidence for an effector function in the regulation of CD5 phosphorylation. *J. Leukoc. Biol.* 73:183–90.
- Castro, M.A.A., M.I. Oliveira, R.J. Nunes, S. Fabre, R. Barbosa, A. Peixoto, M.H. Brown, J.R. Parnes, G. Bismuth, A. Moreira, B. Rocha, and A.M. Carmo. 2007. Extracellular isoforms of CD6 generated by alternative splicing regulate targeting of CD6 to the immunological synapse. *J. Immunol.* 178:4351–61.
- Cayrol, R., K. Wosik, J.L. Berard, A. Dodelet-Devillers, I. Ifergan, H. Kebir, A.S. Haqqani, K. Kreymborg, S. Krug, R. Moumdjian, A. Bouthillier, B. Becher, N. Arbour, S. David, D. Stanimirovic, and A. Prat. 2008. Activated leukocyte cell adhesion molecule promotes leukocyte trafficking into the central nervous system. *Nat. Immunol.* 9:137–45. doi:10.1038/ni1551.
- Cenit, M.C., M. Martínez-Florensa, M. Consuegra, L. Bonet, E. Carnero-Montoro, N. Armiger, M. Caballero-Baños, M.T. Arias, D. Benitez, N. Ortego-Centeno, E. de Ramón, J.M. Sabio, F.J. García-Hernández, C. Tolosa, A. Suárez, M.A. González-Gay, E. Bosch, J. Martín, and F. Lozano. 2014. Analysis of Ancestral and Functionally Relevant CD5 Variants in Systemic Lupus Erythematosus Patients. *PLoS One.* 9:e113090. doi:10.1371/journal.pone.0113090.
- Ceuppens, J.L., and M.L. Baroja. 1986. Monoclonal antibodies to the CD5 antigen can provide the necessary second signal for activation of isolated resting T cells by solid-phase-bound OKT3. *J. Immunol.* 137:1816–21.
- Chang, J.T., E.J. Wherry, and A.W. Goldrath. 2014. Molecular regulation of effector and memory T cell differentiation. *Nat. Immunol.* 15:1104–1115. doi:10.1038/ni.3031.
- Chappell, P.E., L.I. Garner, J. Yan, C. Metcalfe, D. Hatherley, S. Johnson, C. V Robinson, S.M. Lea, and M.H. Brown. 2015. Structures of CD6 and Its Ligand CD166 Give Insight into Their Interaction. *Structure.* doi:10.1016/j.str.2015.05.019.
- Chen, L., and D.B. Flies. 2013. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat. Rev. Immunol.* 13:227–42. doi:10.1038/nri3405.
- Chopra, A., S. Chandrashekar, R. Iyer, L. Rajasekhar, N. Shetty, S.M. Veeravalli, A. Ghosh, M. Merchant, J. Oak, V. Londhey, A. Barve, M.S. Ramakrishnan, and E. Montero. 2015. Itolizumab in combination with methotrexate modulates active rheumatoid arthritis: safety and efficacy from a phase 2, randomized, open-label, parallel-group, dose-ranging study. *Clin. Rheumatol.* doi:10.1007/s10067-015-2988-9.
- Chow, A., D. Lucas, A. Hidalgo, S. Méndez-Ferrer, D. Hashimoto, C. Scheiermann, M. Battista, M. Leboeuf, C. Prophete, N. van Rooijen, M. Tanaka, M. Merad, and P.S. Frenette. 2011. Bone marrow CD169+ macrophages promote the retention of hematopoietic stem and progenitor cells in the mesenchymal stem cell niche. *J. Exp. Med.* 208:261–71. doi:10.1084/jem.20101688.
- Clarke, S.R., M. Barnden, C. Kurts, F.R. Carbone, J.F. Miller, and W.R. Heath. 2000. Characterization of the ovalbumin-specific TCR transgenic line OT-I: MHC elements for positive and negative

- selection. *Immunol. Cell Biol.* 78:110–7. doi:10.1046/j.1440-1711.2000.00889.x.
- Cobbold, S.P., R. Castejon, E. Adams, D. Zelenika, L. Graca, S. Humm, and H. Waldmann. 2004. Induction of foxP3+ regulatory T cells in the periphery of T cell receptor transgenic mice tolerized to transplants. *J. Immunol.* 172:6003–10.
- Consuegra-Fernandez, M., F. Aranda, I. Simoes, M. Orta, A. Sarukhan, and F. Lozano. 2015. CD5 as a Target for Immune-Based Therapies. *Crit. Rev. Immunol.* 35:85–115.
- Cortés, F., F. Deschaseaux, N. Uchida, M.C. Labastie, A.M. Frieria, D. He, P. Charbord, and B. Péault. 1999. HCA, an immunoglobulin-like adhesion molecule present on the earliest human hematopoietic precursor cells, is also expressed by stromal cells in blood-forming tissues. *Blood.* 93:826–37.
- Cron, R.Q., A. Ezquerro, J.E. Coligan, B.A. Houlden, J.A. Bluestone, and W.L. Maloy. 1989. Identification of distinct T cell receptor (TCR)-gamma delta heterodimers using an anti-TCR-gamma variable region serum. *J. Immunol.* 143:3769–75.
- Crotty, S. 2011. Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu. Rev. Immunol.* 29:621–63. doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101400.
- Crotty, S. 2015. A brief history of T cell help to B cells. *Nat. Rev. Immunol.* 15:185–189. doi:10.1038/nri3803.
- Czabotar, P.E., G. Lessene, A. Strasser, and J.M. Adams. 2014. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15:49–63. doi:10.1038/nrm3722.
- Le Dantec, C., R. Alonso, T. Fali, E. Montero, V. Devauchelle, A. Saroux, J.-O. Pers, and Y. Renaudineau. 2013. Rationale for treating primary Sjögren's syndrome patients with an anti-CD6 monoclonal antibody (Itolizumab). *Immunol. Res.* 56:341–347. doi:10.1007/s12026-013-8423-x.
- Dasu, T., J.E. Qualls, H. Tuna, C. Raman, D.A. Cohen, and S. Bondada. 2008. CD5 plays an inhibitory role in the suppressive function of murine CD4(+) CD25(+) T(reg) cells. *Immunol. Lett.* 119:103–13. doi:10.1016/j.imlet.2008.05.008.
- Dauphinée, M., Z. Tovar, and N. Talal. 1988. B cells expressing CD5 are increased in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 31:642–7.
- Delsing, C.E., M.S. Gresnigt, J. Leentjens, F. Preijers, F.A. Frager, M. Kox, G. Monneret, F. Venet, C.P. Bleeker-Rovers, F.L. van de Veerdonk, P. Pickkers, A. Pachot, B.J. Kullberg, and M.G. Netea. 2014. Interferon-gamma as adjunctive immunotherapy for invasive fungal infections: a case series. *BMC Infect. Dis.* 14:166. doi:10.1186/1471-2334-14-166.
- Dennehy, K.M., R. Broszeit, W.F. Ferris, and A.D. Beyers. 1998. Thymocyte activation induces the association of the proto-oncoprotein c-cbl and ras GTPase-activating protein with CD5. *Eur. J. Immunol.* 28:1617–25. doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199805)28:05<1617::AID-IMMU1617>3.0.CO;2-7.
- Dennehy, K.M., R. Broszeit, D. Garnett, G.A. Durrheim, L.L. Spruyt, and A.D. Beyers. 1997. Thymocyte activation induces the association of phosphatidylinositol 3-kinase and pp120 with CD5. *Eur. J. Immunol.* 27:679–86. doi:10.1002/eji.1830270316.
- Dorothee, G., I. Vergnon, F. El Hage, B. Le Maux Chansac, V. Ferrand, Y. Lécluse, P. Opolon, S. Chouaib, G. Bismuth, and F. Mami-Chouaib. 2005. In situ sensory adaptation of tumor-infiltrating T lymphocytes to peptide-MHC levels elicits strong antitumor reactivity. *J. Immunol.* 174:6888–97.
- Ebert, P.J.R., L.I.R. Ehrlich, and M.M. Davis. 2008. Low ligand requirement for deletion and lack of synapses in positive selection enforce the gauntlet of thymic T cell maturation. *Immunity.* 29:734–45. doi:10.1016/j.immuni.2008.09.014.
- Ehrenstein, M.R., J.G. Evans, A. Singh, S. Moore, G. Warnes, D.A. Isenberg, and C. Mauri. 2004. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy. *J. Exp. Med.* 200:277–85. doi:10.1084/jem.20040165.
- El-Omar, E.M., M.T. Ng, and G.L. Hold. 2008. Polymorphisms in Toll-like receptor genes and risk of cancer. *Oncogene.* 27:244–52. doi:10.1038/sj.onc.1210912.
- Escoda-Ferran, C., E. Carrasco, M. Caballero-Baños, C. Miró-Julià, M. Martínez-Florensa, M. Consuegra-Fernández, V.G. Martínez, F.-T. Liu, and F. Lozano. 2014. Modulation of CD6 function through interaction with Galectin-1 and -3. *FEBS Lett.* 588:2805–13. doi:10.1016/j.febslet.2014.05.064.
- Fenutría, R., V.G. Martinez, I. Simões, J. Postigo, V. Gil, M. Martínez-Florensa, J. Sintes, R. Naves, K.S. Cashman, J. Alberola-Illa, M. Ramos-Casals, G. Soldevila, C. Raman, J. Merino, R. Merino, P. Engel, and F. Lozano. 2014. Transgenic expression of soluble human CD5 enhances experimentally-induced autoimmune and anti-tumoral immune responses. *PLoS One.* 9:e84895. doi:10.1371/journal.pone.0084895.
- Ferwerda, G., F. Meyer-Wentrup, B.-J. Kullberg, M.G. Netea, and G.J. Adema. 2008. Dectin-1 synergizes with TLR2 and TLR4 for cytokine production in human primary monocytes and macrophages. *Cell. Microbiol.* 10:2058–2066. doi:10.1111/j.1462-5822.2008.01188.x.
- Ford, M.L., A.B. Adams, and T.C. Pearson. 2014. Targeting co-stimulatory pathways: transplantation and autoimmunity. *Nat. Rev. Nephrol.* 10:14–24. doi:10.1038/nrneph.2013.183.
- Friedlein, G., F. El Hage, I. Vergnon, C. Richon, P. Saulnier, Y. Lécluse, A. Caignard, L. Boumsell, G. Bismuth, S. Chouaib, and F. Mami-Chouaib. 2007. Human CD5 protects circulating tumor antigen-specific CTL from tumor-mediated activation-induced cell death. *J. Immunol.* 178:6821–7.
- Fulton, R.B., S.E. Hamilton, Y. Xing, J.A. Best, A.W. Goldrath, K.A. Hogquist, and S.C. Jameson. 2014. The TCR's sensitivity to self peptide-MHC dictates the ability of naive CD8+ T cells to respond to foreign antigens. *Nat. Immunol.*

- doi:10.1038/ni.3043.
- Fulton, R.B., S.E. Hamilton, Y. Xing, J.A. Best, A.W. Goldrath, K.A. Hogquist, and S.C. Jameson. 2015. The TCR's sensitivity to self peptide-MHC dictates the ability of naive CD8(+) T cells to respond to foreign antigens. *Nat. Immunol.* 16:107–17. doi:10.1038/ni.3043.
- Gabrilovich, D.I., and S. Nagaraj. 2009. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 9:162–74. doi:10.1038/nri2506.
- Gallo, V., G. Giardino, D. Capalbo, L. Palamaro, R. Romano, F. Santamaria, F. Maio, M. Salerno, P. Vajro, and C. Pignata. 2013. Alterations of the autoimmune regulator transcription factor and failure of central tolerance: APECED as a model. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 9:43–51. doi:10.1586/eci.12.88.
- Gantner, B.N., R.M. Simmons, S.J. Canavera, S. Akira, and D.M. Underhill. 2003. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J. Exp. Med.* 197:1107–17. doi:10.1084/jem.20021787.
- Garcia Santana, C.A., J.W. Tung, and S. Gulnik. 2014. Human treg cells are characterized by low/negative CD6 expression. *Cytometry. A.* 85:901–8. doi:10.1002/cyto.a.22513.
- Gary-Gouy, H., P. Bruhns, C. Schmitt, A. Dalloul, M. Daéron, and G. Bismuth. 2000. The pseudo-immunoreceptor tyrosine-based activation motif of CD5 mediates its inhibitory action on B-cell receptor signaling. *J. Biol. Chem.* 275:548–56.
- Gary-Gouy, H., J. Harriague, G. Bismuth, C. Platzer, C. Schmitt, and A.H. Dalloul. 2002. Human CD5 promotes B-cell survival through stimulation of autocrine IL-10 production. *Blood.* 100:4537–43. doi:10.1182/blood-2002-05-1525.
- Gary-Gouy, H., A. Sainz-Perez, J.-B. Marteau, A. Marfaing-Koka, J. Delic, H. Merle-Beral, P. Galanaud, and A. Dalloul. 2007. Natural phosphorylation of CD5 in chronic lymphocytic leukemia B cells and analysis of CD5-regulated genes in a B cell line suggest a role for CD5 in malignant phenotype. *J. Immunol.* 179:4335–44.
- Geerman, S., S. Hickson, G. Brassier, M.F. Pascutti, and M.A. Nothe. 2015. Quantitative and Qualitative Analysis of Bone Marrow CD8(+) T Cells from Different Bones Uncovers a Major Contribution of the Bone Marrow in the Vertebrae. *Front. Immunol.* 6:660. doi:10.3389/fimmu.2015.00660.
- Geijtenbeek, T.B.H., and S.I. Gringhuis. 2009. Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 9:465–79. doi:10.1038/nri2569.
- Genovese, T., R. Di Paola, P. Catalano, J.-H. Li, W. Xu, E. Massuda, A.P. Caputi, J. Zhang, and S. Cuzzocrea. 2004. Treatment with a novel poly(ADP-ribose) glycohydrolase inhibitor reduces development of septic shock-like syndrome induced by zymosan in mice. *Crit. Care Med.* 32:1365–74.
- Germain, R.N. 2002. T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat. Rev. Immunol.* 2:309–22. doi:10.1038/nri798.
- Gimferrer, I., M. Calvo, M. Mittelbrunn, M. Farnos, M.R. Sarrías, C. Enrich, J. Vives, F. Sanchez-Madrid, and F. Lozano. 2004. Relevance of CD6-mediated interactions in T cell activation and proliferation. *J. Immunol.* 173:2262–2270.
- Gimferrer, I., M. Farnos, M. Calvo, M. Mittelbrunn, C. Enrich, F. Sanchez-Madrid, J. Vives, and F. Lozano. 2002. The accessory molecules CD5 and CD6 associate on the membrane of T lymphoid cells. *J. Biol. Chem.* M209591200. doi:10.1074/jbc.M209591200.
- Gimferrer, I., A. Ibáñez, M. Farnós, M.-R. Sarrías, R. Fenutría, S. Roselló, P. Zimmermann, G. David, J. Vives, C. Serra-Pagès, and F. Lozano. 2005. The lymphocyte receptor CD6 interacts with syntenin-1, a scaffolding protein containing PDZ domains. *J. Immunol.* 175:1406–14.
- Ginhoux, F., and S. Jung. 2014. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* 14:392–404. doi:10.1038/nri3671.
- Godfrey, D.I., S. Stankovic, and A.G. Baxter. 2010. Raising the NKT cell family. *Nat. Immunol.* 11:197–206. doi:10.1038/ni.1841.
- Gottschalk, R.A., E. Corse, and J.P. Allison. 2010. TCR ligand density and affinity determine peripheral induction of Foxp3 in vivo. *J. Exp. Med.* 207:1701–11. doi:10.1084/jem.20091999.
- Gringhuis, S.I., L.F. de Leij, G.A. Wayman, H. Tokumitsu, and E. Vellenga. 1997. The Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase type IV is involved in the CD5-mediated signaling pathway in human T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 272:31809–20.
- Grosso, J.F., and M.N. Jure-Kunkel. 2013. CTLA-4 blockade in tumor models: an overview of preclinical and translational research. *Cancer Immun.* 13:5.
- Haas, K.M., and D.M. Estes. 2001. The identification and characterization of a ligand for bovine CD5. *J. Immunol.* 166:3158–66.
- Hafler, D.A., R.J. Fallis, D.M. Dawson, S.F. Schlossman, E.L. Reinherz, and H.L. Weiner. 1986. Immunologic responses of progressive multiple sclerosis patients treated with an anti-T-cell monoclonal antibody, anti-T12. *Neurology.* 36:777–84.
- Harwood, N.E., and F.D. Batista. 2010. Early events in B cell activation. *Annu. Rev. Immunol.* 28:185–210. doi:10.1146/annurev-immunol-030409-101216.
- Hassan, N.J., A.N. Barclay, and M.H. Brown. 2004. Frontline: Optimal T cell activation requires the engagement of CD6 and CD166. *Eur. J. Immunol.* 34:930–40. doi:10.1002/eji.200424856.
- Hassan, N.J., S.J. Simmonds, N.G. Clarkson, S. Hanrahan, M.J. Puklavec, M. Bomb, A.N. Barclay, and M.H. Brown. 2006. CD6 regulates T-cell responses through activation-dependent recruitment of the positive regulator SLP-76. *Mol. Cell. Biol.* 26:6727–38. doi:10.1128/MCB.00688-06.
- Hawiger, D., R.F. Masilamani, E. Bettelli, V.K. Kuchroo, and M.C. Nussenzweig. 2004. Immunological unresponsiveness characterized

- by increased expression of CD5 on peripheral T cells induced by dendritic cells in vivo. *Immunity*. 20:695–705. doi:10.1016/j.immuni.2004.05.002.
- Henderson, J.G., A. Opejin, A. Jones, C. Gross, and D. Hawiger. 2015. CD5 Instructs Extrathymic Regulatory T Cell Development in Response to Self and Tolerizing Antigens. *Immunity*. 42:471–483. doi:10.1016/j.immuni.2015.02.010.
- Henson, P.M., and D.A. Hume. 2006. Apoptotic cell removal in development and tissue homeostasis. *Trends Immunol.* 27:244–50. doi:10.1016/j.it.2006.03.005.
- von Herrath, M.G., and L.C. Harrison. 2003. Antigen-induced regulatory T cells in autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.* 3:223–32. doi:10.1038/nri1029.
- Hogquist, K.A., T.A. Baldwin, and S.C. Jameson. 2005. Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nat Rev Immunol.* 5:772–782.
- Hogquist, K.A., and S.C. Jameson. 2014. The self-obsession of T cells: how TCR signaling thresholds affect fate “decisions” and effector function. *Nat. Immunol.* 15:815–23. doi:10.1038/ni.2938.
- Hollander, N., E. Pillemer, and I.L. Weissman. 1981. Effects of Lyt antibodies on T-cell functions: augmentation by anti-Lyt-1 as opHollander, N., Pillemer, E., & Weissman, I. L. (1981). Effects of Lyt antibodies on T-cell functions: augmentation by anti-Lyt-1 as opposed to inhibition by anti-Lyt-2. *Proceed. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78:1148–51.
- Hotchkiss, R.S., G. Monneret, and D. Payen. 2013. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* 13:862–74. doi:10.1038/nri3552.
- Hsieh, C.-S., H.-M. Lee, and C.-W.J. Lio. 2012. Selection of regulatory T cells in the thymus. *Nat Rev Immunol.* 12:157–167.
- Huppa, J.B., and M.M. Davis. 2003. T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nat. Rev. Immunol.* 3:973–83. doi:10.1038/nri1245.
- Ibanez, A., M.R. Sarrías, M. Farnos, I. Gimferrer, C. Serra-Pages, J. Vives, and F. Lozano. 2006. Mitogen-activated protein kinase pathway activation by the CD6 lymphocyte surface receptor. *J Immunol.* 177:1152–1159.
- Imboden, J.B., C.H. June, M.A. McCutcheon, and J.A. Ledbetter. 1990. Stimulation of CD5 enhances signal transduction by the T cell antigen receptor. *J. Clin. Invest.* 85:130–4. doi:10.1172/JCI114402.
- Iwatani, Y., N. Amino, T. Kaneda, K. Ichihara, H. Tamaki, J. Tachi, F. Matsuzuka, S. Fukata, K. Kuma, and K. Miyai. 1989. Marked increase of CD5 + B cells in hyperthyroid Graves' disease. *Clin. Exp. Immunol.* 78:196–200.
- Izquierdo Cano, L.M., E.E. Espinosa Estrada, C. Hernández Padrón, L.G. Ramón Rodríguez, O.M. Ávila Cabrera, P. Hernández Ramírez, J.E. Montero Casimiro, and P. Hernández Casaña. 2014. Itolizumab humanized monoclonal antibody (anti-cd6) in patients with cd6+ lymphoproliferative disorders. Preliminary experience. *Rev. Cuba. Hematol Immunol y Hemoter.* 30:257–264.
- De Jager, P.L., X. Jia, J. Wang, P.I. de Bakker, L. Ottoboni, N.T. Aggarwal, L. Piccio, S. Raychaudhuri, D. Tran, C. Aubin, R. Briskin, S. Romano, S.E. Baranzini, J.L. McCauley, M.A. Pericak-Vance, J.L. Haines, R.A. Gibson, Y. Naeglin, B. Uitdehaag, P.M. Matthews, L. Kappos, C. Polman, W.L. McArdle, D.P. Strachan, D. Evans, A.H. Cross, M.J. Daly, A. Compston, S.J. Sawcer, H.L. Weiner, S.L. Hauser, D.A. Hafler, and J.R. Oksenberg. 2009. Meta-analysis of genome scans and replication identify CD6, IRF8 and TNFRSF1A as new multiple sclerosis susceptibility loci. *Nat Genet.* 41:776–782. doi:10.1038/ng.401.
- Jameson, S.C. 2002. Maintaining the norm: T-cell homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* 2:547–56. doi:10.1038/nri853.
- Jameson, S.C., Y.J. Lee, and K.A. Hogquist. 2015. Innate memory T cells. *Adv. Immunol.* 126:173–213. doi:10.1016/bs.ai.2014.12.001.
- June, C.H., P.S. Rabinovitch, and J.A. Ledbetter. 1987. CD5 antibodies increase intracellular ionized calcium concentration in T cells. *J Immunol.* 138:2782–2792.
- Kamoun, M., M.E. Kadin, P.J. Martin, J. Nettleton, and J.A. Hansen. 1981. A novel human T cell antigen preferentially expressed on mature T cells and shared by both well and poorly differentiated B cell leukemias and lymphomas. *J. Immunol.* 127:987–91.
- Kassiotis, G., R. Zamoyska, and B. Stockinger. 2003. Involvement of avidity for major histocompatibility complex in homeostasis of naive and memory T cells. *J. Exp. Med.* 197:1007–16. doi:10.1084/jem.20021812.
- Kieper, W.C., J.T. Burghardt, and C.D. Surh. 2004. A role for TCR affinity in regulating naive T cell homeostasis. *J. Immunol.* 172:40–4.
- Kimura, M.Y., L.A. Pobezinsky, T.I. Guintier, J. Thomas, A. Adams, J.-H. Park, X. Tai, and A. Singer. 2012. IL-7 signaling must be intermittent, not continuous, during CD8+ T cell homeostasis to promote cell survival instead of cell death. *Nat. Immunol.* 14:143–151. doi:10.1038/ni.2494.
- Klein, L., M. Hinterberger, G. Wirnsberger, and B. Kyewski. 2009. Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat Rev Immunol.* 9:833–844.
- Kobarg, J., G.S. Whitney, D. Palmer, A. Aruffo, and M.A. Bowen. 1997. Analysis of the tyrosine phosphorylation and calcium fluxing of human CD6 isoforms with different cytoplasmic domains. *Eur. J. Immunol.* 27:2971–80. doi:10.1002/eji.1830271133.
- Kofler, D.M., C.A. Severson, N. Mousissian, P.L. De Jager, and D.A. Hafler. 2011. The CD6 multiple sclerosis susceptibility allele is associated with alterations in CD4+ T cell proliferation. *J Immunol.* 187:3286–3291. doi:10.4049/jimmunol.1100626.
- Kolaczowska, E., and P. Kubes. 2013. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 13:159–75.

- doi:10.1038/nri3399.
- Konno, A., J.-S. Ahn, H. Kitamura, M.J. Hamilton, J.A. Gebe, A. Aruffo, and W.C. Davis. 2001. Tissue distribution of CD6 and CD6 ligand in cattle: expression of the CD6 ligand (CD166) in the autonomic nervous system of cattle and the human. *J. Leukoc. Biol.* 69:944–950.
- Kriengkaykiat, J., J.I. Ito, and S.S. Dadwal. 2011. Epidemiology and treatment approaches in management of invasive fungal infections. *Clin. Epidemiol.* 3:175–91. doi:10.2147/CLEP.S12502.
- Krintel, S.B., L. Essioux, A. Wool, J.S. Johansen, E. Schreiber, T. Zekharya, P. Akiva, M. Ostergaard, and M.L. Hetland. 2012. CD6 and syntaxin binding protein 6 variants and response to tumor necrosis factor alpha inhibitors in Danish patients with rheumatoid arthritis. *PLoS One.* 7:e38539. doi:10.1371/journal.pone.0038539.
- Krupashankar, D.S., S. Dogra, M. Kura, A. Saraswat, L. Budamakuntla, T.K. Sumathy, R. Shah, M.G. Gopal, T. Narayana Rao, C.R. Srinivas, R. Bhat, N. Shetty, G. Manmohan, K. Sai Krishna, D. Padmaja, D.V.S. Pratap, V. Garg, S. Gupta, N. Pandey, U. Khopkar, E. Montero, M.S. Ramakrishnan, P. Nair, and P.C. Ganapathi. 2014. Efficacy and safety of itolizumab, a novel anti-CD6 monoclonal antibody, in patients with moderate to severe chronic plaque psoriasis: results of a double-blind, randomized, placebo-controlled, phase-III study. *J. Am. Acad. Dermatol.* 71:484–92. doi:10.1016/j.jaad.2014.01.897.
- Kullberg, B.J., J.W. van 't Wout, C. Hoogstraten, and R. van Furth. 1993. Recombinant interferon-gamma enhances resistance to acute disseminated *Candida albicans* infection in mice. *J. Infect. Dis.* 168:436–43.
- Kumar, H., T. Kawai, and S. Akira. 2011. Pathogen Recognition by the Innate Immune System. *Int. Rev. Immunol.*
- Lanzavecchia, A., and F. Sallusto. 2005. Understanding the generation and function of memory T cell subsets. *Curr. Opin. Immunol.* 17:326–32. doi:10.1016/j.coi.2005.04.010.
- Lazzaro, B.P. 2005. Elevated polymorphism and divergence in the class C scavenger receptors of *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*. *Genetics.* 169:2023–34. doi:10.1534/genetics.104.034249.
- Lecomte, O., J.B. Bock, B.W. Birren, D. Vollrath, and J.R. Parnes. 1996. Molecular linkage of the mouse CD5 and CD6 genes. *Immunogenetics.* 44:385–90.
- Ledbetter, J.A., R. V Rouse, H.S. Micklem, and L.A. Herzenberg. 1980. T cell subsets defined by expression of Lyt-1,2,3 and Thy-1 antigens. Two-parameter immunofluorescence and cytotoxicity analysis with monoclonal antibodies modifies current views. *J. Exp. Med.* 152:280–95.
- Lemaitre, B., E. Nicolas, L. Michaut, J.M. Reichhart, and J.A. Hoffmann. 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette spätzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell.* 86:973–83.
- Lenz, L.L. 2009. CD5 sweetens lymphocyte responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106:1303–4. doi:10.1073/pnas.0812579106.
- Long, S.A., and J.H. Buckner. 2011. CD4+FOXP3+ T regulatory cells in human autoimmunity: more than a numbers game. *J. Immunol.* 187:2061–6. doi:10.4049/jimmunol.1003224.
- Lozano, F., M. Simarro, J. Calvo, J.M. Vilà, O. Padilla, M.A. Bowen, and K.S. Campbell. 2000. CD5 signal transduction: positive or negative modulation of antigen receptor signaling. *Crit. Rev. Immunol.* 20:347–58.
- Luckheeram, R.V., R. Zhou, A.D. Verma, and B. Xia. 2012. CD4⁺T cells: differentiation and functions. *Clin. Dev. Immunol.* 2012:925135. doi:10.1155/2012/925135.
- Lydyard, P.M., A.P. Jewell, C. Jamin, and P.Y. Youinou. 1999. CD5 B cells and B-cell malignancies. *Curr. Opin. Hematol.* 6:30–6.
- Malissen, M., A. Gillet, L. Ardouin, G. Bouvier, J. Trucy, P. Ferrier, E. Vivier, and B. Malissen. 1995. Altered T cell development in mice with a targeted mutation of the CD3-epsilon gene. *EMBO J.* 14:4641–53.
- Mami-Chouaib, F., K. Franciszkiewicz, C. Raman, and M. Tabbekh. 2010. CD5 knock out mice display a strong antitumor immune response associated with tumor infiltration by hyperactivated tumor-reactive CD8⁺ T lymphocytes. *J. Immunol.* 184:101.21.
- Mandl, J.N., J.P. Monteiro, N. Vrisekoop, and R.N. Germain. 2013. T cell-positive selection uses self-ligand binding strength to optimize repertoire recognition of foreign antigens. *Immunity.* 38:263–74. doi:10.1016/j.immuni.2012.09.011.
- Martin, G.S., D.M. Mannino, S. Eaton, and M. Moss. 2003. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N. Engl. J. Med.* 348:1546–54. doi:10.1056/NEJMoa022139.
- Martínez, V.G., S.K. Moestrup, U. Holmskov, J. Mollenhauer, and F. Lozano. 2011. The conserved scavenger receptor cysteine-rich superfamily in therapy and diagnosis. *Pharmacol. Rev.* 63:967–1000. doi:10.1124/pr.111.004523.
- Martínez-Florensa, M., M. Consuegra-Fernández, V.G. Martínez, O. Cañadas, N. Armiger-Borràs, L. Bonet-Roselló, A. Farrán, J. Vila, C. Casals, and F. Lozano. 2014. Targeting of key pathogenic factors from gram-positive bacteria by the soluble ectodomain of the scavenger-like lymphocyte receptor CD6. *J. Infect. Dis.* 209:1077–86. doi:10.1093/infdis/jit624.
- Marwali, M.R., C.-P. Hu, B. Mohandas, A. Dandapat, P. Deonikar, J. Chen, I. Cawich, T. Sawamura, M. Kavdia, and J.L. Mehta. 2007. Modulation of ADP-induced platelet activation by aspirin and pravastatin: role of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1, nitric oxide, oxidative stress, and inside-out integrin signaling. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 322:1324–32. doi:10.1124/jpet.107.122853.
- Masopust, D., S.M. Kaech, E.J. Wherry, and R. Ahmed. 2004. The role of programming in

- memory T-cell development. *Curr. Opin. Immunol.* 16:217–25. doi:10.1016/j.coi.2004.02.005.
- Matsushita, T., K. Yanaba, J.-D. Bouaziz, M. Fujimoto, and T.F. Tedder. 2008. Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression. *J. Clin. Invest.* 118:3420–30. doi:10.1172/JCI36030.
- Matutes, E., K. Owusu-Ankomah, R. Morilla, J. Garcia Marco, A. Houlihan, T.H. Que, and D. Catovsky. 1994. The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia.* 8:1640–5.
- McDonagh, M., and E.B. Bell. 1995. The survival and turnover of mature and immature CD8 T cells. *Immunology.* 84:514–20.
- McGuire, D.J., A.L. Rowse, H. Li, B.J. Peng, C.M. Sestero, K.S. Cashman, P. De Sarno, and C. Raman. 2014. CD5 enhances Th17-cell differentiation by regulating IFN- γ response and ROR γ t localization. *Eur. J. Immunol.* 44:1137–42. doi:10.1002/eji.201343998.
- McKenzie, I.F., and T. Potter. 1979. Murine lymphocyte surface antigens. *Adv. Immunol.* 27:179–338.
- Mier-Aguilar, C.A., B. Vega-Baray, E. Burgueño-Bucio, F. Lozano, E.A. García-Zepeda, C. Raman, and G. Soldevila. 2015. Functional requirement of tyrosine residue 429 within CD5 cytoplasmic domain for regulation of T cell activation and survival. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* doi:10.1016/j.bbrc.2015.09.033.
- Mills, K.H.G. 2004. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nat. Rev. Immunol.* 4:841–55. doi:10.1038/nri1485.
- Mizoguchi, A., E. Mizoguchi, Y.P. de Jong, H. Takedatsu, F.I. Preffer, C. Terhorst, and A.K. Bhan. 2003. Role of the CD5 molecule on TCR gammadelta T cell-mediated immune functions: development of germinal centers and chronic intestinal inflammation. *Int. Immunol.* 15:97–108.
- Mogensen, T.H. 2009. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin. Microbiol. Rev.* 22:240–73, Table of Contents. doi:10.1128/CMR.00046-08.
- Moran, A.E., K.L. Holzappel, Y. Xing, N.R. Cunningham, J.S. Maltzman, J. Punt, and K.A. Hogquist. 2011. T cell receptor signal strength in Treg and iNKT cell development demonstrated by a novel fluorescent reporter mouse. *J. Exp. Med.* 208:1279–89. doi:10.1084/jem.20110308.
- Morgan, M.E., R.P.M. Suttmuller, H.J. Witteveen, L.M. van Duivenvoorde, E. Zanelli, C.J.M. Melief, A. Srijders, R. Offringa, R.R.P. de Vries, and R.E.M. Toes. 2003. CD25+ cell depletion hastens the onset of severe disease in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 48:1452–60. doi:10.1002/art.11063.
- Morris, G.P., and P.M. Allen. 2012. How the TCR balances sensitivity and specificity for the recognition of self and pathogens. *Nat. Immunol.* 13:121–8. doi:10.1038/ni.2190.
- Mougiakakos, D., A. Choudhury, A. Lladser, R. Kiessling, and C.C. Johansson. 2010. Regulatory T cells in cancer. *Adv. Cancer Res.* 107:57–117. doi:10.1016/S0065-230X(10)07003-X.
- Muñoz, A., T. Gallart, O. Viñas, and R. Gomis. 1991. Increased CD5-positive B lymphocytes in type I diabetes. *Clin. Exp. Immunol.* 83:304–8.
- Murray, P.J., and T.A. Wynn. 2011. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat. Rev. Immunol.* 11:723–37. doi:10.1038/nri3073.
- Nair, P., R. Melarkode, D. Rajkumar, and E. Montero. 2010. CD6 synergistic co-stimulation promoting proinflammatory response is modulated without interfering with the activated leucocyte cell adhesion molecule interaction. *Clin Exp Immunol.* 162:116–130. doi:10.1111/j.1365-2249.2010.04235.x.
- Nathan, C.F., H.W. Murray, M.E. Wiebe, and B.Y. Rubin. 1983. Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J. Exp. Med.* 158:670–89.
- Netea, M.G., L.A.B. Joosten, J.W.M. van der Meer, B.-J. Kullberg, and F.L. van de Veerdonk. 2015. Immune defence against Candida fungal infections. *Nat. Rev. Immunol.* 15:630–642. doi:10.1038/nri3897.
- Netea, M.G., R. Suttmuller, C. Hermann, C.A.A. Van der Graaf, J.W.M. Van der Meer, J.H. van Krieken, T. Hartung, G. Adema, and B.J. Kullberg. 2004. Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells. *J. Immunol.* 172:3712–8.
- Netea, M.G., A.G. Vonk, M. van den Hoven, I. Verschueren, L.A. Joosten, J.H. van Krieken, W.B. van den Berg, J.W.M. Van der Meer, and B.J. Kullberg. 2003. Differential role of IL-18 and IL-12 in the host defense against disseminated *Candida albicans* infection. *Eur. J. Immunol.* 33:3409–17. doi:10.1002/eji.200323737.
- Nutt, S.L., P.D. Hodgkin, D.M. Tarlinton, and L.M. Corcoran. 2015. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat. Rev. Immunol.* 15:160–71. doi:10.1038/nri3795.
- Oliveira, M.I., C.M. Gonçalves, M. Pinto, S. Fabre, A.M. Santos, S.F. Lee, M.A.A. Castro, R.J. Nunes, R.R. Barbosa, J.R. Parnes, C. Yu, S.J. Davis, A. Moreira, G. Bismuth, and A.M. Carmo. 2011. CD6 attenuates early and late signaling events, setting thresholds for T-cell activation. *Eur. J. Immunol.* 42:195–205. doi:10.1002/eji.201040528.
- Ordoñez-Rueda, D., F. Lozano, A. Sarukhan, C. Raman, E.A. Garcia-Zepeda, and G. Soldevila. 2009. Increased numbers of thymic and peripheral CD4+ CD25+Foxp3+ cells in the absence of CD5 signaling. *Eur. J. Immunol.* 39:2233–47. doi:10.1002/eji.200839053.
- Osorio, L.M., C.A. Garcia, M. Jondal, and S.C. Chow. 1994. The Anti-CD6 mAb, IOR-T1, Defined a New Epitope on the Human CD6 Molecule That Induces Greater Responsiveness in T Cell Receptor/CD3-Mediated T Cell Proliferation. *Cell. Immunol.* 154:123–133.
- Osorio, L.M., C. Ordonez, C.A. Garcia, M. Jondal, and

- S.C. Chow. 1995. Evidence for protein tyrosine kinase involvement in CD6-induced T cell proliferation. *Cell Immunol.* 166:44–52. doi:10.1006/cimm.1995.0006.
- Osorio, L.M., M. Rottenberg, M. Jondal, and S.C. Chow. 1998. Simultaneous cross-linking of CD6 and CD28 induces cell proliferation in resting T cells. *Immunology.* 93:358–65.
- Osorio, L.M., A. De Santiago, M. Aguilar-Santelises, H. Mellstedt, and M. Jondal. 1997. CD6 ligation modulates the Bcl-2/Bax ratio and protects chronic lymphocytic leukemia B cells from apoptosis induced by anti-IgM. *Blood.* 89:2833–41.
- Padilla, O., J. Calvo, J.M. Vilà, M. Arman, I. Gimferrer, L. Places, M.T. Arias, M.A. Pujana, J. Vives, and F. Lozano. 2000. Genomic organization of the human CD5 gene. *Immunogenetics.* 51:993–1001.
- Pani, G., K.D. Fischer, I. Mlinaric-Rascan, and K.A. Siminovitch. 1996. Signaling capacity of the T cell antigen receptor is negatively regulated by the PTP1C tyrosine phosphatase. *J. Exp. Med.* 184:839–52.
- Parretta, E., G. Cassese, A. Santoni, J. Guardiola, A. Vecchio, and F. Di Rosa. 2008. Kinetics of in vivo proliferation and death of memory and naive CD8 T cells: parameter estimation based on 5-bromo-2'-deoxyuridine incorporation in spleen, lymph nodes, and bone marrow. *J. Immunol.* 180:7230–9.
- Patel, D.D., S.F. Wee, L.P. Whichard, M.A. Bowen, J.M. Pesando, A. Aruffo, and B.F. Haynes. 1995. Identification and characterization of a 100-kD ligand for CD6 on human thymic epithelial cells. *J. Exp. Med.* 181:1563–8.
- Peña-Rossi, C., L.A. Zuckerman, J. Strong, J. Kwan, W. Ferris, S. Chan, A. Tarakhovskiy, A.D. Beyers, and N. Killeen. 1999. Negative regulation of CD4 lineage development and responses by CD5. *J. Immunol.* 163:6494–501.
- Perez-Villar, J.J., G.S. Whitney, M.A. Bowen, D.H. Hewgill, A.A. Aruffo, and S.B. Kanner. 1999. CD5 negatively regulates the T-cell antigen receptor signal transduction pathway: involvement of SH2-containing phosphotyrosine phosphatase SHP-1. *Mol. Cell. Biol.* 19:2903–12.
- Persaud, S.P., C.R. Parker, W.-L. Lo, K.S. Weber, and P.M. Allen. 2014. Intrinsic CD4+ T cell sensitivity and response to a pathogen are set and sustained by avidity for thymic and peripheral complexes of self peptide and MHC. *Nat. Immunol.* 15:266–74. doi:10.1038/ni.2822.
- Pieper, K., B. Grimbacher, and H. Eibel. 2013. B-cell biology and development. *J. Allergy Clin. Immunol.* 131:959–971. doi:10.1016/j.jaci.2013.01.046.
- Plater-Zyberk, C., R.N. Maini, K. Lam, T.D. Kennedy, and G. Janosy. 1985. A rheumatoid arthritis B cell subset expresses a phenotype similar to that in chronic lymphocytic leukemia. *Arthritis Rheum.* 28:971–6.
- Pospisil, R., G.J. Silverman, G.E. Marti, A. Aruffo, M.A. Bowen, and R.G. Mage. 2000. CD5 is a potential selecting ligand for B-cell surface immunoglobulin: a possible role in maintenance and selective expansion of normal and malignant B cells. *Leuk. Lymphoma.* 36:353–65. doi:10.3109/10428190009148857.
- Postigo, J., F. Genre, M. Iglesias, M. Fernández-Rey, L. Buelta, J. Carlos Rodríguez-Rey, J. Merino, and R. Merino. 2011. Exacerbation of type II collagen-induced arthritis in apolipoprotein E-deficient mice in association with the expansion of Th1 and Th17 cells. *Arthritis Rheum.* 63:971–80. doi:10.1002/art.30220.
- Postigo, J., M. Iglesias, D. Cerezo-Wallis, A. Rosal-Vela, S. García-Rodríguez, M. Zubiaur, J. Sancho, R. Merino, and J. Merino. 2012. Mice Deficient in CD38 Develop an Attenuated Form of Collagen Type II-Induced Arthritis. *PLoS One.* 7:e33534. doi:10.1371/journal.pone.0033534.
- Prabhudas, M., D. Bowdish, K. Drickamer, M. Febbraio, J. Herz, L. Kobzik, M. Krieger, J. Loike, T.K. Means, S.K. Moestrup, S. Post, T. Sawamura, S. Silverstein, X.-Y. Wang, and J. El Khoury. 2014. Standardizing scavenger receptor nomenclature. *J. Immunol.* 192:1997–2006. doi:10.4049/jimmunol.1490003.
- Ramos-Casals, M., J. Font, M. García-Carrasco, J. Calvo, L. Places, O. Padilla, R. Cervera, M.A. Bowen, F. Lozano, and M. Ingelmo. 2001. High circulating levels of soluble scavenger receptors (sCD5 and sCD6) in patients with primary Sjögren's syndrome. *Rheumatology (Oxford).* 40:1056–9.
- Reefman, E., J.G. Kay, S.M. Wood, C. Offenhäuser, D.L. Brown, S. Roy, A.C. Stanley, P.C. Low, A.P. Manderson, and J.L. Stow. 2010. Cytokine secretion is distinct from secretion of cytotoxic granules in NK cells. *J. Immunol.* 184:4852–62. doi:10.4049/jimmunol.0803954.
- Reinherz, E.L., R. Geha, J.M. Rapoport, M. Wilson, A.C. Penta, R.E. Hussey, K.A. Fitzgerald, J.F. Daley, H. Levine, F.S. Rosen, and S.F. Schlossman. 1982. Reconstitution after transplantation with T-lymphocyte-depleted HLA haplotype-mismatched bone marrow for severe combined immunodeficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79:6047–51.
- Reinherz, E.L., P.C. Kung, G. Goldstein, and S.F. Schlossman. 1979. A monoclonal antibody with selective reactivity with functionally mature human thymocytes and all peripheral human T cells. *J. Immunol.* 123:1312–7.
- Reis e Sousa, C. 2006. Dendritic cells in a mature age. *Nat. Rev. Immunol.* 6:476–83. doi:10.1038/nri1845.
- Renaudineau, Y., S. Hillion, A. Sarau, R.A. Mageed, and P. Youinou. 2005. An alternative exon 1 of the CD5 gene regulates CD5 expression in human B lymphocytes. *Blood.* 106:2781–9. doi:10.1182/blood-2005-02-0597.
- Ricklin, D., G. Hajishengallis, K. Yang, and J.D. Lambris. 2010. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat. Immunol.* 11:785–97. doi:10.1038/ni.1923.
- Te Riet, J., J. Helenius, N. Strohmeyer, A. Cambi, C.G. Figdor, and D.J. Muller. 2014. Dynamic coupling of ALCAM to the actin cortex strengthens cell adhesion to CD6. *J Cell Sci.* 127:1595–1606.

- doi:10.1242/jcs.141077.
- Rittirsch, D., M.S. Huber-Lang, M.A. Flierl, and P.A. Ward. 2009. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nat. Protoc.* 4:31–6. doi:10.1038/nprot.2008.214.
- Roa, N.S., D. Ordoñez-Rueda, J.R. Chávez-Rios, C. Raman, E.A. García-Zepeda, F. Lozano, and G. Soldevila. 2013. The carboxy-terminal region of CD5 is required for c-CBL mediated TCR signaling downmodulation in thymocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 432:52–9. doi:10.1016/j.bbrc.2013.01.086.
- Robinson, M.J., F. Osorio, M. Rosas, R.P. Freitas, E. Schweighoffer, O. Gross, J.S. Verbeek, J. Ruland, V. Tybulewicz, G.D. Brown, L.F. Moita, P.R. Taylor, and C. Reis e Sousa. 2009. Dectin-2 is a Syk-coupled pattern recognition receptor crucial for Th17 responses to fungal infection. *J. Exp. Med.* 206:2037–51. doi:10.1084/jem.20082818.
- Robinson, W.H., H.E. Neuman de Vegvar, S.S. Prohaska, J.W. Rhee, and J.R. Parnes. 1995. Human CD6 possesses a large, alternatively spliced cytoplasmic domain. *Eur. J. Immunol.* 25:2765–9. doi:10.1002/eji.1830251008.
- Rodriguez, P.C., R. Torres-Moya, G. Reyes, C. Molinero, D. Prada, A.M. Lopez, I.M. Hernandez, M. V Hernandez, J.P. Martinez, X. Hernandez, A. Casaco, M. Ramos, Y. Avila, Y. Barrese, E. Montero, and P. Hernandez. 2012. A clinical exploratory study with itolizumab, an anti-CD6 monoclonal antibody, in patients with rheumatoid arthritis. *Results Immunol.* 2:204–11. doi:10.1016/j.rinim.2012.11.001.
- Roncagalli, R., S. Hauri, F. Fiore, Y. Liang, Z. Chen, A. Sansoni, K. Kanduri, R. Joly, A. Malzac, H. Lahdesmaki, R. Lahesmaa, S. Yamasaki, T. Saito, M. Malissen, R. Aebbersold, M. Gstaiger, and B. Malissen. 2014. Quantitative proteomics analysis of signalosome dynamics in primary T cells identifies the surface receptor CD6 as a Lat adaptor-independent TCR signaling hub. *Nat Immunol.* 15:384–392. doi:10.1038/ni.2843http://www.nature.com/ni/journal/v15/n4/abs/ni.2843.html#supplementary-information.
- Roncagalli, R., M. Mingueneau, C. Grégoire, M. Malissen, and B. Malissen. 2010. LAT signaling pathology: an “autoimmune” condition without T cell self-reactivity. *Trends Immunol.* 31:253–259. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2010.05.001.
- Sakaguchi, S., K. Fukuma, K. Kuribayashi, and T. Masuda. 1985. Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease. *J. Exp. Med.* 161:72–87.
- Sakaguchi, S., T. Takahashi, and Y. Nishizuka. 1982. Study on cellular events in post-thymectomy autoimmune oophoritis in mice. II. Requirement of Lyt-1 cells in normal female mice for the prevention of oophoritis. *J. Exp. Med.* 156:1577–86.
- Sandel, P.C., and J.G. Monroe. 1999. Negative Selection of Immature B Cells by Receptor Editing or Deletion Is Determined by Site of Antigen Encounter. *Immunity.* 10:289–299. doi:10.1016/S1074-7613(00)80029-1.
- Santos, R.F., L. Oliveira, and A.M. Carmo. 2015. Tuning T cell activation: the function of CD6 at the immunological synapse and in T cell responses. *Curr. Drug Targets.*
- Sarhan, M.A., T.N.Q. Pham, A.Y. Chen, and T.I. Michalak. 2012. Hepatitis C virus infection of human T lymphocytes is mediated by CD5. *J. Virol.* 86:3723–35. doi:10.1128/JVI.06956-11.
- Sarrias, M.-R., M. Farnós, R. Mota, F. Sánchez-Barbero, A. Ibáñez, I. Gimferrer, J. Vera, R. Fenutria, C. Casals, J. Yélamos, and F. Lozano. 2007. CD6 binds to pathogen-associated molecular patterns and protects from LPS-induced septic shock. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104:11724–9. doi:10.1073/pnas.0702815104.
- Satoh, T., H. Kato, Y. Kumagai, M. Yoneyama, S. Sato, K. Matsushita, T. Tsujimura, T. Fujita, S. Akira, and O. Takeuchi. 2010. LGP2 is a positive regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107:1512–7. doi:10.1073/pnas.0912986107.
- Schmidt, A.M., W. Lu, V.J. Sindhava, Y. Huang, J.K. Burkhardt, E. Yang, M.J. Riese, J.S. Maltzman, M.S. Jordan, and T. Kambayashi. 2015. Regulatory T cells require TCR signaling for their suppressive function. *J. Immunol.* 194:4362–70. doi:10.4049/jimmunol.1402384.
- Schmitt, E.G., and C.B. Williams. 2013. Generation and function of induced regulatory T cells. *Front. Immunol.* 4:152. doi:10.3389/fimmu.2013.00152.
- Scott, D., C. Addey, P. Ellis, E. James, M.J. Mitchell, N. Saut, S. Jurcevic, and E. Simpson. 2000. Dendritic Cells Permit Identification of Genes Encoding MHC Class II–Restricted Epitopes of Transplantation Antigens. *Immunity.* 12:711–720. doi:10.1016/S1074-7613(00)80221-6.
- Segal, B.H., and W.J. Steinbach. 2007. Combination antifungals: an update. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 5:883–92. doi:10.1586/14787210.5.5.883.
- Sembries, S., H. Pahl, S. Stilgenbauer, H. Döhner, and F. Schriever. 1999. Reduced expression of adhesion molecules and cell signaling receptors by chronic lymphocytic leukemia cells with 11q deletion. *Blood.* 93:624–31.
- Sestero, C.M., D.J. McGuire, P. De Sarno, E.C. Brantley, G. Soldevila, R.C. Axtell, and C. Raman. 2012. CD5-dependent CK2 activation pathway regulates threshold for T cell anergy. *J. Immunol.* 189:2918–30. doi:10.4049/jimmunol.1200065.
- Shalaby, M.R., B.B. Aggarwal, E. Rinderknecht, L.P. Svedersky, B.S. Finkle, and M.A. Palladino. 1985. Activation of human polymorphonuclear neutrophil functions by interferon-gamma and tumor necrosis factors. *J. Immunol.* 135:2069–73.
- Shen, S., Y. Ding, C.E. Tadokoro, D. Olivares-Villagómez, M. Camps-Ramírez, M.A. Curotto de Lafaille, and J.J. Lafaille. 2005. Control of homeostatic proliferation by regulatory T cells. *J. Clin. Invest.* 115:3517–26. doi:10.1172/JCI25463.

- Shiozawa, Y., and R.S. Taichman. 2014. HSCs and niche relations marked by CD166. *Blood*. 124:471–2. doi:10.1182/blood-2014-04-571638.
- Simarro, M., J. Calvo, J.M. Vilà, L. Places, O. Padilla, J. Alberola-Ila, J. Vives, and F. Lozano. 1999. Signaling through CD5 involves acidic sphingomyelinase, protein kinase C-zeta, mitogen-activated protein kinase kinase, and c-Jun NH2-terminal kinase. *J. Immunol.* 162:5149–55.
- Simarro, M., C. Pelassy, J. Calvo, L. Places, C. Aussel, and F. Lozano. 1997. The cytoplasmic domain of CD5 mediates both TCR/CD3-dependent and -independent diacylglycerol production. *J. Immunol.* 159:4307–15.
- Singer, N.G., D.A. Fox, T.M. Haqqi, L. Beretta, J.S. Endres, S. Prohaska, J.R. Parnes, J. Bromberg, and R.M. Sramkoski. 2002. CD6: expression during development, apoptosis and selection of human and mouse thymocytes. *Int Immunol.* 14:585–597.
- Skarnes, W.C., B. Rosen, A.P. West, M. Koutourakis, W. Bushell, V. Iyer, A.O. Mujica, M. Thomas, J. Harrow, T. Cox, D. Jackson, J. Severin, P. Biggs, J. Fu, M. Nefedov, P.J. de Jong, A.F. Stewart, and A. Bradley. 2011. A conditional knockout resource for the genome-wide study of mouse gene function. *Nature*. 474:337–42. doi:10.1038/nature10163.
- Smith, H.R., and R.R. Olson. 1990. CD5+ B lymphocytes in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 17:833–5.
- Soldevila, G., C. Raman, and F. Lozano. 2011. The immunomodulatory properties of the CD5 lymphocyte receptor in health and disease. *Curr. Opin. Immunol.* 23:310–8. doi:10.1016/j.coi.2011.03.003.
- Sprent, J., and C.D. Surh. 2011. Normal T cell homeostasis: the conversion of naive cells into memory-phenotype cells. *Nat. Immunol.* 12:478–84.
- Stamou, P., J. de Jersey, D. Carmignac, C. Mamalaki, D. Kioussis, and B. Stockinger. 2003. Chronic exposure to low levels of antigen in the periphery causes reversible functional impairment correlating with changes in CD5 levels in monoclonal CD8 T cells. *J. Immunol.* 171:1278–84.
- Sutmuller, R., A. Garritsen, and G.J. Adema. 2007. Regulatory T cells and toll-like receptors: regulating the regulators. *Ann. Rheum. Dis.* 66 Suppl 3:iii91–5. doi:10.1136/ard.2007.078535.
- Sutmuller, R.P.M., M.E. Morgan, M.G. Netea, O. Grauer, and G.J. Adema. 2006. Toll-like receptors on regulatory T cells: expanding immune regulation. *Trends Immunol.* 27:387–93. doi:10.1016/j.it.2006.06.005.
- Swaminathan, B., A. Cuapio, I. Alloza, F. Matesanz, A. Alcina, M. Garcia-Barcina, M. Fedetz, O. Fernandez, M. Lucas, T. Orpez, M.J. Pinto-Medel, D. Otaegui, J. Olascoaga, E. Urcelay, M.A. Ortiz, R. Arroyo, J.R. Oksenberg, A. Antiguiedad, E. Tolosa, and K. Vandenbroeck. 2013. Fine mapping and functional analysis of the multiple sclerosis risk gene CD6. *PLoS One*. 8:e62376. doi:10.1371/journal.pone.0062376.
- Tabbekh, M., K. Franciszkiewicz, H. Haouas, Y. Lecluse, K. Benihoud, C. Raman, and F. Mami-Chouaib. 2011. Rescue of Tumor-Infiltrating Lymphocytes from Activation-Induced Cell Death Enhances the Antitumor CTL Response in CD5-Deficient Mice. *J. Immunol.* 187:102–109. doi:10.4049/jimmunol.1004145.
- Takeuchi, O., and S. Akira. 2010. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. 140:805–20. doi:10.1016/j.cell.2010.01.022.
- Tang, D., R. Kang, C.B. Coyne, H.J. Zeh, and M.T. Lotze. 2012. PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity. *Immunol. Rev.* 249:158–75. doi:10.1111/j.1600-065X.2012.01146.x.
- Tangye, S.G. 2013. To B1 or not to B1: that really is still the question! *Blood*. 121:5109–10. doi:10.1182/blood-2013-05-500074.
- Tarakhovskiy, A., S.B. Kanner, J. Hombach, J.A. Ledbetter, W. Müller, N. Killeen, and K. Rajewsky. 1995. A role for CD5 in TCR-mediated signal transduction and thymocyte selection. *Science*. 269:535–7.
- Tarakhovskiy, A., W. Müller, and K. Rajewsky. 1994. Lymphocyte populations and immune responses in CD5-deficient mice. *Eur. J. Immunol.* 24:1678–1684. doi:10.1002/eji.1830240733.
- Taylor, P.R., S.V. Tsoni, J.A. Willment, K.M. Dennehy, M. Rosas, H. Findon, K. Haynes, C. Steele, M. Botto, S. Gordon, and G.D. Brown. 2007. Dectin-1 is required for beta-glucan recognition and control of fungal infection. *Nat. Immunol.* 8:31–8. doi:10.1038/ni1408.
- Tortorano, A.M., G. Dho, A. Prigitano, G. Breda, A. Grancini, V. Emmi, C. Cavanna, G. Marino, S. Morero, C. Ossi, G. Delvecchio, M. Passera, V. Cusumano, A. David, G. Bonaccorso, A. Corona, M. Favaro, C. Vismara, M.G. Garau, S. Falchi, and M.R. Tejada. 2012. Invasive fungal infections in the intensive care unit: a multicentre, prospective, observational study in Italy (2006-2008). *Mycoses*. 55:73–9. doi:10.1111/j.1439-0507.2011.02044.x.
- Treanor, B. 2012. B-cell receptor: from resting state to activate. *Immunology*. 136:21–7. doi:10.1111/j.1365-2567.2012.03564.x.
- Tsuge, I., K.R. Utsumi, R. Ueda, S. Takamoto, and T. Takahashi. 1985. Assignment of gene coding human T-cell differentiation antigen, Tp120, to chromosome 11. *Somat. Cell Mol. Genet.* 11:217–22.
- Vantourout, P., and A. Hayday. 2013. Six-of-the-best: unique contributions of $\gamma\delta$ T cells to immunology. *Nat. Rev. Immunol.* 13:88–100. doi:10.1038/nri3384.
- van de Veerdonk, F.L., and M.G. Netea. 2010. T-cell Subsets and Antifungal Host Defenses. *Curr. Fungal Infect. Rep.* 4:238–243. doi:10.1007/s12281-010-0034-6.
- Van de Velde, H., I. von Hoegen, W. Luo, J.R. Parnes, and K. Thielemans. 1991. The B-cell surface protein CD72/Lyb-2 is the ligand for CD5. *Nature*. 351:662–5. doi:10.1038/351662a0.
- Veldhoen, M., R.J. Hocking, C.J. Atkins, R.M. Locksley, and B. Stockinger. 2006. TGFbeta in

- the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*. 24:179–89. doi:10.1016/j.immuni.2006.01.001.
- Venet, F., C.-S. Chung, H. Kherouf, A. Geeraert, C. Malcus, F. Poitevin, J. Bohé, A. Lepape, A. Ayala, and G. Monneret. 2009. Increased circulating regulatory T cells (CD4(+)/CD25(+)/CD127(-)) contribute to lymphocyte anergy in septic shock patients. *Intensive Care Med*. 35:678–86. doi:10.1007/s00134-008-1337-8.
- Vera, J., R. Fenutria, O. Cañadas, M. Figueras, R. Mota, M.-R. Sarrias, D.L. Williams, C. Casals, J. Yelamos, and F. Lozano. 2009. The CD5 ectodomain interacts with conserved fungal cell wall components and protects from zymosan-induced septic shock-like syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106:1506–1511. doi:10.1073/pnas.0805846106.
- Verwilghen, J., P. Vandenberghe, G. Wallays, M. de Boer, N. Anthony, G.S. Panayi, and J.L. Ceuppens. 1993. Simultaneous ligation of CD5 and CD28 on resting T lymphocytes induces T cell activation in the absence of T cell receptor/CD3 occupancy. *J. Immunol.* 150:835–46.
- Vilà, J.M., J. Calvo, L. Places, O. Padilla, M. Arman, I. Gimferrer, C. Aussel, J. Vives, and F. Lozano. 2001a. Role of two conserved cytoplasmic threonine residues (T410 and T412) in CD5 signaling. *J. Immunol.* 166:396–402.
- Vilà, J.M., I. Gimferrer, O. Padilla, M. Arman, L. Places, M. Simarro, J. Vives, and F. Lozano. 2001b. Residues Y429 and Y463 of the human CD5 are targeted by protein tyrosine kinases. *Eur. J. Immunol.* 31:1191–8. doi:10.1002/1521-4141(200104)31:4<1191::AID-IMMU1191>62;3.CO;2-H.
- Vivier, E., E. Tomasello, M. Baratin, T. Walzer, and S. Ugolini. 2008. Functions of natural killer cells. *Nat. Immunol.* 9:503–10. doi:10.1038/ni1582.
- Volman, T.J.H., T. Hendriks, and R.J. a Goris. 2005. Zymosan-Induced Generalized Inflammation: Experimental Studies Into Mechanisms Leading To Multiple Organ Dysfunction Syndrome. *Shock*. 23:291–297. doi:10.1097/01.shk.0000155350.95435.28.
- Wang, C.Y., R.A. Good, P. Ammirati, G. Dymbort, and R.L. Evans. 1980. Identification of a p69,71 complex expressed on human T cells sharing determinants with B-type chronic lymphatic leukemic cells. *J. Exp. Med.* 151:1539–44.
- Wee, S., G.L. Schieven, J.M. Kiriara, T.T. Tsu, J.A. Ledbetter, and A. Aruffo. 1993. Tyrosine phosphorylation of CD6 by stimulation of CD3: augmentation by the CD4 and CD2 coreceptors. *J. Exp. Med.* 177:219–23.
- Whitney, G.S., G.C. Starling, M.A. Bowen, B. Modrell, A.W. Siadak, and A. Aruffo. 1995a. The Membrane-proximal Scavenger Receptor Cysteine-rich Domain of CD6 Contains the Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule Binding Site. *J. Biol. Chem.* 270:18187–18190. doi:10.1074/jbc.270.31.18187.
- Whitney, G.S., G.C. Starling, M.A. Bowen, B. Modrell, A.W. Siadak, and A. Aruffo. 1995b. The membrane-proximal scavenger receptor cysteine-rich domain of CD6 contains the activated leukocyte cell adhesion molecule binding site. *J Biol Chem.* 270:18187–18190.
- Williams, O., C.L. Mok, T. Norton, N. Harker, D. Kioussis, and H.J. Brady. 2001. Elevated Bcl-2 is not a causal event in the positive selection of T cells. *Eur. J. Immunol.* 31:1876–82. doi:10.1002/1521-4141(200106)31:6<1876::AID-IMMU1876>62;3.CO;2-F.
- Williams, O., T. Norton, M. Halligey, D. Kioussis, and H.J. Brady. 1998. The action of Bax and bcl-2 on T cell selection. *J. Exp. Med.* 188:1125–33.
- de Wit, J., Y. Souwer, A.J. van Beelen, R. de Groot, F.J.M. Muller, H. Klaasse Bos, T. Jorritsma, M.L. Kapsenberg, E.C. de Jong, and S.M. van Ham. 2011. CD5 costimulation induces stable Th17 development by promoting IL-23R expression and sustained STAT3 activation. *Blood*. 118:6107–6114. doi:10.1182/blood-2011-05-352682.
- Wormley, F.L., J.R. Perfect, C. Steele, and G.M. Cox. 2007. Protection against cryptococcosis by using a murine gamma interferon-producing *Cryptococcus neoformans* strain. *Infect. Immun.* 75:1453–62. doi:10.1128/IAI.00274-06.
- Xiong, J., M.A. Armato, and T.M. Yankee. 2011. Immature single-positive CD8+ thymocytes represent the transition from Notch-dependent to Notch-independent T-cell development. *Int. Immunol.* 23:55–64. doi:10.1093/intimm/dxq457.
- Yuseff, M.-I., P. Pierobon, A. Reversat, and A.-M. Lennon-Duménil. 2013. How B cells capture, process and present antigens: a crucial role for cell polarity. *Nat. Rev. Immunol.* 13:475–86. doi:10.1038/nri3469.
- Yuseff, M.-I., A. Reversat, D. Lankar, J. Diaz, I. Fanget, P. Pierobon, V. Randrian, N. Larochette, F. Vaschetto, C. Desdouets, B. Jauffred, Y. Bellaiche, S. Gasman, F. Darchen, C. Desnos, and A.-M. Lennon-Duménil. 2011. Polarized secretion of lysosomes at the B cell synapse couples antigen extraction to processing and presentation. *Immunity*. 35:361–74. doi:10.1016/j.immuni.2011.07.008.
- Zhang, D., G. Luo, X. Ding, and C. Lu. 2012. Preclinical experimental models of drug metabolism and disposition in drug discovery and development. *Acta Pharm. Sin.* 33:549–561. doi:10.1016/j.apsb.2012.10.004.
- Zimmerman, A.W., B. Joosten, R. Torensma, J.R. Parnes, F.N. van Leeuwen, and C.G. Figdor. 2006. Long-term engagement of CD6 and ALCAM is essential for T-cell proliferation induced by dendritic cells. *Blood*. 107:3212–3220. doi:10.1182/blood-2005-09-3881.
- Zuckerman, E., G. Slobodin, A. Kessel, E. Sabo, D. Yeshurun, K. Halas, and E. Toubi. 2002. Peripheral B-cell CD5 expansion and CD81 overexpression and their association with disease severity and autoimmune markers in chronic hepatitis C virus infection. *Clin. Exp. Immunol.* 128:353–8.

Annex

Solucions

Cultius cel·lulars

Medi RPMI complet: 500mL de medi RPMI, 10% FBS, 10mM HEPES, 1mM Sodium pyruvat, 50µM β-Mercaptoethanol, Penicilina-Glutamina-Streptamicina

Solució per aïllament de cèl·lules T: PBS1X lliure de Ca^{2+} i Mg^{2+} , enriquit amb 0.1% BSA

Experiments de calci

Solució per calci (microscopia): (en mM): 140 NaCl, 5 KCl, 1.2 $CaCl_2$, 0.5 $MgCl_2$, 5 glucosa, 10 HEPES (300 mosmol/l, pH 7.4 with Tris.

Solució per calci (citometria): 100mL de medi HBSS lliure de Ca^{2+} i Mg^{2+} enriquit amb 0.1% BSA, 1mL HEPES, 1mM Ca i 1mM Mg

Experiments de bioquímica

Lower buffer (en mL): 18.1 H_2O , 10.4 PAA 30%, 9.75 4x Lower, 0.75 APS 10%, 0.01 TEMED

Lower 4X (en grams): 90.86 Tris base, 2 SDS 0.4%

Stacking buffer (en mL): 6.75 H_2O 2 PAA 30%, 3 4x Upper, 0.05 APS 10%, 0.01 TEMED

Upper 4X (en grams): 30.3 Tris base, 2 SDS 4%

Lisis buffer (en mL): 10 TNE2X, 0.4 Na_3VO_4 (90mg/10mL), 1 NaF (1M), 0.2 inhibidors PMSF/LECK/TPPK, 0.1 Leupeptina (2mg/mL), 0.1 Aprotinina (2mg/mL)

TNE2X (en mL): 0.1 H_2O , 5 Tris 1M pH8, 0.4 EDTA 0.5M pH8

Leamly buffer (en mL): 55 H_2O , 4x Upper, 20 Glycerol, 6g SDS, 0.02g Bromofenol blau 0.02%

Running buffer (en 4L H_2O): 12g Tris, 57.6g glicina, 4g SDS

Transfer buffer (en 4L H_2O): 6g Tris, 30g glicina

Publicacions

- **Orta-Mascaró M**, Consuegra-Fernández M, Carreras E, Roncagalli R, Carreras-Sureda A, Álvarez P, Girard L, Simões I, Martínez-Florensa M, Aranda F, Merino R, Martínez VG, Vicente R, Merino J, Sarukhan A, Malissen M, Malissen B, Lozano F. *CD6 modulates the threshold for thymocyte selection and peripheral T cell homeostasis*. Manuscript submitted.

- Consuegra-Fernandez M, Aranda F, Simões I, **Orta M**, Sarukhan A, Lozano F. *CD5 as a target for immune-based therapies*. Crit Rev Immu, 2015. 35(2):85-116.

- G Martínez V, Escoda-Ferran C, Tadeu Simões I, Arai S, **Orta M**, Carreras E, Martínez-Florensa M, Yelamos J, Miyazaki T, Lozano F. *The macrophage soluble receptor AIM/Api6/CD5L displays a broad pathogen recognition spectrum and is involved in early response to microbial aggression*. Cell Mol Immunol, 2014. 11(4):343-54

- Aulí M, Domènech A, Andrés A, **Orta M**, Salvà M, Descotes J, Prats N. *Multiparametric immunotoxicity screening in mice during early drug development*. Toxicol Lett, 2012. 17(14): p. 200-8.