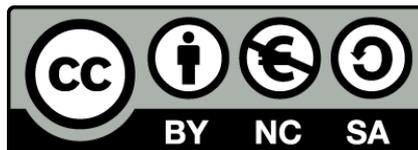




UNIVERSITAT<sub>DE</sub>  
BARCELONA

## Estudio de la función inmunomoduladora de co-receptores linfocitarios tipo *scavenger*

Alejandra Leyton Pereira



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – Compartir Igual 4.0. Espanya de Creative Commons.**

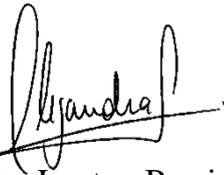
Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – Compartir Igual 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0. Spain License.**





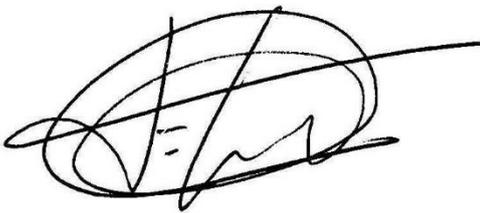
ESTUDIO DE LA FUNCIÓN INMUNOMODULADORA  
DE CO-RECEPTORES  
LINFOCITARIOS TIPO SCAVENGER



Alejandra Leyton Pereira

Memoria presentada por Alejandra Leyton Pereira para optar al grado de Doctora por la  
Universitat de Barcelona.

Programa de Doctorado en Biomedicina



Francisco Lozano Soto  
Director de la Tesis



Fernando Aranda Vega  
Co-Director de la Tesis



*Dedicada*  
*Al pilar de mi vida*  
*A mi amada madre ...*



*“El acto real de descubrimiento no consiste  
En encontrar nuevas tierras  
Sino en ver con otros ojos”  
Marcel Proust*



*“De todo, quedaron tres cosas:  
la certeza de que estaba siempre comenzando,  
la certeza de que había que seguir  
y la certeza de que sería interrumpida antes de terminar.*

*Hacer de la interrupción un camino nuevo,  
hacer de la caída, un paso de danza,  
del miedo, una escalera,  
del sueño, un puente,  
de la búsqueda... un encuentro”*

*Fernando Pessoa*



## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero comenzar a agradecer a mi director de tesis, el Doctor Francisco Lozano Soto, por el apoyo que me ha brindado durante todos estos años. Paco, no hay palabras merecedoras y suficientes para agradecer todo tu apoyo, por creer en mí, por darme la libertad de investigar y guiarme cuando lo necesitaba. Por compartir tu conocimiento y animarme a seguir respondiendo las interminables preguntas que nos surgían en el camino. Por enseñarme lo importante que es formar redes para que todos avancen juntos. Gracias por esa calidez y generosidad humana que te caracteriza, que en estos tiempos es difícil de encontrar y sin duda alguna, en momentos difíciles me permitieron seguir en pie.

A mi co-director de tesis, Doctor Fernando Aranda, por tu apoyo desde mis inicios del doctorado, en donde me dedicaste tu tiempo para explicar conceptos de una forma muy didáctica que no he olvidado hasta hoy en día. Gracias por tu amabilidad y generosidad de compartir lo que sabías conmigo. Por tus palabras de motivación en momentos difíciles llenos de incertidumbres y por tu incondicional apoyo.

También quisiera agradecer a las personas que durante estos años compartieron conmigo tantos momentos de dudas, preocupaciones, alegrías y risas. A Sergi, que nunca me abandonó en esta aventura, a pesar de que él estuviese en Suiza o yo en Alemania, fuimos compañeros de día a día. Por todas las horas que discutimos sobre CD5 y CD6, como de dudas existenciales. Por ayudarme cada vez que envié un S.O.S, ojalá todos tuviesen un Sergi cerca, moltes gràcies, amic meu. A Cristina Catalá por esas horas de CLP con charlas sobre ansiedades del doctorado y por tu constante apoyo en cada uno de mis experimentos, fuesen 20 o 3 ratones, igualmente me ayudabas para que resultará todo bien. A Rebe y Javi, por esas conversaciones que terminaban en risas en cultivos. A Laura que se incorporó al final al grupo, gracias por tu amabilidad.

Tuve la oportunidad de explorar otros laboratorios en Barcelona, como el de Bioquímica y el de Fisiología en la Facultad de Farmacia, donde conocí a maravillosas personas. Gracias Ana Calpena, María José, Pepita y Laura, por permitir hacer una estancia en sus laboratorios y colaborar en este proyecto, siempre con muy buena disposición y amabilidad, por sus consejos y por su apoyo. María José, gracias por todas esas conversaciones, por escuchar todas mis ansiedades del doctorado mientras

cortábamos orejitas, por tú gran gentileza y calidez humana, por la motivación y todos los consejos, me siento muy afortunada y agradecida por conocerte. A mis compañeras Cecy y Yeni, por recibirme tan amablemente, por darme un espacio y hacerme sentir parte de su equipo, a los pocos días, ya me sentía trabajando cómodamente como en casa. Gracias por su cariño y todas las entretenidas conversaciones que tuvimos. Muchas gracias a Noa y a Irene, que tan sólo nos conocemos vía email, pero que he sentido su incondicional apoyo y a pesar de las adversidades hemos logrado salir adelante como buen equipo.

To all the amazing people I met in Essen. To our captain, Marc; thank you for letting me have such an enriching experience at your lab, for believing in my project and for improving it with your ideas. Victoria, Frederik, Kerstin, Daisuke, Kevin, Artur and Bettina, thank you very much guys for your kindness and cooperation in everything I needed. It was such a pleasure to see you all at work and after work as well. Victoria, I will never forget your cakes and your unconditional help. A Kerstin, muchas gracias por tu valiosa amistad y por las clases de alemán y español que tuvimos acompañado de un buen café. Daisuke, for laughing at all the adventures in Germany, including the fines and the fact that the Germans didn't understand our English. Dankeshön to the lovely Essen, I learned and broadened my perspective about science and life. I will always be grateful for the wonderful experience I have had here.

A mis queridos amigos y amigas de Barcelona, quienes hicieron mi paso por Barcelona un hermoso y cálido hogar, quienes con mucho cariño dedicaron y compartieron su tiempo conmigo. A mi Eli corazón de melón, Barcelona nos volvió a juntar, por estar siempre a una llamada de S.O.S y porque cada vez que me junto contigo es más risa que conversación, gracias amiga mía de la vida, te quiero mucho. A Darlyn y a Cristina, amigas de aventuras y de viajes, desde el primer año que llegué a Barcelona, tantas historias con ustedes, muchas gracias por siempre estar conmigo. A Xavi, mi amigo del alma, el autor de esta maravillosa portada, no tengo palabras para expresar lo afortunada y agradecida que me siento por tu amistad, gracias por estar ahí siempre y por esas cervecitas después del trabajo que hacían más livianas nuestras vidas. A Natalia, mi hermanita, siempre te lo he dicho y hasta la vida nos juntó al final, trabajando en el mismo edificio y hasta en la misma planta. ¿Increíble no?, gracias por todos esos cafecitos y chismecitos que compartimos, por endulzar nuestro día a día, estés donde estés siempre tendrás parte de este corazoncito para ti. A las guachonas más apañadoras de la vida, Sol,

Andrea, Moni, Maca, Juli, José, por toda la buena vida que nos damos cuando estamos juntas, por esta comunidad que hemos formado de amistad, diversidad, respeto, apañe y amorcito. A mi Yoss y Sophie, por todas esas salidas a mover el bote y por su linda amistad, risas que sin duda hicieron este camino mucho más ameno. A mi querida Vicky, es difícil para mí poder explicar en unas líneas lo que siento y todo lo agradecida que estoy de ti, de toda tu amabilidad y toda tu dedicación, eres quien me acompaño este agridulce camino que es para toda la vida, agradezco y me siento afortunada enormemente que la vida nos uniera y gracias por ayudarme a lograrlo, Namaste, querida amiga.

A mi querida familia, que a pesar de la distancia que nos separa, siempre están presentes en mi día a día. A mi madre, por todo su amor y paciencia de escucharme día a día y más de una vez por día jajaja, por creer en mí y darme tranquilidad en aquellos con mucho estrés y frustración. A mis hermanas Katherine y Camila, A mi abuelita Cleme, A mi tía Náyade y a mi tío Mauricio, a Eli, Víctor y Vero, y a toda mi familia, primos y primas, por siempre estar presentes, apoyarme y enviar siempre buenos deseos y energías desde Chile. To my Rajat Khatter, thank you for your unconditional support and sweetening my daily life, anything is possible with you, Namaste my lou.



## **RESUMEN**



## ABSTRACT

**Introduction:** The lymphocyte CD5 and CD6 receptors are transmembrane molecules structurally and functionally belonging to the scavenger receptor group of innate immune receptors. CD5 and CD6 are characterized by the presence of three tandem repeats of scavenger receptor cysteine-rich (SRCR) domains, which can recognize conserved microbial-associated molecular patterns (MAMPs) present in bacteria, viruses, fungi, or parasites. CD5 and CD6 also have intracellular signal transduction capacity and are physically associated with the antigen-specific clonotypic receptor of T (TCR) and B (BCR) lymphocytes. The combination of both capacities allows them to positively or negatively modulate essential lymphocyte functions (cell activation, differentiation, and death signals) upon specific antigen recognition. Therefore, CD5 and CD6 can be considered receptors at the interface between innate and adaptive immunity, which in addition hold immunomodulatory properties shared with a select group of lymphocyte receptors called immune checkpoint regulators.

**Hypothesis and objectives:** Although CD5 and CD6 have been identified about four decades ago, there are still controversies and unresolved issues regarding the physiological function. One of them is to clarify definitively whether CD6 is a positive or negative regulator of lymphocyte function. Currently, this confusion remains, mainly due to the use of supra-physiological stimulation conditions in the experimental models performed up to date. Accordingly, one of the objectives of this thesis is to analyze the co-stimulatory/inhibitory role of CD6 in antigen-specific physiological stimulation systems *in vitro* and *in vivo*. In the case of CD5, studies performed both in genetically modified mice (*Cd5<sup>-/-</sup>*) and in lymphoid cell transfectants allowed to assign it a clearly defined as a co-inhibitor. Further studies also have shown that CD5 expression on lymphoid cells can induce relevant changes in their gene expression pattern. In humans, CD5 deficiencies have not been reported so far, but a functionally relevant CD5 polymorphism (rs2229177; Ala471>Val) is known to influence the clinical course of autoimmune and neoplastic processes. In light of the above, another objective of this thesis is to analyze changes in the transcriptomic profile of lymphoid cells induced by the expression of functionally relevant variants of CD5, as well as by the expression of CD6

to validate the functional significance and the resulting signaling pathways derived from the expression of these receptors.

**Methodology and results:** For the first objective, MHC class II-restricted and ovalbumin-specific (OVA)-specific TCR transgenic mice with normal (OT-II *Cd6*<sup>+/+</sup>) or deficient (OT-II *Cd6*<sup>-/-</sup>) CD6 surface expression were analyzed. Initially, early and late events following antigen-specific lymphocyte activation were evaluated on splenocytes or T-APC cell conjugated from both mouse lines stimulated in the presence of OVA<sub>323-339</sub> peptide (ISQAVHAAHAEINEAGR). On the other hand, a model of OVA-induced delayed hypersensitivity (DTH) was evaluated in OT-II *Cd6*<sup>+/+</sup> and OT-II *Cd6*<sup>-/-</sup> mice. Altogether, the results from those *in vitro* and *in vivo* experimental models indicate an ambivalent function of the CD6 receptor (positive or negative) depending on the experimental system used. For the second objective, mRNA libraries from Daudi cells and CLL patient cells expressing different CD6 levels or different CD5 variants (Ala471 or Val471) were analyzed. Bioinformatic analyses reveal that the non-synonymous rs2229177 (Ala471>Val) substitution of CD5 in its cytoplasmic domain can modulate the lymphoid cell transcriptome with effects on metabolite transport, glycolysis, amino acid synthesis and chromatin organization. Similarly, CD6 expression can modulate genes involved in lymphocyte activation, apoptosis, and Wnt signaling.

**Discussion and conclusion:** In conclusion, the results obtained confirm the critical role of CD5 and CD6 in regulating T and B lymphocyte-mediated responses, and they provide a complete characterization of the underlying molecular mechanisms. CD5 and CD6 are relevant molecules in various immune-related disorders, such as autoimmunity and cancer, which are considered a *priori* as antagonistic but also bi-directional responses. Functional analysis of these lymphocyte receptors in various physiological contexts is a crucial element for their rational use in therapeutic protocols.

## RESUMEN

**Introducción:** Los receptores linfocitarios tipo *scavenger* CD5 y CD6, son moléculas de transmembrana que funcional y estructuralmente pertenecen a la superfamilia de receptores de la inmunidad innata. CD5 y CD6 se caracterizan por la presencia de tres dominios repetidos en tándem de *scavenger* receptor ricos en cisteínas (SRCR), que pueden reconocer estructuras microbianas conservadas (del inglés MAMPs) presentes en bacterias, virus, hongos o parásitos. CD5 y CD6 son receptores con capacidad transductora de señales intracelulares y que se asocian físicamente al receptor clonotípico específico de antígeno de los linfocitos T (TCR) y B (BCR). La sumatoria de ambas competencias, y tras el reconocimiento específico de antígenos, sitúa perfectamente a estos receptores con la capacidad de modular positiva o negativamente importantes funciones linfocitarias (activación, diferenciación y muerte celular). Por tanto, podemos considerar a CD5 y CD6 como receptores que están en la interfase entre la inmunidad innata y adaptativa, y que simultáneamente, comparten propiedades inmunomoduladoras con un selecto grupo de receptores linfocitarios denominados *immune checkpoint regulators*.

**Hipótesis y objetivos:** A pesar de haber sido identificados unas cuatro décadas atrás, aún existen controversias y aspectos pendientes de estudio respecto a la función fisiológica de CD5 y CD6. Uno de ellos es aclarar definitivamente si CD6, es un regulador positivo o negativo de la función linfocitaria. Hasta la actualidad esta confusión se mantiene, principalmente debido a la utilización de condiciones de estimulación supra-fisiológicas en los modelos experimentales realizados hasta la fecha. En consecuencia, uno de los objetivos de esta tesis propone analizar el papel co-estimulador/inhibidor de CD6 en sistemas de estimulación fisiológica antígeno-específica *in vitro* e *in vivo*. En el caso de CD5, estudios realizados tanto en ratones modificados genéticamente (*Cd5<sup>-/-</sup>*) como en transfectantes de células linfoides, han permitido asignarle un papel inequívocamente regulador negativo. Además de evidenciar, que su expresión en células linfoides es capaz de inducir cambios relevantes en el patrón de expresión génica de las mismas. En humanos se desconocen deficiencias de CD5, pero sí un polimorfismo funcionalmente relevante (rs2229177; Ala471>Val) capaz de condicionar el curso clínico de procesos autoinmunitarios y neoplásicos. A la vista de ello, otro de los objetivos de esta tesis propone analizar cambios en el perfil transcriptómico de células linfoides inducidos por

la expresión de variantes funcionalmente relevantes de CD5, así como por la expresión de CD6, con el fin de validar la importancia funcional y las vías de señalización resultantes de la expresión de estos receptores.

**Metodología y resultados:** Para el primer objetivo, se analizaron ratones transgénicos con TCR restringido a MHC clase II y específicos de ovoalbúmina (OVA) que expresan (OT-II *Cd6<sup>+/+</sup>*) o son deficientes (OT-II *Cd6<sup>-/-</sup>*) para CD6. En primer lugar, se evaluaron fenómenos tempranos o tardíos de la activación linfocitaria en esplenocitos totales o conjugados de células T-APC de ambas líneas de ratones, cultivados en presencia del péptido OVA<sub>323-339</sub> (ISQAVHAAHAEINEAGR). Por otro lado, se evaluó un modelo de hipersensibilidad retardada inducida por OVA en ratones OT-II *Cd6<sup>+/+</sup>* y OT-II *Cd6<sup>-/-</sup>*. Aunque, los resultados indican una función ambivalente del receptor CD6 (positiva o negativa) en función del sistema experimental *in vitro* o *in vivo* utilizado. Para el segundo objetivo, se analizaron librerías de mRNA de células Daudi y células de pacientes con LLC que expresan diferentes niveles de CD6 humano o las variantes de CD5 humano (Ala471 o Val471). Los análisis bioinformáticos revelan que sustitución no sinónima rs2229177 (Ala471>Val) en el dominio citoplasmático de CD5 introduce cambios relevantes en el transcriptoma de las células linfoides que afectan a vías del transporte de metabolitos, la glucólisis, la síntesis de aminoácidos y la organización de la cromatina. Asimismo, la expresión de CD6 puede modular los genes implicados en la activación de los linfocitos, la apoptosis y la señalización Wnt.

**Discusión y conclusión:** En conclusión, los resultados obtenidos confirman el importante papel de CD5 y CD6 en la regulación de las respuestas mediadas por linfocitos T y B, y proporcionan una caracterización más completa de los mecanismos moleculares subyacentes. CD5 y CD6 son moléculas relevantes en la variedad de trastornos relacionados con el sistema inmunitario, como la autoinmunidad y el cáncer, que son considerados *a priori* respuestas antagónicas, pero a la vez bidireccionales. El análisis funcional de estos receptores linfocitarios en diversos contextos fisiológicos es una pieza clave para su uso racional en protocolos terapéuticos.

## ÍNDICE



Tabla de contenido

<b>RESUMEN</b> .....	15
<b>ABREVIATURAS</b> .....	25
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	32
<b>1. El sistema inmunitario</b> .....	<b>34</b>
1.1 Inmunidad innata .....	35
1.2 Inmunidad adaptativa .....	37
<b>2. CD6</b> .....	<b>41</b>
2.1 Genes y estructura molecular de CD6.....	41
2.2 Expresión tisular de CD6.....	44
2.3 Ligandos de CD6 .....	45
2.4 Función de CD6 .....	47
2.5 Polimorfismos de <i>CD6</i> .....	53
2.6 Aplicaciones terapéuticas de CD6.....	56
<b>3. CD5</b> .....	<b>58</b>
3.1 Genes y estructura de CD5 .....	58
3.2 Expresión tisular de CD5.....	60
3.3 Ligandos de CD5 .....	61
3.4 Función de CD5 .....	64
3.5 Polimorfismos de CD5 .....	68
3.6 Aplicaciones terapéuticas de CD5.....	70
<b>II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	73
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	79
<b>1. Ratones OT-II <i>Cd6<sup>-/-</sup></i> y OT-II <i>Cd6<sup>+/+</sup></i></b> .....	<b>81</b>
<b>2. Cultivo celular</b> .....	<b>82</b>
2.1 Cultivo de células murinas .....	83
2.2 Cultivos de células humanas .....	87
<b>3. Análisis por citometría de flujo</b> .....	<b>89</b>
3.1. Antígenos de superficie e intracelulares.....	89
3.2 Marcaje de apoptosis celular (Anexina V y 7AAD) .....	91
3.3 Determinación de la proliferación celular .....	92

4. Análisis de expresión de citocinas y factores de transcripción .....	92
4.1 PCR semicuantitativa a tiempo real .....	92
4.2 Análisis de citocinas por ELISA .....	96
5. Modelo murino de hipersensibilidad retardada inducida por Ovoalbúmina .	96
6. Análisis histológicos y tinción inmunohistoquímica (IHC) .....	97
7. Expresión de variantes de CD5 y CD6 en células Daudi y análisis del transcriptoma. ....	98
8. Análisis estadístico .....	100
IV. RESULTADOS .....	101
1. Generación y caracterización fenotípica de la línea de ratones OT-II <i>Cd6<sup>-/-</sup></i>	103
2. Análisis de la activación <i>in vitro</i> antígeno-específica de esplenocitos OT-II <i>Cd6<sup>-/-</sup></i> y OT-II <i>Cd6<sup>+/+</sup></i> . ....	108
3. Estudio de la función inmunomoduladora <i>in vivo</i> de CD6 en el modelo de hipersensibilidad retardada (DTH) inducida por ovoalbúmina.....	117
4. Análisis de la activación antígeno-específica de células T CD4 <sup>+</sup> OT-II <i>Cd6<sup>-/-</sup></i> y OT-II <i>Cd6<sup>+/+</sup></i> mediante la formación <i>in vitro</i> de conjugados T-APC.....	122
5. Análisis de la expresión de CD6 en subpoblaciones linfocitarias B de sangre periférica de adultos y recién nacidos. ....	129
6. Análisis del perfil transcriptómico resultante de la expresión de CD6 en células Daudi .....	131
7. Análisis del perfil transcriptómico resultante de la expresión de las isoformas Ala471 y Val471 de CD5 en células Daudi.....	136
V. DISCUSIÓN.....	147
1. Análisis las propiedades inmunomoduladoras de CD6 en condiciones de estimulación fisiológica antígeno-específica tanto <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .....	149
2. Analizar cambios en el perfil transcriptómico de células linfoides inducidos por la expresión de variantes funcionalmente relevantes de CD5, así como por la expresión de CD6. ....	164
VI. CONCLUSIONES .....	172
VII. REFERENCIAS .....	176

## **ABREVIATURAS**



<b>aa</b>	Aminoácido
<b>AcMo</b>	Anticuerpo Monoclonal
<b>ADNc</b>	ADN complementario
<b>AICD</b>	Muerte inducida por activación celular ( <i>Activation-Induced Cell Death</i> )
<b>Ala</b>	Alanina
<b>ALCAM</b>	<i>Activated leukocyte adhesion molecule</i> (CD166/ALCAM)
<b>ALL</b>	Leucemia linfocítica aguda ( <i>Acute lymphocytic leukemia</i> )
<b>ALR</b>	<i>Aim-2-like receptors</i>
<b>AP-1</b>	Proteína activadora 1 ( <i>Activator protein 1</i> )
<b>APC</b>	Célula presentadora de antígeno ( <i>Antigen Presenting Cell</i> )
<b>AR</b>	Artritis Reumatoide
<b>ARNss</b>	Ácido ribonucleico de cadena sencilla
<b>ARNds</b>	Ácido ribonucleico de cadena doble
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>BCR</b>	Receptor de células B ( <i>B-cell receptor</i> )
<b>BMDC</b>	Células dendríticas derivadas de médula ósea ( <i>bone marrow-derived dendritic cells</i> )
<b>Breg</b>	Célula B reguladora ( <i>Regulatory B cell</i> )
<b>CK2</b>	<i>Casein kinase 2</i>
<b>CIA</b>	Artritis inducida por colágeno ( <i>Collagen-induced arthritis</i> )
<b>CFSE</b>	<i>Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester</i>
<b>cSMAC</b>	<i>Central supramolecular activation complex</i>
<b>CTLA-4</b>	Proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos ( <i>cytotoxic T lymphocyte antigen 4</i> )
<b>CpG</b>	Dinucleótidos de citosina y guanina metilados
<b>CU</b>	Colitis Ulcerosa
<b>DAMP</b>	<i>Damage-associated molecular pattern</i>
<b>DC</b>	Células dendríticas ( <i>Dendritic cell</i> )
<b>DP</b>	Doble positivo
<b>DN</b>	Doble negativo
<b>EAE</b>	Encefalomiелitis Autoinmune Experimental ( <i>Experimental autoimmune encephalitis</i> )
<b>EC</b>	Enfermedad de Crohn
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EM</b>	Esclerosis Múltiple
<b>ESSDAI</b>	<i>EULAR Sjögren's syndrome disease activity index</i>
<b>GADPH</b>	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
<b>GADS</b>	Proteína adaptadora relacionada con Grb2

<b>GO</b>	<i>Gene ontology</i>
<b>GST</b>	Glutación S-transferasas
<b>GWAS</b>	<i>Genome-wide association study</i>
<b>h</b>	horas
<b>hCD5</b>	<i>Human CD5</i>
<b>HPRT-1</b>	<i>Hypoxanthine phosphoribosyl transferase 1</i>
<b>HMGB-1</b>	<i>High mobility Group box 1</i>
<b>i.d.</b>	intradérmico
<b>IFN</b>	interferón
<b>Ig</b>	Inmunoglobulina ( <i>Immunoglobulin</i> )
<b>IL</b>	Interleucina ( <i>Interleukin</i> )
<b>ILC</b>	Células linfoides innatas
<b>IMID</b>	<i>Immune-mediated inflammatory disease</i>
<b>i.p.</b>	Intraperitoneal
<b>ITAM</b>	Motivo de activación basado en inmunorreceptores de tirosina ( <i>Immunoreceptor-tyrosine-based activation motif</i> )
<b>ITIM</b>	Motivo de inhibición basado en inmunorreceptores de tirosina ( <i>Immune-mediated inflammatory disease</i> )
<b>KO</b>	<i>Knock-out</i>
<b>L</b>	Litro
<b>LAG3</b>	<i>Lymphocyte-activation gene 3</i>
<b>LDL</b>	Lipoproteínas de baja densidad
<b>LES</b>	Lupus eritematoso sistémico
<b>LLC</b>	Leucemia linfática crónica
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido ( <i>Lipopolysaccharide</i> )
<b>LTA</b>	Ácido lipoteicoico ( <i>Lipoteichoic acid</i> )
<b>mAb</b>	<i>Monoclonal Antibody</i>
<b>MAMP</b>	<i>Microbial-associated molecular pattern</i>
<b>MAPK</b>	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
<b>MHC</b>	<i>Major histocompatibility complex</i>
<b>min</b>	minuto
<b>MTOC</b>	<i>Microtubule organizing centre</i>
<b>MPO</b>	<i>Myeloperoxidase</i>
<b>NFAT</b>	<i>Nuclear factor of activated T cells</i>
<b>NFκB</b>	<i>Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
<b>NK</b>	Linfocitos asesinos naturales ( <i>Natural killer</i> )
<b>NKT</b>	Linfocitos T asesinos naturales ( <i>natural killer T lymphocytes</i> )
<b>NLR</b>	<i>NOD-like receptor</i>

<b>PAMPs</b>	Patrones moleculares asociados a patógenos ( <i>Pathogen associated molecular pattern</i> )
<b>PBMC</b>	Células mononucleares de sangre periférica ( <i>Peripheral blood mononuclear cell</i> )
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino ( <i>Phosphate buffered saline</i> )
<b>PD-1</b>	<i>Programmed cell death 1</i>
<b>PD-L1</b>	<i>Programmed cell death ligand 1</i>
<b>PFA</b>	paraformaldehído
<b>PKC</b>	<i>Protein kinase C</i>
<b>PLC</b>	<i>Phospholipase C</i>
<b>PRR</b>	<i>Pattern recognition receptor</i>
<b>RLR</b>	<i>RIG-I-like receptor</i>
<b>rshCD5</b>	Proteína recombinante soluble humana CD5
<b>rshCD6</b>	Proteína recombinante soluble humana CD6
<b>RT-qPCR</b>	<i>Real-time quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>sCD5</b>	Forma soluble de CD5
<b>sCD6</b>	Forma soluble de CD6
<b>Ser</b>	Serina
<b>SF</b>	<i>Superfamily</i>
<b>SI</b>	Sistema inmunitario
<b>SIRS</b>	Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica
<b>SLP-76</b>	Proteína leucocitaria de 76 kDa que contiene el dominio SH2
<b>SNP</b>	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
<b>SP</b>	Simple positivo
<b>SR</b>	<i>Scavenger receptor</i>
<b>SRCR-SF</b>	Superfamilia de receptores de tipo <i>scavenger</i> , carroñeros o basureros, ricos en cisteína ( <i>Scavenger Receptor Cysteine-Rich Superfamily</i> )
<b>SSp</b>	Síndrome de Sjögren primario
<b>TA</b>	Temperatura ambiente
<b>T<sub>CM</sub></b>	Célula T memoria central
<b>TCR</b>	Receptor de células T ( <i>T-Cell Receptor</i> )
<b>T<sub>EM</sub></b>	Célula T memoria efectora
<b>TGF</b>	<i>Transforming growth factor</i>
<b>Th</b>	Linfocitos T cooperadores ( <i>T helper</i> )
<b>Thr</b>	Treonina
<b>TIL</b>	<i>Tumor-infiltrating lymphocyte</i>
<b>TIM3</b>	<i>Mucin-domain containing-3</i>
<b>TLR</b>	Receptores de tipo Toll ( <i>Toll-like receptors</i> )

<b>TNF</b>	<i>Tumor necrosis factor</i>
<b>T<sub>reg</sub></b>	Células T reguladoras ( <i>Regulatory T cell</i> )
<b>TSA<sub>d</sub></b>	Proteína adaptadora específica de células T
<b>Tyr</b>	Tirosina
<b>Zap-70</b>	Proteína cinasa de 70kDa asociada a la cadena zeta ( <i>Zeta-chain associated protein kinase-70</i> )
<b>Val</b>	Valina
<b>VIH</b>	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
<b>WB</b>	<i>Western Blot</i>
<b>WT</b>	<i>Wild type</i>

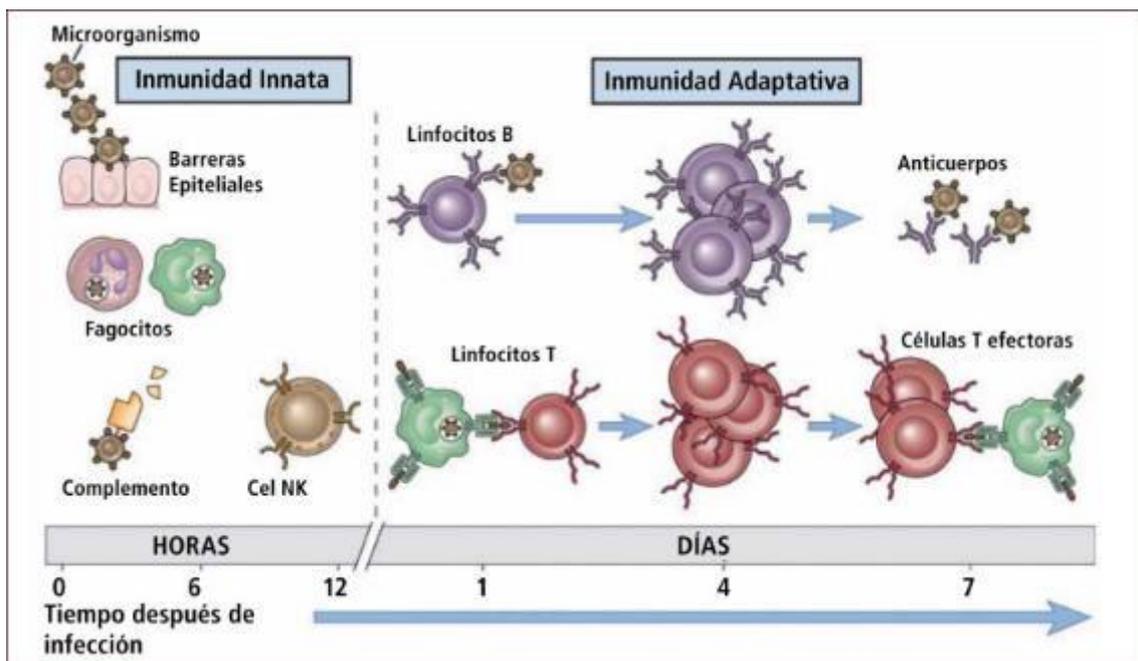


# **I. INTRODUCCIÓN**



## 1. El sistema inmunitario

El Sistema inmunitario (SI) es el encargado de mantener la homeostasis o equilibrio interno del individuo frente a agresiones tanto externas (p.ej., infecciones) como internas (p.ej., tumores). Se subdivide en SI innato, natural o inespecífico y SI adaptativo, adquirido o específico. Mientras que el SI innato está operativo desde el nacimiento (es congénito), el adaptativo se pone en marcha tras el contacto con los antígenos, pero no estará disponible hasta el cabo de unos días (es de respuesta adquirida). Ambos sistemas se relacionan estrechamente, mediante una compleja red de interacciones que permiten su funcionamiento de forma coordinada en la defensa del organismo (**Figura I-1**). Así, el SI innato emitirá señales de peligro que activarán el SI adaptativo y éste, una vez operativo, potenciará las respuestas mediadas por el SI innato.



**Figura I-1. Principales componentes celulares y moleculares del Sistema inmunitario innato y adaptativo.**

Fuente: Adaptado del libro de texto Abbas et al: *Cellular and Molecular Immunology 6e* - [www.studentconsult.com](http://www.studentconsult.com).

### 1.1 Inmunidad innata

El SI innato es la primera línea de defensa del huésped gracias a que se compone de mecanismos celulares y moleculares preformados, los cuales se activan de manera rápida (pocos minutos/horas) y preceden a los del SI adaptativo. Una característica del SI innato es la baja o nula especificidad, ya que reconoce estructuras moleculares comunes entre distintos agentes patogénicos, pero no aquellas diferencias sutiles o específicas de cada uno de ellos. El SI innato se compone de barreras cutáneo-mucosas (epitelios, enzimas, mucus, saliva, sudor, pH ácido gástrico, etc.), células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos, células dendríticas), células mediadoras de reacciones inflamatorias (mastocitos, basófilos, eosinófilos) y linfocitos de tipo innato (linfocitos *Natural Killer* o NK, linfocitos NKT, linfocitos  $T\gamma\delta$ , células linfoides innatas o ILC) (Basset et al., 2003). Por su parte, entre los elementos humorales encontramos el sistema del complemento, reactantes de fase aguda, péptidos antimicrobianos, citocinas y quimiocinas.

El reconocimiento de estructuras microbianas por parte del SI innato se establece a través de receptores denominados PRRs (del inglés *Pattern Recognition Receptor*), presentes en la superficie o en el interior de determinados tipos celulares, o bien, en forma soluble en el suero sanguíneo y/o líquidos extracelulares. Dichos PRRs están especializados en el reconocimiento de los denominados MAMPs (del inglés *Microbial-Associated Molecular Patterns*) que son estructuras moleculares altamente conservadas, compartidas por distintos tipos de microorganismos, fundamentales para la supervivencia de éstos y ausentes en el hospedador (Chu & Mazmanian, 2013). Ejemplos de MAMPs son, el lipopolisacárido (LPS) de las bacterias Gram-negativas, el peptidoglicano (PGN) y el ácido lipoteicoico (LTA) de las bacterias Gram-positivas, los mananos y  $\beta$ -glucanos de los hongos, los ácidos ribonucleicos de cadena sencilla o doble (ARNss, ARNd) de los virus, o islas de dinucleótidos de citosina y guanina metilados (CpG) abundantes en el ADN bacteriano, pero escasos en el ADN de vertebrados, entre otros. Además, los PRRs también reconocen estructuras del propio organismo que se liberan como consecuencia de daño tisular asociado a procesos inflamatorios, infecciosos o de estrés celular. Dichas estructuras propias se denominan DAMPs (del inglés *Damage-Associated Molecular Patterns*) y entre ellas encontramos proteínas de shock térmico, HMGB-1 (del inglés *high mobility Group box 1*), ácido úrico, ácido hialurónico o ATP.

Los PRRs se encuentran expresados en un amplio espectro de tipos celulares que incluyen neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, células endoteliales, células epiteliales y linfocitos. Dentro de los PRRs encontramos receptores pertenecientes a diferentes familias estructurales como son los receptores tipo *Toll* (TLRs) (Kopp & Medzhitov, 1999), receptores tipo NOD (NLRs o *NOD-like receptors*) (Platnich & Muruve, 2019), receptores tipo RIG (RLRs o *RIG-like receptors*) (Kato et al., 2006), receptores tipo AIM2 (*Aim-2-like receptors* o ALRs) (Bürckstümmer et al., 2009), receptores tipo lectina (*C-type lectin receptors* o CLR) (Flühmann et al., 1995) y receptores tipo *Scavenger* (Kigerl et al., 2014). Algunos de estos receptores son proteínas de secreción o se expresan en la superficie celular (receptores tipo *scavenger* y algunos TLRs), lo que facilita la vigilancia del entorno extracelular. Otros receptores se expresan intracelularmente (receptores tipo NOD o RLR) y facilitan la vigilancia del medio interno. La activación de estos PRRs conduce a la producción de mediadores inflamatorios que ayudan a eliminar los patógenos o a restaurar la homeostasis del medio celular (interno o externo), lo que subsecuentemente amplifica la respuesta inmunitaria innata y activa la respuesta adaptativa. No obstante, la activación persistente o crónica de estos receptores puede causar enfermedades inflamatorias o autoinmunitarias.

### 1.1.1 Receptores tipo *Scavenger*

Los receptores *scavenger* (SR) son un grupo estructuralmente muy heterogéneo de receptores solubles o unidos a membrana, que fueron descubiertos inicialmente por su importante papel en la endocitosis y la degradación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) modificadas, así como en la diferenciación de los macrófagos y la inflamación crónica asociada a la aterosclerosis. Actualmente, los SR se clasifican en doce clases estructuralmente diferenciadas, con muy poca o ninguna homología entre sí y designadas de la A a la L (**Figura I-2**). En mayor o menor medida, los SR muestran afinidad por ligandos similares como lipoproteínas, fosfolípidos, ésteres de colesterol, células apoptóticas, carbohidratos, proteoglicanos y ferritina, considerándose una subclase importante de PRRs (Ashraf & Sahu, 2012). Estos receptores intervienen en diversos mecanismos celulares que incluyen la adhesión, la endocitosis, la fagocitosis, el transporte y señalización, que conduce a la eliminación de sustancias degradadas o dañinas (PrabhuDas et al., 2014). Entre los SR se encuentra un grupo estructuralmente

homogéneo (aunque funcionalmente heterogéneo) de receptores, caracterizados por la presencia de una o varias repeticiones de un dominio extracelular de 90-110 aminoácidos denominados SRCR (del inglés *Scavenger Receptor Cysteine-Rich*) (Sarrias et al., 2004). Entre los receptores SR con dominios SRCR se encuentran miembros de la clase A y de la clase I, que se expresan tanto en células hematopoyéticas (p.ej., macrófagos y linfocitos) o no hematopoyéticas (p.ej., epitelios de los tractos digestivo, respiratorio y urinario) (Sarrias et al., 2007). Son objetivo de estudio en esta Tesis Doctoral, los receptores SR linfocitarios CD5 y CD6 que se caracterizan por su pertenencia a la clase I y que serán descritos en detalle más adelante (ver apartados 2 y 3 de esta Introducción).

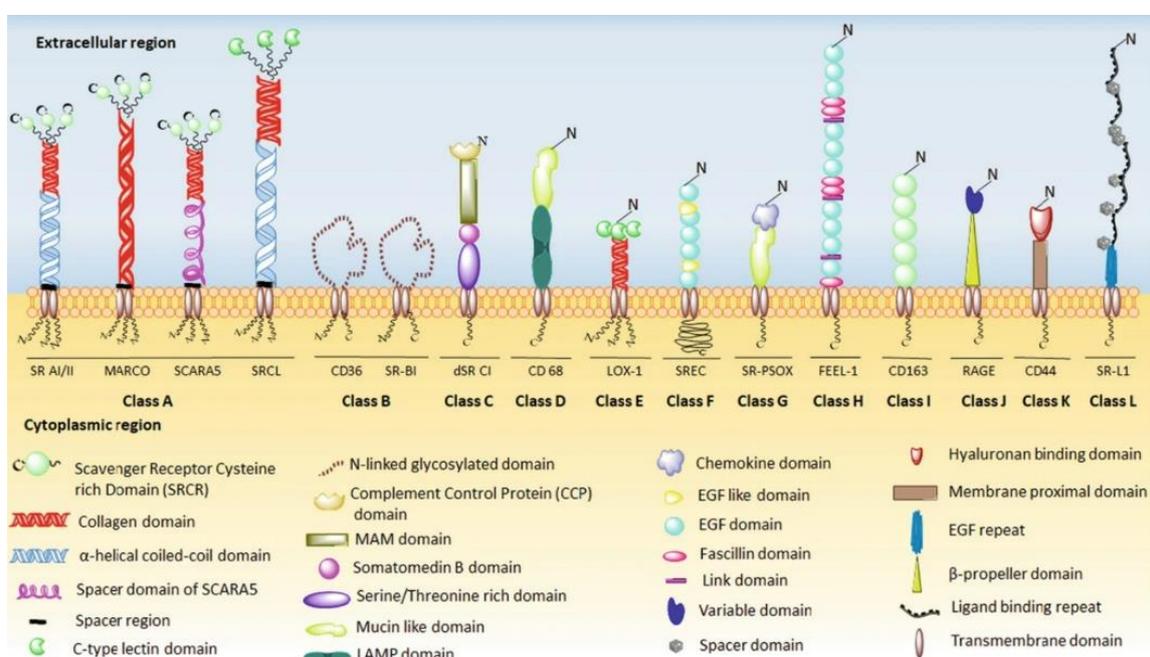


Figura I-2. Representación esquemática de diferentes clases de SR y sus características estructurales. Fuente: Lokhande et al. 2019.

## 1.2 Inmunidad adaptativa

Las respuestas del SI adaptativo (específico o adquirido) son más tardías que las del innato, y se caracterizan por su alta especificidad frente al reconocimiento de estructuras propias y extrañas. Dicho reconocimiento implica una interacción estrechamente regulada entre diferentes tipos celulares: células presentadoras de antígenos (APC, del inglés *Antigen Presenting Cell*) como son las células dendríticas y macrófagos y también las células dotadas de receptores clonotípicos y específicos de

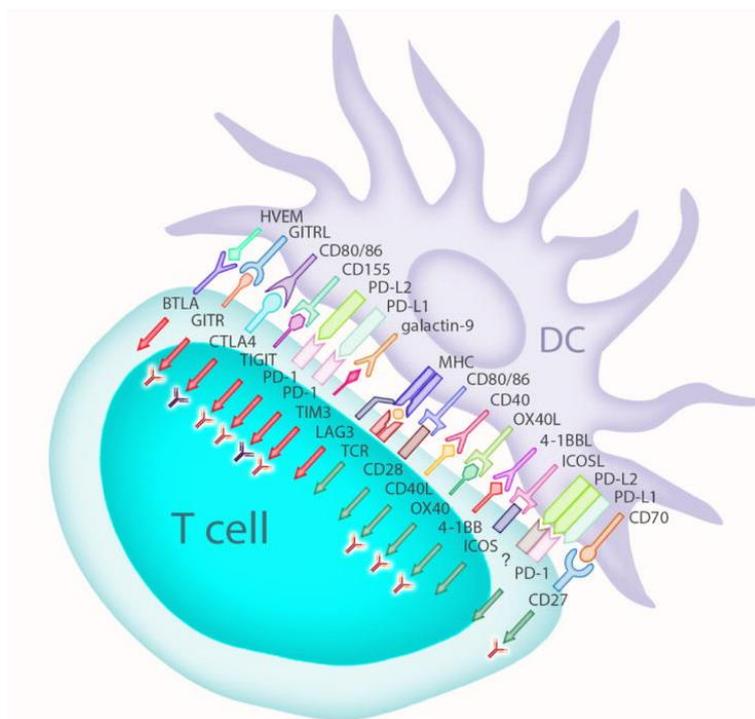
antígeno como los linfocitos T y B, que facilitan las vías efectoras inmunológicas específicas de los patógenos, la generación de memoria inmunológica y la regulación de la homeostasis inmunitaria del huésped. Los linfocitos T y B se desarrollan en los órganos linfoides primarios (timo y médula ósea, respectivamente) y se activan en los órganos linfoides secundarios (ganglios linfáticos y bazo). En los órganos linfoides primarios se genera el repertorio de reconocimiento linfocitario mediante recombinaciones de genes que codifican las cadenas de los receptores de las células T (*T-cell receptor* o TCR  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ) o de las células B (*B-cell receptor* o BCR *heavy* y *light chains*) que son exclusivos y específicos (clonotípicos) de cada linfocito T y B.

Las células B y T maduras y *naïve* son portadoras del receptor clonotípico para células T (TCR) o B (BCR) y que tras el reconocimiento de un antígeno concreto, se activan y se diferencian, por un lado, en células efectoras de vida media corta encargadas de la producción de anticuerpos (células B plasmáticas), la citotoxicidad (células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas) y la secreción de citocinas (células T CD4<sup>+</sup> colaboradores) y, por otro, en células quiescentes de vida media larga (células memoria) que quedarán disponibles para futuros encuentros con el mismo antígeno. Dichos encuentros dan lugar a las llamadas respuestas inmunitarias secundarias, en las que las células memoria se activan rápidamente para producir una respuesta protectora más rápida, de mayor magnitud y más especificidad que la del primer encuentro (respuesta inmunitaria primaria).

Las respuestas inmunitarias adaptativas pueden ser: 1) de tipo humoral, mediadas por los linfocitos B y caracterizadas por la producción de anticuerpos, o 2) de tipo celular mediadas por linfocitos T y caracterizadas por la producción de citocinas y de fenómenos de citotoxicidad (Bonilla & Oettgen, 2010). Para que ambos tipos de respuestas se pongan en marcha, primero se necesita el reconocimiento específico de antígenos por receptores clonotípicos de los linfocitos B (BCR) y T (TCR), respectivamente, que dará lugar a la llamada “primera señal”. Acto seguido, la participación de receptores o moléculas adicionales denominadas accesorias o co-señalizadoras darán lugar a la llamada “segunda señal” imprescindible para que los linfocitos se activen y diferencien en células B efectoras productoras de anticuerpos (células plasmáticas) o células T efectoras citotóxicas o productoras de citocinas (linfocitos T citotóxicos o CD8<sup>+</sup> y colaboradores o CD4<sup>+</sup>, respectivamente).

### 1.2.1 Moléculas co-señaladoras

Las moléculas co-señaladoras constituyen puntos de control inmunitario que permiten modular la duración y/o intensidad de las primeras señales generadas por el TCR o el BCR y/o participar en la estabilización de las interacciones entre los linfocitos B con los linfocitos T por un lado y de los linfocitos T y las APC por otro, que darán lugar a la activación linfocitaria B y T, respectivamente (Shaw & Dustin, 1997). Son receptores de membrana que transmiten señales intracelulares a la célula T, para modular positivamente (co-estimuladoras) o negativamente (co-inhibidoras) la señalización procedente del TCR/CD3 (**Figura I-3**). La integración de señales co-estimuladoras y co-inhibidoras, determinan la naturaleza de las respuestas inmunitarias (Liechtenstein et al., 2012). Estos receptores co-señaladores se han descrito en diferentes tipos celulares, participando tanto de la inmunidad innata como adaptativa (Shibru et al., 2021).



**Figura I-3. Esquema de las principales moléculas co-señaladoras implicadas en la regulación de la activación de las células T.** Flechas rojas indican señales inhibitorias y flechas verdes indican señales de activación del TCR. Los anticuerpos de color rojo indican ensayos clínicos para el cáncer realizados con esas vías de señalización y los anticuerpos más oscuros indican uso clínico de esas vías de señalización. Fuente: Wykes & Lewin. 2018.

Los estudios sobre la función activadora o inhibidora de las moléculas co-señalizadoras han puesto de manifiesto el importante papel que desempeñan en la activación linfocitaria y en la eficacia de la respuesta inmunitaria, así como en la patogénesis de las enfermedades infecciosas, autoinmunitarias y el cáncer. Por ejemplo, CD28 es una molécula co-estimuladora que se encuentra expresada constitutivamente en todos los linfocitos T. Sus ligandos son CD80 y CD86 expresados en APCs, y la sumatoria de interacciones y señalizaciones mediadas por el TCR y CD28 da lugar a la activación de NFAT, AP-1 y NF- $\kappa$ B, que promueven la transcripción importantes genes para la respuesta inmunitaria, como los implicados en la proliferación linfocitaria y la secreción de citocinas (Collins et al., 2002). Sin embargo, en ausencia de la co-estimulación de CD28, la activación de NFAT es mayor que la de AP-1 (o cuando no ocurre la cooperación de estas moléculas), lo que conduce a un aumento de expresión génica asociada a la anergia de las células T (Macián et al., 2002). Así, se activa la expresión de receptores con función inhibidora, como CTLA-4 (del inglés *cytotoxic T lymphocyte antigen 4*), que se une de forma competitiva a los ligandos CD80 y CD86 y evita la activación excesiva de la célula T y como consecuencia, previene fenómenos de autoinmunidad no deseados (Qn et al., 2019).

Actualmente, existen terapias combinadas incluyendo como *target* los receptores PD1 (del inglés *programmed cell death protein 1*) y CTLA-4, demostrando ser más eficaz que cualquiera de las dos terapias por separado para el tratamiento del melanoma (Larkin et al., 2015). Así como su demostrado éxito en el tratamiento del cáncer, existen estudios que sugieren la importancia de estos receptores en el tratamiento de diferentes enfermedades infecciosas en las cuales no ha sido posible el desarrollo de una vacuna eficaz, como la malaria (bloqueo de PD-L1 (Butler et al., 2011), la infección por el VIH (ej. anti-PD1 o anti-CTLA-4 (Rasmussen et al., 2017)) y la tuberculosis (Bloqueo de TIM3 (Jayaraman et al., 2016)). No obstante, hay que reconocer que el bloqueo de los puntos de control inmunitarios también puede provocar efectos adversos relacionados con el sistema inmunitario, ya que CTLA-4, PD1, LAG3 y TIM3 también participan en la regulación y mantenimiento de la tolerancia periférica (Wykes & Lewin, 2018).

Los receptores linfocitarios CD5 y CD6 sobre los que versa esta Tesis Doctoral, aparte de su función PRRs como miembros que son del grupo de receptores SR, también son moléculas co-señalizadoras que tienen la capacidad de modular la activación

linfocitaria. En consecuencia, CD5 y CD6 se posicionan como posibles dianas terapéuticas, tanto en patologías en las que conviene potenciar la respuesta inmunitaria (infección y cáncer) como en las que es necesario atenuarla (autoinmunidad, trasplante, alergia).

## 2. CD6

CD6 fue una de las primeras moléculas de superficie de las células T en ser identificadas y caracterizadas. Más concretamente, CD6 se descubrió en 1981 gracias al anticuerpo monoclonal (AcMo) 12.1 que reconocía a un antígeno de diferenciación linfocítica presente en células T normales y células B de leucemias linfática crónica y linfomas (Kamoun et al., 1981). Diez años más tarde, se aisló por primera vez el ADNc de CD6 (aunque incompleto) de una leucemia de células T (HPB-ALL), caracterizándose su patrón de expresión tisular, así como su adscripción a la superfamilia de receptores con dominios SRCR (Aruffo et al., 1991). Luego de su descubrimiento, AcMos anti-CD6 T12 se utilizaron como agentes inmunosupresores en pacientes trasplantados de médula ósea para deplecionar las células T del donante y prevenir un posible rechazo (EL et al., 1982). En 1995, el grupo de la Dra. Parnes clonó la secuencia completa del homólogo murino de CD6 a partir de la primera secuencia parcial de ADNc (Robinson, Prohaska, et al., 1995). La aparente discrepancia entre el tamaño del dominio citoplásmico de la molécula CD6 humana (44 aa) y la murina (243 aa), los llevó a utilizar la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa de ARNm de linfocitos de sangre periférica humana, logrando identificar finalmente la secuencia completa de ADNc de CD6 humano (Robinson, de Vegvar, et al., 1995).

### 2.1 Genes y estructura molecular de CD6

El receptor linfocitario CD6 es una glicoproteína de transmembrana tipo I y pertenece a los receptores con dominios ricos en cisteínas tipo *scavenger* (SRCR, *Scavenger Receptor Cysteine-Rich*) que actualmente incluye a receptores SR de clase A y clase I (PrabhuDas et al., 2014; Sarrias et al., 2004). CD6 tiene dos formas moleculares que se encuentran en un equilibrio dinámico y sólo difieren en su grado de fosforilación:

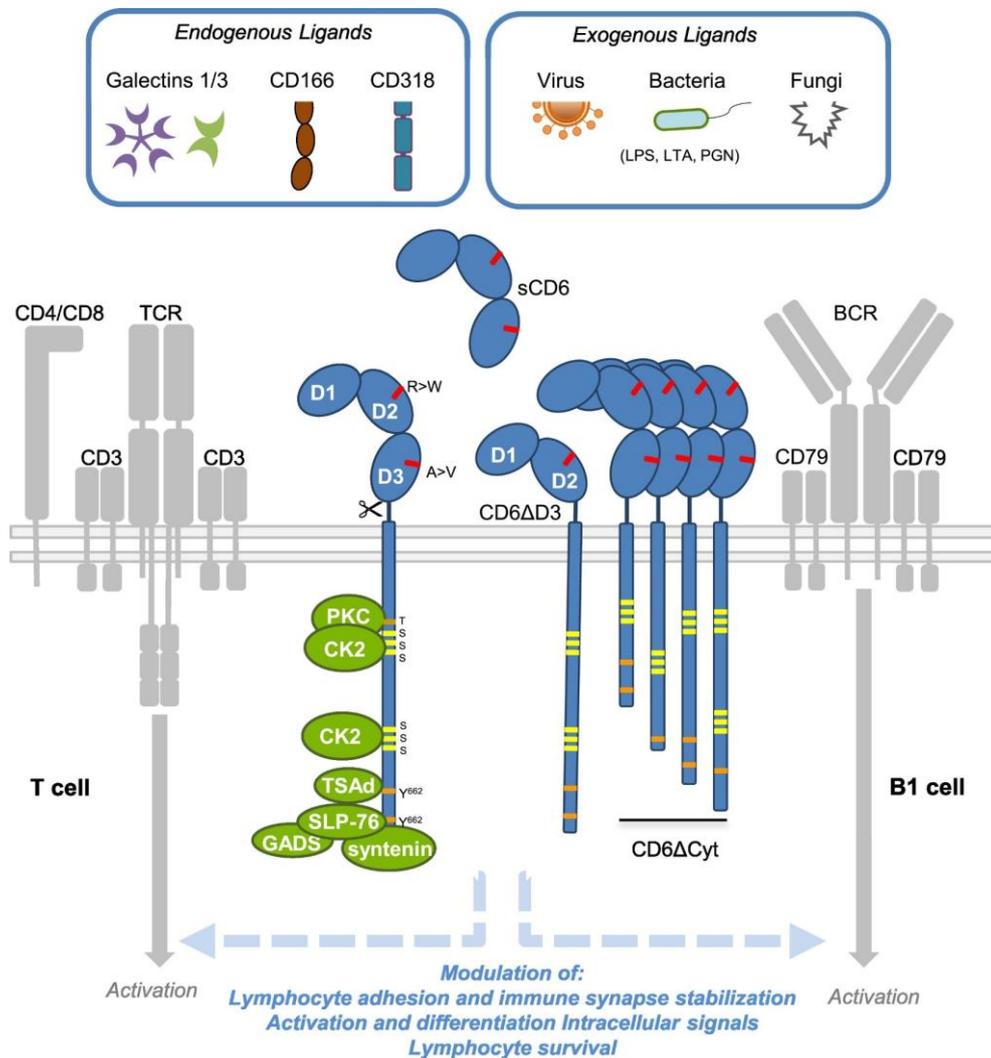
una de 105 kDa (naciente, no fosforilada) y otra de 130 kDa (madura, fosforilada) (Cardenas et al., 1990).

CD6 consta de un péptido señal (24 aa), una región extracelular (397 aa) compuesta por tres dominios SRCR consecutivos en tándem (D1, D2, D3), una región espaciadora (*stalk*) (33 aa), una región de transmembrana (26 aa) y una región citoplasmática (244 aa), aunque ésta puede ser de menor tamaño según el procesamiento alternativo de su RNA (*splicing*) (**Figura I-4**). Esta región citoplasmática no tiene actividad catalítica intrínseca, pero contiene numerosos motivos consenso de unión a proteínas implicadas en la transducción de señales (Robinson, de Vegvar, et al., 1995). En consecuencia, posee 2 motivos ricos en prolina que contienen la secuencia consenso de unión al dominio SH3, 3 motivos ricos en Ser/Thr, 3 motivos de fosforilación para la proteína cinasa C (PKC), 1 sitio de unión a dominio SH2, 10 motivos de sitio de fosforilación para caseína cinasa 2 (CK2) y 9 residuos Tyr (Bonet et al., 2013). Los residuos Ser/Thr están fosforilados de forma constitutiva y los residuos Tyr son fosforilables de forma inducible post activación del TCR (Cardenas et al., 1990).

CD6 está codificado por genes localizados en el cromosoma 11 humano (región 11q12.2) y en la región ortóloga del cromosoma 19 murino (región 19) (Padilla et al., 2000), en posición inmediatamente 5' con respecto al gen *CD5*, un gen altamente homólogo con similar patrón de expresión tisular y función (ver apartado 3 de esta introducción). Esto ha llevado a suponer que ambos genes derivan de la duplicación de un gen ancestral común (Lecomte et al., 1996). El gen *CD6* contiene al menos 13 exones (2 para el péptido señal, 3 para la región extracelular (dominios SRCR), 1 para la región *stalk*, 1 para la región transmembrana y 6 para la región citoplasmática). Procesos de *splicing* alternativo pueden dar lugar a distintas isoformas de CD6, que afectan sobre todo la región citoplasmática (M. A. Bowen et al., 1997; Robinson, de Vegvar, et al., 1995), pero también la región extracelular (Castro et al., 2007).

Se han detectado niveles circulantes de una forma soluble de CD6 (sCD6) en rangos de pico/nano molar tanto en suero humano como de ratón (Sarrias et al., 2007). Los niveles de séricos de sCD6 aumentan en pacientes con Síndrome de Sjögren primario (Ramos-Casals et al., 2001) y con síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) (Aibar et al., 2015), que se han relacionado con procesos de escisión proteolítica (*shedding*) mediados por metaloproteasas y resultantes de la activación linfocitaria de

células T (Carrasco et al., 2017), de forma similar a lo que sucede con otros receptores leucocitarios (Garton et al., 2006).



**Figura I-4. Esquema de las interacciones extracelulares e intracelulares mediadas por CD6 y sus isoformas expresado en células T y B.** CD6 se representa compuesto por tres dominios extracelulares SRCR (D1, D2 y D3), una región espaciadora (*stalk*), una región transmembrana y una cola citoplasmática. Se representan los ligandos endógenos y exógenos de CD6. También se representan sustituciones de los aminoácidos en los dominios D2 y D3 (R > W y A > V, respectivamente). El punto de escisión proteolítica que da lugar a la forma soluble de CD6 (sCD6) tras la activación linfocitaria se representa por una tijera. También se representan esquemáticamente los múltiples residuos Ser (S), Thr (T) y Tyr (Y) que pueden ser fosforilados de forma constitutiva o inducible por parte de las proteínas serin/treonin (CK2, PKC) y tirosin (Lck, Zap-70) cinasas y el posterior acoplamiento de moléculas efectoras de señalización intracelular (TSAd, SLP-76, GADS, Syntenin). Se representan las isoformas de CD6 que carecen de dominios extracelulares (CD6ΔD3) o intracitoplásmicos (CD6ΔCyt). Fuente: Consuegra-Fernández M et al. 2018.

### 2.2 Expresión tisular de CD6

CD6 se encuentra expresado en la membrana de todos los linfocitos T ( $\alpha\beta$  y  $\gamma\delta$ ). Su expresión aumenta durante el proceso de maduración de células T, donde los timocitos más inmaduros doble negativos (DN) tienen menor expresión que los doble positivos (DP), y éstos, a su vez, menos que los simple positivos (SP), siendo los timocitos SP CD4<sup>+</sup> los que expresan niveles más elevados de CD6 (Kamoun et al., 1981).

En el linaje B, CD6 se expresa sólo en una fracción de células B maduras. En humanos, se ha reportado una expresión relativamente alta de CD6 en las células B-1a de amígdalas, que a su vez expresan CD5 (CD5<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup>) (Alonso et al., 2010). En ratones, CD6 se expresa en células B-1a provenientes de sangre periférica y bazo, pero no del peritoneo (Enyindah-Asonye, Li, Xin, et al., 2017). No obstante, no existen hasta la fecha estudios detallados de la expresión de CD6 en las diferentes subpoblaciones de células B humanas.

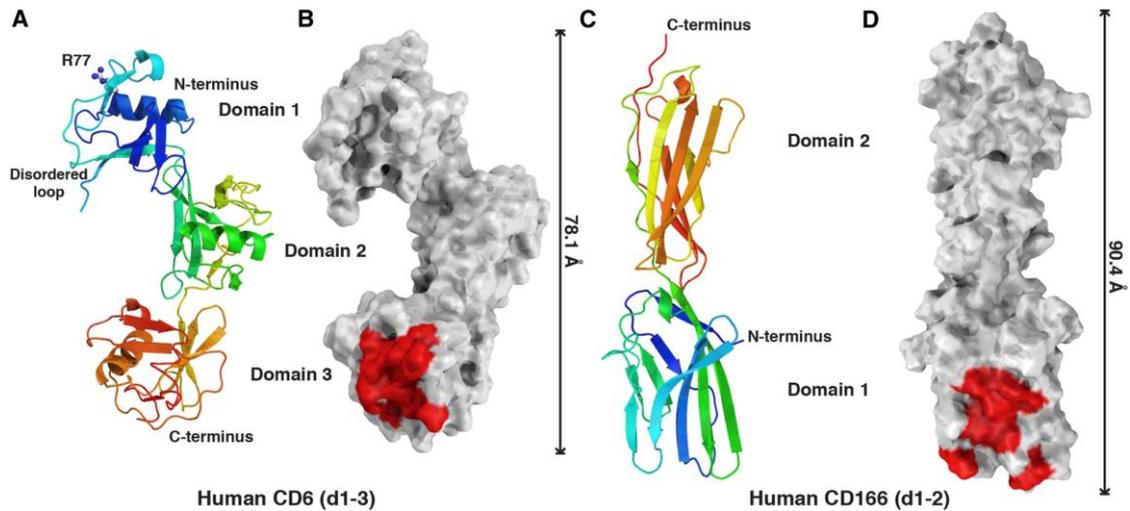
Al contrario de CD5, CD6 también se expresa en una subpoblación de células NK periféricas (CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>+</sup>), en un grupo de precursores hematopoyéticos de la médula ósea (CD34<sup>+</sup> rho123<sup>med/lo</sup>) y en algunas regiones del parénquima cerebral (Braun et al., 2011; Cortés et al., 1999; Mayer et al., 1990), pero no en células T<sub>reg</sub> humanas (García Santana et al., 2014).

Aunque existen resultados contradictorios, en los estudios recientes se observó que tras la activación *in vitro* vía TCR (con AcMos anti-CD3 y anti-CD28 o PHA) de células T humanas disminuye la expresión de CD6 en la membrana, cosa que no sucede en presencia de IL-2 (Carrasco et al., 2017) o en células efectoras de tipo Th1 y Th17 (Brück et al., 2022). Estos últimos hallazgos son importantes para el desarrollo de terapias dirigidas a CD6 y muestran una expresión diferencial de este receptor tras la activación. Algunas leucemias y linfomas B y T también expresan CD6. Al igual que CD5, el receptor CD6 se expresa en las células leucémicas de pacientes con leucemia linfocítica crónica de tipo B (LLC-B) (Kamoun et al., 1981). También, se expresa en neoplasias de células T como la leucemia linfoblástica aguda de células T (LLA-T) y el linfoma de células T (LCT), en las cuales se ha reportado una menor supervivencia asociada en los casos con expresión baja o nula de CD6 (y CD5) (Sui et al., 2022).

### 2.3 Ligandos de CD6

El ligando mejor estudiado de CD6 es CD166/ALCAM (del inglés *Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule*) (M. A. Bowen et al., 1995). CD166/ALCAM es un receptor transmembrana de tipo I perteneciente a las moléculas de adhesión de la superfamilia de las inmunoglobulinas (SF-Ig). CD166/ALCAM consta de 5 dominios Ig extracelulares (2 N-terminales del tipo V y 3 C-terminales del tipo C2), 1 dominio transmembrana hidrofóbico y 1 reducido dominio citoplasmático que se une al citoesqueleto de actina (M. A. Bowen et al., 1995). CD166/ALCAM tiene una amplia distribución tisular encontrándose expresado en linfocitos T y B activados, en diferentes tejidos epiteliales (queratinocitos y células epiteliales de los tractos mucosos digestivo, mamario, pancreático y genito-urinario), células endoteliales, fibroblastos y varios tipos de cáncer como osteosarcoma, melanoma, cáncer colorrectal, cáncer de próstata y cáncer de páncreas (M. A. Bowen et al., 1995; Chitteti et al., 2013), en los que su alta expresión se correlaciona con un mal pronóstico (van Kempen et al., 2000).

CD166/ALCAM establece interacciones moleculares adhesivas tanto homo- como hetero-fílicas. La interacción heterofílica es con CD6 y su constante de afinidad (Kd) es 100 veces mayor que las interacciones homofílicas ALCAM-ALCAM (Hassan et al., 2004). La interacción de CD6 con CD166/ALCAM se establece entre el dominio más amino terminal (D1) de CD166/ALCAM y el dominio más proximal a la membrana (D3) de CD6, mientras que la interacción ALCAM-ALCAM se hace a través de sus dominios D1 (Chappell et al., 2015; Whitney et al., 1995) (**Figura I-5**). Las interacciones ALCAM-CD6 tienen un papel crítico en la estabilización de la sinapsis inmunitaria, la activación linfocitaria y las respuestas linfoproliferativas y de diferenciación subsiguientes (Zimmerman et al., 2006), mientras que las homofílicas ALCAM-ALCAM lo tienen en la migración celular transendotelial y en procesos de metastatización (van Kempen et al., 2000).



**Figura I-5. Representación de la estructura tridimensional de los dominios extracelulares de CD6 (izquierda) y los dos dominios (D1-2) de CD166/ALCAM (derecha). En rojo se ha marcado la zona de interacción entre el dominio proximal de membrana de CD6 (D3) y el dominio distal de membrana de CD166/ALCAM (D1).** Fuente: Chappell et al. 2015.

Otros ligandos reportados para CD6 incluyen las galectinas 1 y 3 (Escoda-Ferran et al., 2014) y más recientemente CD318 (Enyindah-Asonye, Li, Ruth, et al., 2017). Las galectinas son un grupo de proteínas solubles situadas en las membranas celulares o en la matriz extracelular, poseen un dominio de 130 aa de reconocimiento de carbohidratos (CRD, del inglés *Carbohydrate-Recognition Domain*), con el cual reconocen  $\beta$ -galactósidos (Rabinovich, 1999). Pueden interactuar con glicoconjugados de la superficie celular y de la matriz extracelular (glicoproteínas y glicolípidos), a través de interacciones lectina-carbohidrato (Liu, 2005). Se expresan tanto en células inflamatorias como no inflamatorias, incluyendo monocitos, macrófagos, células dendríticas, mastocitos y células B y T. Las galectinas pueden actuar tanto a nivel intracelular como extracelular, afectando a procesos tan diversos como la adhesión celular, la señalización, la proliferación, la diferenciación y la apoptosis (Dhirapong et al., 2009). Más concretamente, se ha visto que tanto galectina 1 como 3, interaccionan con CD6 y con CD166/ALCAM, interfiriendo en la interacción CD6-CD166/ALCAM. Además, la expresión de CD6 protege a los linfocitos de la apoptosis inducida por estas galectinas (Escoda-Ferran et al., 2014).

Por su parte, CD318 es una glicoproteína de superficie celular de aproximadamente de ~140 kDa que se expresa ampliamente en las células cancerígenas,

correlacionándose su grado de expresión con la agresividad del cáncer y el potencial metastásico (Ruth et al., 2021). También, se encuentra expresado en tejidos sinoviales y participa junto a CD6 en la adhesión de las células T a los fibroblastos sinoviales, esto indicaría la importancia de la interacción entre CD318-CD6 para el diagnóstico y el tratamiento de enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple y la artritis reumatoidea (Enyindah-Asonye, Li, Ruth, et al., 2017).

Al igual que sucede con CD5 también se ha reportado la interacción de CD6 con ligandos microbianos. En este caso se trata de MAMPs constitutivos de bacterias como LPS, LTA y PGN (Martínez-Florensa et al., 2014; Sarrias et al., 2007), de virus como el *loop* V3 de gp120 del VIH-1 (Carrasco et al., 2014), de parásitos como componentes del tegumento (PSEx) de *Echinococcus granulosus* (Mourglia-Ettlin et al., 2018) y de especies fúngicas saprofitas a través de estructuras todavía no identificadas (Vera et al., 2009). Todas estas interacciones con diferentes MAMPs permiten asignar un papel adicional como receptor reconocedor de patrones moleculares asociados a microorganismos (PRR o *pattern-recognition receptor*).

## 2.4 Función de CD6

### 2.4.1 Regulación de la activación de células T y B

Se ha demostrado que el receptor CD6 está implicado en procesos de regulación de la activación y diferenciación de las células T. Esto se debe por su asociación física con el receptor clonotípico específico de antígeno de las células T, es decir, el complejo TCR/CD3 (Gimferrer et al., 2004). Los primeros estudios que identificaron el papel funcional de CD6, fueron realizados con AcMos y los más recientes con ratones *knockouts* para CD6 (*Cd6<sup>-/-</sup>*). A pesar de ser una molécula estudiada desde hace 40 años, aún se mantiene cierta incertidumbre sobre su función biológica. En 1989, estudios *in vitro* demostraron que la activación de células T mediada por AcMos anti-CD3, puede aumentar significativamente mediante señales adicionales inducidas por el ligamento de CD6 con el AcMo T12 de tipo IgM (a concentraciones 0.5 a 5 pg/mL) (Gangemi et al., 1989). En la misma línea, otro estudio realizado con células T aisladas de sangre periférica humanas activadas con PMA (*por phorbol-myristate acetate*) demostró que al adicionar el AcMo 2H1 (anti-CD6) producía aumentos significativos de la expresión del

receptor de IL-2 (CD25/IL-2R) con respecto a sólo PMA (Morimoto et al., 1988). En 1998, el grupo del Dr. Chow demostró que las células T purificadas humanas estimuladas con AcMo anti-CD28 inducía la proliferación y que esta aumentaba significativamente con la adición de diferentes concentraciones del AcMo anti-CD6 IOR-TI (Osorio, Rottenberg, et al., 1998). Este conjunto de estudios apoya la idea de que CD6 actuaría como un regulador positivo (co-estimulador) de la respuesta linfocitaria.

Cabe mencionar, que al utilizar AcMos dirigidos contra diferentes receptores de superficie se pueden generar artificialmente efectos similares a los que se producen durante el reconocimiento de antígeno por el TCR. Por ejemplo, si se ligan simultáneamente receptores como CD2 y CD4 que asocian tirosin cinasas (ej., p56lck), se fosforila el complejo TCR/CD3 de forma análoga a lo que sucede durante el reconocimiento de antígenos (Barber et al., 1989; Carmo et al., 1993). Se debe destacar que en todos los estudios descritos con AcMos, no se afectó la proliferación de células T cuando se utilizaron AcMos anti-CD6 como único estímulo. En cambio, cuando de forma simultánea se ligó CD6 y el complejo TCR/CD3, se produjo una potenciación de la respuesta, que incluía un aumento de la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular, la producción/liberación de IL-2 y, en consecuencia, de la proliferación de las células T, tal y como haría un receptor co-estimulador.

Después de estos estudios iniciales, se obtuvieron resultados contradictorios con nuevos AcMos anti-CD6 como es el caso de UMCD6. En uno de estos estudios, el AcMo UMCD6 aumentó de forma significativa la proliferación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) co-estimuladas con PMA. Incluso, observándose una potencia superior a otros AcMos reportados anteriormente (Bott et al., 1993). Dos años más tarde, el mismo grupo publicó que este AcMo UMCD6 inhibía la proliferación inducida por Toxina Tetánica (TT) (Singer et al., 1996), demostrándose una función totalmente contraria. Una posible explicación sobre estas diferencias observadas, en donde un mismo AcMo anti-CD6 puede regular positiva o negativamente la proliferación celular, es que la señalización mediada por CD6 implica la participación de diversos factores que pueden desequilibrar la balanza hacia un lado u otro (Pinto & Carmo, 2013) como consecuencia de la utilización de diferentes co-estímulos o del reconocimiento de distintos epítomos en la misma molécula.

Posteriormente, el grupo del Dr. Carmo propuso un diferente sistema experimental, en donde utilizó una línea celular T (Jurkart E6.1) que provienen de una leucemia aguda de células T y que previamente se seleccionó fracción negativa para CD6. Esta línea celular fue transducida de forma estable con el receptor CD6 humano completo. Se observó que luego de estimular con el AcMo OKT3 (anti-CD3), las células T que expresan CD6 producían tres veces menos IL-2 que las células negativas para CD6 (Oliveira et al., 2012), resultando una vez más contradictorio a los primeros estudios realizados con este receptor. Posteriormente, nuestro grupo desarrolló una línea de ratones C57BL/6N deficientes para la expresión de CD6 en membrana (*Cd6<sup>-/-</sup>*) lo que permitiría comprender los mecanismos moleculares de CD6 *in vivo*. Se aislaron células T CD4<sup>+</sup> proveniente de los bazo de ratones *Cd6<sup>-/-</sup>* y se compararon con las células de ratones *wild type* (*Cd6<sup>+/+</sup>*), después de su estimulación por 72 h en presencia de diferentes concentraciones de AcMo anti-CD3. Se observó que las células deficientes en CD6 proliferaron más, lo que indicó que este receptor tiene la capacidad de modular negativamente la activación de las células T (Orta-Mascaró et al., 2016). Esta observación fue posteriormente validada en una línea de ratones *Cd6<sup>-/-</sup>* en fondo genético DBA/1. Las células T provenientes de estos ratones se activaron con AcMos anti-CD3 y anti-CD28, y donde se observó, una proliferación reducida como consecuencia del aumento significativo de la apoptosis celular inducida por activación (AICD, Activation-Induced cell death) (Y. Li et al., 2017). Todo ello abogaría a favor de un papel regulador negativo de CD6 en la activación linfocitaria. Aunque estos estudios con ratones *Cd6<sup>-/-</sup>* parecen bastante concluyentes, también incluyen la utilización de AcMos como sistemas de estimulación. Estos sistemas se caracterizan por proporcionar condiciones supra-fisiológicas, en cuanto a la afinidad y la duración del estímulo. Por lo tanto, quedaría por reevaluar los datos en condiciones equiparables a las fisiológicas, es decir, similares a las inducidas durante el reconocimiento específico de antígenos por las células T.

Para conciliar toda la información disponible, actualmente, se postula que CD6 puede inducir efectos duales, a veces antagónicos, en las células T en función del tipo y la fuerza de las interacciones que establece tanto a través de sus dominios de tipo *scavengers* con ligandos extracelulares, así como con efectores intracelulares a través de la larga cola citoplasmática (Carmo, 2016).

A diferencia de las células T, hay poca información sobre la relevancia de la expresión y función de CD6 en las células B. Existe un estudio que indaga en la función y expresión de este receptor en células B de LLC-B) estimuladas con anti-IgM y anti-CD6, en el que se observó un efecto protector frente a la apoptosis inducida por activación (Osorio et al., 1996). Dicho efecto estaría mediado por un aumento de la relación a nivel de ARNm de bcl-2/bax. Posteriormente, el mismo grupo confirmó que tras el ligamiento de CD6 se induce la expresión de proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 en las mismas células leucémicas (Osorio, Jondal, et al., 1998). Estos datos sugieren que una interacción entre CD6 y su ligando podría contribuir a la supervivencia de la LLC-B a través de la modulación de la relación Bcl-2/Bax, disminuyendo su sensibilidad a la apoptosis y favoreciendo su anormal expansión. En línea con esta afirmación, nuestro grupo demostró que la expresión de CD6 interfiere con la apoptosis inducida por galectinas en células linfoides (Carrasco et al., 2017; Escoda-Ferran et al., 2014).

### **2.4.2 Factores extracelulares y su efecto en la señalización de CD6**

Como se ha comentado previamente, CD6 modula señales de activación y diferenciación de las células T como consecuencia de su unión a diferentes ligandos, incluidos patrones moleculares asociados a microbios (MAMPs), al igual que otros miembros de la SF-SRCR (Martínez et al., 2011). La interacción con CD166/ALCAM tiene un efecto sobre la activación celular, a través de la estabilización de la unión entre células T y APCs, y de su co-localización con el TCR/CD3 en la zona central del Complejo Supramolecular de Activación (cSMAC, por *central supramolecular activation complex*), también conocido como sinapsis inmunitaria (Gimferrer et al., 2004). Durante el reconocimiento específico de antígenos por el TCR, CD6 se concentra en el cSMAC de forma dependiente de la unión a su ligando CD166/ALCAM, expresado en la APC. Es posible que la participación de CD6 refuerce la activación de las células T de forma indirecta, ya que esta interacción CD6-ALCAM puede influir en la duración o estabilización de la sinapsis inmunitaria (IS, por *immunological synapse*). Así pues, podría preverse una función dual para CD6, de equilibrio en los procesos de adhesión y modulación de la señalización en las células T (Hassan et al., 2006).

Además, se ha observado que la activación de las células T da lugar a un aumento de la tasa de transcripción de CD6 y, concomitantemente, a la omisión (*skipping*) del exón 5, dando lugar a la expresión de la isoforma CD6 $\Delta$ D3 que, al carecer del tercer dominio SRCR de unión a CD166/ALCAM, no permite su co-localización en la IS (da Glória et al., 2014). Este hecho se ha interpretado como un posible mecanismo regulador negativo de señales de activación vía TCR/CD3 (Castro et al., 2007), aunque un estudio demostró que la capacidad inhibitoria de CD6 depende de su expresión *per se* y no se ve afectada por la de la isoforma CD6 $\Delta$ D3 (Oliveira et al., 2012).

Otro aspecto importante por considerar es que la unión de CD6 a galectinas 1 y 3 interfiere con la interacción de CD6-ALCAM en la IS y, en consecuencia, afecta la proliferación de las células T (Escoda-Ferran et al., 2014). También, dicha interacción puede estar interferida por proteínas solubles de CD6 y CD166/ALCAM (sCD6, CD6-Fc o ALCAM-Fc) o AcMos bloqueantes contra CD6 o CD166/ALCAM (Escoda-Ferran et al., 2014; Gimferrer et al., 2004; Zimmerman et al., 2006). Sin embargo, no se puede descartar los efectos estéricos en la alteración observada de la IS.

Por último, debemos considerar que no todas las moléculas de CD6 de la superficie celular están asociadas al TCR o interactuando con CD166/ALCAM durante la formación de la IS. Por lo tanto, estas moléculas pueden actuar como PRRs y contribuir a la señalización de una manera diferente, mediante el reconocimiento de determinados MAMPs (Sarukhan et al., 2016) lo que puede tener también consecuencias funcionales en la activación y diferenciación de las células T. Específicamente, en un estudio se demostró que CD6 unido a membrana es capaz de reconocer LPS y enviar señales intracelulares a través de la vía de MAPK (Sarrias et al., 2007). Asimismo, en modelos de infección intraabdominal monobacteriana y polimicrobiana por ligadura y punción cecal (CLP, por *cecal ligation and puncture*) en ratones *Cd6*<sup>-/-</sup> se observó una supervivencia disminuida, aumento de carga bacteriana y citocinas proinflamatorias, lo que indicaría un papel relevante de CD6 en la respuesta contra la infección bacteriana (Català, Velasco-de Andrés, Leyton-Pereira, et al., 2022).

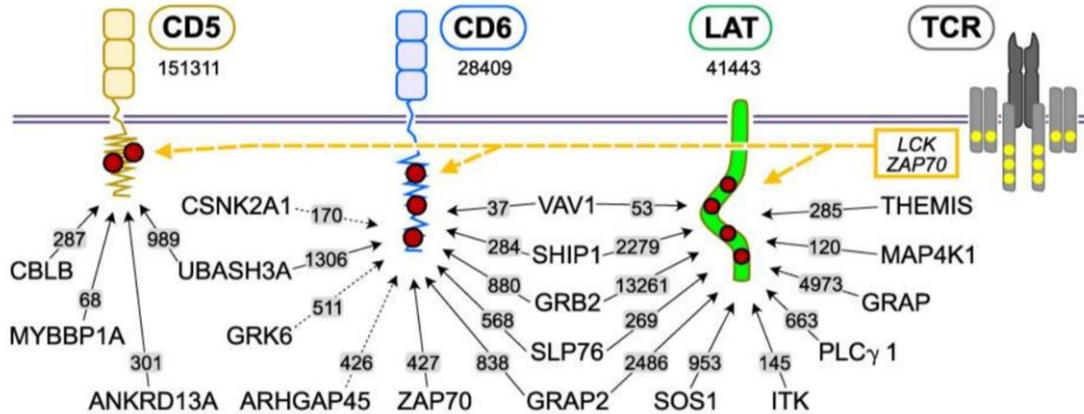
### 2.4.3 Factores intracelulares y su efecto en la señalización de CD6

CD6 es un receptor de transmembrana que tiene la capacidad de transmitir señales gracias a una larga cola citoplasmática que carece de actividad enzimática intrínseca, pero contiene residuos susceptibles de ser fosforilados por cinasas de residuos Ser/Thr (PKC, CaMKII, CK2) o Tyr (Lck, Fyn, ZAP-70) que interactúan posteriormente con moléculas efectoras de cascadas de señalización intracelular como las MAPK (Nica et al., 2003; Tarakhovsky et al., 1995). Al igual que sucede con la función de CD6, aún no está suficientemente caracterizada la vía de señalización intracelular mediada por CD6.

Mediante el ligamiento de CD6 con diferentes AcMos (161.8, SPV-L14.2 y MAE1-C10) se demostró la inducción de fosforilación de Erk1/2, p38 y JNK en linfocitos T (Ibáñez et al., 2006). También, se ha descrito que la fosforilación de los residuos de Tyr (Y622 e Y629) de la cola citoplasmática de CD6 permite el reclutamiento de efectores intracelulares como GADS/SLP-76 (Hassan et al., 2006), TSA<sub>d</sub> (adaptador específico de células T) (Hem et al., 2017) o Syntenin-1 (Gimferrer et al., 2005). A través de espectrometría de masas en tándem, se demostró que tanto en células Jurkat humanas como en células T CD4<sup>+</sup> primarias de ratón, CD6 puede iniciar las vías de señalización reclutando SLP-76, independientemente de la presencia de LAT (*Linker for activation of T cells*) (Roncagalli et al., 2014). También, se postula que la vía de señalización de CD6 es inducible por el TCR e independiente de LAT, lo que podría explicar el hallazgo de células T citotóxicas deficientes en LAT siguen siendo capaces de matar a las células diana mediante la liberación de gránulos preformados (Ou-Yang et al., 2012).

Un reciente análisis proteómico ha dilucidado los componentes del *signalosoma* de CD6 que contribuyen a la ampliación temprana de la señalización del TCR (Mori et al., 2021), en donde se confirma una serie de interacciones intracelulares con reguladores tanto positivos (SLP-76, ZAP-70, VAV1) como negativos (UBASH3A, SHIP1) mencionados en estudios previos (**Figura I-6**). Estos nuevos resultados indican que CD6 tiene la capacidad de reclutar proteínas efectoras positivas y negativas en su *signalosoma* con funciones opuestas en la activación de las células T, lo que explica las dificultades anteriores para clasificar a CD6 como co-inhibidor o co-estimulador. Sin embargo, debemos considerar que todos estos estudios también se han realizado con estímulos

supra-fisiológicos como AcMos u otros activadores de la célula T como el pervanadato, lo que podría estar distorsionando la verdadera vía de señalización utilizada en condiciones fisiológicas como consecuencia del reconocimiento específico de antígenos.



**Figura I-6. Representación de la diversificación de señales de CD5, CD6 y LAT.** Los puntos rojos representan los residuos de tirosina presentes en los segmentos intracitoplásmicos de CD5, CD6 y LAT que son fosforilados por la PTK, LCK o ZAP70 que se asocian con el TCR tras activación (flechas amarillas discontinuas). Después de 30 s de la activación del TCR, se forman diferentes *signalosomas* fosforilados en tirosina de los receptores transmembrana CD5 y CD6 y del adaptador transmembrana LAT. Se indican el número de copias por célula T de CD5, CD6 y LAT (por ejemplo, se expresan 28409 copias de CD6 por célula T) y complejos asocian a cada uno de ellos (ejemplo CD5-UBASH3A son 989). Las flechas continuas corresponden a las interacciones inducidas por el TCR, mientras que las punteadas corresponden a interacciones constitutivas. Fuente: Mori et al. 2021.

Por último, dado que muy pocas células T no expresan CD6, es posible que se logre una regulación de la función de señalizadora y el ajuste de los umbrales de activación/inhibición que ejerce esta molécula, mediante la generación de isoformas intracelulares de CD6 producidas en distintas etapas de la activación o diferenciación linfocitarias. En linfocitos humanos se han descrito múltiples isoformas por procesamiento alternativo (*splicing*) de uno o varios exones que codifican la región citoplasmática (CD6 $\Delta$ cyt) (Bonet et al., 2013; M. Bowen et al., 1997; Kureel et al., 2019).

## 2.5 Polimorfismos de CD6

A pesar de que no se han reportado hasta la fecha de individuos con expresión deficiente de la molécula CD6, sí que se han identificado polimorfismos genéticos de un único nucleótido (SNP por *single nucleotide polymorphism*) funcionalmente relevantes

que apoyan su papel inmunomodulador. El gen *CD6* ha sido identificado recientemente como un locus de susceptibilidad para esclerosis múltiple (EM). Dicha susceptibilidad está ligada a un polimorfismo localizado en el intrón 1 (rs17824933, C>G) responsable de un *splicing* alternativo por el que se genera una isoforma de CD6 (CD6 $\Delta$ D3) que carece del dominio de interacción con CD166/ALCAM (M. Kofler et al., 2016). A pesar de no haber diferencias de la expresión total de CD6 en la membrana linfocitaria entre sujetos homocigotos GG e individuos CC, se ha descrito que los primeros tendrían una expresión relativa disminuida de la isoforma *wild type* y que sería compensada por un aumento en la expresión de la isoforma CD6 $\Delta$ D3. También se asocian a EM dos SNPs sinónimos, rs11230563C (C>T, R225W) y rs2074225C (T>C A257V), que introducen cambios aminoacídicos en el segundo dominio SRCR (D2) de CD6. El haplotipo protector (CC) correspondiente a estos dos SNPs se caracteriza por una expresión aumentada de CD6 en células T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup> y NKT (Swaminathan et al., 2013). Estudios posteriores han demostrado que estos polimorfismos de *CD6* también actúan como factores de susceptibilidad o como modificadores de enfermedad en otros procesos autoinmunitarios como la enfermedad de Behçet (Zheng et al., 2016), Enfermedad Inflamatoria Intestinal (Casadó-Llombart, Velasco-de Andrés, et al., 2022; Ellinghaus et al., 2016) y Psoriasis (Consuegra-Fernández, Julià, et al., 2018). Los SNPs de *CD6* están señalados en la **Figura I-4**.

Ratones *Cd6*<sup>-/-</sup> de dos fondos genéticos diferentes (C57BL/6 o DBA-1) presentan formas atenuadas o exacerbadas de enfermedades autoinmunitarias experimentales en función del modelo de enfermedad (encefalomielitis autoinmune experimental, artritis inducida por colágeno, uveítis autoinmune, lupus-like inducido por la enfermedad crónica de injerto contra huésped o psoriasis inducida por imiquimod) (Consuegra-Fernández, Isamat, et al., 2017; Consuegra-Fernández, Julià, et al., 2018; Y. Li et al., 2017; Orta-Mascaró et al., 2016). Incluso, considerando la misma cepa C57BL/6 de ratones *Cd6*<sup>-/-</sup> se puede observar este contraste: atenuada encefalomielitis autoinmune experimental (EAE) y exacerbada artritis inducida por colágeno (CIA) (Orta-Mascaró et al., 2016) o o lupus-like inducido por enfermedad crónica de injerto contra huésped (Consuegra-Fernández, Martínez-Florensa, et al., 2017). Esto indicaría que CD6 podría desempeñar diferentes funciones en distintos modelos de enfermedad autoinmunitaria.

También se ha descrito el SNP rs12360861, G>A en el exón 5 que codifica el dominio SRCR D3, en donde individuos AA tienen 3 veces menos riesgo a desarrollar EM que los sujetos GG (Wagner et al., 2014). Además, se observó una menor expresión de ARNm de CD6 en pacientes que en individuos sanos. Este SNP también afecta la interacción de CD6 y CD166/ALCAM. De hecho, favorece la isoforma que carece del dominio 3 (CD6 $\Delta$ D3) (como ocurre con en el SNP rs17824933) y en este caso, sería un factor protector frente el desarrollo de EM, ya que la menor unión entre CD6 y CD166/ALCAM interferiría la transmigración de linfocitos T CD4<sup>+</sup> autorreactivos al sistema nervioso central. De manera análoga, se ha descrito que individuos homocigotos TT para el SNP rs12288280 (G>T) presentan un menor riesgo de neuromielitis óptica en una población asiática (Park et al., 2013).

Un estudio publicado recientemente, detalla diferentes SNPs de *CD6* rs17824933, rs11230563 y rs12360861 descritos en el síndrome de Sjögren primario (SSp). Los resultados indican la asociación entre el SNP rs17824933C con neutropenia, mientras que el SNP rs11230563T con un leucopenia y neutropenia exacerbada, pero con una disminución del índice de ESSDAI (del inglés *EULAR Sjögren's Syndrome Disease Activity Index*) de afectación del sistema nervioso periférico. Dado que ambos alelos afectan a la región extracelular de CD6, el SNP rs17824933 se relaciona a un aumento de la expresión de la isoforma CD6 $\Delta$ D3 y el SNP rs11230563 a una sustitución de Arg225 por Trp en el dominio SRCR D2. El haplotipo rs17824933<sup>G</sup>-rs11230563<sup>C</sup>-rs12360861<sup>G</sup> se asoció con ESSDAI de afectación cutánea (Casadó-Llombart, Gheitasi, et al., 2022).

También se han evaluado SNPs de *CD6* en pacientes con enfermedades inflamatorias del intestino (EII) como la enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerosa (CU). El análisis no observó ninguna asociación de SNPs individuales con la susceptibilidad a estas enfermedades. Sin embargo, si se observó asociación de rs17824933 y rs12360861 con localización ileal y pronóstico, respectivamente, en pacientes con EC, así como de rs17824933 con la extensión de la CU y la presencia de espondilitis anquilosante en la EII (Casadó-Llombart, Velasco-de Andrés, et al., 2022). Por último, se ha reportado la asociación del SNP rs12360861 (G>A; Ala271>Thr) a cáncer de próstata. Más concretamente, homocigosis AA es un factor pronóstico de recidiva bioquímica de cáncer de próstata (Casadó-Llombart et al., 2022).

### 2.6 Aplicaciones terapéuticas de CD6

El reconocimiento de MAMPs bacterianos por parte de CD6 ha permitido obtener evidencias de su utilidad en modelos experimentales de infección. En primer lugar, se observaron efectos beneficiosos (aumento de supervivencia y disminución de citocinas proinflamatorias) de la infusión profiláctica de proteína CD6 soluble humana en un modelo experimental murino de shock séptico inducido por LPS (Sarrias et al., 2007). Más tarde se observaron los mismos beneficios, tanto a nivel profiláctico como terapéutico (dosis y tiempo dependiente) en distintos modelos de sepsis bacteriana (Martínez-Florensa et al., 2014, 2017). Estudios posteriores han permitido identificar cortas secuencias peptídicas (11 aa) presentes en cada uno de los dominios SRCR de CD6 y que conservan las propiedades de unión a bacterias, y de protección frente a la sepsis bacteriana de la proteína nativa (Martínez-Florensa et al., 2018). Por otro lado, la demostración de la unión de la región extracelular de CD6 a componentes tegumentales (PSEx) de *E. granulosus* ha permitido evidenciar su potencial profiláctico frente a hidatidosis secundaria (Mourglia-Ettlin et al., 2018). Estas evidencias experimentales avalan el uso de CD6 como diana terapéutica en infecciones sistémicas.

Nuestro grupo ha demostrado el potencial terapéutico de CD6 también en cáncer. Mediante el estudio de ratones transgénicos que expresan altos niveles circulantes de sCD6 humano (shCD6lckE $\mu$ Tg) desafiados vía subcutánea con células cancerígenas de diferentes orígenes (melanoma B16-F0, sarcoma MCA-205 y linfoma RMA-S). Se observó un menor crecimiento tumoral en los ratones con altos niveles de sCD6 en comparación con ratones control *wild type* (Simões et al., 2020). También, se observaron similares resultados favorables (disminución del crecimiento tumoral y de la formación de metástasis) mediante la infusión de proteína sCD6 humana en ratones *wild type* desafiados con tumores. Estos resultados preclínicos en cáncer, han sido validados recientemente mediante la infusión de un AcMo anti-CD6 (UMCD6) que internaliza la molécula CD6 y potencia la actividad NK (Ruth et al., 2021).

Existen estudios preclínicos con AcMos anti-CD6 de ratón y humanos utilizados en el tratamiento de enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoidea (AR) y la psoriasis. Entre ellos cabe mencionar Itolizumab, un AcMo que reconoce el dominio SRCR D1 de CD6 y que es la versión humanizada del anticuerpo murino IOR-T1. Itolizumab se utiliza en pacientes con psoriasis desde el año 2013, con buenos resultados

de eficacia y duración de remisión, además de efectos inmunomoduladores y antiinflamatorios (Budamakuntla et al., 2019; Krupashankar et al., 2014). Incluso, se muestra ventaja sobre otros tratamientos biológicos como anti-TNF, ya que presenta un menor riesgo de efectos adversos o infecciones sistémicas graves (Dogra et al., 2020). Itolizumab no sólo tiene efectos en la psoriasis, sino también se ha visto su eficacia en un estudio de fase I de pacientes con artritis reumatoide tratados durante 6 semanas (Rodriguez et al., 2012). Por último, un estudio propone el uso de Itolizumab como opción terapéutica para síndrome de Sjögren, ya que en estos pacientes se detectan células T y B que expresan CD6 en las glándulas salivales y una sobreexpresión de ALCAM (le Dantec et al., 2013).

El efecto de Itolizumab se asocia a la reducción de la liberación de citocinas proinflamatorias, como el IFN- $\gamma$ , la IL-6 y el TNF- $\alpha$ . Debido a esto, se comenzó a utilizar en pacientes graves y en estado crítico de COVID-19, en donde el síndrome de liberación de citocinas inflamatorias está asociado a la progresión de la enfermedad. El Itolizumab fue capaz de reducir las concentraciones de IL-6 en todos los pacientes. Dos de los tres pacientes mostraron una mejora respiratoria y radiológica y se recuperaron por completo (Filgueira et al., 2021). Este anticuerpo con su potencial antiinflamatorio podría reducir la morbilidad y la mortalidad asociadas a la COVID-19. Asimismo, se utilizó en 19 pacientes de edad avanzada con comorbilidad y COVID-19, en donde el 94.7% de los pacientes se recuperaron transcurridos 13 días de tratamiento. Sorprendentemente, luego de una dosis de Itolizumab, la IL-6 circulante disminuyó en las primeras 24-48 h en los pacientes con valores basales altos de esta citocina, mientras que, en los pacientes con niveles bajos, esta concentración se mantuvo. Incluso, el tratamiento con Itolizumab redujo la mortalidad en comparación con el grupo control (Díaz et al., 2020). Estos resultados también se observaron en otro estudio con 70 pacientes, con una media de edad de 68 años y también presentaban comorbilidad (Caballero et al., 2020). Estos estudios apoyarían el uso de Itolizumab en combinación con otros antivirales para abordar la tormenta de citocinas relacionada con la COVID-19 y sus complicaciones.

### 3. CD5

CD5 fue también uno de los primeros receptores linfocitarios de superficie identificados hace ya más de 40 años. Sin embargo, no fue hasta mediados de los años 80 y principios de los 90 cuando se realizaron estudios moleculares y funcionales sobre el papel del CD5. Inicialmente fue nombrado como Lyt-1 en ratón y Leu-1 en humano (Contor & Boyse, 1975). Su nombre oficial se asignó durante el primer *Workshop* Internacional y conferencia sobre antígenos humanos de diferenciación leucocitaria (HLDA) (Ledbetter et al., 1980). A la vez, el aloantígeno de ratón Lyt-1 (también llamado Ly-A, Ly-1, y más tarde conocido como CD5) surgió como uno de los primeros sistemas de antígenos específicos de linfocitos (Boyse et al., 1968).

#### 3.1 Genes y estructura de CD5

CD5 es una glicoproteína de transmembrana de tipo I de 67 kDa, cuyo gen se encuentra en el cromosoma 11 humano y el cromosoma 9 murino (M. A. Bowen et al., 1997). Por su estructura y función pertenece a la SF-SRCR y actualmente se incluye dentro de los receptores SR de clase I (PrabhuDas et al., 2014; Sarrias et al., 2004). CD5 se asocia físicamente al receptor clonotípico específico de antígeno presente en las células T (TCR/CD3) como en las B-1a (BCR) (Lankester et al., 1994; Osman et al., 1992). Su gen está constituido por 11 exones: los exones 1 (18 aa) y 2 (6 aa) codifican el péptido señal, los exones 3, 5 y 6 codifican cada uno de los tres dominios extracelulares SRCR (D1, D2 y D3), el exón 4 codifica la región espaciadora rica en residuos Pro/Ser/Thre (25 aa) que conecta los dominios SRCR D1 y D2, el exón 7 codifica la región transmembrana y los exones 8, 9 y 10 codifican la región intracitoplasmática (Padilla et al., 2000). Los dominios SRCR más N-terminales (D1 y D2) presentan glicosilaciones en N-, la región espaciadora tiene glicosilaciones en O- y el dominio D3 carece de glicosilación alguna (Julenius et al., 2005).

Un mecanismo de regulación de la expresión de CD5 en la membrana es a través de la utilización de dos exones diferentes: el exón 1A más proximal codifica para la proteína completa y se expresa en membrana, mientras que el exón 1B más distal en dirección 5' codifica una isoforma truncada y queda retenida en el citoplasma. Las células

B regulan esas dos isoformas a través de la enzima metiltransferasa de ADN (Garaud et al., 2008).

La región intracitoplasmática (94 aa) carece de actividad catalítica intrínseca, pero contiene residuos de Ser, Thr y Tyr que son susceptibles de ser fosforilados y permiten la transducción de señales de forma tanto dependiente como independiente de la señalización del TCR. Particularmente, se encuentran tres motivos principales relacionados con la transducción de señales. En primer lugar, un "pseudo" motivo de activación de inmunoreceptores basado en tirosina (ITAM, *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*), que comprende los residuos Y429 e Y441; en segundo lugar, un motivo de inhibición de inmunoreceptores basado en tirosina (ITIM *immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*) y múltiples sitios potenciales de fosforilación Ser/Thr., como por ejemplo cerca de la región carboxi-terminal de CD5, un dominio de unión a la Caseína Kinasa 2 (CK2) (S458-S461) (Calvo et al., 1998). Cuando el linfocito se activa vía TCR, estos dominios se fosforilan permitiendo el reclutamiento de distintas proteínas señalizadoras, incluyendo p56lck, CD3 $\zeta$ , PI3K, c-Cbl, RasGAP, Zap70 y CK2 (Dennehy et al., 1998; Raman & Kimberly, 2022). La naturaleza exacta, tanto de las cinasas como de los residuos implicados en la hiperfosforilación inducible de CD5 se analizará con más detalle más adelante (véase apartado 3.4).

Se ha demostrado que, tras la activación linfocitaria, el receptor CD5 unido a la membrana celular se proteoliza liberando una forma soluble (sCD5), que puede detectarse en suero en un rango pico /nano molar y es similar a la encontrada en sueros de pacientes que sufren diversos trastornos autoinmunitarios (LES, síndrome de Sjögren primario, AR, dermatitis atópica) y no autoinmunitarios (insuficiencia renal crónica, leucemia linfocítica crónica de células B, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica) (Calvo et al., 1999; Velasco-de Andrés et al., 2020). Se especula con que sCD5 pueda actuar como un "*decoy receptor*" uniéndose a al/los ligando/s natural/es del receptor CD5 de membrana tanto endógenos como exógenos, interfiriendo en dichas interacciones e influyendo en la homeostasis de ciertas subpoblaciones linfocitarias (Axtell et al., 2004; Fenutría et al., 2014; Simões et al., 2017; Vera et al., 2009).

### 3.2 Expresión tisular de CD5

CD5 está principalmente expresado en todos los linfocitos T ( $\alpha\beta$  y  $\gamma\delta$ ) y en la subpoblación de linfocitos B-1a ( $CD5^+ CD23^- IgM^{hi} IgD^{low}$ ) productora de anticuerpos naturales polirreactivos y que está expandida en ciertos procesos autoinmunes (AR, LES, Diabetes Mellitus tipo 1, Tiroiditis de Graves-Basedow, Síndrome Sjögren), infecciosos (Hepatitis C) o linfoproliferativos (LLC-B, Linfoma del Manto y Tricoleucemia) (Zuckerman et al., 2002). Aunque en niveles bajos CD5 también se expresa en la superficie de ciertos macrófagos (Borrello et al., 2001), endotelios (Gogolin-Ewens et al., 1989) y subpoblaciones de células dendríticas (H. Li et al., 2019).

CD5 es uno de los marcadores más tempranos del linaje T y su expresión está regulada a su vez por los niveles de expresión del complejo TCR/CD3 durante el proceso madurativo en el timo, por este motivo el nivel de expresión aumenta progresivamente desde las fases más inmaduras a las más maduras (DN < DP < SP  $CD8^+$  < SP  $CD4^+$ ). Por otro lado, los niveles de CD5 expresados en timocitos y células T maduras son proporcionales a la avidez de la interacción del TCR con los complejos MHC-péptido; es decir, a mayor afinidad mayor expresión de CD5 (Azzam et al., 1998).

Existe una alta expresión de CD5 en células T reguladoras ( $T_{reg}$ ;  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ ) tanto generadas en el timo ( $T_{reg}$  naturales o  $nT_{reg}$ ) como en la periferia ( $T_{reg}$  inducibles o  $iT_{reg}$ ). Dado que la expresión de CD5 está influenciada cuantitativamente por la intensidad de la señalización del TCR durante el desarrollo de los timocitos, el aumento de la expresión de CD5 en las células T reguladoras naturales ( $nT_{reg}$ ) es consistente con la noción de que estas células se seleccionan bajo interacciones de alta avidez (Ordoñez-Rueda et al., 2009).

En el linaje B, CD5 se expresa en la subpoblación de linfocitos B-1a, que representa  $\approx 20\%$  de los linfocitos B circulantes durante la edad adulta y que es responsable de la producción de anticuerpos naturales. Dichos anticuerpos se caracterizan por su baja afinidad, polireactividad y autorreactividad, y se les ha asignado un papel protector de tipo innato frente a las infecciones (Havelock Wortis, 2002). También se ha propuesto que la expresión de CD5 en células B-1a autorreactivas podría ayudar a prevenir la activación inapropiada de dichas células como consecuencia de su papel como regulador negativo de la señalización BCR (Berland & Wortis, 2002). Asimismo, en ratones se ha descrito la expresión de CD5 en una subpoblación de células B reguladoras ( $B_{reg}$ ;

CD19<sup>+</sup> CD1d<sup>high</sup> CD5<sup>+</sup>) también llamadas B10 (como los linfocitos T<sub>reg</sub> son también productoras de IL-10 y participarían en la prevención de autoinmunidad) (Yanaba et al., 2009). Se debe considerar que los trabajos se refieren casi exclusivamente a estudios en ratones. En los seres humanos existen dos clases de células B CD5<sup>+</sup>, de las cuales sólo una parece compartir propiedades fenotípicas con las células B-1a murinas. Al igual que las células B-1a murinas, las células B humanas CD5<sup>+</sup> de sangre periférica producen anticuerpos poliespecíficos y autorreactivos. Sin embargo, no han sido muy bien estudiadas y no está claro hasta qué punto son equivalentes a las células B-1a murinas. Por el momento, se sabe que los anticuerpos naturales de baja afinidad son producidos por los linfocitos B-1a en el ratón y en el hombre, por las células de memoria de la inmunoglobulina M (IgM) (Carsetti et al., 2004).

Se ha reportado la expresión aberrante de CD5 en algunas neoplasias de linfocitos B como la LLC y el linfoma de células del manto (LCM), mientras que otras neoplasias de células B suelen ser CD5 negativas o débilmente positivas. Casos raros de leucemia pro-linfocítica B (LPL-B), linfoma B difuso de células grandes (LDCB), linfoma folicular (LF), linfoma esplénico de la zona marginal (LZSE) e incluso leucemia linfoblástica aguda tipo B (LLA-B), también pueden presentar una expresión aberrante de CD5 (Bröker et al., 1988; Jaseb et al., 2019).

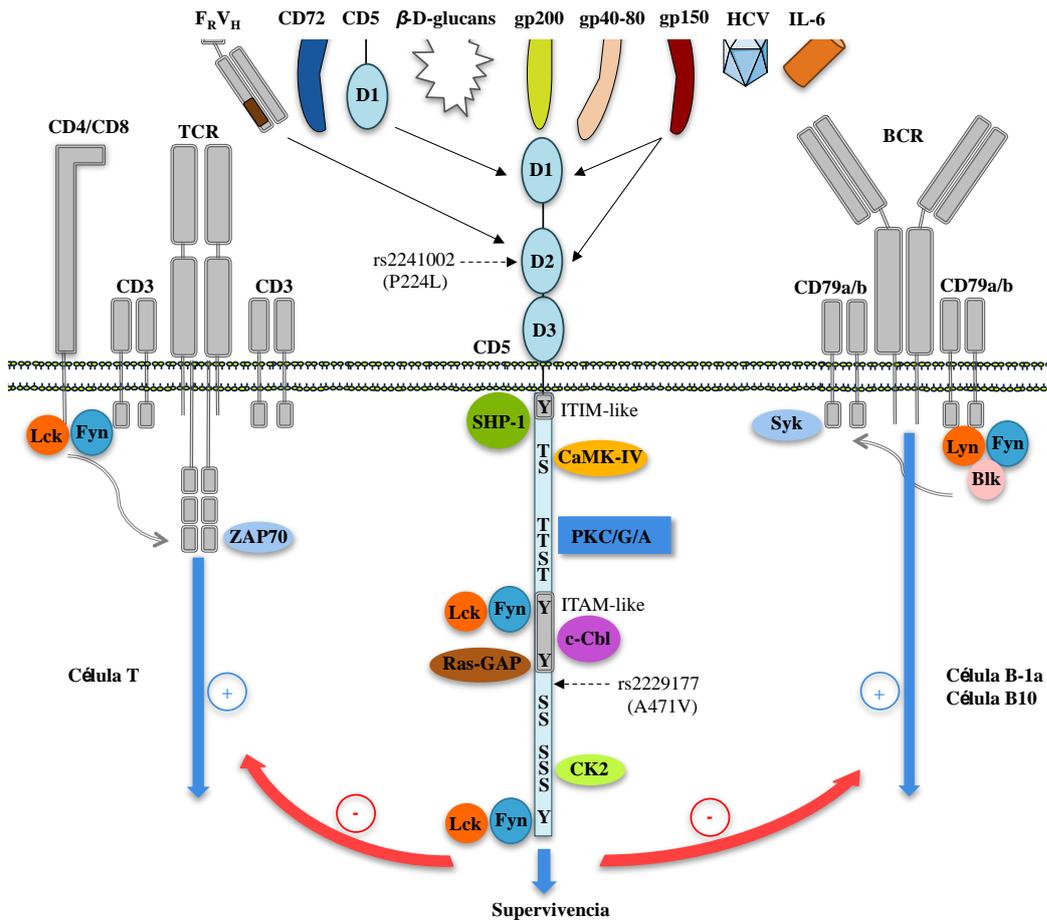
Recientemente, se ha observado que algunas DCs humanas expresan CD5 y que pueden subdividirse en poblaciones CD5<sup>low</sup> y CD5<sup>high</sup>. Las DCs CD5<sup>high</sup> inducen una proliferación más potente de las células T. Por otro lado, la subpoblación CD5<sup>low</sup> induce células T productoras de IFN- $\gamma$ , mientras que la CD5<sup>high</sup> induce células T productoras de IL-10, IL-22 e IL-4, por lo que podrían desempeñar funciones opuestas en la inmunidad o la tolerancia (Yin et al., 2017).

### 3.3 Ligandos de CD5

Por ahora no hay consenso sobre la naturaleza del ligando de CD5. Inicialmente, se identificó el receptor CD72 (de Velde et al., 1991) expresado en células B, como probable ligando de CD5. Posteriormente, diferentes estudios han ido reportando la interacción de CD5 con ligandos tan diversos como: la región *framework* de la IgV<sub>H</sub> (a través del D2) (Pospisil et al., 2000), gp200 (Haas & Estes, 2001), gp40-80 (expresado en células T) (Biancone et al., 1996; Bikah et al., 1998), gp150 (a través del D1 y D2) (Calvo

et al., 1999), el propio CD5 (a través del D1) (Bikah et al., 1998) y más recientemente IL-6 (Masuda & Kishimoto, 2016) (**Figura I-7**). En cualquier caso, ninguno de ellos ha podido ser confirmado de forma fehaciente por distintos grupos independientes.

Por otro lado, existe evidencia de que CD5 puede interaccionar con diferentes MAMPs, tales como los  $\beta$ -D-glucanos constitutivos de hongos (Vera et al., 2009), el virus de la hepatitis C (Sarhan et al., 2012) o el tegumento del parásito helminto *Echinococcus granulosus* (Mourglia-Ettlin et al., 2018). La interacción con  $\beta$ -D-glucanos es de la misma afinidad ( $K_d$ ) que la reportada para Dectin-1, considerado el principal receptor de  $\beta$ -D-glucanos en células mieloides. Esta interacción parece ser específica, ya que no se observa con componentes de las paredes bacterianas (LPS, PGN, LTA) ni con otras estructuras fúngicas (mananos), y estaría mediada por todos y cada uno de los dominios SRCR de CD5 (Vera et al., 2009). Alternativamente, se ha demostrado que la expresión de CD5 es necesaria para la entrada del virus de la Hepatitis C (HCV, del inglés Hepatitis C Virus,) en células T humanas, primarias y leucémicas (Sarhan et al., 2012), planteando la posibilidad de ser un receptor importante en el reconocimiento vírico. Sin embargo, ya que todos estos trabajos se han realizado *in vitro*, se requieren diferentes estudios independientes, que puedan corroborar estos hallazgos o demostrar otras interacciones de CD5 *in vivo*.



**Figura I-7. Esquema de las interacciones extracelulares e intracelulares mediadas por CD5 expresado en células T y B.** El receptor CD5 se representa como un compuesto por tres dominios extracelulares SRCR (D1, D2 y D3), una región espaciadora (*stalk*), una región transmembrana y una cola citoplasmática. Se representan los ligandos: gp200, gp40-80, gp150 (D1 y D2); IgVH y CD5 (D1); *zymosan* (β glucano) (D1, D2 y D3); HCV; IL-6 y CD72. También, se representan sustituciones de los aminoácidos en el dominio extracelular de rs2241002 (P224L) y en la cola citoplasmática de rs2229177 (A471V). Tras la activación de los linfocitos, se puede producir una escisión proteolítica (representada por una tijera) que da lugar a la forma de CD5 soluble (sCD5). También se representan esquemáticamente los múltiples residuos Ser (S), Thr (T) y Tyr (Y) que pueden ser fosforilados de forma constitutiva o inducible. El dominio citoplasmático de CD5 presenta un motivo de activación pseudo-ITAM que sirve para reclutar enzimas que participan en la señalización celular, como Lck, Fyn, Ras-GAP o c-Cbl (tirosinas cinasas). También muestra un motivo de inhibición pseudo-ITIM cercano a la membrana, que interactúa con la tirosina fosfatasa SHP-1. También, por las proteínas Ser/Thr cinasas (CK2, PKC, CaMK-II) que interactúan en la cola citoplasmática. Las estructuras no están dibujadas a escala. Fuente: Marta Consuegra-Fernández et al. 2018.

### 3.4 Función de CD5

#### 3.4.1. Regulación de la activación de células T y B

CD5 está físicamente asociado al receptor clonotípico de los linfocitos T (TCR) y B-1a (BCR) (Lankester et al., 1994; Osman et al., 1992) gracias a lo cual participa en el reajuste fino (*fine tuning*) de la señalización intracelular durante el reconocimiento antigénico. CD5, junto con otras moléculas co-señalizadoras, forma parte de la zona central del SMAC (o IS), donde tiene funciones de modulación del TCR, sin influir en la estabilización vía contactos adhesivos de los conjugados T-APC (Gimferrer et al., 2003). Por este motivo, se considera a CD5 como una molécula accesoria involucrada en la regulación de la activación linfocitaria.

De la misma manera que con CD6, los primeros estudios sobre la funcionalidad de CD5 se realizaron estimulando células T en presencia de AcMos anti-CD5, anti-CD3 y anti-CD28, concluyendo que se trataba de un receptor co-estimulador (Alberola-Ila et al., 1992; Ceuppens & Baroja, 1986; Hollander et al., 1981; Imboden et al., 1990). Estos hallazgos iniciales marcaron la pauta en los futuros experimentos, proponiendo a CD5 como un regulador/co-estimulador positivo de las señales del TCR que se mantuvo durante un tiempo. Posteriormente, experimentos con ratones deficientes (*knockout*) para CD5 (*Cd5*<sup>-/-</sup>) demostraron fehacientemente que este receptor modulaba negativamente las señales mediadas por el TCR y el BCR en células T y en linfocitos B-1a, respectivamente (Bikah et al., 1996; Tarakhovsky et al., 1995). En concreto, se demostró que los timocitos de ratones *Cd5*<sup>-/-</sup> son hiper-respondedores a la estimulación vía TCR/CD3, mostrando una mayor movilización del Ca<sup>+2</sup> intracelular y fosforilación en tirosinas de PLC- $\gamma$ 1, CD3 $\zeta$  y Vav (Tarakhovsky et al., 1995). De acuerdo con estos hallazgos, se observó también que CD5 es una de las moléculas que contribuye a establecer el umbral de procesos de selección negativa durante la transición de timocitos DP a SP (Azzam et al., 2001; Kishimoto & Sprent, 1999) y que la expresión de CD5 en timocitos maduros (SP) es proporcional a la avidéz de la interacción TCR/MHC-péptido (Azzam et al., 1998). Consiguientemente, el nivel de expresión de CD5 en superficie es considerado un marcador sustituto de la afinidad del TCR con los péptidos propios en las células T periféricas maduras, hasta el punto de que muchos investigadores utilizan la expresión del CD5 para distinguir las células T que se unen a los péptidos propios de forma fuerte o débil (Matson et al., 2020). Por lo tanto, CD5 se correlaciona con la auto-reactividad y se encuentra incrementada su

expresión en la subpoblación de células T<sub>reg</sub> y células T anérgicas generadas durante la estimulación crónica con autoantígenos. Además, un estudio demuestra que las T efectoras con altos niveles de expresión de CD5 (CD5<sup>high</sup>), están mejor preparadas para la actividad anti-patogénica, ya que presentan un reclutamiento y expansión clonal más eficiente frente a determinados antígenos (Fulton et al., 2015). De igual manera, en el caso de las células B autorreactivas, se caracterizan por una gran expresión de CD5 en la membrana, siendo clave para regular la tolerancia.

Existen datos experimentales que apoyan la hipótesis de que CD5 regularía negativamente la señalización del receptor de Ig y, en consecuencia, inhibiría el desarrollo de respuestas autoinmunitarias asociadas a células B (Hippen et al., 2000). Específicamente, el dominio intracelular de CD5 tiene múltiples residuos Ser (n=11), Thr (n=4) y Tyr (n=4) susceptibles de ser fosforilados en varias etapas de la activación de las células T (Voisinne et al., 2018). Durante la estimulación vía TCR/CD3, el dominio citoplasmático de CD5 se fosforila muy rápidamente, siendo los residuos Tyr429 y Tyr463 los principales sitios de fosforilación (Dennehy et al., 2001; Viù et al., 2001). La tirosin cinasa Lck parece ser la responsable de la mayor parte de la fosforilación de Tyr de CD5, aunque Fyn e Itk pueden complementar o regular este aspecto de la función de Lck (Dennehy et al., 2001; Nica et al., 2003; Viù et al., 2001). Se ha propuesto que estas fosforilaciones por cinasas Src servirían como sitios de acoplamiento para efectores intracelulares como RasGAP o fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) (Dennehy et al., 1998). Por otro lado, residuos citoplasmáticos Ser más distales (Ser458, Ser459 and Ser461) servirían de sitios de unión constitutiva y fosforilación de la serin/treonin cinasa casein cinasa 2 (CK2) (Calvo et al., 1998; Raman et al., 1998). Se ha demostrado que tras la activación de CD5 la actividad de Fyn disminuye significativamente, contribuyendo a la inhibición mediada por CD5 (Bamberger et al., 2011). Así mismo, CD5 se asociaría con el dominio SH2 de fosfatasas como SHP-1 en células T Jurkat, timocitos murinos y células B-1a (Carmo et al., 1999; Perez-Villar et al., 1999; Sen et al., 1999).

En consecuencia, CD5 podría inhibir la señalización temprana del TCR a través de varias rutas que implican a ZAP-70. Por ejemplo, CD5 puede asociarse con SHP-1, que podría defosforilar directamente a ZAP-70, inhibiendo su actividad. Paralelamente, CD5 puede inhibir a Fyn, que también es importante para la activación de ZAP-70 (Brockdorff et al., 1999; Plas et al., 1996). La convergencia de estas vías puede garantizar

un control eficaz de esta molécula durante la señalización. Además de estas moléculas, CD5 se puede asociar con Cbl, Cbl-b y Grb2 tras la estimulación del TCR (Voisinne et al., 2016). Cbl controla la ubiquitinación y la degradación de las cadenas de CD3 y la actividad de las tirosin cinasas Lck y ZAP70, mientras que Cbl-b regula negativamente la vía co-estimuladora de CD28 amortiguando la actividad de PI3K (Voisinne et al., 2018). Así mismo, las proteínas A y B asociadas a ubiquitina y que contienen el dominio SH3 (UBASH3A, UBASH3B, también conocidas como STS-2 y STS-1) también se asocian a la regulación negativa de la vía de señalización del TCR (Carpino et al., 2004). Un estudio reciente indica que la función reguladora negativa se produce por el reclutamiento de moléculas como Cbl-b, UBASH3A, ANKRD13A en el *signalosoma* de CD5, confirmando las moléculas señaladas anteriormente (Mori et al., 2021) (**Figura I-6**).

### 3.4.2. Regulación de la transmisión de señales de supervivencia

CD5 sería un importante regulador de la supervivencia de las células T y B-1a, lo que explicaría que los ratones *Cd5<sup>-/-</sup>* no padezcan fenómenos autoinmunitarios espontáneamente, a pesar de que pierdan la regulación negativa de las señales inducidas por el TCR o BCR (Soldevila et al., 2011). Se ha demostrado que los linfocitos T citotóxicos (CTL) con especificidad antitumoral y alta expresión de CD5 (CD5<sup>high</sup>) son menos susceptibles a la muerte celular inducida por activación autóloga (AICD) que los de baja expresión (CD5<sup>low</sup>). También, se ha demostrado que los mecanismos implicados en la mayor supervivencia de estas células, sería una disminución de la expresión de FasL y una mayor inhibición de la caspasa 8 (Friedlein et al., 2007). Un estudio reciente, indica que CD5 altera la actividad basal de la señalización NF-κB en las células T periféricas en reposo. En donde, las células T CD5<sup>high</sup> en reposo expresan más proteína NF-κB que las células CD5<sup>low</sup>, en ausencia de señales del TCR. La existencia en condiciones basales de aumento de NF-κB confiere una ventaja de supervivencia a las células T CD5<sup>high</sup> sobre las CD5<sup>low</sup> (Voisinne et al., 2018). Aunque no se ha dilucidado completamente el efecto de CD5 en el aumento de señales de supervivencia, se cree que podría estar implicado el aumento de expresión de moléculas como Bcl-2, Bcl-xl y NF-κB o la vía de señalización de PI3K/Akt (Charo et al., 2005; Ordoñez-Rueda et al., 2009; N. Zhang & He, 2005).

En el caso de las células B, la resistencia a la apoptosis está claramente asociado a CD5. Posterior a la estimulación del BCR (anti-IgM), CD5 disminuye la movilización

del  $\text{Ca}^{+2}$  e induce la producción de IL-10 (Gary-Gouy et al., 2002). Por otro lado, se ha demostrado que el complejo CK2-BLNK-CD5 estaría implicado en la fosforilación constitutiva de STAT3, la cual estaría implicada en procesos de la fisiopatología de células de LLC como el crecimiento celular, la supresión de la apoptosis o la tumorigénesis (Rozovski et al., 2017). Además, un estudio de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) que codifica un cambio aminoacídico en la cola citoplasmática (Ala471>Val) adyacente al dominio pseudo ITAM se relaciona con supervivencia libre de progresión en pacientes con LLC-B (Delgado et al., 2017; Sellick et al., 2008), aunque el mecanismo y las consecuencias funcionales de este SNP aún no está esclarecido. Por consiguiente, CD5 podría jugar un papel importante en la activación o estimulación vía BCR, promoviendo la supervivencia y la regulación de la homeostasis en las células B-1a.

### **3.4.3. Función de reconocimiento de patógenos (PRR)**

Hoy en día sabemos que CD5 funciona como PRR para el reconocimiento de ciertos MAMPs presentes en las superficies fúngicas, virales y parasitarias, pero no bacterianas. Tanto la forma de membrana como la forma soluble de CD5 humano (sCD5) pueden unirse a partículas ricas en  $\beta$ -glucanos como es el *zymosan*, así como a diferentes  $\beta$ -glucanos solubles expresados en los hongos e inducir cascadas de señalización como la vía de las MAPK y liberar citocinas. Se ha demostrado también que sCD5 se une y agrega un grupo diverso de células fúngicas tanto saprofitas como patógenas, como *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans* (Vera et al., 2009). Por otro lado, se ha demostrado el potencial uso terapéutico de la administración de sCD5 en un modelo experimental murino de sepsis fúngica inducido por *zymosan*, dado que aumentaba significativamente la supervivencia de los ratones tratados y disminuía los niveles séricos de citocinas proinflamatorias (IL-6 e IL-1 $\beta$ ), la leucocitosis y la actividad de la mieloperoxidasa (MPO) hepática (Lenz, 2009; Vera et al., 2009). También se han demostrado efectos beneficiosos de la infusión de sCD5 en modelos experimentales de infección fúngica sistémica inducida por especies patógenas (*Cándida albicans* y *Cryptococcus neoformans*) (Andrés et al., 2020). Por último, un estudio en ratones deficientes de CD5 infectados con *Cándida albicans*, confirma una menor supervivencia

y un aumento de carga fúngica en comparación con los ratones *wild type* (Velasco-de-Andrés et al., 2021).

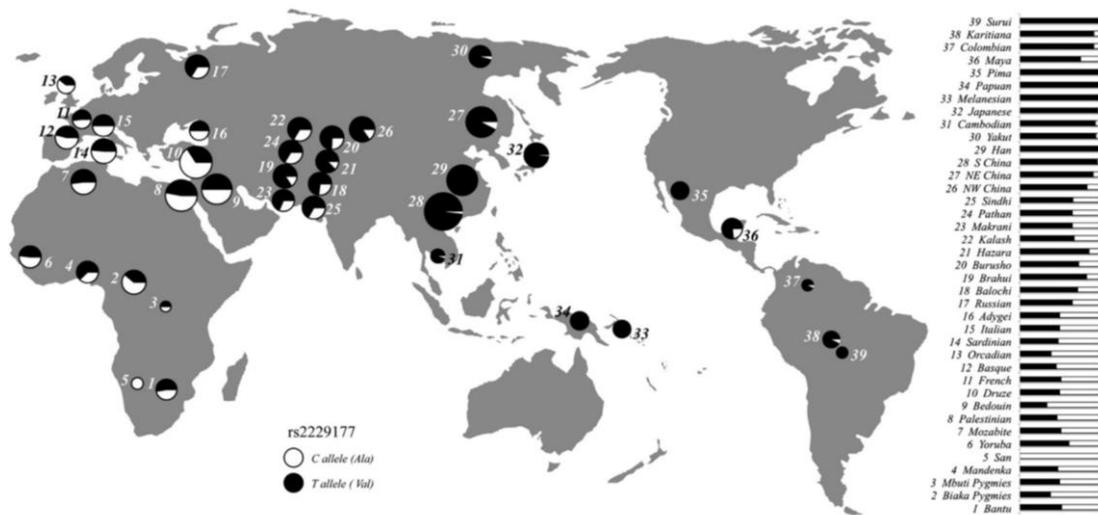
La doble función de CD5 (y CD6) como molécula PRR e inmunomoduladora, ha hecho que se postule la hipótesis de que tendría un importante papel regulador potenciando las respuestas antiinfecciosas y previniendo las autoinmunitarias (Lenz, 2009). Por un lado, las señales inhibitorias de CD5 permitirían aumentar el umbral de activación de los linfocitos T y B implicados en la respuesta antimicrobiana, de forma que se expandirían y seleccionarían solamente los clones con más alta afinidad por los patógenos. Por otro lado, se sabe que las infecciones son un factor desencadenante de autoinmunidad. La detección de productos microbianos vía CD5 proporcionaría señales inhibitorias que dificultaría la expansión de clones de células T y B autorreactivas con baja afinidad de reconocimiento de autoantígenos.

### 3.5 Polimorfismos de CD5

A pesar de que no se han reportado hasta la fecha individuos con expresión deficiente de la molécula de CD5, sí se han identificado polimorfismos genéticos funcionalmente relevantes. Así, se ha observado que individuos portadores de determinadas combinaciones alélicas de los SNPs rs2241002 (Pro224>Leu) y rs2229177 (Ala471>Val) de CD5 son hiperreactivos a la estimulación vía TCR/CD3 y se asocia a formas clínicamente severas de LES (Cenit et al., 2014), así como a un mejor pronóstico en enfermedades neoplásicas tales como LLC (Delgado et al., 2017) o Melanoma (Potrony et al., 2016) o carcinoma de próstata (Casadó-Llombart et al., 2022).

El SNP rs2241002 es frecuente en individuos caucásicos y se caracteriza por una sustitución de un residuo Pro a Leu en la posición 224 en el dominio SRCR D2, mientras que el SNP rs2229177 introduce una sustitución no sinónima de Ala a Val en la posición 471 (en la zona C-terminal con respecto al motivo citoplasmático pseudo-ITAM). Existen evidencias de que la selección positiva ha operado en épocas relativamente recientes de la evolución de la especie humana, en este caso sobre el locus *CD5* y más concretamente del SNP rs2229177. La variante ancestral (Ala471) y la más reciente (Val471) existen en proporciones equivalentes en población europea. Por el contrario, en poblaciones asiáticas la variante ancestral es prácticamente inexistente y predominaría la de aparición

más reciente (Carnero-Montoro et al., 2012) (**Figura I-8**). Se ha reportado que los portadores homocigotos para la variante Pro224-Ala471 de CD5 proporcionan señales inhibitorias menos potentes de la vía de señalización del complejo TCR/CD3 que los homocigotos para Pro224-Val471 y que presentarían formas clínicamente más agresivas de LES, como es el desarrollo de nefritis lúpica (Cenit et al., 2014) . La homocigosis para la variante Pro224-Ala471 también se asocia a mejor supervivencia en pacientes con melanoma (Potrony et al., 2016) y a una supervivencia libre de progresión (SPL) más prolongada en el grupo de pacientes de LLC con genes IGHV mutados (presentan una enfermedad menos agresiva y eso favorece que se pueda observar mejor el efecto protector de la variante de CD5) (Delgado et al., 2017). El modo en que las variantes Ala/Val471 de CD5 pueden influir en el comportamiento natural de las células de la LLC es una cuestión aún no resuelta. Sin embargo, sabemos que la variante Ala471 tiene una menor capacidad de transducción de señales inhibitoras (Carnero-Montoro et al., 2012; Cenit et al., 2014) y puede influir en una menor capacidad para modular negativamente el BCR o una menor señalización anti-apoptótica (Tibaldi et al., 2011). Por lo tanto, CD5 no es sólo un marcador fenotípico, sino es un actor relevante en la normal biología linfocitaria y en los procesos patológicos resultantes como son la infección, la autoinmunidad o el cáncer.



**Figura I-8. Distribución geográfica de los alelos ancestrales CD5 rs2229177<sup>C</sup> (Ala471, blanco) y los derivados rs2229177<sup>T</sup> (Val471, negro) en el Panel de Diversidad del Genoma Humano. Las poblaciones, numeradas de 1 a 39, se mencionan en el gráfico de barras de la derecha de frecuencia alélica. Fuente: Carnero-Montoro et al. 2012.**

Finalmente, un reciente estudio de nuestro grupo ha reportado la asociación de la variante Pro224 de CD5 con la localización en la enfermedad inflamatoria intestinal, de Pro224-Val471 con la necesidad de terapia biológica en la enfermedad de Crohn y de Leu224-Val471 con mal pronóstico en la colitis ulcerosa (Casadó-Llombart, Velasco-de Andrés, et al., 2022). Todo ello sugiere que CD5 influye de forma diferencial dependiendo de la enfermedad, lo que posiciona a CD5 como biomarcador y una herramienta útil para el diagnóstico y pronóstico, así como potencial diana en terapias inmunomoduladoras.

### 3.6 Aplicaciones terapéuticas de CD5

CD5 actúa como PRR de  $\beta$ -glucanos, característica que le otorga una importante capacidad antifúngica y potencial uso en micosis invasivas de gran mortalidad. En un modelo experimental de inflamación inducida por *zymosan*, se demostró un aumento de la supervivencia tras infundir de forma profiláctica la proteína sCD5 humana. De forma análoga, también se observaron efectos beneficiosos similares en modelos de ratón de infección sistémica por especies fúngicas patógenas (*C. albicans* y *C. neoformans*). Paralelamente a una mayor supervivencia, los ratones mostraban reducción de la carga fúngica, aumento de los niveles de IFN- $\gamma$  y una mayor infiltración de células linfoides (NK y B) y mieloides (DCs, macrófagos y granulocitos) en los órganos diana (Andrés et al., 2020; Vera et al., 2009). Sin embargo, no se observó eficacia al utilizar la sCD5 en ratones inmunodeficientes NSG (del inglés *NOD scid gamma*) infectados por *C. albicans*, lo que sugiere la necesidad de un sistema inmunitario intacto (Velasco-de-Andrés et al., 2021).

Por otro lado, también se ha estudiado el valor terapéutico de sCD5 en modelos experimentales murinos de infección por *E. granulosus*, responsable de la hidatidosis humana. El uso profiláctico de sCD5 redujo de forma significativa el número de ratones infectados, y el recuento total y del peso de los quistes hidatídicos por ratón (Miles et al., 2020; Mourglia-Ettlin et al., 2018). El papel de CD5 en infecciones víricas no está muy estudiado, pero se ha informado que CD5 es una molécula importante para la entrada del VHC (virus de hepatitis C) en los linfocitos T humanos (Sarhan et al., 2012). Todos estos resultados confieren a CD5, un potencial terapéutico frente a infecciones (fúngicas, parasitarias, víricas u otras todavía por explorar).

Las propiedades inmunomoduladores de CD5 son relevantes en la respuesta inmunitaria frente al cáncer o en enfermedades autoinmunes. Con respecto a lo primero, estudios en ratones *Cd5<sup>-/-</sup>* han demostrado mejor respuesta de las células T frente a melanoma en las primeras etapas del crecimiento tumoral, aunque en etapas avanzadas se observaron fenómenos de AICD en las células T CD8<sup>+</sup> asociadas a la infiltración tumoral (Tabbekh et al., 2011). Del mismo modo, la administración repetida de la proteína sCD5 y quimioterapia en ratones *wild type* se asocia a una disminución del crecimiento tumoral (melanoma) en comparación con aquellos ratones tratados sólo con quimioterapia (Fenutría et al., 2014). Recientemente, se ha publicado un estudio con células T transducidas con un CD5CAR que tiene la capacidad de lisar *in vitro* de forma específica y potente diferentes líneas de células T malignas y tumores primarios (Wada et al., 2020). Esto apoya el potencial uso de las células CD5CAR-T en el tratamiento de neoplasias de células T, lo que resulta esperanzador ante las limitadas estrategias actuales. Las leucemias y los linfomas de células T suelen hacer metástasis en el SNC, donde los resultados son pobres y las opciones de tratamiento están asociadas a efectos secundarios graves. Un primer estudio preclínico con CD5CAR ha demostrado su eficacia, logrando una ablación rápida de pocas semanas de los linfoblastos del SNC, lo que provocó la remisión exitosa del linfoma de un paciente, a pesar de que experimentó una aplasia de células T breve y transitoria debido a la expresión de CD5 en las células T normales (Feng et al., 2021). Recientemente, se ha utilizado la línea celular NK-92 como fuente de inmunoterapias celulares adoptivas. Sin embargo, en modelos preclínicos, las células CAR-T parecen ser superiores a las células CAR-NK-92. Interesantemente, se evaluó la eficacia de la inmunoterapia CAR-NK anti-CD5 en un modelo de ratón de leucemia linfoblástica aguda de células T CD5<sup>+</sup> (LLA-T), cabe destacar que el CAR-NK anti-CD5 tenía un dominio co-estimulador asociado a NK y favorablemente, se observó una prolongación de la supervivencia en estos ratones (Xu et al., 2019). En resumen, estas nuevas estrategias CAR basadas en CD5 suponen soluciones prometedoras para el tratamiento de procesos linfoproliferativos T.

En cuanto a la autoinmunidad, los AcMos anti-CD5 pueden inducir la internalización de CD5 de membrana y subsiguientemente el agotamiento o suicidio de los linfocitos T autorreactivos fruto de procesos de AICD (Velasco-de Andrés et al., 2020). Estudios en ratones *Cd5<sup>-/-</sup>* muestran de un retraso en la aparición y una disminución de la gravedad de la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), asociada a una

frecuencia elevada de células T que sufrían AICD (Axtell et al., 2004). En cambio, los ratones transgénicos que expresan niveles circulantes elevados de sCD5 desarrollan formas más graves de EAE y de artritis inducida por colágeno (CIA) (Fenutría et al., 2014). Estos resultados son contradictorios con lo anteriormente expuesto, dado que se esperaría que la sCD5 actuara como un “*decoy receptor*” e interfiriese la señalización vía CD5 al competir las uniones de éste con sus ligandos potenciales. No obstante, pueden ser explicados por la idiosincrasia misma de los modelos experimentales utilizados, tanto por lo que se refiere a las distintas cepas de ratones y como a los diferentes mecanismos patogénicos inducidos, así como por la mayor o menor eficiencia del bloqueo funcional de CD5 inducido por sCD5.

## **II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



Los receptores linfocitarios CD5 y CD6 son importantes moléculas con capacidad señalizadora, que pertenecen a una gran familia de receptores del Sistema Inmunitario Innato como son los receptores tipo *scavenger* y que, por otro lado, se expresan principalmente en células del Sistema Inmunitario Adaptativo (linfocitos T, B y NK). En base a ello, CD5 y CD6 permiten modular la función linfocitaria como consecuencia de su interacción con ligandos endógenos (ya sean solubles o expresados en las superficies de células hematopoyéticas, endoteliales o epiteliales) o exógenos (estructuras microbianas conservadas y ampliamente distribuidas, denominadas MAMPs) (Bikah et al., 1998; M. A. Bowen et al., 1995; Calvo et al., 1999; de Velde et al., 1991; Escoda-Ferran et al., 2014; Martínez-Florensa et al., 2014; Mourglia-Ettlin et al., 2018; Sarukhan et al., 2016; Vera et al., 2009). Por tanto, podemos considerar a CD5 y CD6 como receptores que están a caballo o en la interfase entre la inmunidad innata y adaptativa.

Estudios previos, a los que nuestro grupo de investigación ha contribuido, demuestran que los receptores linfocitarios CD5 y CD6 tienen un papel regulador de las respuestas inmunitarias anti-infecciosas, autoinmunitarias o anti-tumorales, que los convierten en dianas terapéuticas en diversos procesos inmunomediados (Consuegra-Fernández et al., 2015; Consuegra-Fernández, Lin, et al., 2018). Tanto CD5 como CD6 son co-receptores transductores de señales intracelulares y que se asocian físicamente al receptor clonotípico de los linfocitos T (TCR) y B (BCR), lo que les permite participar en la modulación positiva o negativa y en el ajuste (*fine tuning*) de las señales de activación, diferenciación y muerte celular emitidas tras el reconocimiento específico de antígenos (Blaise et al., 2020; Cho & Sprent, 2018; Mori et al., 2021). Esta característica confiere a ambos receptores propiedades de *immune checkpoint regulators* respaldando así su implicación en la fisiopatología de algunos procesos infecciosos (p.ej, infección fúngica invasiva y sepsis bacteriana) (Català, Velasco-de Andrés, Leyton-Pereira, et al., 2022; Velasco-de-Andrés et al., 2021), autoinmunitarios (p.ej., LES, psoriasis, enfermedad inflamatoria intestinal y síndrome de Sjögren) (Casadó-Llombart, Gheitasi, et al., 2022; Cenit et al., 2014; Consuegra-Fernández, Julià, et al., 2018) y neoplásicos (p.ej., LLC, melanoma, cáncer de pulmón de células no pequeñas y carcinoma de próstata) (Delgado et al., 2017; Moreno-Manuel et al., 2020; Potrony et al., 2016). Estas evidencias se han obtenido a partir del estudio de modelos experimentales de enfermedad en ratones deficientes (*knockout*) para la expresión de CD5 (*Cd5<sup>-/-</sup>*) o CD6 (*Cd6<sup>-/-</sup>*), así

como de pacientes portadores de diferentes polimorfismos genéticos relevantes para la función de ambos receptores.

Mientras que múltiples evidencias experimentales apoyan una función inhibitoria del receptor CD5 durante la activación linfocitaria, existen hoy en día evidencias contradictorias en cuanto a la función moduladora positiva o negativa de CD6, en ese mismo contexto. Los primeros estudios sobre la función de CD6 realizados hace ya más de tres décadas, se llevaron a cabo en condiciones de estimulación supra-fisiológicas, es decir, mediante potentes estímulos policlonales como AcMos anti-CD3 $\epsilon$ , lectinas mitogénicas (fitohemaglutinina, *Pokeweed mitogen*) o agentes químicos (ésteres de forbol e ionóforos de calcio) en presencia o ausencia de AcMos anti-CD6, asignaron un papel co-estimulador o regulador positivo para CD6 (Gangemi et al., 1989; Morimoto et al., 1988; Osorio et al., 1994; Osorio, Rottenberg, et al., 1998; Swack et al., 1991). No obstante, estudios *in vitro* e *in vivo* realizados en la última década con líneas celulares linfoides transfectadas con formas nativas o mutadas de CD6 y con ratones *Cd6*<sup>-/-</sup>, respectivamente, han permitido evidenciar un posible papel co-inhibidor o regulador negativo para CD6 (Oliveira et al., 2012; Orta-Mascaró et al., 2016). Nuevamente, estos estudios también están realizados en condiciones de estimulación supra-fisiológica (AcMos anti-CD3 $\epsilon$ ), es decir, en presencia de señales de intensidad y duración muy superiores a las generadas durante el reconocimiento específico de antígenos por el receptor clonotípico de los linfocitos. En consecuencia, sería importante abordar el estudio del papel co-estimulador/inhibidor de CD6 en sistemas *in vitro* e *in vivo* de estimulación fisiológica antígeno-específica.

Tal y como se ha comentado anteriormente, existe un amplio consenso en considerar a CD5 como un receptor eminentemente regulador negativo (inhibidor) de la activación linfocitaria. No obstante, las primeras investigaciones *in vitro* con sistemas de estimulación supra-fisiológicos en presencia o ausencia de AcMos anti-CD5 también apoyaban una posible función co-estimuladora de CD5 (Ledbetter et al., 1985; Ceuppens & Baroja, 1986; Alberola-Ila et al., 1992), pero fueron posteriores estudios *in vivo* en ratones *Cd5*<sup>-/-</sup> los que evidenciaron una indudable función co-inhibidora de CD5 (Bikah et al., 1996; Tarakhovsky et al., 1995). Estos datos no han podido ser confirmados en linfocitos humanos dado que, hasta la fecha, no se han reportado individuos con expresión deficiente de CD5. Sin embargo, se han identificado individuos portadores de variantes genéticas de CD5 funcionalmente relevantes que apoyan su papel inmunomodulador

negativo (Carnero-Montoro et al., 2012; Cenit et al., 2014). Concretamente, se trata de los polimorfismos de único nucleótido (SNPs) no sinónimos rs2241002 (Pro224>Leu) y rs2229177 (Ala471>Val) de CD5. Se ha demostrado que los linfocitos de individuos homocigotos para las variantes Pro224 y Ala471 son hiperreactivos a la estimulación con AcMos anti-CD3 $\epsilon$  y presentan formas clínicamente más severas de LES (Cenit et al., 2014), así como un mejor pronóstico en procesos neoplásicos, tales como LLC (Delgado et al., 2017), melanoma (Potrony et al., 2016) o carcinoma de próstata (Casadó-Llombart, Ajami, et al., 2022).

Aunque se han hecho importantes avances en descifrar las señales bioquímicas tempranas implicadas en la modulación de la activación linfocitaria por parte de CD5 y CD6, se desconoce qué consecuencias tienen esas señales a nivel de la expresión de génica. Existen evidencias de que la expresión de CD5 en células linfoides es capaz de inducir cambios relevantes en el patrón de expresión génica (Gary-Gouy et al., 2007; Whitley et al., 2022), pero se desconoce si esos cambios difieren entre individuos portadores de las variantes genéticas de CD5, así como, si la expresión de CD6 induce cambios transcriptómicos similares a los de CD5. Por consiguiente, sería importante abordar estudios de expresión génica con el propósito de validar la importancia funcional y las vías de señalización resultantes de la expresión en células linfoides de variantes genéticas de CD5, así como de la expresión de CD6.

En base a todo lo anteriormente expuesto, la presente Tesis Doctoral propone profundizar en el papel inmunomodulador de los receptores linfocitarios CD5 y CD6. Para esto, una de nuestras hipótesis es abordar el papel regulador positivo y negativo de CD6 en la función linfocitaria. En el caso del receptor CD5, nuestra hipótesis es que las variantes de CD5 inducen cambios en el perfil transcriptómico de células linfoides funcionalmente relevantes, así como por la expresión de CD6.

Finalmente, la presente Tesis Doctoral propone el estudio de los siguientes objetivos específicos:

1. Analizar las propiedades inmunomoduladoras de CD6 en condiciones de estimulación fisiológica antígeno-específica tanto *in vitro* como *in vivo*.

2. Analizar cambios en el perfil transcriptómico inducido en células linfoides por la expresión de variantes genéticas funcionalmente relevantes de CD5, así como por la expresión de CD6.

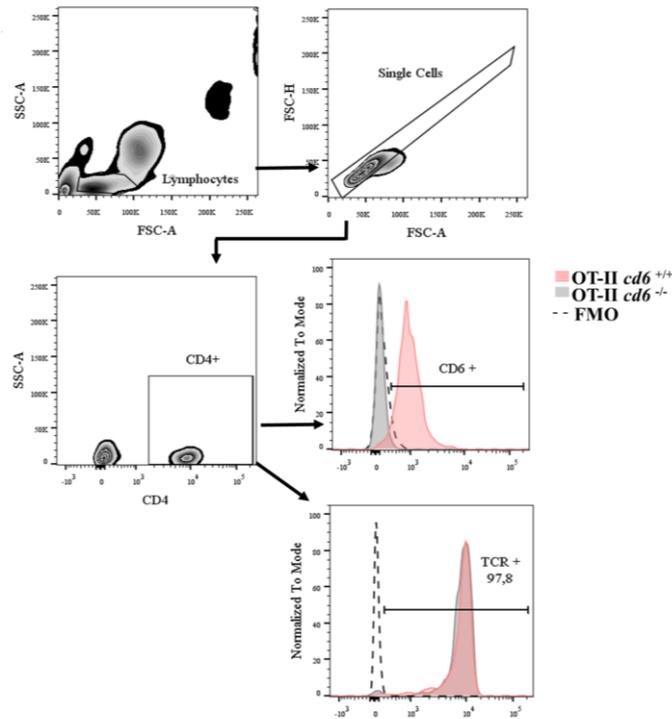
### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**



## 1. Ratones OT-II $Cd6^{-/-}$ y OT-II $Cd6^{+/+}$

Para evaluar la función del receptor linfocitario CD6, se generó en nuestro laboratorio una nueva línea de ratones C57BL/6 provenientes del cruce entre: ratones transgénicos OT-II ((Tcra Tcrb) 425Cbn/Crl) y ratones  $Cd6^{-/-}$ . Los ratones OT-II fueron proporcionados por la Dra. Pilar Martín (Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Madrid) y se caracterizan por expresar un TCR $\alpha\beta$  que reconoce específicamente el péptido 323-339 de la ovoalbúmina (OVA<sub>323-339</sub>, ISQAVHAAHAEINEAGR) en el contexto de I-A<sup>b</sup>. Los ratones  $Cd6^{-/-}$  fueron generados tal y como se ha descrito previamente (Orta-Mascaró et al., 2016). El entrecruzamiento de al menos diez generaciones permitió estabilizar la colonia de ratones OT-II  $Cd6^{-/-}$  y sus hermanos OT-II  $Cd6^{+/+}$  (*littermates*, pero serán señalados como *wild type* para referirse a la condición  $Cd6^{+/+}$ ) como control. Para determinar el fenotipo de los ratones OT-II  $Cd6^{-/-}$  y OT-II  $Cd6^{+/+}$ , se sangraron mediante punción de la vena facial y los linfocitos se tiñeron con un AcMo anti-CD6-PE para analizar la expresión de CD6 y anti-V $\alpha$ 2-APC para evaluar la expresión de la cadena alfa del receptor de células T de ratón.

Se observó que los ratones homocigotos de OT-II expresan la misma cantidad de receptor TCR transgénico que los heterocigotos (>90% de las células T CD4<sup>+</sup> son TCR-V $\alpha$ 2<sup>+</sup>). Por lo tanto, se fenotipó cada camada proveniente de cruces heterocigotos u homocigotos y así poder distinguir de los ratones no OT-II (<20% de las células T CD4<sup>+</sup> presentan TCR-V $\alpha$ 2<sup>+</sup>), como se representa en la **Figura M-1**. La cría y mantenimiento de la colonia de ratones OT-II  $Cd6^{-/-}$  (y  $Cd6^{+/+}$ ) se hizo en el estabulario de la Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona, en condiciones convencionales de estabulación (ventilación, luz y temperatura controladas y condiciones de agua y alimento *ad libitum*). Todos los ensayos *in vivo* e *in vitro* se hicieron con ratones de 8 a 12 semanas de edad de ambos sexos, según procedimientos aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal (CEEA) de la Universidad de Barcelona (CEEA: OB 43/20).



**Figura M-1.** Estrategia de “gating” usada para el fenotipado de la línea de ratones OT-II *Cd6*<sup>-/-</sup> y OT-II *Cd6*<sup>+/+</sup>. Se muestran histogramas y *zebra plot* representativos de la estrategia de análisis utilizada para el estudio de linfocitos T CD4<sup>+</sup> provenientes de ratones OT-II *Cd6*<sup>+/+</sup> (rosa) y OT-II *Cd6*<sup>-/-</sup> (gris). También se representa en el histograma el control FMO (del inglés *Fluorescence minus one*) (línea punteada).

## 2. Cultivo celular

Para los cultivos celulares se utilizó un medio RPMI 1640 con 2 mM L-Glutamina (Sigma & Aldrich, ref. R8758) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS, del inglés *Fetal Bovine Serum*, BioWest, ref. S1810-500), penicilina sódica 100 U/mL (Laboratorios ERN, España), estreptomycin 100 µg/mL (NORMON, España). En este trabajo este medio será referido como medio RPMI completo. El mantenimiento de los cultivos celulares se hizo en incubadores estándar (*AutoFlow*, NUAIRE), a una temperatura constante de 37 °C y a una presión parcial de CO<sub>2</sub> del 5%, en frascos de cultivo de 75 y 182,5 cm<sup>2</sup>, con tapón ventilado (VWR, ref. 734-2313 y 734-2315).

## 2.1 Cultivo de células murinas

Los ensayos *ex vivo* con células murinas, se cultivaron en medio RPMI completo, suplementado con 50  $\mu$ M de 2- $\beta$ -Mercaptoetanol (ThermoFisher, ref. 31350-010).

### 2.1.1 Procesamiento de órganos y aislamiento de células murinas

Todos los bazo y ganglios linfáticos utilizados se homogeneizaron presionando con un émbolo de jeringuilla (Plastipak 2 mL BD, ref. 300185) sobre una malla de 40  $\mu$ m (*cell strainer*, BIOLOGIX, ref. 15-1040). A continuación, se lavaron dos veces con exceso de tampón fosfato salino (PBS, del inglés *phosphate-buffered saline*), centrifugando a 350 x g por 5 min. En el caso del bazo, una vez procesado el órgano, se lisaron los eritrocitos con solución de lisis comercial (eBioscience, ref. 00-4333-57) a razón de 4 mL durante 4 min a temperatura ambiente (TA), seguido de dos lavados más con PBS. En cuanto a la sangre total, se realizó una punción de la vena mandibular con una aguja de 19G (BD Microlance, ref. 301700) o una punción cardíaca con jeringuilla de 1 mL (BD Plastipak, ref. 300014), en caso de sacrificio del animal. La sangre se recogió en *ependorfs* con heparina (Laboratorios Farm. ROVI, S.A., ref. 58.693). Finalmente, se lisaron los eritrocitos durante 60 min, y se lavó el exceso de solución de lisis con PBS.

### I Aislamiento de células T CD4<sup>+</sup> aisladas de bazo murino

Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> se aislaron por separación magnética con el *kit Dynabeads Untouched Mouse CD4 Cells* (Invitrogen, ref. 11415D) a partir de bazo. Una vez extraído el órgano y separadas las células a través de una malla o *cell strainer*, las células se incubaron durante 20 min a 4 °C con 100  $\mu$ L de cóctel de anticuerpos del kit (*Antibody Mix*), 100  $\mu$ L de FBS y 500  $\mu$ L de solución de separación (*Isolation buffer*, PBS sin calcio/magnesio al 2% de FBS, suplementado con 2 mM de EDTA. Pasado este tiempo, las células se lavaron por centrifugación con exceso de solución de separación (350 x g por 8 min). Posteriormente, las células se incubaron con 1 mL de *Microbeads* o bolas magnéticas previamente lavadas con 2 mL de solución de separación. La incubación se

hizo a TA durante 15 min, en agitación suave y constante. Al finalizar, se añadieron 5 mL de solución de separación a cada tubo y se introdujeron en el imán proporcionado por la casa comercial. En este punto, el imán atrae las células T CD4<sup>-</sup>, marcadas con anticuerpos unidos a las *Microbeads* magnéticas, dejando las células T CD4<sup>+</sup> en suspensión. Por último, después de retirar la suspensión celular con la ayuda de una pipeta, las células se lavaron con exceso de solución de separación. La pureza de la suspensión celular es mayor a un 95%, lo que fue confirmado por citometría de flujo.

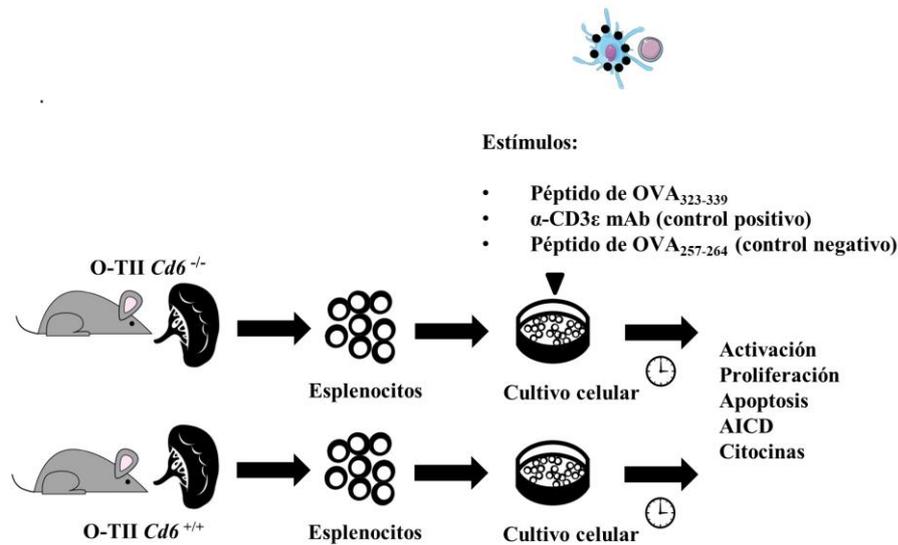
## II. Obtención de células dendríticas derivadas de la médula ósea

Las células progenitoras de médula ósea fueron aisladas de tibias y fémures de ratones *wild type* C57BL/6 de 8-20 semanas de edad. Se sembraron en placas de Petri de 150 mm (no tratadas, Cultex, ref. 45351058) a una concentración de  $4 \times 10^5$  células/mL en RPMI completo suplementado con 20 ng/mL de factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF; PeproTech, ref. 315-03) durante 10 días para diferenciarlas en células dendríticas derivadas de la médula ósea (BMDCs, del inglés *bone marrow-derived dendritic cells*). Para madurar las células dendríticas se incubaron durante 24 h con 250 ng/mL de lipopolisacárido (LPS, *LipoPolySaccharide*) del serotipo O111:B4 de *E. coli* (Sigma-Aldrich, ref. L2630). Las células dendríticas se utilizaron en el experimento a día 10 tras testar el grado de diferenciación y activación por citometría de flujo con los anticuerpos que se detallan en la **Tabla M-1**.

### 2.1.2 Estimulación *in vitro* de esplenocitos totales y células T CD4<sup>+</sup>

Para la estimulación *in vitro* de esplenocitos totales de ratones OT-II *Cd6<sup>-/-</sup>* y OT-II *Cd6<sup>+/+</sup>*, se repartieron  $2 \times 10^5$  células/pocillo en placas de 96 pocillos de fondo en “U” (Jet Biofill, ref. TCP 012096) y se incubaron sin péptido, con péptido OVA<sub>323-339</sub> (1-10 µg/mL; ISQAVHAAHAEINEAGR, InvivoGen, vac-isq), péptido OVA<sub>257-264</sub> (1-10 µg/mL; SIINFELK; InvivoGen, vac-sin) o con AcMo 145-2C11 anti-CD3ε soluble (TONBO Biosciences, ref. 70-0031-U100) a diferentes concentraciones (0.1-0.5 µg/mL) y tiempos (**Figura M-2**). Para estimular células T CD4<sup>+</sup> purificadas, se sensibilizó

previamente la placa de cultivo durante toda la noche a 4 °C con el anticuerpo AcMo 145-2C11 anti-CD3ε (0.5-5 µg/mL; TONBO Biosciences, ref. 70-0031-U100) diluido en PBS. Antes de adicionar las células, se lavó con PBS el exceso de anticuerpo no pegado a la placa. Una vez adicionadas se incluyó como co-estímulo AcMo anti-CD28 (1 µg/mL; TONBO Biosciences, ref. 70-0281-U100) en forma soluble. Las células fueron incubadas a diferentes tiempos y concentraciones de estímulos dependiendo del experimento.



**Figura M-2.** Esquema de cultivo de esplenocitos de ratón OT-II *Cd6*<sup>-/-</sup> y OT-II *Cd6*<sup>+/+</sup>. Se representan los estímulos añadidos y las determinaciones realizadas posteriormente.

### 2.1.3 Formación de conjugados T-APC e inmunofluorescencia

Los bazo de ratones OT-II *Cd6*<sup>-/-</sup> y OT-II *Cd6*<sup>+/+</sup> fueron disgregados para el aislamiento de células T CD4<sup>+</sup> por separación magnética con el kit *EasySep*<sup>TM</sup> *Mouse CD4*<sup>+</sup> *T Cell Isolation* (STEMCELL Technologies, ref. 19852) siguiendo las instrucciones del proveedor. Paralelamente, se obtuvieron BMDCs tal y como se mencionó en el apartado anterior, las cuales fueron previamente maduradas 24 h con LPS (250 ng/mL; Sigma-Aldrich, L2630) y cargadas durante 2 h con el péptido OVA<sub>323-339</sub> (5 µg/mL). También, en otra condición de estimulación se utilizó la proteína ovoalbúmina (100 µg/mL; Sigma-Aldrich, ref. A2512) que se administró a BMDCs simultáneamente con el LPS. Luego, se marcó con CMAC (10 µM; 7-amino-4 chloromethylcoumarin) a las BMDCs para distinguirlas de las células T. Ambos tipos celulares (T CD4<sup>+</sup> y los BMDC) se co-cultivaron (proporción 2:1) en portaobjetos recubiertos de poly-L-Lys (50

$\mu\text{g/mL}$ ) durante 1 h a 37 °C y luego se fijaron con paraformaldehído (PFA; 4% durante 10 min a TA). Las células se bloquearon y permeabilizaron con una solución de PBS conteniendo BSA (3 %), Fc-block, Tritón X-100 (0.1 %), globulina- $\gamma$  humana (50  $\mu\text{g/mL}$ ), suero de pollo (10 %) y azida (0.1 %) durante 30 min. Las muestras se tiñeron después con anticuerpos primarios y secundarios: anti-CD3 $\zeta$  (*rabbit antibody* 448; proporcionado por Dr. B. Alarcón), *chicken anti-rabbit* AF647 A-21443, phalloidin-AF568 (5  $\mu\text{g/mL}$ ; Invitrogen) y anti- $\alpha$ -*tubulin*-FITC (0.1  $\mu\text{g/mL}$ ; Sigma). Los cubreobjetos se montaron sobre *Prolong Diamond* y se analizaron con un microscopio confocal Leica SP8 (Leica) equipado con un objetivo HCX PL APO 40x o 63x. Las imágenes se procesaron y montaron utilizando el software Imaris y el software Photoshop. Para el cálculo de la distancia del centro organizador de microtúbulos (MTOC, *microtubule organizing centre*) al área de contacto se utilizó el software Imaris.

### 2.1.4 Ensayos de *Western Blot* (WB)

Para los ensayos de WB se utilizaron células T CD4<sup>+</sup> aisladas de bazo de ratones OT-II *Cd6<sup>-/-</sup>* y OT-II *Cd6<sup>+/+</sup>* que fueron co-cultivadas con BMDCs maduras (precargadas con el péptido de OVA) durante 0, 5 o 20 min (proporción 5:1). Las células se lisaron durante 20 min a 4 °C en solución Tris-HCl (50 mM, pH 7.5) con NP40 (1%), Tritón X-100 (0.2%), NaCl (150 mM), EDTA (2 mM), MgCl<sub>2</sub> (1.5 mM) e inhibidores de fosfatasa (PhosSTOP, Roche, 4906837001) y proteasas (Complete, Roche, 11836145001). Los extractos se mezclaron con solución de *Laemli* y  $\beta$ -Mercaptoetanol (concentración final 150 mM), se hirvieron durante 10 min a 100 °C, se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon con solución salina tamponada con Tris que contenía TWEEN-20 (0.2%) y BSA (5%). Posteriormente, se incubaron con anticuerpos primarios (durante la noche a 4 °C): anti CD3 $\zeta$  (Y83; Abcam, ref. ab68236), anti-PLC $\gamma$  (Y783; Cell Signaling, ref. 2821), anti-ERK 1/2 T202/Y204 (Calbiochem) y anti- $\beta$ -actina (Sigma Aldrich, ref. SAB3500350). A continuación, se aplicaron anticuerpos secundarios marcados con peroxidasa (30 min a TA) y se revelaron con *Immobilon Forte Western HRP substrate* (Sigma Aldrich, Ref. WBLUF0500) con la ayuda de un sistema de imagen de quimioluminiscencia y fluorescencia ImageQuant LAS-4000 (Fujifilm). La intensidad óptica de las bandas se

midió con ImageJ, normalizada con respecto al control de carga y a un control interno (lisado idéntico para todos los geles).

## 2.2 Cultivos de células humanas

Se utilizó una línea celular Daudi derivada de un paciente afecto de linfoma Burkitt B y células B primarias provenientes de sangre periférica de adultos y de cordón umbilical. Todas las células humanas fueron cultivadas en medio RPMI completo.

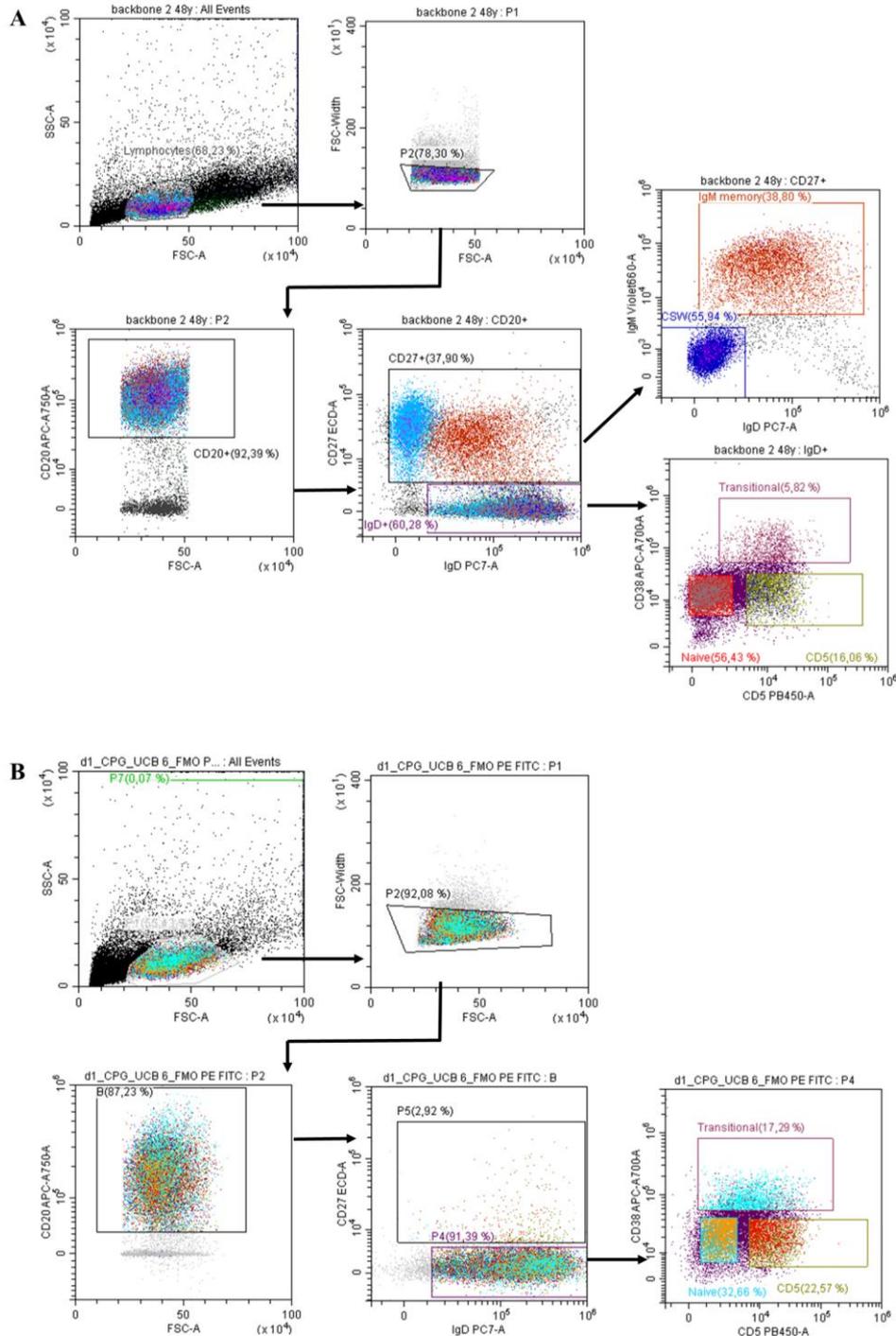
### 2.2.1 Enriquecimiento de células B CD19<sup>+</sup>

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC, del inglés *peripheral blood mononuclear cells*) de adultos y de sangre de cordón umbilical (UCB, del inglés *umbilical cord blood*) de donantes sanos. Las muestras se obtuvieron previo consentimiento de los padres o donantes, de acuerdo con la Declaración de Helsinki y la aprobación del comité de ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Duisburg-Essen (BO-10-4380). Las células se aislaron mediante centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll (densidad 1,077 g/mL; PAN-Biotech, Ref: P04-601000), seguida de una selección positiva con *microbeads* magnéticas recubiertas de AcMo anti-CD19<sup>+</sup> (Miltenyi Biotec, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 2.2.2 Estimulación *in vitro* de linfocitos B

Células B CD19<sup>+</sup> ( $5 \times 10^5$ /pocillo) se cultivaron *in vitro* durante 24 y 48 h en medio RPMI completo en presencia de estímulos dependientes (TD) e independientes (TI) de células T. La estimulación TD se realizó con anti-Igs (0.03 µg/µL; Jackson ImmunoResearch, ref. 109-006-064) y CD40-L (1 µg/mL; R&D Systems, ref. 6420-CL-025/CF) y anticuerpos anti-HA (5 ng/mL; R&D Systems, ref. MAB060), mientras que la TI se realizó con *cytosine-phosphate-guanine oligonucleotide type B* (CpG-B ODNs *type B* o R848) (2.5 µM; InvivoGen). Además, otra condición de estimulación fue BCR-dependiente con anti-IgM F(ab')<sub>2</sub> (10 µg/mL; Jackson ImmunoResearch). Post-estimulación las células fueron lavadas con PBS y se tiñeron para evaluar la expresión de

CD6 en las subpoblaciones de células B, siguiendo la estrategia de *gating* representada en la (Figura M-3).



**Figura M-3. Análisis de subpoblaciones de células B provenientes de sangre de cordón umbilical y sangre periférica de adultos sanos.** (A) Estrategia de *gating* usada para la selección de subpoblaciones de células B en adultos; las células B de memoria IgM (CD27<sup>+</sup> IgD<sup>+</sup> IgM<sup>+</sup>), las células B CD5<sup>+</sup> (CD5<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> CD38<sup>low</sup> IgD<sup>+</sup>), linfocitos B vírgenes o naïve (CD20<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> CD38<sup>high</sup> IgD<sup>+</sup>), las células B transicionales (CD27<sup>-</sup>CD38<sup>high</sup>) y las células de memoria

con cambio de clase (CD27<sup>+</sup> IgD<sup>-</sup> IgM<sup>-</sup>), en inglés *switch memory cells* (CSW) en sangre periférica de adultos. **(B)** Estrategia de *gating* usada para la selección de subpoblaciones de células B en recién nacidos; células B CD5<sup>+</sup> (CD5<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> CD38<sup>low</sup> IgD<sup>+</sup>), linfocitos B vírgenes o *naïve* (CD20<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>CD38<sup>low</sup> IgD<sup>+</sup>), las células B transicionales (CD27<sup>-</sup>CD38<sup>high</sup>) en recién nacidos.

### 3. Análisis por citometría de flujo

La lectura se hizo en el citómetro FACS CANTO II (BD), del Servicio de Inmunología del Hospital Clínic de Barcelona y en CytoFLEX (Beckman Coulter, Krefeld, Germany) del Institute of Cell Biology (Cancer Research) de la University of Duisburg-Essen. Se utilizó FAC-SARIA III cell sorter (BD Biosciences, Heidelberg, Germany) /FACSAria Fusion cell sorter (BD Bioscience) se utilizó para la separación de células en suspensión equipado con BD FACSDiva software (BD Biosciences). Los análisis fueron realizados en el software Flowjo VX y en CytExpert 2.5 (Beckman Coulter).

#### 3.1. Antígenos de superficie e intracelulares

Para la determinación de antígenos de superficie, se bloquearon 10<sup>5</sup> células con PBS-FBS (10%), durante 20 min a 4 °C. En el caso de células murinas, se añadió un bloqueador de Fc anti-CD16/CD32 (1 µg/10<sup>6</sup> células; 2.4G2, TONBO Biosciences, ref. 35-0161-U025). A continuación, se centrifugaron a 1.500 rpm durante 5 min a 4-8 °C y se descartó el sobrenadante. En el siguiente paso se añadieron los anticuerpos inmunorreactivos (**Tabla M-1, M-2 y M-3**) para los antígenos de interés, marcados con fluorocromos, y se incubaron durante 25 min a 4-8 °C. Posteriormente, las muestras se lavaron dos veces con exceso de PBS, centrifugando a 1.500 rpm durante 5 min y se adquirieron por citometría de flujo. Se adquirieron y analizaron un mínimo de 20.000 eventos/muestra.

Para la tinción de linfocitos T<sub>regs</sub>, las células se tiñeron con anticuerpos de superficie de la misma manera que en el caso anterior. Posteriormente, se lavó el exceso de anticuerpo con PBS y se incubaron con la solución de fijación y permeabilización (TONBO Biosciences, ref. 1020-L050) durante 30 min a 4 °C. Posteriormente se lavaron

(2.100 rpm 5 min a 4 °C) e incubaron con la solución de permeabilización (TONBO Biosciences, ref. 1213-L150) donde se encontraba diluido el anticuerpo anti-FoxP3-PE. Pasados 30 min de incubación, las células se lavaron con exceso de PBS a 2.100 rpm 5 min, para su posterior adquisición por citometría de flujo.

**Tabla M-1. Lista de anticuerpos usados con células murinas.**

Especificidad	Fluorocromo	Clon	Proveedor
CD3	APC	145-2C11	TONBO Biosciences
CD8	PE	53-6.7	BioLegend
CD4	V450	75-0042	TONBO Biosciences
CD19	PE	1D3	TONBO Biosciences
NK1.1	PE	PK136	BD Pharmigen
CD44	Percp-Cy5.5	IM7	TONBO Biosciences
CD62L	APC	MEL-14	TONBO Biosciences
CD25	APC	PC61.5	TONBO Biosciences
CD69	eF450	H1.2F3	eBioscience™
FOXP3	PE	3G3	TONBO Biosciences
PD1	FITC	J43	eBioscience™
CD11c	V450	N418	BD Biosciences
GR-1	APC	RB6-8C5	TONBO Biosciences
CD86	PE	GL1	BD Pharmigen
CD40	APC	3/23	BioLegend
Vα 2 TCR	APC	B20.	BD Biosciences
CD6	PE	OX-129	BioLegend
CD24	BV421	ML5	BD Biosciences
CD21	APC/Fire™ 750	Bu32	BioLegend

Abreviaciones: *Allophycocyanin* (APC), *Phycoerythrin* (PE), *Fluorescein Isothiocyanate* (FITC), *violet Fluor 450* (V450), *Peridinin Chlorophyll Protein-Cyanine5.5* (PerCP-Cy5.5), *Allophycocyanin/ Fire 750* (APC/Fire™ 750), *eFluor™ 450* (eF450).

**Tabla M-2. Lista de anticuerpos usados en experimentos de activación de células Daudi**

Especificidad	Fluorocromo	Clon	Proveedor
CD40	BV421	5C3	BD Pharmigen
CD69	PE-Cy7	L78	BD Biosciences
CD80	FITC	MEM-233	ImmunoTools
CD83	PE	HB15e	BioLegend
CD86	APC	FUN-1	BD Biosciences

## Materiales y métodos

CD6	FITC	M-T605	BD Biosciences
CD5	PerCP-Cy5.5	L17F12	TONBO Biosciences
CD21	PE-Cy7	B-ly4	BD Biosciences
CD19	PE-Cy7	HIB19	TONBO Biosciences
CD20	APC-Cy7	2H7	BioLegend
IgD	PE	IA6-2	BD Biosciences
Anti-HLA-DR	V450	L243	BD Biosciences

Abreviaciones: *Brilliant Violet 421* (BV421), *Phycoerythrin-Cy7* (PE-Cy7), *Fluorescein Isothiocyanate* (FITC), *Phycoerythrin* (PE), *Allophycocyanin* (APC), *Peridinin Chlorophyll Protein-Cyanine5.5* (PerCP-Cy5.5), *violet Fluor 450* (V450) *Allophycocyanin -Cy7* (APC-Cy7).

**Tabla M-3. Lista de anticuerpos usados con células B humanas.**

Especificidad	Fluorocromo	Clon	Proveedor
CD6	APC	M-T411	Miltenyi Biotec
CD69	PE	FN50	BD Pharmingen
Anti-IgM	BV650	MHM-88	BioLegend
CD20	APC-H7	2H7	BD Pharmingen
CD5	BV421	L17F12	BioLegend
Anti-IgD	PE-Cy7	IA6-2	BD Pharmingen
CD27	PE/Dazzle 594	M-T271	BioLegend
CD38	APC-R700	HIT2	BD Horizon
CD25	FITC	M-A251	BD Pharmingen
CD80	FITC	L307.4	BD Pharmingen
CD86	PE	IT2.2	BD Pharmingen
Anti-IgA	FITC	IS11-8E10	Miltenyi Biotec
Anti-IgG	PE	IS11-3B2.2.3	Miltenyi Biotec

Abreviaciones: *Allophycocyanin* (APC), *Phycoerythrin* (PE), *Brilliant Violet 650* (BV650), *allophycocyanin - H7* (APC-H7), *Brilliant Violet 421* (BV421), *Phycoerythrin-Cy7* (PE-Cy7), *phycoerythrin/Dazzle 594*(PE/Dazzle 594), *Allophycocyanin -R700* (APC-R700), *Fluorescein Isothiocyanate* (FITC).

### 3.2 Marcaje de apoptosis celular (Anexina V y 7AAD)

Los marcajes con Anexina V y 7-aminoactinomycin D (7AAD) se hizo durante 15 min a TA y siguiendo las instrucciones del fabricante (Biolegend, ref. 640930). Las células Anexina V<sup>+</sup> y 7AAD<sup>-</sup> se consideraron como células en apoptosis, mientras que las células con tinción Anexina V<sup>-</sup> y 7AAD<sup>+</sup> como células en apoptosis tardía y necrosis.

### 3.3 Determinación de la proliferación celular

La determinación del porcentaje de células proliferantes se llevó a cabo mediante tinción con *Carboxyfluorescein succinimidyl ester* (CFSE; Life Technologies, ref. C34554) y posterior análisis de fluorescencia por citometría de flujo. En este caso, las células se incubaron con CFSE (0.5  $\mu$ M) durante 15 min a 37 °C. A continuación, las células se lavaron para retirar el exceso de CFSE y se incubaron a 37 °C con medio RPMI completo durante 30 min, antes de lavarlas por última vez y ponerlas en cultivo. A las 72 y/o 96 h las células se tiñeron y se analizaron por citometría de flujo. Las células muertas se excluyeron tiñendo las células con el colorante LIVE/DEAD *Fixable Violet Dead Cell Staining dye* (Invitrogen, ref. L34964). También, se utilizó para medir la proliferación de células T CD4<sup>+</sup> la tinción con Cell Trace™ Violet (Invitrogen, C34557). Brevemente, las células T se tiñeron con Cell Trace Violet antes del cocultivo de BMDCs.

## 4. Análisis de expresión de citocinas y factores de transcripción

### 4.1 PCR semicuantitativa a tiempo real

#### 4.1.1 Extracción y purificación de ARN

Se extrajo ARN de muestras de orejas y de ganglios linfáticos drenantes localregionales provenientes del modelo murino experimental *in vivo*. Para extraer el ARN de las orejas, se sumergió el tejido en un *ependorf* con 1 mL TRIzol™ *Reagent* (Invitrogen, ref. 15596018) y se homogeneizó durante 4 min con *Polytron*™ PT1200E (Thermo Fisher Scientific) para continuar según indicaciones del fabricante. En el caso de los ganglios linfáticos drenantes localregionales, el ARN se extrajo con el *kit illustra*™ *RNAspin Mini Isolation* (Cytiva, ref. GE25-0500-71) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para extraer el ARN de esplenocitos murinos o células humanas se utilizó el *kit RNeasy*® *Micro* (Qiagen, ref. 74004) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración y la calidad del ARN purificado se analizó mediante la lectura de la absorbancia a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro NanoDrop™ 2000/2000c (Thermo Fisher Scientific). Sólo se consideraron aquellas muestras con valores de pureza próximos a un cociente 260/280nm de 2.

#### 4.1.2 Retrotranscripción y análisis de la expresión génica diferencial

Todas las muestras de ARN extraídas se retrotranscribieron a ADN complementario (ADNc) siguiendo las instrucciones del kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription with RNase Inhibitor* (Applied Biosystems, ref. 4374966), con las siguientes condiciones de termociclación: 1 ciclo de 10 min a 25.5 °C, 1 ciclo de 120 min a 37 °C, 1 ciclo de 5 min a 85 °C y para finalizar a 4 °C.

El análisis de la expresión génica diferencial de muestras provenientes de células murinas se hizo por PCR semicuantitativa a tiempo real (RT-qPCR, del inglés *real-time quantitative Polymerase Chain Reaction*) con sondas *Taqman* en un termociclador 7900HT *fast real-time PCR system* (Applied Biosystems, Foster City, CA, US). Para ello se mezclaron 2 µL de ADNc de cada muestra, 2.5 µL de H<sub>2</sub>O, 0.5 µL de *Master Mix (Taqman Fast universal PCR Master Mix*, Life Technologies, ref. 4352042) y 0.5 µL de cada cóctel de *primers* y sonda *Taqman* para diferentes citocinas o factores de transcripción (**Tabla M-4**). El análisis de la expresión de cada citocina se normalizó respecto a los valores de expresión de un gen no inducible como es Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH, Mm99999915\_g1, Life Technologies), siguiendo la fórmula:  $2^{-\Delta Ct}$ ; dónde  $\Delta Ct = (CT_{\text{Gen de interés muestra}} - CT_{\text{GADPH muestra}})$ . Los resultados se representan en cantidad relativa.

El análisis de la expresión génica diferencial a partir del ARN proveniente de orejas y ganglios linfáticos drenantes locorregionales murinos se realizó por qPCR mediante *SYBR® Green* (Applied Biosystems) y el termociclador de PCR *StepOne Plus* (Applied Biosystems). Para ello se mezclaron 9 µL de ADNc de cada muestra diluida (1:20), 10 µL de *SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, ref. 4368702) y 1 µL del cóctel oligonucleótidos específicos para las diferentes citocinas (**Tabla M-5**). La expresión de cada citocina se normalizó respecto a los valores de dos genes no inducibles como son HPRT-1 (del inglés *hypoxanthine phosphoribosyl transferase 1*) y GAPDH (del inglés *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) mediante la fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  siguiendo las instrucciones de *Applied Biosystem's*.

## Materiales y métodos

**Tabla M-4. Sondas TaqMan usadas para la cuantificación de ARN específicos**

Gen	Proteína	Ensayos TaqMan
<i>Cd274</i>	Ligando 1 de la Proteína de muerte celular programada 1(PD-L1)	Mm00452054_m1
<i>Pdcd1</i>	Proteína de muerte celular programada 1(PD-1)	Mm00435532_m1
<i>Ifng</i>	interferón- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )	Mm00801778_m1
<i>Il2</i>	Interleucina-2 (IL-2)	Mm00434256_m1
<i>Faslg</i>	<i>Tumor necrosis factor ligand superfamily member 6 (FasL)</i>	Mm00438864_m1
<i>Fas</i>	<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily member 6 (Fas)</i>	Mm01204974_m1

**Tabla M-5. Secuencias de oligonucleótidos utilizadas para la cuantificación de ARN**

Gen	Proteína	Secuencias (5' - 3')	Referencia
<i>Ifng</i>	interferón- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )	FW: TGAAAGACAATCAGGCCATC R: TTGCTGTTGCTGAAGAAGGT	Phoon R <i>et al.</i> , 2008.(Phoon et al., 2008)
<i>Tnf</i>	Factor de necrosis tumoral (TNF)	FW: CCCCAAAGGGATGAGAAGTT R: GGTCTGGCCATAGAACTGA	Wright CR <i>et al.</i> , 2015.(Wright et al., 2015)
<i>Il1b</i>	Interleucina-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )	FW: GCAGGCAGTATCACTCATTGTGG R: GAGTCACAGAGGATGGGCTCTTC	Shi Y <i>et al.</i> , 2020.(Shi et al., 2020)
<i>Il4</i>	Interleucina-4 (IL-4)	FW: TCAACCCCCAGCTAGTTGTC R: TGTTCCTTCGTTGCTGTGAGG	Phoon RK <i>et al.</i> , 2008.(Phoon et al., 2008)
<i>Il6</i>	Interleucina-6 (IL-6)	FW: TTCCATCCAGTTGCCTTCTT R: ATTTCCACGATTTCCAGAG	Yang YH <i>et al.</i> , 2004.(Y. H. Yang et al., 2004)
<i>Il10</i>	Interleucina-10 (IL-10)	FW: ATTTGAATTCCCTGGGTGAGAAG R: CACAGGGGAGAAATCGATGACA	Yee CS <i>et al.</i> , 2005.(Yee et al., 2005)
<i>Il17a</i>	Interleucina- 17A (IL-17A)	FW: ATCAGGACGCGAAACATGA R: TTGGACACGCTGAGCTTTGA	Kreymborg K <i>et al.</i> , 2007.(Kreymborg et al., 2007)
		FW: TTGAGGTGTCCAACCTCCAGCA	

## Materiales y métodos

<i>Il22</i>	Interleucina-22 (IL-22)	R: AGCCGGACGTCTGTGTTGTTA	Kreymborg K <i>et al.</i> , 2007.(Kreymborg et al., 2007)
<i>Csf2</i>	Factor de estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF/ CSF)	FW: ACCACCTATGCGGATTTTCAT R: TCATTACGCAGGCACAAAAG	Kim DH <i>et al.</i> , 2008.(Kim et al., 2008)
<i>Tbx21</i>	Factores de transcripción T- box (TBX21 / T- bet)	FW: CCTGGACCCAACTGTCAACT R: AACTGTGTTCCCGAGGTGTC	Phoon RK <i>et al.</i> , 2008.(Phoon et al., 2008)
<i>Rorc</i>	Receptor Nuclear (ROR- $\gamma$ )	FW: GACAGGGAGCCAAGTTCTCAG R: TCGGTCAATGGGGCAGTTC	Yang J & Xu L., 2010.(J. Yang & Xu, 2016)
<i>Gata3</i>	Factor de transcripción específico de células T (GATA-3)	FW: GAACCGCCCCTTATCAAG R: CAGGATGTCCCTGCTCTCCTT	Kemp KL <i>et al.</i> , 2010.(Kemp et al., 2010)
<i>Foxp3</i>	<i>Forkhead box protein P3</i> (FOXP3)	FW: AGACCCCTGTGCTCCAAGTG R: CAGACTCCATTT-GCCAGCAG	Devaud C <i>et al.</i> , 2014.(Devaud et al., 2014)
<i>Ahr</i>	Receptor de hidrocarburos de arilos (AhR)	FW: GGCTTTCAGCAGTCTGATGTC R: CATGAAAGAAGCGTTCTCTGG	Qiu J <i>et al.</i> , 2012.(Qiu et al., 2012)
<i>Tgfb1</i>	<i>Transforming growth factor <math>\beta</math>- 1</i> (TGF- $\beta$ -1)	FW: CCGAAGCGGACTACTAT R: GTAACGCCAGGAATT GT	Martín P <i>et al.</i> , 2010.(Martín et al., 2010)
<i>Gapdh</i>	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH)	FW: AACTTTGGCATTGTGGAAGG R: ACACATTGGGGGTAGGAACA	Wu PC <i>et al.</i> , 2015.(Wu et al., 2015)

<i>Hprt</i>	Hipoxantina fosforribosil- transferasa (HPRT)	FW: TCCTCCTCAGACCGCTTTT R: CCTGGTTCATCATCGCTAATC	Surette FA <i>et al.</i> , 2021.(Surette et al., 2021)
-------------	--	---	---

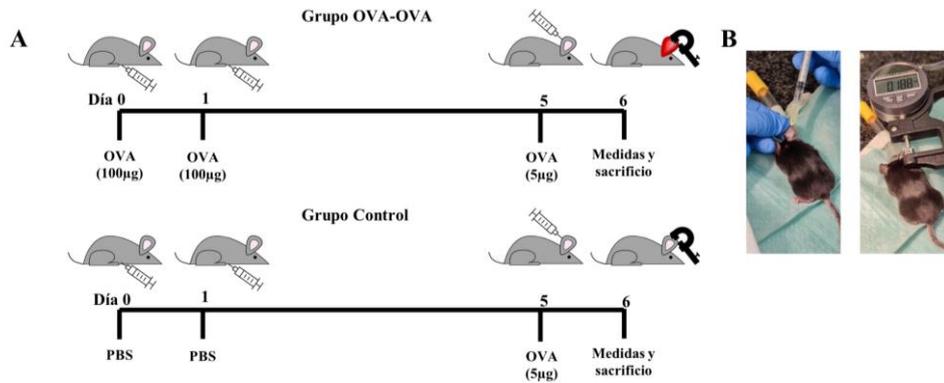
#### 4.2 Análisis de citocinas por ELISA

La determinación de citocinas (IL-2, IFN- $\gamma$ ) presentes en los sobrenadantes del cultivo celular, se hizo por ELISA, empleando los kits de BD Bioscience OptEIA (IFN $\gamma$  ref. 555142, IL-2 ref. 555148), en placas de 96 pocillos (Maxisorp Nunc-Immunoplate, ref. 439454) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### 5. Modelo murino de hipersensibilidad retardada inducida por Ovoalbúmina

Los ratones OT-II *Cd6<sup>-/-</sup>* y OT-II *Cd6<sup>+/+</sup>* se inmunizaron mediante una inyección intradérmica (*i.d.*) de 100  $\mu$ g de OVA (EndoGrade<sup>®</sup>, ref. #300028) diluida en 200  $\mu$ L de solución salina estéril (0,9%) y libre de pirógenos (suero fisiológico Braun, ref. 354-5180), se inyectó en la zona abdominal sin adyuvantes y la piel sin afeitar (**Figura M-4**). Debido a que los ratones de fondo C57BL/6 tienen una respuesta DTH a OVA comparativamente reducida a la de otras cepas murinas, se realizaron 2 inmunizaciones *i.d.* de 100  $\mu$ g en 2 días consecutivos. Al 4<sup>o</sup> día se inyectaron ambas orejas con 10  $\mu$ l vía *i.d.* con OVA (5  $\mu$ g) en solución salina (grupo sensibilizado a OVA) bajo anestesia con isoflurano (1.5-2.5 %, Abbott Laboratories). Los ratones de los grupos control se “inmunizaron” de manera idéntica con 200  $\mu$ L del diluyente y se desafiaron las orejas con 10  $\mu$ L vía *i.d.* con OVA (5  $\mu$ g) (control PBS-OVA) o solución salina (PBS-PBS). Se controló el peso de los ratones durante el tratamiento y el grosor de las orejas con un micrómetro (Neoteck Company, China) antes y 24 h después del desafío. El aumento del grosor de la oreja se expresó como media  $\pm$  SEM (en mm). La inflamación de las orejas también se midió después de la exposición mediante el análisis de las diferencias de peso (en mg) entre los discos de 4 mm obtenidos de las orejas del grupo control y grupo sensibilizado a OVA. En el día del sacrificio de los ratones, se aislaron bazo, orejas y ganglios linfáticos drenantes locorregionales. Parte de las orejas y ganglios se sumergieron en formol durante 24 h y luego se incluyeron en parafina. El tejido restante

se usó para analizar la expresión diferencial de ARNm de citocinas. El bazo se utilizó para análisis por citometría de flujo.



**Figura M-4. Esquema del modelo murino de hipersensibilidad retardada inducida con Ovoalbúmina, en ratones OT-II *Cd6<sup>-/-</sup>* y OT-II *Cd6<sup>+/+</sup>*.** (A) Esquema del modelo de hipersensibilidad retardada inducida con Ovoalbúmina en el grupo sensibilizado con OVA (OVA-OVA) y control. (B) Se muestran unas imágenes representativas del procedimiento.

## 6. Análisis histológicos y tinción inmunohistoquímica (IHC)

Las orejas y ganglios linfáticos drenantes locorreregionales se extirparon inmediatamente después del sacrificio y se almacenaron durante la noche en una solución con PFA (4%) a TA. Al día siguiente, las muestras se lavaron en PBS durante 3 h, luego se deshidrataron en etanol graduado (70%, 90% y 100%) se permearon en xileno y se incluyeron en parafina (Merck, ref. 107150). Luego, las muestras se cortaron en secciones de 5 µm de espesor (Microtomo Leica HistoCore MULTICUT) y se tiñeron con hematoxilina (Sigma-Aldrich, ref. MHS16) y eosina (Sigma-Aldrich, ref. HT110116). Para la tinción de IHC, se utilizó un kit de detección de HRP/DAB de Abcam (Abcam, ref. ab64261) y se continuó según indicaciones del fabricante. Brevemente, los cortes de tejidos de 5 µm de espesor se desparafinaron en xileno y luego se rehidrataron en una serie de graduaciones decrecientes de alcohol etílico (100 %, 100 %, 95 %, 70 % y 50 %). A continuación, los cortes se sumergieron en una solución de tampón citrato (pH 6), y se calentaron a 121 °C en autoclave durante 10 min para la recuperación antigénica. Luego, fueron lavados en solución tamponada TBST conteniendo Tris 50 mM y Tween 20 (0,025 % v/v). Seguidamente, los cortes se incubaron en solución de peróxido de hidrógeno durante 10 min para bloquear la actividad endógena de peroxidasa, seguido de

una solución de bloqueo de proteínas durante 30 min a TA, con la intención de bloquear sitios de unión inespecíficos. Después, se añadieron los anticuerpos primarios contra IL-22 (1:500; Invitrogen, ref. PA121358) e IFN- $\gamma$  (1:500; Thermo Scientific, ref. PA595560), durante toda la noche a 4°C, en cámara húmeda. Posteriormente, los cortes fueron lavados en solución TBST e incubados durante 30 min con un anticuerpo policlonal de cabra biotinado. En seguida se añadió estreptavidina-peroxidasa (SAv-PO) durante 10 min siguiendo las instrucciones del fabricante (Abcam). Finalmente, se incubaron durante 3 min con cromógeno 3,3'-diaminutosobencidina (DAB) y su sustrato para revelar la reacción. La tinción positiva dio como resultado un producto de reacción marrón. Los tejidos se contrastaron con hematoxilina antes de montarlos con medio DPX (Sigma-Aldrich, ref. 1005790500). Los controles negativos se trataron como antes, pero omitiendo el primer anticuerpo. Todas las muestras fueron observadas con el microscopio Olympus BX41 y Cámara Olympus XC50 a 20, 40 y 60x. Las imágenes digitales fueron analizadas con el *software* Image J (NIH Image, Bethesda, MD, USA).

## **7. Expresión de variantes de CD5 y CD6 en células Daudi y análisis del transcriptoma.**

Mediante técnicas de expresión lentiviral se transdujeron y seleccionaron células Daudi (una línea celular B derivada de un linfoma de Burkitt CD5<sup>neg</sup> y CD6<sup>neg</sup>) para que expresen establemente CD6, así como las variantes Ala471 y Val471 de CD5 o una proteína fluorescente verde de control (ZsGreen). Para ello, se sintetizó la versión con codones optimizados de ADNc completo de CD6 humano (Proteogenix, Schiltigheim, France) y de las variantes Ala471 y Val471 de CD5 (GenScript, Leiden, Países Bajos) para su posterior clonación (como fragmentos EcoRI y XbaI) en el vector lentiviral de segunda generación pLVX-puro.

A continuación, se generaron partículas lentivirales completas mediante la cotransfección con el *kit Lipofectamine2000* (Thermo Fisher Scientific) de la línea celular empaquetadora HEK293T con dichos vectores pLVX-Puro y los plásmidos de empaquetamiento pCMV-VSV-G y psPAX. Después de 3 días en cultivo con medio DMEM (Gibco) conteniendo FBS (10 %; Sigma-Aldrich), penicilina (100 UI/mL; Laboratorios ERN) y estreptomina (100  $\mu$ g/mL Laboratorios Normon), se recogieron los sobrenadantes ricos en partículas lentivirales y se purificaron por centrifugación y

filtración (0.45  $\mu\text{m}$ ). Para la transducción lentiviral, las células Daudi se incubaron durante 48 h con partículas lentivirales que codificaban para CD6 o para las variantes Ala471 o Val471 de CD5 en presencia de polibreno (Merck Millipore).

Las células transducidas se seleccionaron en presencia de medio de cultivo RPMI completo que contenía puromicina (1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ; Gibco). Mediante el marcaje con AcMo anti-CD6 FITC humano (M-T605, BD Biosciences) o anti-CD5 PerCP-Cy5.5 humano (clon 53- 7.3, BioLegend), según corresponda, se seleccionaron por *cell sorting* en un BD FACSAria células Daudi con una expresión elevada y estable de CD5 o CD6. Se determinó la expresión de marcadores de activación mediante citometría de flujo en estado basal o en condiciones de estimulación y se extrajo ARN para su análisis por secuenciación masiva paralela (*RNA-seq*), con el *Kit RNeasy Mini* (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. En el caso de las líneas Daudi que expresan las variantes de CD5, las librerías para la secuenciación se prepararon con *NEBNext rRNA Depletion Kit and the NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina* (New England Biolabs) para la secuenciación en una plataforma *MiSeq* (Illumina). El procesamiento de las muestras para la preparación de las librerías y la secuenciación se llevó a cabo en el Centro Nacional de Análisis Genómico (CNAG-CRG) y el análisis de los datos se realizó con el apoyo del equipo de Genómica Funcional del CNAG-CRG. Las lecturas de *RNA-seq* se mapearon contra el genoma humano de referencia y el vector CD5 (GRCh38<sup>+</sup>vector CD5) utilizando STAR/2.7. 8<sup>a</sup> (Dobin et al., 2013) con parámetros de ENCODE. La cuantificación de genes se realizó con RSEM/1.3.0 8(B. Li & Dewey, 2011) con parámetros por defecto y anotación de genes (gencode38). La normalización y análisis de expresión diferencial se realizó con limma/3.34.9 con la transformación 'voom' (Law et al., 2014). El análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes se realizó con GSEA *software* (<http://software.broadinstitute.org/gsea/>) y la visualización e interpretación con Cytoscape (<http://www.cytoscape.org/>) (EnrichmentMap y AutoAnnotate).

Finalmente, para las líneas Daudi que expresan el receptor CD6, el procesamiento de las muestras para la preparación de las librerías y la secuenciación, así como el análisis de los datos se llevó a cabo con el apoyo del grupo de investigación de *Immunology and Lymphomagenesis* del Hospital universitario de Essen, Alemania. Las librerías para la secuenciación se prepararon con NuGEN Trio *RNA-seq* System (NuGEN, Redwood City,

California). Las muestras se dividieron en partes iguales y se procesaron en pasos de secuenciación independientes para permitir la corrección de los efectos del lote. La secuenciación se llevó a cabo con secuenciación de extremo emparejado y de una longitud de 2 x 100 pb. Las secuencias se alinearon con HiSAT2 versión 2.1.0. al genoma humano hg38 y se analizaron con DESeq2. El análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes se realizó con la herramienta GSEA *software* (<http://software.broadinstitute.org/gsea/>) y la visualización e interpretación con Cytoscape (<http://www.cytoscape.org/>) (EnrichmentMap y AutoAnnotate).

### **8. Análisis estadístico**

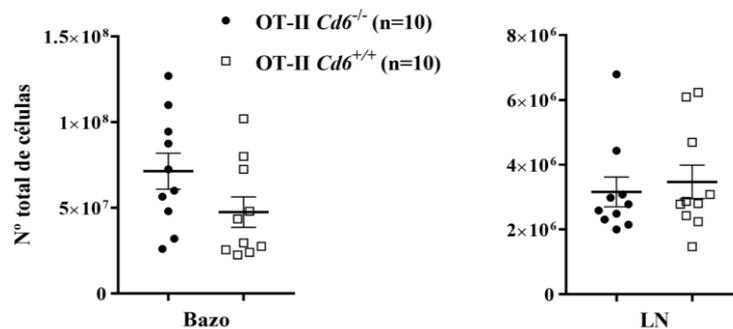
El análisis estadístico de los resultados obtenidos en este trabajo se hizo con el software GraphPad PRISM versión 7.03 (2017, USA). Para comparar dos grupos independientes se usó la prueba estadística de T-student bilateral (paramétrico). Para distribuciones no gaussianas (no normales) se usó la prueba de Mann-Whitney. Para comparar tres o más grupos independientes se usó el Análisis de la Varianza (ANOVA). Tanto para un análisis como para otro, el valor de probabilidad (p) se representa con \* $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  y, en los gráficos que representan resultados provenientes de células humanas se muestra la desviación estándar de los valores (SD) y en el caso de modelos murinos se representa el error estándar de la media (SEM).

## **IV. RESULTADOS**



## 1. Generación y caracterización fenotípica de la línea de ratones OT-II $Cd6^{-/-}$

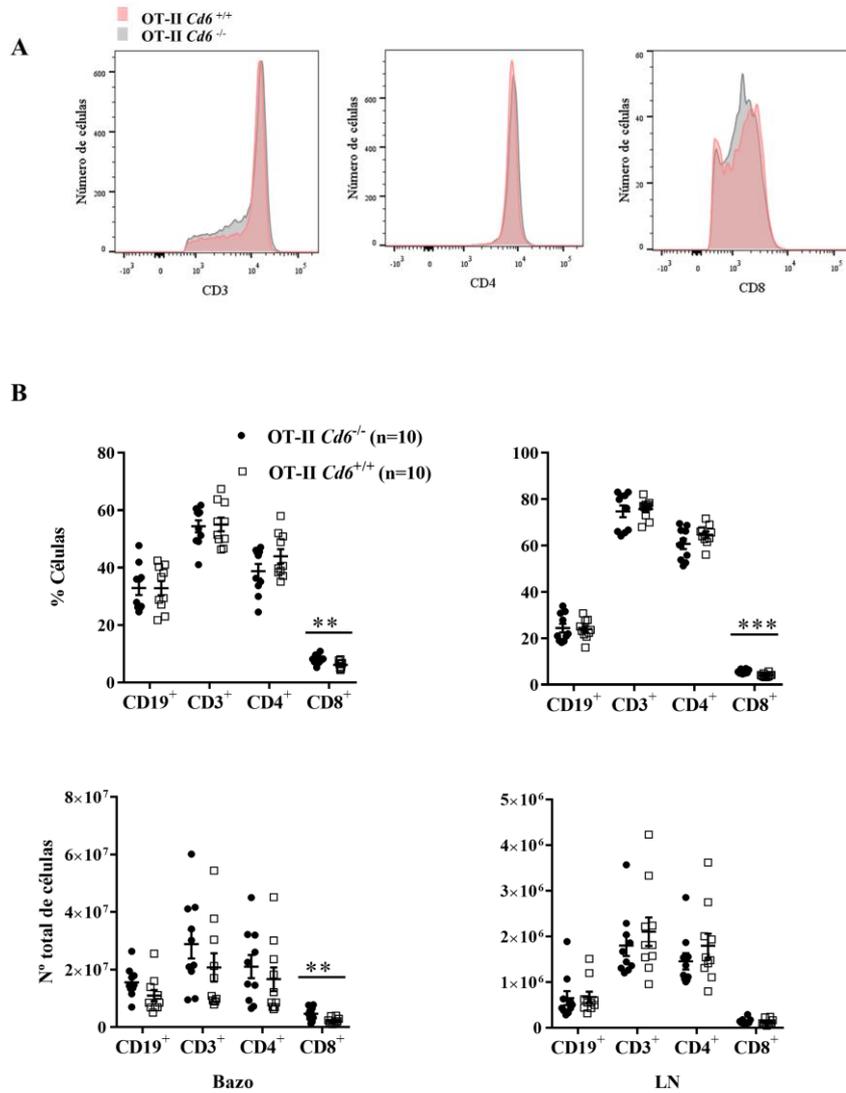
Para estudiar la relevancia fisiológica de CD6 y sus interacciones moleculares en la función de las células T, se generó una línea de ratones transgénicos OT-II deficientes de CD6 (OT-II  $Cd6^{-/-}$ ) (ver apartado 1 de la sección de Material y Métodos). Los ratones transgénicos OT-II expresan un receptor TCR $\alpha\beta$  específico para un péptido de la ovoalbúmina de pollo en el contexto de moléculas MHC de clase II. Esto da como resultado células T CD4<sup>+</sup> que reconocen péptidos OVA<sub>323-339</sub> cuando son presentados por la molécula MHC de clase II I-A<sup>b</sup> (Kikuchi et al., 2006). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a celularidad (tanto en números absolutos como de porcentaje relativo) en bazo y ganglios linfáticos (LN, del inglés *lymph node*) entre los ratones OT-II  $Cd6^{-/-}$  y sus hermanos OT-II  $Cd6^{+/+}$ , indicando que la ausencia de CD6 no produce defectos relevantes a nivel de la celularidad de los órganos linfoides secundarios (**Figura R-1**).



**Figura R-1. Análisis de la celularidad total en bazo y ganglios linfáticos de ratones OT-II  $Cd6^{-/-}$  y OT-II  $Cd6^{+/+}$ .** Número total de células del bazo (A) y ganglios linfáticos (LN) (B) de ratones OT-II  $Cd6^{+/+}$  y OT-II  $Cd6^{-/-}$  en estado basal. Se muestran los resultados (media  $\pm$  SEM) de un experimento representativo (n=10) de 3 independientes realizados (test T de Student).

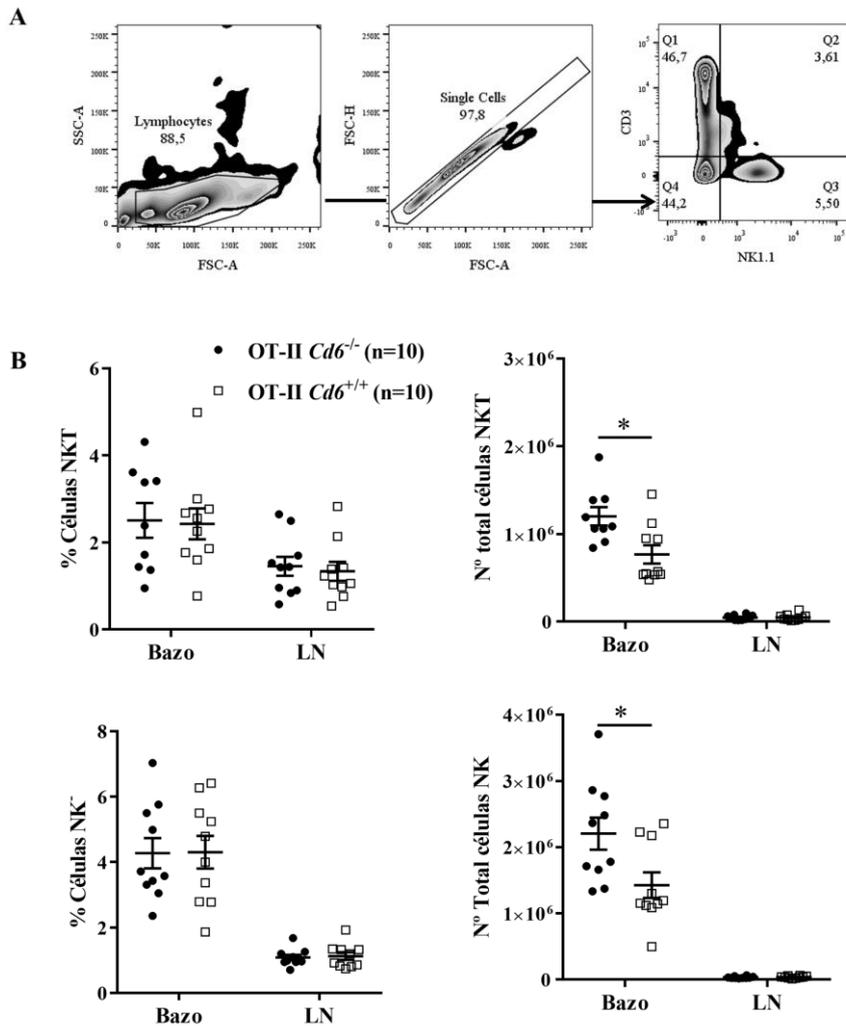
Dada la asociación física reportada entre CD6 y el complejo TCR/CD3 (Gimferrer et al., 2004) y las moléculas accesorias que lo acompañan, se determinó si la ausencia de CD6 afectaba la expresión de membrana de estos receptores. El análisis de células T de ganglios linfáticos y bazo demostró una expresión similar de los receptores CD3, CD4 y CD8 en ambos grupos de ratones OT-II  $Cd6^{-/-}$  y OT-II  $Cd6^{+/+}$  (**Figura R-2A**). El estudio fenotípico de las principales poblaciones linfocitarias tampoco objetivó diferencias significativas tanto en bazo como en ganglios linfáticos en cuanto a la frecuencia de

linfocitos B (CD19<sup>+</sup>) y linfocitos T (CD3<sup>+</sup>) entre ratones OT-II *Cd6*<sup>-/-</sup> y OT-II *Cd6*<sup>+/+</sup> (**Figura R-2B**). El número de linfocitos T CD4<sup>+</sup> fue similar en ambos grupos de ratones, mientras tanto el porcentaje como el número absoluto de linfocitos T CD8<sup>+</sup> estaba aumentado en bazo de ratones OT-II *Cd6*<sup>-/-</sup> (**Figura R-2B**).



**Figura R-2. Análisis de las principales poblaciones linfocitarias periféricas de ratones OT-II *Cd6*<sup>+/+</sup> y OT-II *Cd6*<sup>-/-</sup>.** (A) Histogramas representativos de la expresión de CD3, CD4 y CD8 en esplenocitos de ratones OT-II *Cd6*<sup>+/+</sup> (rosa) y OT-II *Cd6*<sup>-/-</sup> (gris). (B) Porcentaje (arriba) y número total de células (abajo) CD19<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en bazo (izquierda) y ganglios linfáticos (derecha). Se muestran los resultados (media ± SEM) de la sumatoria (n=10) de 2 experimentos independientes realizados. \*\*, *p*<0.01, \*\*\*, *p*<0.001 (test T de Student).

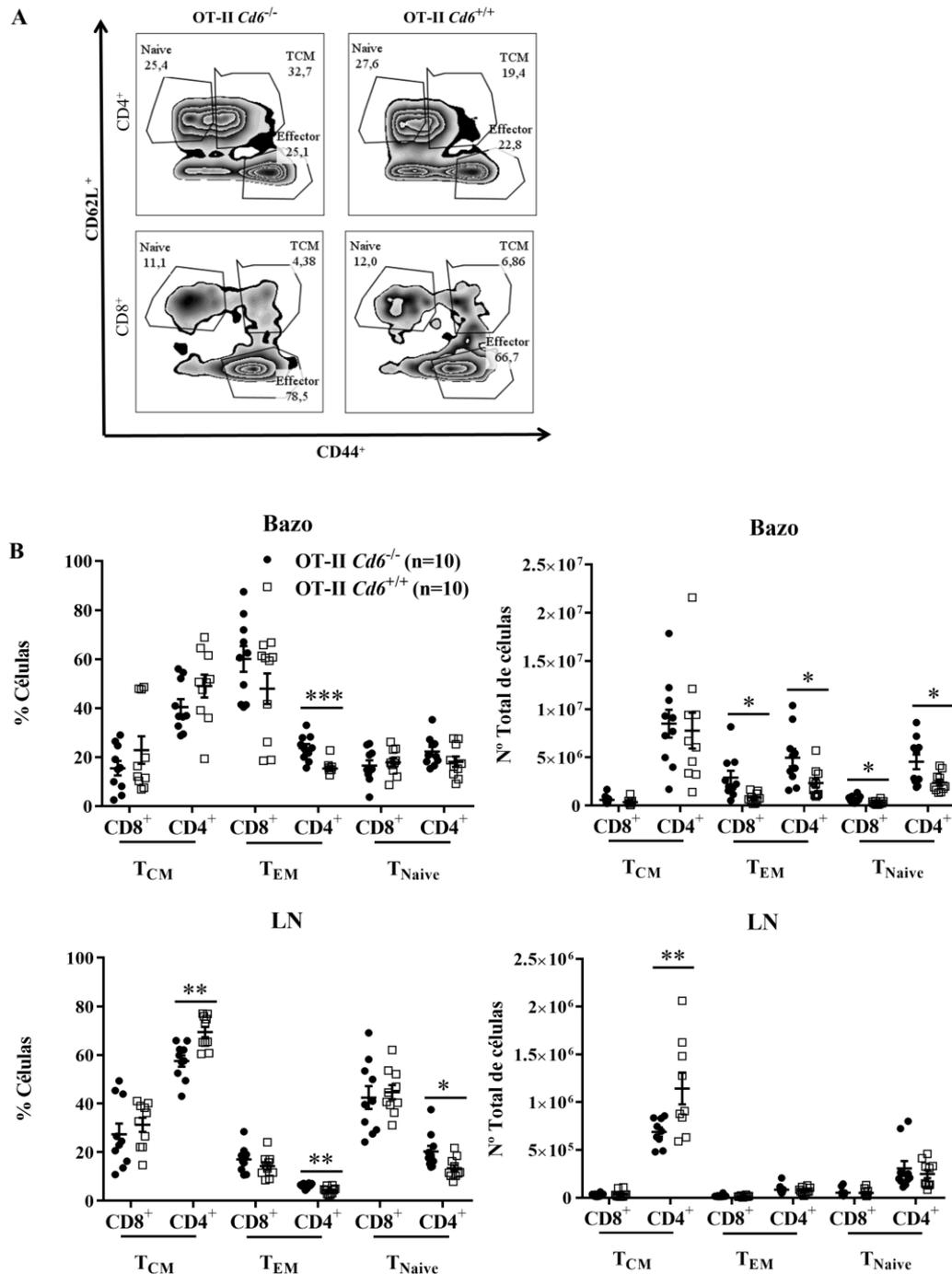
De manera similar, las poblaciones de células NK y NKT del bazo estaban aumentadas significativamente en el grupo de ratones OT-II *Cd6*<sup>-/-</sup> (**Figura R-3**)



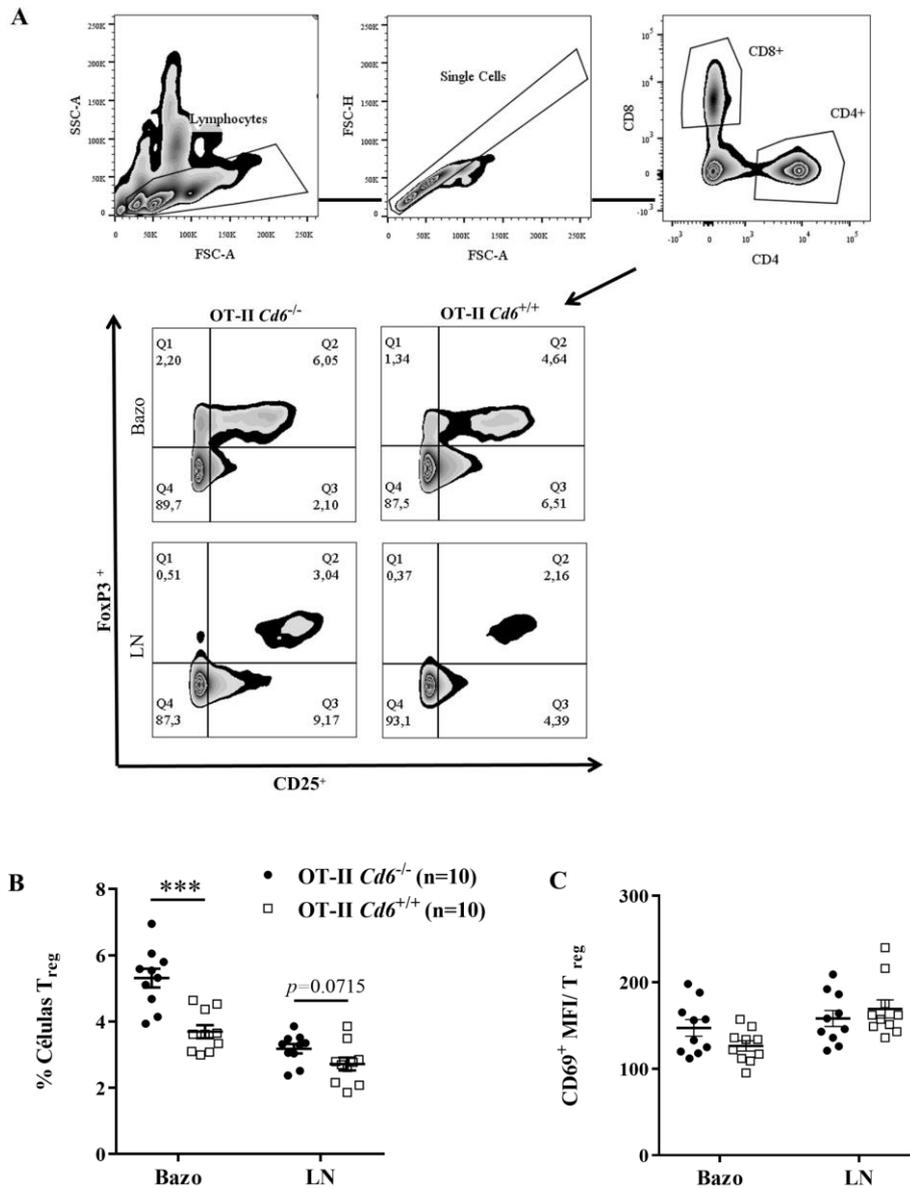
**Figura R-3. Análisis de las poblaciones linfocitarias NK y NKT de ratones OT-II *Cd6*<sup>-/-</sup> y OT-II *Cd6*<sup>+/+</sup>. (A)** Estrategia de selección de la población de células y porcentaje de células NKT (Nk1.1<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup>) y NK (Nk1.1<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup>). **(B)** Porcentaje (izquierda) y número total de células (derecha) NKT (arriba) y NK (abajo) en bazo y ganglios linfáticos. Se muestran los resultados (media ± SEM) de la sumatoria (n=10) de 2 experimentos independientes realizados. \*,  $p < 0.05$  (test T de Student).

El análisis de poblaciones T *naïve* (T<sub>Naïve</sub>, CD44<sup>low</sup> CD62L<sup>high</sup>), así como memoria central (T<sub>CM</sub>, CD44<sup>high</sup> CD62L<sup>high</sup>) y memoria efectora (T<sub>EM</sub>, CD44<sup>high</sup> CD62L<sup>low</sup>) objetivó un incremento estadísticamente significativo del número total de células T<sub>EM</sub> y T<sub>Naïve</sub> tanto CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup> en bazo de ratones OT-II *Cd6*<sup>-/-</sup>, pero no así de T<sub>CM</sub> (**Figura R-4**). En ganglios linfáticos, se observó una disminución significativa de la frecuencia de células T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup> en ratones OT-II *Cd6*<sup>-/-</sup> (**Figura R-4**). Por su parte, el análisis de células T<sub>reg</sub> (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup>) mostró un aumento de su porcentaje tanto en bazo como en

ganglios linfáticos de ratones OT-II  $Cd6^{-/-}$ , sin que se observaran diferencias en cuanto a su expresión de CD69 (**Figura R-5**).



**Figura R-4. Análisis de poblaciones linfocitarias T naïve y memoria en ratones OT-II  $Cd6^{-/-}$  y OT-II  $Cd6^{+/+}$  en estado basal. (A) Zebra plot representativos de la estrategia de análisis de subpoblaciones de linfocitos T  $CD4^+$  y T  $CD8^+$  provenientes de bazo de ratones OT-II  $Cd6^{-/-}$  y OT-II  $Cd6^{+/+}$  teñidos con anti-CD62L y anti-CD44. (B) Porcentaje (izquierda) y número total de células (derecha)  $CD8^+$  T<sub>CM</sub>,  $CD4^+$  T<sub>CM</sub>,  $CD8^+$  T<sub>EM</sub> y  $CD4^+$  T<sub>EM</sub> en bazo (arriba) y ganglios linfáticos (abajo). Se muestran los resultados (media  $\pm$  SEM) de la sumatoria (n=10) de 2 experimentos independientes realizados. \*,  $p < 0.05$ , \*\*,  $p < 0.01$ , \*\*\*,  $p < 0.001$  (test T de Student).**



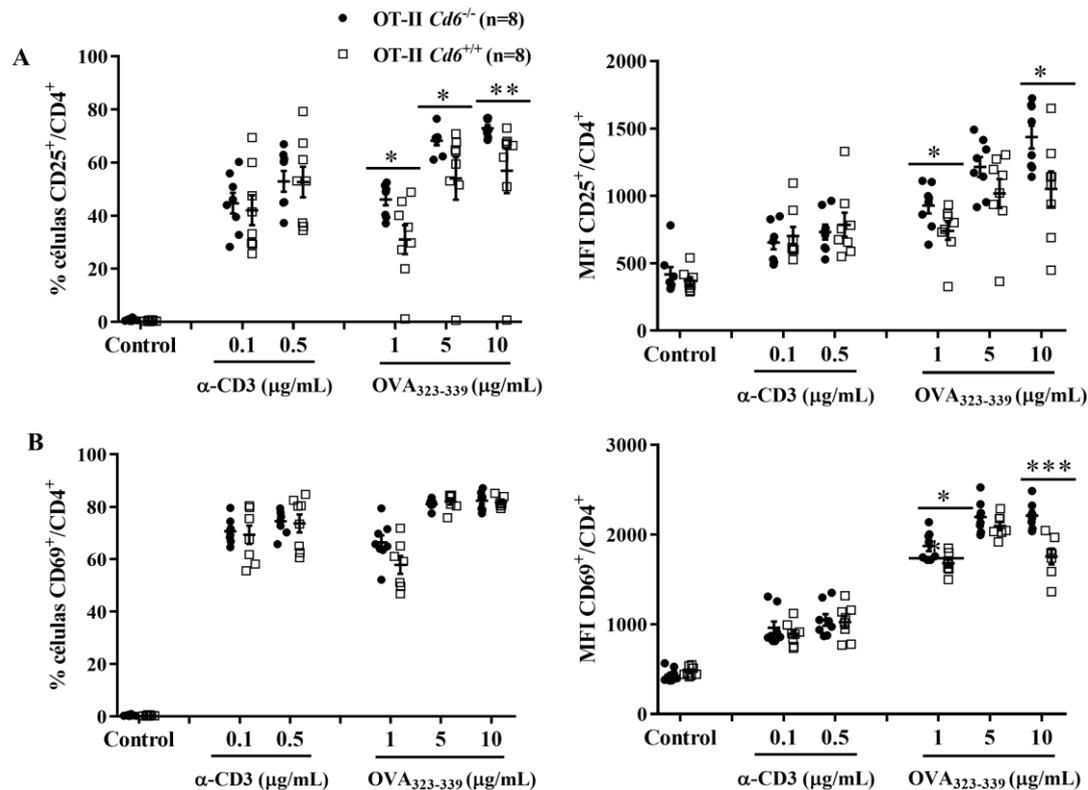
**Figura R-5. Análisis de células T<sub>reg</sub> OT-II *Cd6*<sup>-/-</sup> y OT-II *Cd6*<sup>+/+</sup>.** (A) Estrategia de selección de la población de células T<sub>reg</sub> en bazo y ganglios linfáticos (LN). (B) Porcentaje y número total de células T<sub>reg</sub> (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>) dentro de la subpoblación CD4<sup>+</sup> en bazo y ganglios linfáticos (LN). (C) Canal medio de intensidad de fluorescencia (MFI) de la expresión de CD69<sup>+</sup> en células T<sub>reg</sub> de bazo y ganglios linfáticos. Se muestran los resultados (media ± SEM) de la sumatoria (n=10) de 2 experimentos independientes realizados. \*\*\*,  $p < 0.001$  (test T de Student).

En conclusión, el análisis inmunofenotípico de los ratones OT-II *Cd6*<sup>-/-</sup> revela hallazgos similares a los previamente reportados por nuestro grupo en ratones *Cd6*<sup>-/-</sup> en fondo C57BL7/6 (Orta-Mascaró et al., 2016) que incluían un aumento significativo de ciertas poblaciones linfocitarias T minoritarias con fenotipo efector/memoria (CD8<sup>+</sup>T<sub>CM</sub>, CD4<sup>+</sup>T<sub>EM</sub>) y regulador (T<sub>reg</sub>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>), cuya generación requiere condiciones

de elevada avidéz del TCR y/o de co-estimulación. Estos cambios serían compatibles con una función de CD6 como regulador negativo de las señales generadas por el complejo TCR/CD3. Por otro lado, la ausencia de diferencias inmunofenotípicas significativas entre los ratones *Cd6<sup>-/-</sup>* y OT-II *Cd6<sup>-/-</sup>* validaría el uso de éstos últimos para los estudios objetivo de la presente Tesis.

## **2. Análisis de la activación *in vitro* antígeno-específica de esplenocitos OT-II *Cd6<sup>-/-</sup>* y OT-II *Cd6<sup>+/+</sup>*.**

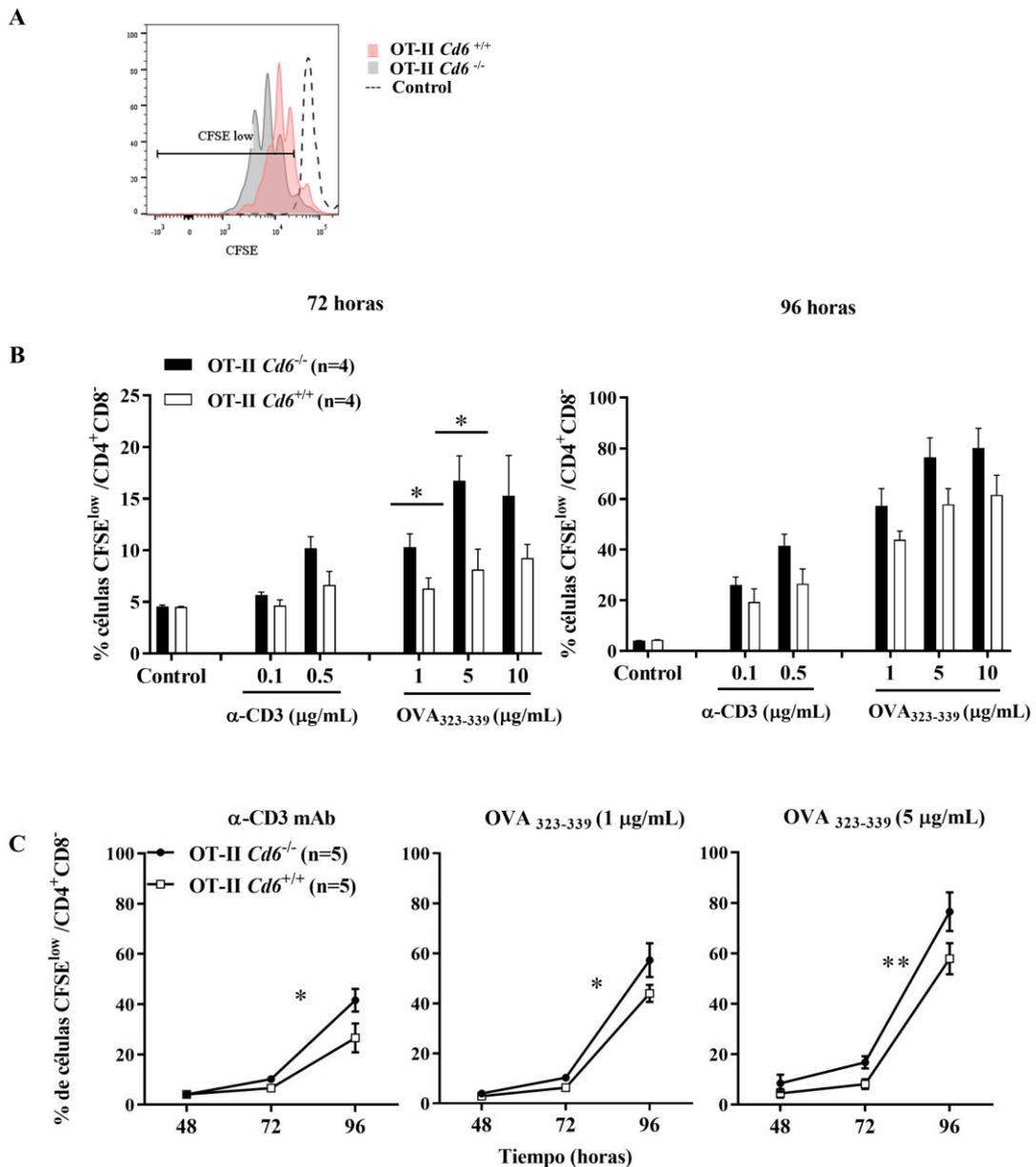
Con el objetivo de analizar las consecuencias de la deficiencia de CD6 en la activación antígeno-específica de células T CD4<sup>+</sup>, se cultivaron esplenocitos totales de ratones OT-II *Cd6<sup>-/-</sup>* y OT-II *Cd6<sup>+/+</sup>* durante 24 h en presencia de diferentes concentraciones de péptido OVA<sub>323-339</sub> (1, 5 y 10 µg/mL) y de AcMo anti-CD3ε 145-2C11 soluble (0.5 y 1 µg/mL) como control positivo. Como control negativo se utilizó el péptido OVA<sub>257-264</sub> que es reconocido en el contexto de MHC de clase I por linfocitos T CD8<sup>+</sup> (citotóxicos). Posteriormente se monitorizó por citometría de flujo la expresión en membrana de los marcadores de activación linfocitaria temprana (CD69 y CD25). Como puede observarse en la **Figura R-6**, las células T CD4<sup>+</sup> OT-II *Cd6<sup>-/-</sup>* mostraron una expresión significativamente mayor (medido como porcentaje de células positivas y/o canal medio de intensidad de fluorescencia; MFI) de los marcadores de activación CD25 (**Figura R-6 A**) y CD69 (**Figura R-6 B**), compatible con una regulación negativa de fenómenos tempranos de activación linfocitaria por parte de CD6 en los linfocitos T CD4<sup>+</sup>.



**Figura R-6.** Análisis de marcadores de activación temprana post estimulación antígeno-específica de esplenocitos OT-II *Cd6*<sup>-/-</sup> y OT-II *Cd6*<sup>+/+</sup>. Esplenocitos de ratones OT-II *Cd6*<sup>-/-</sup> y OT-II *Cd6*<sup>+/+</sup> fueron estimulados durante 24 h con un anti-CD3εb (0.1 y 0.5 µg/mL) y el péptido OVA<sub>323-339</sub> (1-10 µg/mL). **(A-B)** Se muestra el porcentaje de células positivas (izquierda) y la intensidad media de fluorescencia (MFI; derecha) para los marcadores CD25<sup>+</sup> y CD69<sup>+</sup> en esplenocitos OT-II *Cd6*<sup>-/-</sup> y OT-II *Cd6*<sup>+/+</sup>. El control representa a los valores basales de células de ratones OT-II *Cd6*<sup>-/-</sup> y OT-II *Cd6*<sup>+/+</sup> tratados con OVA<sub>257-264</sub> (10 µg/mL). Se muestra la media ± SEM de un experimento (n=4-8) representativo de 5 independientes realizados. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$  (test T de Student **(A)** y test de Mann-Whitney **(B)**).

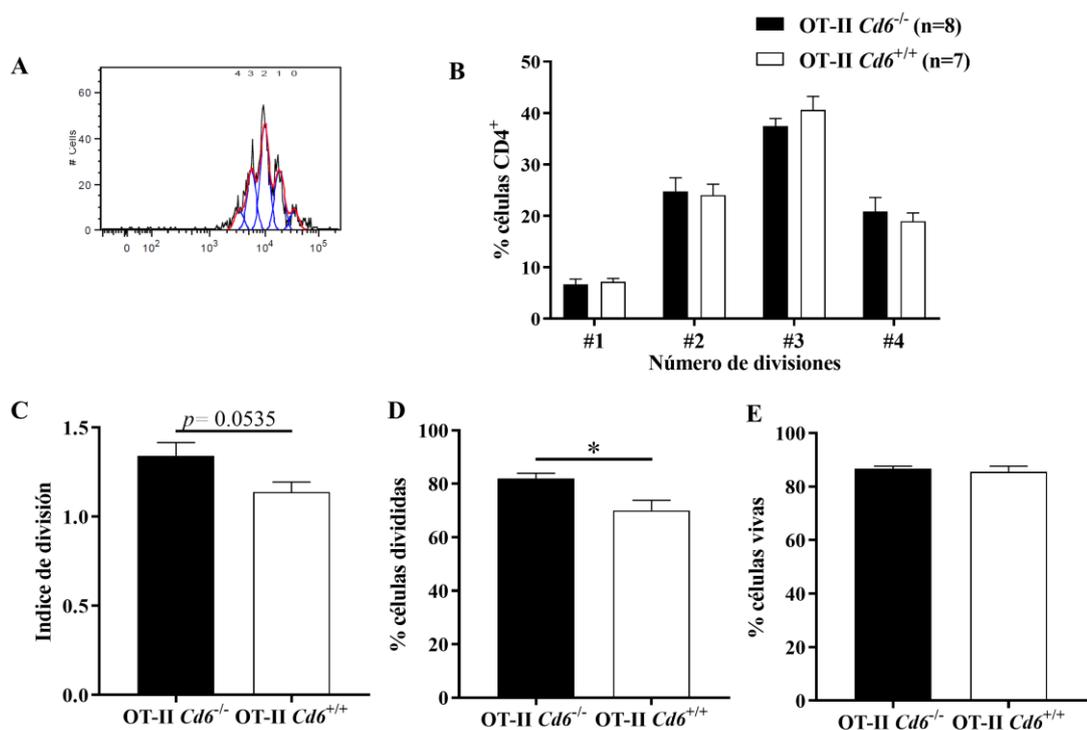
Con el fin de estudiar la respuesta linfoproliferativa antígeno-específica de células T CD4<sup>+</sup> deficientes para CD6, se cultivaron durante 72-96 h esplenocitos de ratones OT-II *Cd6*<sup>-/-</sup> y OT-II *Cd6*<sup>+/+</sup> marcados con CFSE y en presencia de OVA<sub>323-339</sub> (1, 5 y 10 µg/mL) o AcMo anti-CD3ε soluble (0.1 y 0.5 µg/mL) como control positivo. Como control negativo se utilizó el péptido OVA<sub>257-264</sub> (10 µg/mL). Posteriormente se monitorizó por citometría de flujo el número de células CFSE<sup>high</sup> y CFSE<sup>low</sup>. Tal y como se observa en la **Figura R-7 B y C**, los cultivos de esplenocitos OT-II *Cd6*<sup>-/-</sup> presentaron un porcentaje significativamente mayor de células T CD4<sup>+</sup> CFSE<sup>low</sup> (proliferantes) que los OT-II *Cd6*<sup>+/+</sup> tras 72 h de estimulación con péptido de OVA<sub>323-339</sub> y manteniéndose la tendencia a las 96 h de activación. Estos datos apoyarían una respuesta proliferativa antígeno-específica aumentada de las células T CD4<sup>+</sup> deficientes de CD6, de forma

análoga a lo previamente reportado en ratones *Cd6<sup>-/-</sup>* con AcMos anti-CD3 (Orta-Mascaró et al., 2016).



**Figura R-7. Análisis de la respuesta proliferativa antígeno-específica de esplenocitos de ratones OT-II *Cd6<sup>-/-</sup>* y OT-II *Cd6<sup>+/+</sup>*. (A) Histograma representativo de la selección de células proliferantes en la subpoblación CFSE<sup>low</sup> dentro de las células T CD4<sup>+</sup> de bazo de ratones OT-II *Cd6<sup>+/+</sup>* (rosa) y OT-II *Cd6<sup>-/-</sup>* (gris). La línea de puntos representa las células sin estimular. (B) Esplenocitos OT-II *Cd6<sup>+/+</sup>* y OT-II *Cd6<sup>-/-</sup>* estimulados durante 72 o 96 h con AcMo anti-CD3ε (0.5 μg/mL) y el péptido OVA<sub>323-339</sub> (1 y 5 μg/mL). El control representa los valores de esplenocitos OT-II *Cd6<sup>-/-</sup>* y OT-II *Cd6<sup>+/+</sup>* tratados con OVA<sub>257-264</sub> (10 μg/mL). Se representa el porcentaje de células CFSE<sup>low</sup> (proliferantes). (C) Análisis por citometría de flujo del porcentaje células T CD4<sup>+</sup> proliferantes (CFSE<sup>low</sup>) a 48, 72 y 96 h post estimulación con AcMo anti-CD3ε (0.5 μg/mL) o péptido OVA<sub>323-339</sub> (1 y 5 μg/mL). Se muestran los resultados (media ± SEM) de un experimento (n=4-5) representativo de 5 independientes realizados. \*, *p* < 0.05; \*\*, *p* < 0.01 (test T de Student (B) y análisis de varianza (ANOVA) de dos vías (C)).**

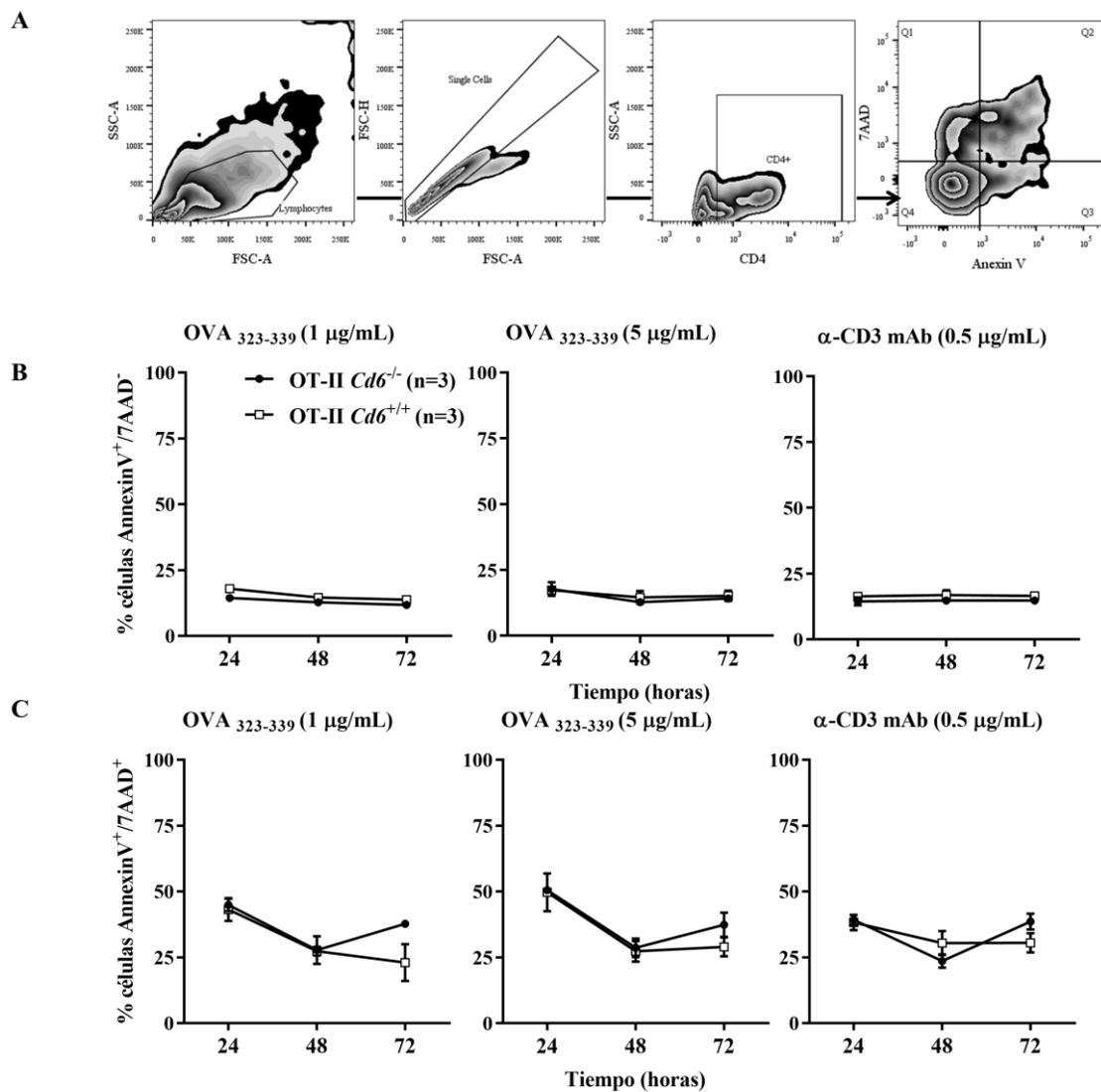
Para analizar con más detalle la respuesta proliferativa se utilizó la herramienta “*proliferation modeling*” de FlowJo. No se observaron diferencias entre los grupos de estudio, en cuanto al número de divisiones o generaciones o al número de células T CD4<sup>+</sup> presentes en cada división obtenidas a partir de la cinética de proliferación (**Figura R-8 B**). El índice de división es el número medio de divisiones celulares que ha sufrido una célula de la población original. Éste es un promedio incluso para las células que nunca se dividieron (es decir, incluye el pico no dividido). Por otro lado, el porcentaje de células en división define la fracción de la población original que se dividió al menos una vez durante el período de cultivo. El cálculo del índice de división y del porcentaje de células divididas permitió objetivar un aumento de estos parámetros en el caso de los esplenocitos OT-II *Cd6*<sup>-/-</sup> (**Figura R-8 C-E**). Estos resultados apoyarían un papel para CD6 en la regulación negativa de las respuestas proliferativas.



**Figura R-8. Análisis de ciclos de proliferación antígeno-específica de esplenocitos OT-II *Cd6*<sup>-/-</sup> y OT-II *Cd6*<sup>+/+</sup>.**

(A) Histograma representativo del análisis de ciclos de células T CD4<sup>+</sup> de esplenocitos marcados con CFSE, realizado con la herramienta “*proliferation modeling*” de FlowJo. (B) Se representa el porcentaje de células T CD4<sup>+</sup> en función del número de divisiones de esplenocitos marcados con CFSE y cultivados durante 96 h con péptido OVA<sub>323-339</sub> (10 µg/mL). (C-E) Se representan el índice de división, el porcentaje de células divididas y el porcentaje de células vivas de células T CD4<sup>+</sup> OT-II *Cd6*<sup>-/-</sup> y OT-II *Cd6*<sup>+/+</sup>, realizado con la herramienta “*proliferation modeling*” de FlowJo. Se muestran los resultados (media ± SEM) de un experimento representativo de 5 independientes realizados (n=7-8). \*,  $p < 0.05$  (test T de Student (C-E) y análisis de varianza (ANOVA) de dos vías (B)).

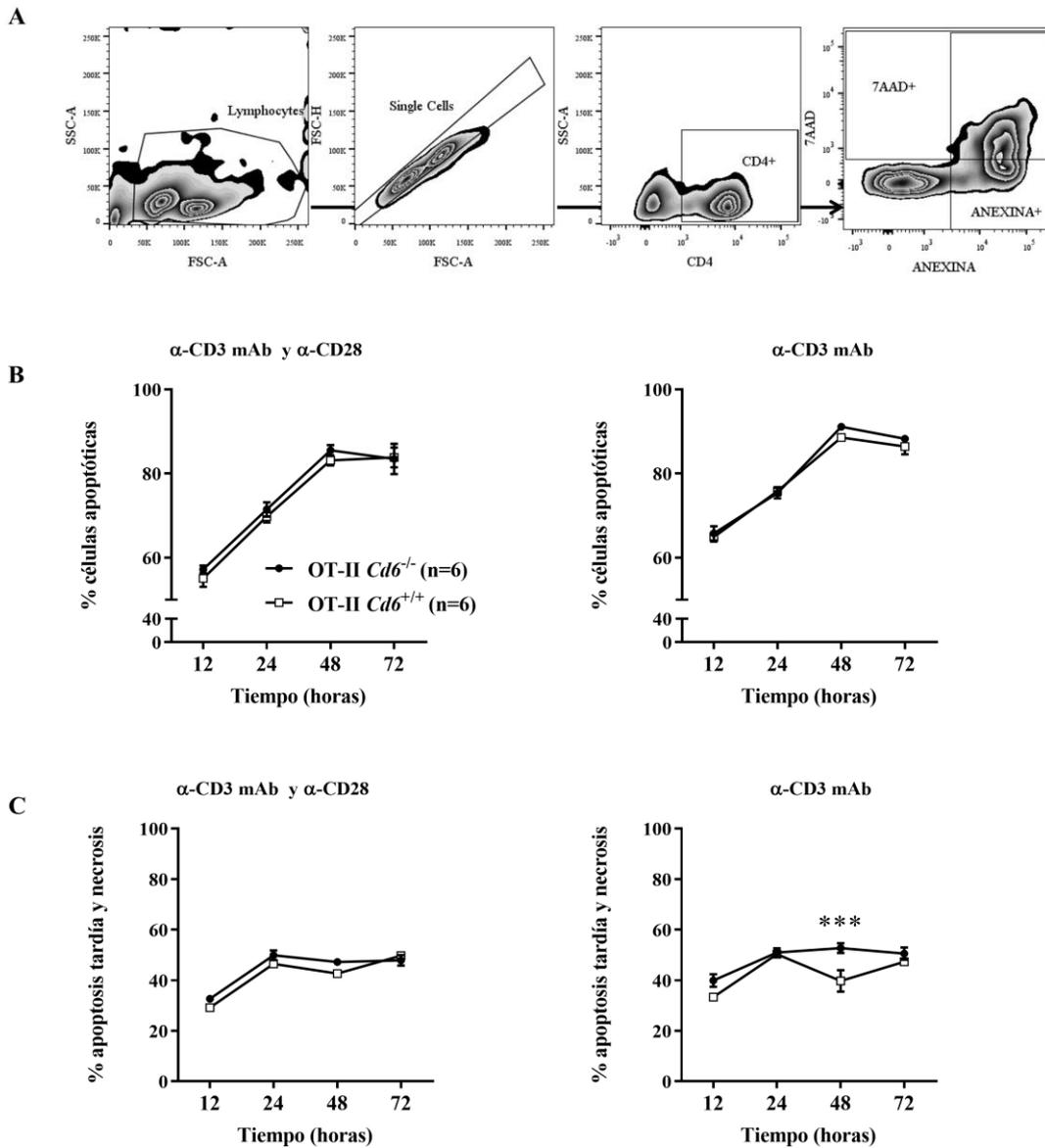
El análisis de los marcadores Anexina V y 7AAD en esplenocitos OT-II *Cd6<sup>-/-</sup>* y OT-II *Cd6<sup>+/+</sup>* cultivados 24, 48 y 72 h, con AcMo anti-CD3 $\epsilon$  (0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) soluble o péptido OVA<sub>323-339</sub> (1 y 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) evidenció una ausencia de diferencias entre ambos grupos de esplenocitos tanto tras la estimulación antígeno-específica como la estimulación inespecífica policlonal con anti-CD3 (**Figura R-9**). Estos datos indicarían que el aumento de activación linfocitaria observado en ausencia de CD6 no conlleva una mayor apoptosis inducida por activación (AICD).



**Figura R-9. Análisis de apoptosis post estimulación antígeno-específica de esplenocitos OT-II *Cd6<sup>-/-</sup>* y OT-II *Cd6<sup>+/+</sup>*.** Esplenocitos de ratones OT-II *Cd6<sup>-/-</sup>* y OT-II *Cd6<sup>+/+</sup>* se cultivaron 24, 48 y 72 h con AcMo anti-CD3 $\epsilon$  (0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) o péptido OVA<sub>323-339</sub> (1 o 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). **(A)** Estrategia de selección de la población de células Anexina V<sup>+</sup> 7AAD<sup>-</sup> y células Anexina V<sup>+</sup> 7AAD<sup>+</sup> dentro de la población T CD4<sup>+</sup>. **(B)** Porcentaje de células T CD4<sup>+</sup> apoptóticas (Anexina V<sup>+</sup> 7AAD<sup>-</sup>). **(C)** Porcentaje de células en apoptosis tardía y necrosis (Anexina V<sup>+</sup> 7AAD<sup>+</sup>). Se muestran los resultados

(media  $\pm$  SEM) de un experimento (n=3) representativo de 5 independientes realizados (Análisis de varianza (ANOVA) de dos vías).

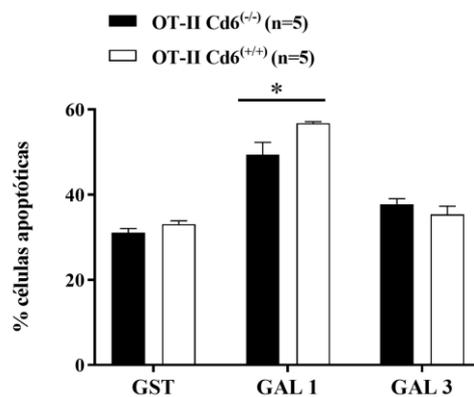
Un estudio similar realizado con ratones *Cd6<sup>-/-</sup>* en fondo DBA-1 demostró previamente que las células T CD4<sup>+</sup> exhibían una menor proliferación acompañada de mayor apoptosis que las células T CD4<sup>+</sup> *Cd6<sup>+/+</sup>* (Y. Li et al., 2017). Para corroborar estos resultados con nuestro modelo de ratón transgénico OT-II *Cd6<sup>-/-</sup>*, se aislaron células T CD4<sup>+</sup> por separación magnética y se cultivaron durante 12, 24, 48 y 72 h, en placas recubiertas con AcMo anti-CD3 $\epsilon$  (5  $\mu$ g/mL) en presencia o ausencia de AcMo anti-CD28 soluble (1  $\mu$ g/mL). A pesar de la utilización de este sistema de estimulación más potente tampoco se observaron diferencias a nivel de apoptosis entre los grupos experimentales (**Figura R-10**). Este dato indicaría que, en ausencia de la función moduladora negativa de CD6, los ratones C57BL/6 serían menos susceptibles a fenómenos de AICD que los DBA/1.



**Figura R-10.** Análisis de apoptosis post estimulación antígeno-específica de células T  $CD4^+$  de ratones OT-II  $Cd6^{-/-}$  y OT-II  $Cd6^{+/+}$ . Células T  $CD4^+$  aisladas por separación magnética de bazo de ratones OT-II  $Cd6^{-/-}$  y OT-II  $Cd6^{+/+}$  se cultivaron a 12, 24, 48 y 72 h, en placas recubiertas con AcMo anti-CD3 $\epsilon$  (5  $\mu$ g/mL) en presencia o ausencia de AcMo anti-CD28 soluble (1  $\mu$ g/mL). (A) Estrategia de selección de la población de células apoptóticas (Anexina V<sup>+</sup>) y células en apoptosis tardía y necrosis (7AAD<sup>+</sup>) dentro de la población T  $CD4^+$ . (B) Porcentaje de células apoptóticas (Anexina V<sup>+</sup>). (C) Porcentaje de células en apoptosis tardía y necrosis (7AAD<sup>+</sup>). Se muestran (n=6) los resultados (media  $\pm$  SEM) de un único experimento realizado. \*\*\*,  $p < 0.001$  (análisis de varianza (ANOVA) de dos vías).

Estudios previos de nuestro grupo han demostrado que tanto Gal-1 como Gal-3, interaccionan con CD6 e interfieren en los fenómenos de adhesión celular mediados por la pareja ligando-receptor (CD6-CD166/ALCAM) (Escoda-Ferran et al., 2014). Asimismo, también han demostrado que la integridad de su región intracitoplasmática de

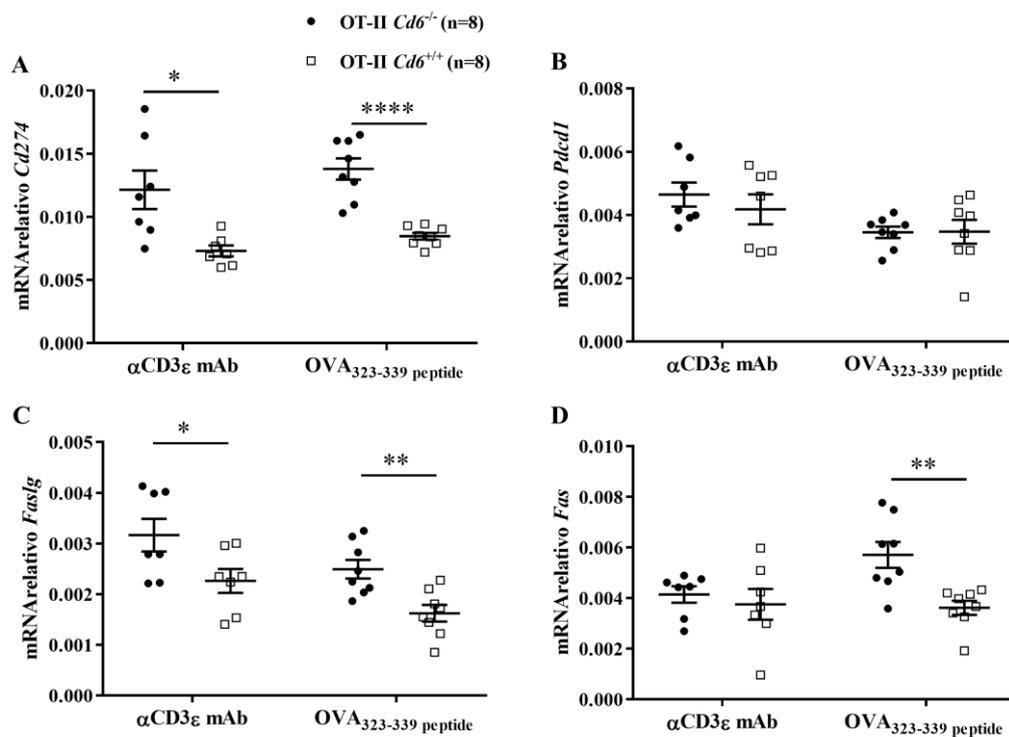
CD6 es necesaria para la inducción de apoptosis mediada por galectinas en células T activadas. En base a ello, se activaron esplenocitos de ratones OT-II *Cd6<sup>-/-</sup>* y OT-II *Cd6<sup>+/+</sup>* durante 96 h con AcMo anti-CD3 $\epsilon$  (1  $\mu$ g/mL) fijado a placa y AcMo anti-CD28 soluble (5  $\mu$ g/mL) y a continuación se indujo su apoptosis mediante la adición de las proteínas de fusión GST-Gal 1, GST-Gal 3 o de proteína GST control durante 30 min (**Figura R-11**). La monitorización de los niveles de células apoptóticas (Anexina V<sup>+</sup> 7AAD<sup>-</sup>) exhibió una menor inducción de apoptosis inducida por Gal1 (pero no por Gal 3) en esplenocitos OT-II *Cd6<sup>-/-</sup>*. Estos resultados confirmarían la mayor susceptibilidad de células T OT-II *Cd6<sup>-/-</sup>* a la apoptosis inducida por Gal 1, cosa que no sucedería con la AICD inducida vía CD3 solo o combinado con CD28.



**Figura R-11. Análisis de la apoptosis inducida por galectinas en células T CD4<sup>+</sup> activadas procedentes de bazo de ratones OT-II *Cd6<sup>-/-</sup>* y OT-II *Cd6<sup>+/+</sup>*.** Esplenocitos de ratones OT-II *Cd6<sup>-/-</sup>* y OT-II *Cd6<sup>+/+</sup>* se activaron 96 h con AcMo anti-CD3 $\epsilon$  (1  $\mu$ g/mL) en fase sólida y anti-CD28 soluble (5  $\mu$ g/mL) y luego incubados durante 30 min con GST, GST-Gal 1 o GST-Gal 3 (50  $\mu$ g/mL cada una). El porcentaje de células apoptóticas (Anexina V<sup>+</sup>) se determinó en la población CD4<sup>+</sup> B220<sup>-</sup> mediante citometría de flujo. Se muestran los resultados (media  $\pm$  SEM) de un único experimento realizado (n=5). \*,  $p < 0.05$  (test T de Student).

Para analizar posibles diferencias a nivel de la inducción de marcadores de AICD se cuantificó por qPCR la expresión relativa de ARNm específico de PD-1 (*Pdcd1*), PD-L1 (*cd274*), Fas (*fas*) y ligando de Fas (*faslg*) en esplenocitos de ratones OT-II *Cd6<sup>-/-</sup>* y OT-II *Cd6<sup>+/+</sup>* estimulados durante 24 h con AcMo anti-CD3 $\epsilon$  o péptido OVA<sub>323-339</sub> (5  $\mu$ g/mL). Dichas moléculas se encuentran ampliamente expresadas y ejercen una gran variedad de funciones moduladoras de la activación de células T, así como en el mantenimiento de la tolerancia periférica (Arasanz et al., 2017). Tal y como se ilustra en la **Figura R-12 A y B**, se observó un aumento de la expresión relativa de ARNm de PD-L1, Fas y FasL pero no de PD-1 en los esplenocitos de ratones OT-II *Cd6<sup>-/-</sup>* estimulados

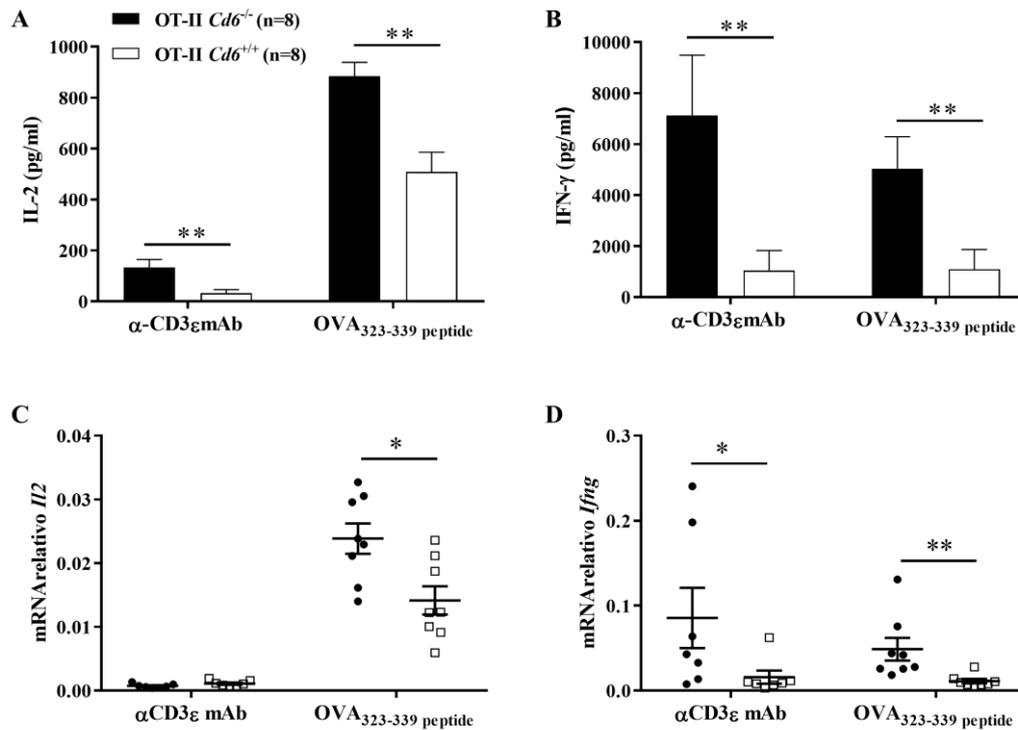
de forma antígeno (OVA<sub>323-339</sub>)-específica con respecto a los OT-II *Cd6*<sup>+/-</sup> (**Figura R-12 C y D**). Resultados similares se observaron después de la activación inespecífica policlonal con AcMo anti-CD3. Estos datos indicarían que la estimulación específica de linfocitos T OT-II *Cd6*<sup>-/-</sup> induciría una mayor expresión de marcadores de activación no solo temprana (CD69 y CD25) sino también tardía (Fas y FasL) relacionados con fenómenos de AICD, a pesar de no traducirse en una mayor apoptosis.



**Figura R-12.** Análisis por qPCR de la expresión de marcadores de AICD post estimulación antígeno-específica de esplenocitos de ratones OT-II *Cd6*<sup>-/-</sup> y OT-II *Cd6*<sup>+/-</sup>. Esplenocitos de ratones OT-II *Cd6*<sup>-/-</sup> y OT-II *Cd6*<sup>+/-</sup> se cultivaron 24 h con AcMo anti-CD3 $\epsilon$  (0,5  $\mu$ g/mL) o péptido OVA<sub>323-339</sub> (5  $\mu$ g/mL). Seguidamente se extrajo el ARN para su posterior retrotranscripción y análisis por PCR cuantitativa a tiempo real de los niveles relativos de ARNm de PD-L1 (A), PD-1 (B), Fas (C) y FasL (D). Se muestran los resultados (media  $\pm$  SEM) de un único experimento realizado (n=8). \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.0001$  (test T de Student).

A continuación, se evaluó la influencia de la expresión de CD6 sobre otras respuestas funcionales linfocitarias, como son la producción de citocinas Th1 IL-2 e IFN- $\gamma$ . Para ello, se analizaron por ELISA los niveles de las citocinas IFN- $\gamma$  y IL-2 en los sobrenadantes de cultivos de esplenocitos OT-II *Cd6*<sup>-/-</sup> y OT-II *Cd6*<sup>+/-</sup> estimulados durante 24 h con AcMo anti-CD3 $\epsilon$  (0.5  $\mu$ g/mL) o péptido OVA<sub>323-339</sub> (5  $\mu$ g/mL). Tal y como ilustra la **Figura R-13 A-B**, se observaron niveles mayores tanto de IL-2 como de

IFN- $\gamma$  en los cultivos de esplenocitos OT-II  $Cd6^{-/-}$  con respecto a los de OT-II  $Cd6^{+/+}$ . Dicha observación podría deberse a un aumento de síntesis/liberación o a un consumo disminuido de las mismas. Esto último se descartó dada la mayor proliferación observada en células OT-II  $Cd6^{-/-}$  y por la constatación mediante técnicas de RT-qPCR de niveles relativos superiores de ARNm tanto de IL-2 como de IFN- $\gamma$  en esplenocitos OT-II  $Cd6^{-/-}$  estimulados (**Figura R-13 C-D**).

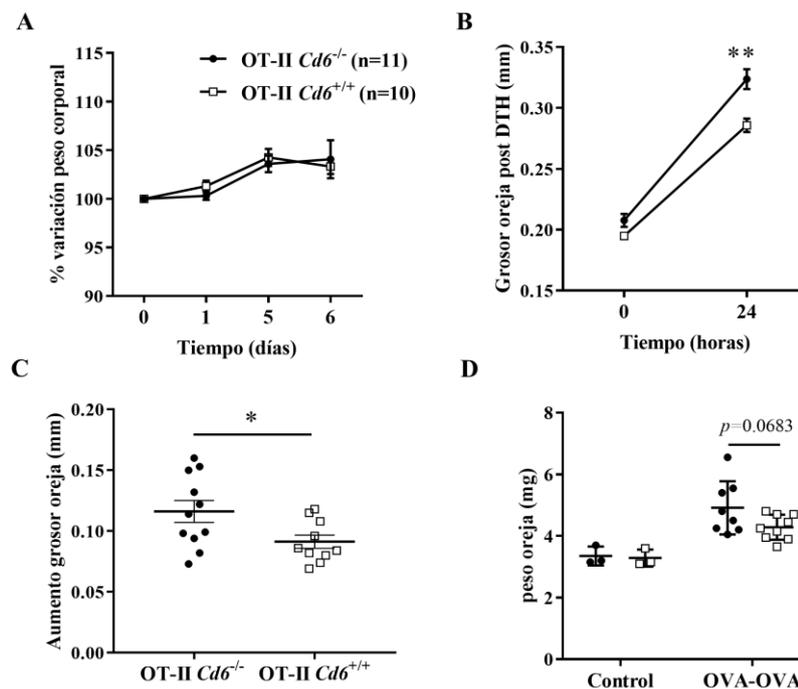


**Figura R-13. Análisis de la expresión de IL-2 e INF- $\gamma$  post estimulación antígeno-específica de esplenocitos OT-II  $Cd6^{-/-}$  y OT-II  $Cd6^{+/+}$ .** Esplenocitos de ratones OT-II  $Cd6^{-/-}$  y OT-II  $Cd6^{+/+}$  fueron estimulados durante 24 h con AcMo anti-CD3 $\epsilon$  (0,5  $\mu$ g/mL) o péptido OVA<sub>323-339</sub> (5  $\mu$ g/mL). (**A, B**) Niveles de IL-2 e INF- $\gamma$  determinados por ELISA en sobrenadantes de cultivo. Se muestran los resultados (media  $\pm$  SEM) de un experimento representativo (n=8) de 4 realizados. (**C, D**) Niveles relativos de ARNm de IL-2 e INF- $\gamma$  determinados por PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR). Se muestran los resultados (media  $\pm$  SEM) de un experimento representativo (n=7-8) de 2 realizados. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$  (test T de Student (C) y test de Mann-Whitney (A, B, D)).

### 3. Estudio de la función inmunomoduladora *in vivo* de CD6 en el modelo de hipersensibilidad retardada (DTH) inducida por ovoalbúmina

Como un enfoque alternativo para validar *in vivo* la función inmunomoduladora de CD6 en la respuesta antígeno-específica de células T CD4<sup>+</sup>, se analizó la respuesta de ratones OT-II  $Cd6^{-/-}$  y OT-II  $Cd6^{+/+}$  en un modelo previamente descrito de

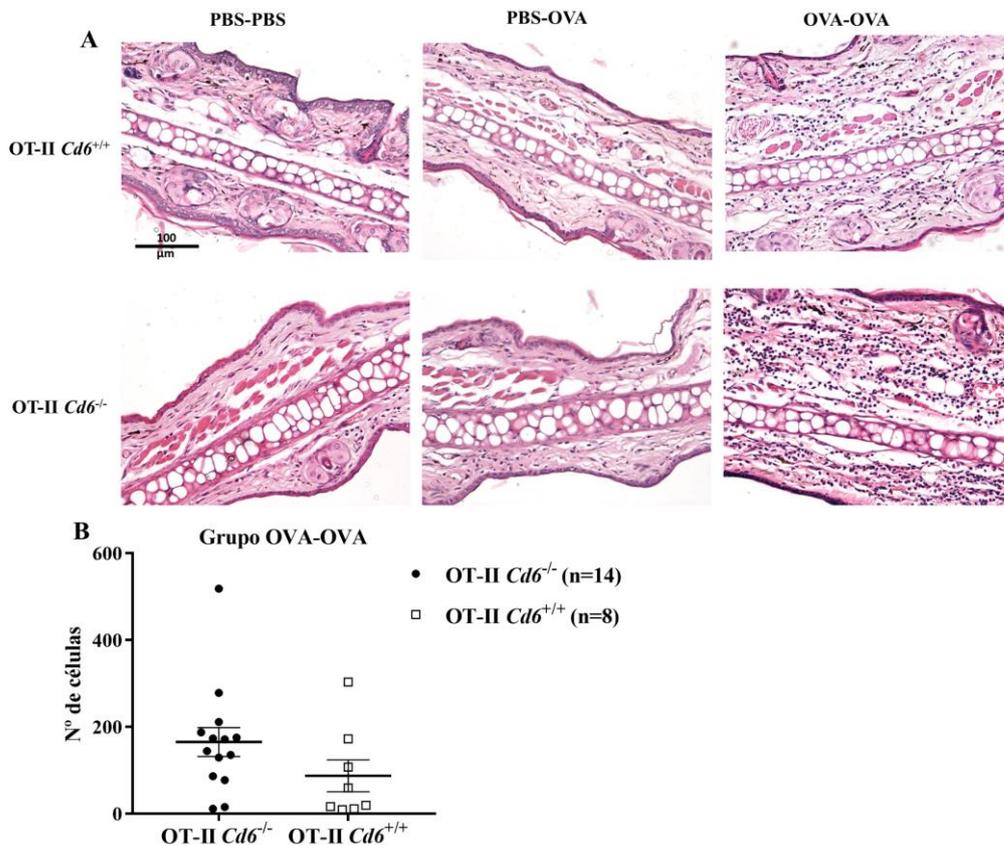
hipersensibilidad retardada (o DTH por *Delayed-Type Hipersensitivity*) inducido por OVA (Nazimek et al., 2020). Como es ya sabido, todas las células T CD4<sup>+</sup> de estos ratones expresan un TCR transgénico que reconoce OVA en el contexto de MHC clase II. Para la inducción del modelo se sensibilizó primero a los ratones OT-II *Cd6*<sup>-/-</sup> y OT-II *Cd6*<sup>+/+</sup> mediante la administración intradérmica (*i.d.*) de OVA (100 µg) sin adyuvante s en la zona abdominal durante 2 días consecutivos. En el 4<sup>o</sup> día, se les administró el mismo antígeno (OVA, 5 µg) por vía *i.d.* en ambas orejas y se analizó su reacción trascurridas las 24 h desde la re-estimulación. Se realizó un seguimiento del peso desde el inicio de la sensibilización sin observarse diferencias entre los grupos (**Figura R-14 A**). A las 24 h de la reexposición al antígeno, se observó un aumento del grosor de las orejas significativamente mayor en los ratones OT-II *Cd6*<sup>-/-</sup> que en el grupo control OT-II *Cd6*<sup>+/+</sup> (**Figura R-14 B y C**). La inflamación de las orejas también se midió después de la exposición mediante el análisis de las diferencias de peso (en mg) entre los discos de 4 mm obtenidos de las orejas del grupo control y sensibilizado a OVA (**Figura R-14 D**).



**Figura R-14. Análisis del modelo de DTH inducida por OVA en ratones OT-II *Cd6*<sup>-/-</sup> vs. OT-II *Cd6*<sup>+/+</sup>.** Ratones OT-II *Cd6*<sup>-/-</sup> (n=11) y OT-II *Cd6*<sup>+/+</sup> (n=10) fueron sensibilizados con OVA (100 µg, *i.d.*) 2 días consecutivos, en la zona abdominal. Después de 4 días, se re-estimularon mediante la inyección de las orejas con OVA (5 µg, *i.d.*) (A) Porcentaje de variación del peso corporal, representado como el peso por día/peso inicial (%) (análisis de varianza (ANOVA) de dos vías). (B) Grosor de las orejas expresado en milímetros (mm) a tiempo 0 y 24 h después de la re-estimulación con OVA. (C) Aumento neto del grosor de las orejas ((grosor de la oreja a tiempo 24 h) – (grosor de la oreja a tiempo 0 h)). (D) Diferencias de peso (en mg) entre los discos de 4 mm obtenidos de las orejas del grupo control

(PBS-PBS y PBS-OVA) y grupo sensibilizado con OVA (OVA-OVA). Se muestran los resultados (media  $\pm$  SEM) de un experimento representativo de 3 independientes realizados. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$  (test T de Student).

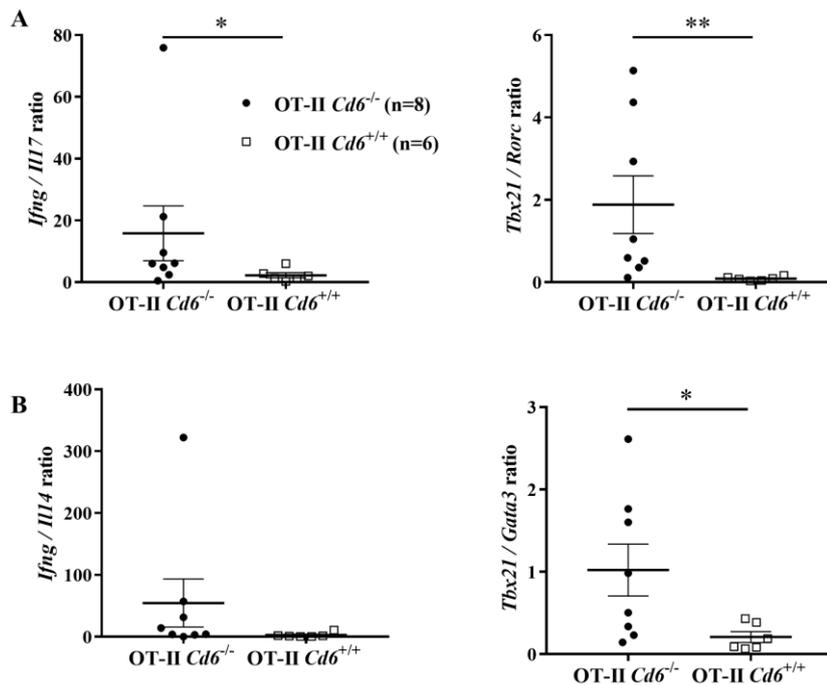
El análisis histológico de las orejas por hematoxilina y eosina (H&E) permitió observar mayor edema e infiltración celular en los ratones sensibilizados y re-estimulados (OVA-OVA) en comparación con los controles (PBS-PBS y PBS-OVA) (**Figura R-15 A**). El recuento total de leucocitos polimorfonucleares y linfocitos mostró una tendencia a la mayor infiltración de las orejas de ratones OT-II  $Cd6^{-/-}$  en comparación con las de OT-II  $Cd6^{+/+}$  (**Figura R-15 B**). En los controles (PBS-PBS y PBS-OVA) apenas se pudo detectar infiltración leucocitaria alguna (**datos no mostrados**).



**Figura R-15. Análisis histológico del modelo de DTH inducida por OVA en ratones OT-II  $Cd6^{-/-}$  vs. OT-II  $Cd6^{+/+}$ .** (A) Imagen representativa de la tinción con H&E de un corte histológico (5  $\mu$ m) de orejas de ratones OT-II  $Cd6^{-/-}$  (n=14) y OT-II  $Cd6^{+/+}$  (n=8) a las 24 h después de la re-exposición a OVA. (B) Recuento total de células (media  $\pm$  SEM) en cortes histológicos de las orejas del grupo re-estimulado con OVA (incluye células polimorfonucleares y linfocitos). Barra = 100  $\mu$ m (200x). (test de T de Student).

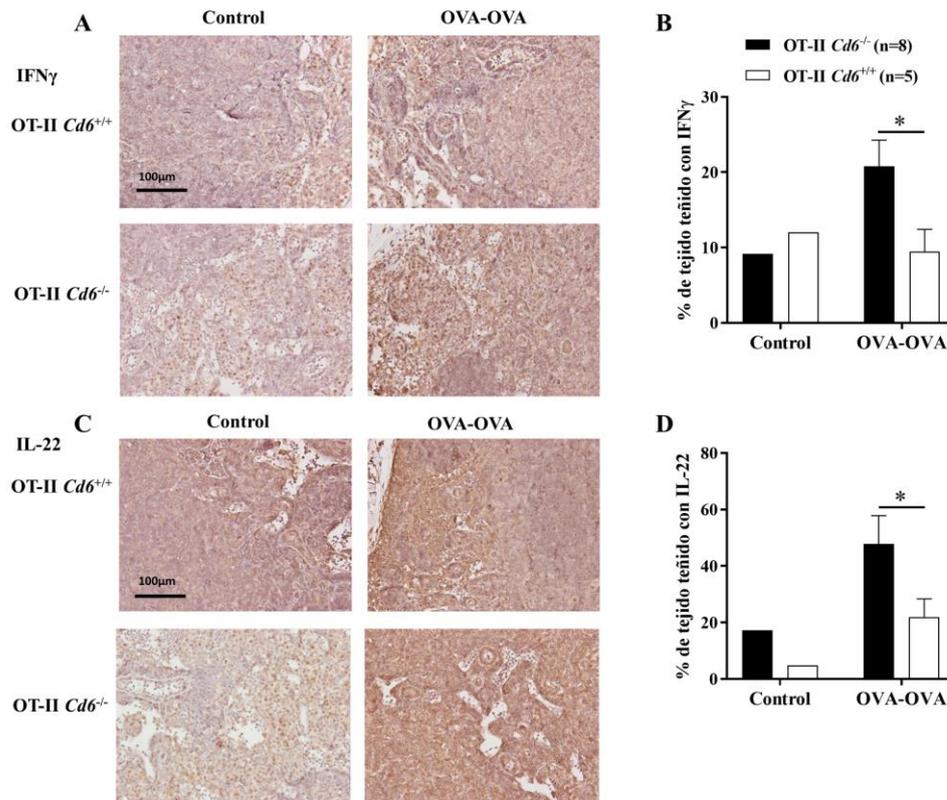
Para caracterizar la respuesta inflamatoria local se extrajeron los ganglios locorreregionales 24 h después de la re-estimulación con OVA y se analizó los niveles relativos de ARNm de diferentes citocinas y factores de transcripción. Para ello se

normalizó la expresión de cada gen analizado (IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-4, ROR- $\gamma$ t, T-bet y Gata-3) con respecto a los valores de expresión de dos genes no inducibles, como son GADPH (*Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) y HPRT-1 (*Hypoxanthine phosphoribosyl transferase 1*). El análisis resultante de las ratios de expresión de citocinas y factores de transcripción Th1/Th17 (*Ifng/Il17*, *Tbx21/Rorc*) y Th1/Th2 (*Ifng/Il14*, *Tbx21/Gata3*) mostró una inducción aumentada de la respuesta Th1 en los ganglios locorreregionales de ratones OT-II *Cd6*<sup>-/-</sup> con respecto a los controles OT-II *Cd6*<sup>+/+</sup> (**Figura R-16**).



**Figura R-16.** Análisis de la expresión de ARNm en ganglios locorreregionales de ratones OT-II *Cd6*<sup>-/-</sup> y OT-II *Cd6*<sup>+/+</sup> post DTH inducida por OVA. El ARNm de ganglios locorreregionales extraídos 24 h después de la re-exposición a OVA de ratones OT-II *Cd6*<sup>-/-</sup> (n=8) y OT-II *Cd6*<sup>+/+</sup> (n=6), se retrotranscribió y analizó por PCR cuantitativa a tiempo real. (A) Ratios de expresión de citocinas (izquierda) y factores de transcripción (derecha) Th1/Th17 (*Ifng/Il17* y *Tbx21/Rorc*, respectivamente). (B) Ratios de expresión de citocinas (izquierda) y factores de transcripción (derecha) Th1/Th2 (*Ifng/Il14* y *Tbx21/Gata3*). La expresión de cada citocina y factor de transcripción se normalizó respecto a los valores de expresión de GADPH y HPRT-1. Se muestran los resultados (media ± SEM) de un único experimento. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$  (test T de Student).

El análisis inmunohistoquímico también mostró un aumento del porcentaje de tejido teñido de IFN- $\gamma$  e IL-22 en ganglios locorreregionales de los ratones transgénicos OT-II *Cd6*<sup>-/-</sup> en comparación con los OT-II *cd6*<sup>+/+</sup> (**Figura R-17**).

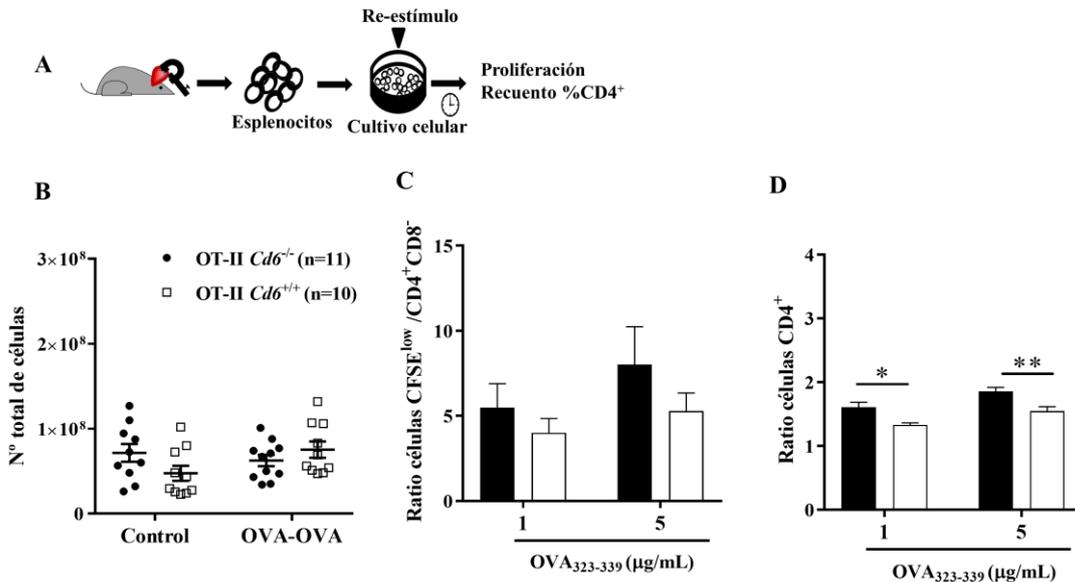


**Figura R-17. Análisis inmunohistoquímico de ganglios locoregionales de ratones OT-II  $Cd6^{-/-}$  y OT-II  $Cd6^{+/+}$  post DTH inducida por OVA.** (A, C) Imagen representativa de tinción inmunohistoquímica para IFN- $\gamma$  e IL-22 en ganglios locoregionales 24 h después de la reexposición a OVA. Barra = 100  $\mu$ m (200x). (B, D) Porcentaje de tejido teñido para IFN- $\gamma$  e IL-22 en ganglios locoregionales de ratones OT-II  $Cd6^{-/-}$  (n=8) y OT-II  $Cd6^{+/+}$  (n=5) tanto control como re-expuestos a OVA (OVA-OVA). El porcentaje (media  $\pm$  SEM) de tejido teñido representa 100\*  $\text{área de DAB} / \text{área de tejido}$ . \*,  $p < 0.05$  (test T de Student).

Finalmente se realizó un ensayo de proliferación celular inducida por OVA a partir de esplenocitos de ratones OT-II  $Cd6^{-/-}$  y OT-II  $Cd6^{+/+}$  que habían sido sometidos previamente al modelo de DTH inducido por OVA. Se observó un aumento significativamente mayor de la proliferación en las células OT-II  $Cd6^{-/-}$  en relación con las células OT-II  $Cd6^{+/+}$  (Figura R-18 A-C), de manera similar a los hallazgos en los ensayos *in vitro* expuestos anteriormente. También, se realizó como control un recuento de esplenocitos totales en los bazo, siendo comparativamente similar el recuento de los ratones del grupo control y grupo sensibilizado a OVA (Figura R-18 D).

En conclusión, este apartado de resultados indicaría que la deficiencia de CD6 se asocia a una respuesta *in vivo* exacerbada de tipo Th1 frente a la inducción por OVA en el modelo de DTH, lo que estaría de acuerdo con la función moduladora negativa

(inhibidora) de CD6 observada durante la activación antígeno (OVA) específica de esplenocitos murinos OT-II  $Cd6^{-/-}$  *in vitro*.



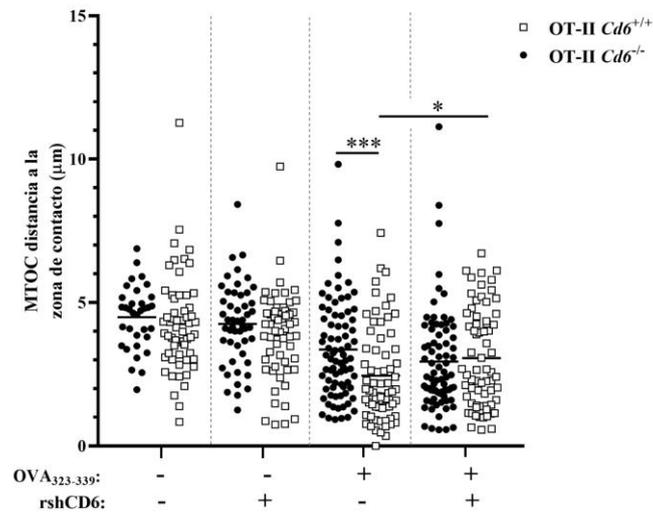
**Figura R-18. Análisis de la respuesta proliferativa a la re-estimulación *ex vivo* con OVA de esplenocitos de ratones OT-II  $Cd6^{-/-}$  y OT-II  $Cd6^{+/+}$  previamente sometidos a DTH inducida por OVA.** Esplenocitos de ratones OT-II  $Cd6^{-/-}$  (n=11) y OT-II  $Cd6^{+/+}$  (n=10) sometidos a DTH por OVA fueron marcados con CFSE y re-estimulados durante 72 h con péptido OVA<sub>323-339</sub> (1 y 5 µg/mL) o control OVA<sub>257-264</sub> (5 µg/mL). (A) Esquema representativo del diseño del experimento. (B) Número de esplenocitos totales de ratones del grupo control (que incluye PBS-PBS y PBS-OVA) y sometido a DTH (OVA-OVA). (C) Ratio determinado por citometría de flujo del porcentaje de células T CD4<sup>+</sup> proliferantes (CFSE<sup>low</sup>) post estimulación con OVA<sub>323-339</sub> respecto a estimuladas con control OVA<sub>257-264</sub>. (D) Ratio determinado por citometría de flujo del porcentaje de células T CD4<sup>+</sup> post estimulación con OVA<sub>323-339</sub> respecto a estimuladas con control OVA<sub>257-264</sub>. Se muestran los resultados (media ± SEM) de un experimento representativo de 3 independientes realizados. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$  (test T de Student).

#### 4. Análisis de la activación antígeno-específica de células T CD4<sup>+</sup> OT-II $Cd6^{-/-}$ y OT-II $Cd6^{+/+}$ mediante la formación *in vitro* de conjugados T-APC.

Otro modelo experimental *in vitro*, controlado y ampliamente utilizado para estudiar fenómenos tempranos de activación linfocitaria es la formación de conjugados de células T con células presentadoras de antígeno (APC) profesionales como son las células dendríticas (DCs). El reconocimiento específico por parte del TCR de antígenos peptídicos presentados vía MHC por la APC induce la formación de la llamada sinapsis inmunitaria (IS) y la subsiguiente inducción de señales intracelulares activadoras de la expresión génica y del ciclo celular.

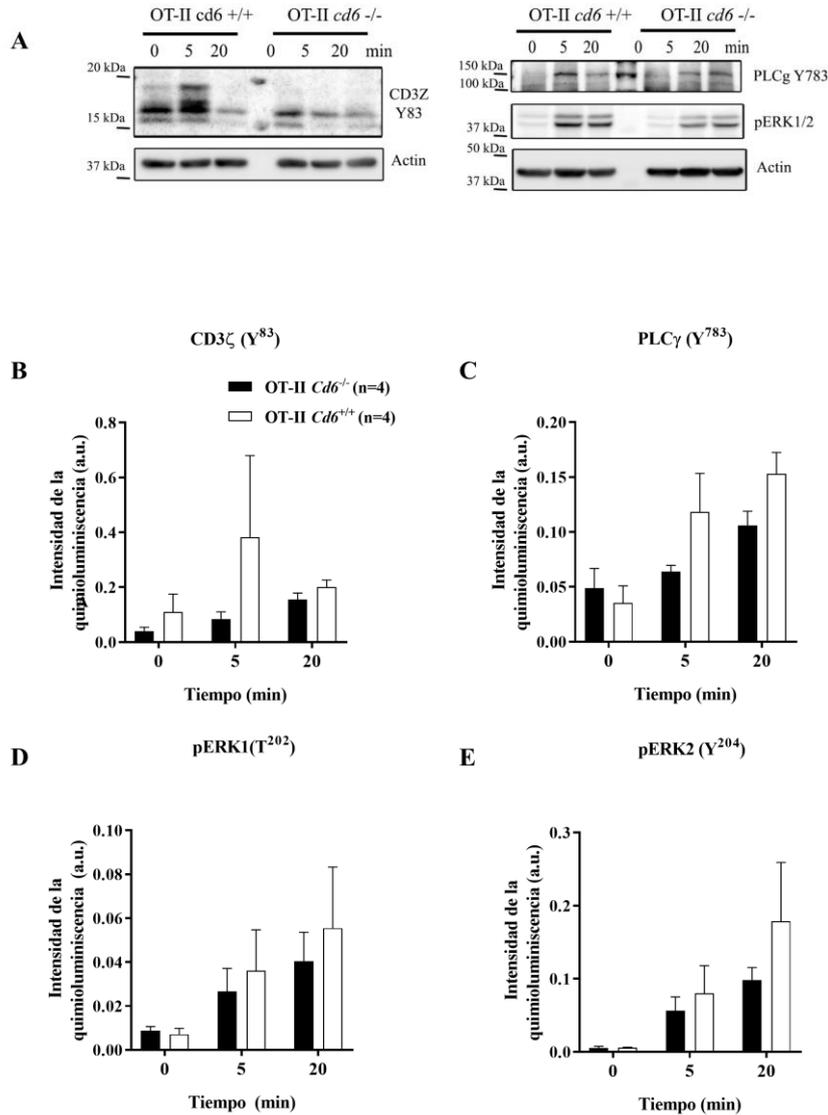
Como se ha mencionado anteriormente, las células T CD4<sup>+</sup> de ratones OT-II *Cd6*<sup>-/-</sup> y OT-II *Cd6*<sup>+/+</sup> comparten TCR transgénicos con especificidad para el péptido de ovoalbúmina (OVA<sub>323-339</sub>) presentado por moléculas MHC clase II I-A<sup>b</sup>. Esto nos proporciona una herramienta para evaluar en condiciones fisiológicas antígeno-específicas la posible función de CD6 como amplificador o atenuador de las señales del receptor clonotípico generadas durante la formación de la IS, así como facilitador de los contactos adhesivos célula-célula (T-APC), a través de la interacción CD6-CD166/ALCAM, que son necesarios para la estabilización y maduración de la IS. A tal efecto se generaron conjugados T-APC (ratio 5:1) utilizando células T CD4<sup>+</sup> aisladas por selección negativa de esplenocitos totales de ratones OT-II *Cd6*<sup>-/-</sup> y OT-II *Cd6*<sup>+/+</sup> por un lado y DCs derivadas de médula ósea (BMDCs) de ratones C57BL/6 *wild type* previamente maduras durante 24 h con LPS y cargadas después con péptido OVA<sub>323-339</sub> durante 2 h. En algunos casos se incluyó el tratamiento con proteína recombinante CD6 humana soluble (shCD6) durante 2 h para inhibir la interacción de CD6 de membrana con su/s ligando/s. Tras 1 h de incubación se analizó la movilización y polarización del centro organizador de microtúbulos (MTOC) hacia la zona de contacto T-APC como indicador de la formación de una IS efectiva y, por tanto, de reconocimiento específico de antígeno por parte del TCR.

Tal y como ilustra la **Figura R-19**, en presencia de péptido OVA<sub>323-339</sub> la distancia del MTOC a la zona de contacto fue significativamente menor para los conjugados con células OT-II *Cd6*<sup>+/+</sup> en relación con los de OT-II *Cd6*<sup>-/-</sup>. Por otro lado, cuando la formación de conjugados se hizo con células T pre-incubadas con proteína shCD6 observó un aumento significativo de la distancia del MTOC para los conjugados con células OT-II *Cd6*<sup>+/+</sup> pero no así para los de células OT-II *Cd6*<sup>-/-</sup>. Todo ello indicaría que la expresión de CD6 y la interacción con su ligando CD166/ALCAM juegan un papel relevante en la formación y estabilización de la IS, de acuerdo con lo previamente publicado por diferentes grupos independientes (Gimferrer et al., 2004; Hassan et al., 2004; Zimmerman et al., 2006).



**Figura R-19. Análisis de la movilización y polarización del MTOC tras el reconocimiento específico de OVA en conjugados de células T CD4<sup>+</sup> de ratones OT-II *Cd6*<sup>-/-</sup> y OT-II *Cd6*<sup>+/+</sup> con BMDCs.** BMDCs maduras y cargadas con el péptido OVA<sub>323-339</sub> y en presencia o ausencia de la proteína recombinante CD6 humana soluble (shCD6; 10 μg/mL) durante 2 h a 37°C se co-incubaron durante 1 h con células T CD4<sup>+</sup> aisladas de bazo de ratones OT-II *Cd6*<sup>-/-</sup> y OT-II *Cd6*<sup>+/+</sup>. Después, las muestras se fijaron y tiñeron con anticuerpos específicos anti- $\alpha$ -tubulina-FITC para detectar la orientación del MTOC, además de con faloidina marcada con Alexa-568 (rojo) y anti-CD3 marcado con Alexa-647 (magenta) y se cuantificó la distancia del MTOC a la zona de contacto T-APC. Se muestra la sumatoria de resultados (media  $\pm$  SD) de 2 experimentos independientes. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$  (test T de Student).

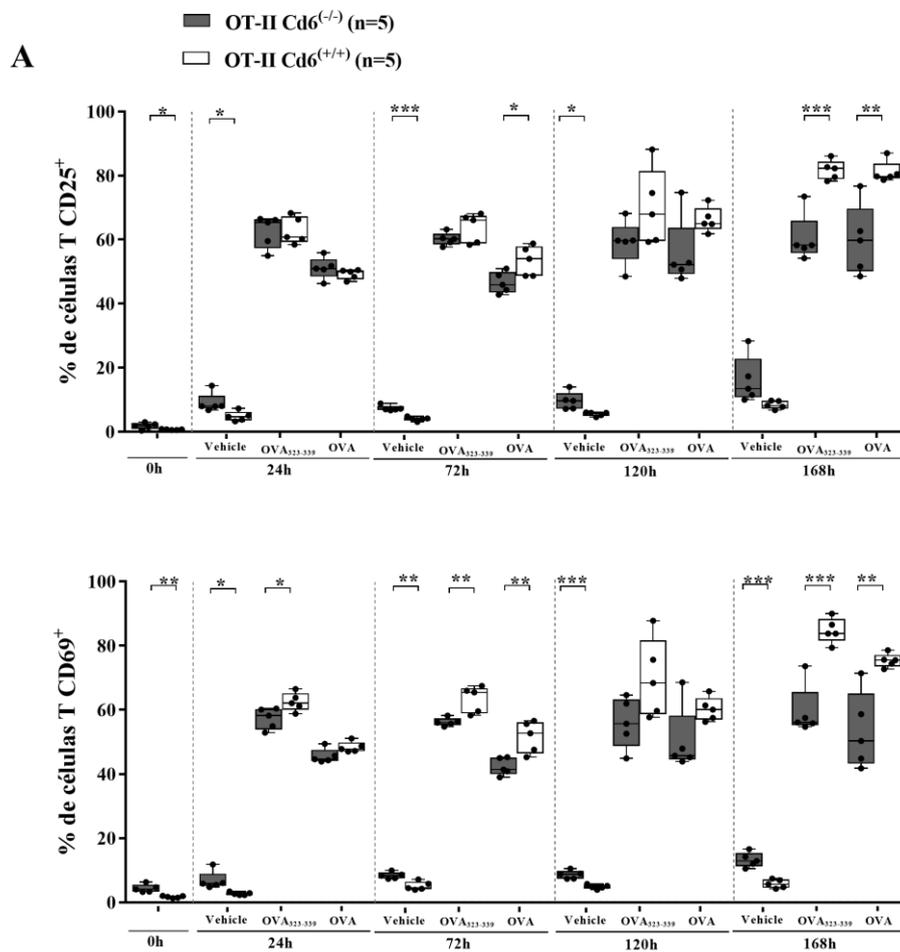
A continuación, se procedió a analizar eventos tempranos de señalización intracelular resultantes de la formación de conjugados T-APC entre células T CD4<sup>+</sup> de ratones OT-II *Cd6*<sup>+/+</sup> y OT-II *Cd6*<sup>-/-</sup> con BMDC maduras cargadas con péptido OVA<sub>323-339</sub>. Mediante *Western Blot* (WB) se analizó la cinética de fosforilación de proteínas señalizadoras como CD3 $\zeta$  (Y<sup>83</sup>), PLC $\gamma$  (Y<sup>783</sup>) y ERK 1/2 (T<sup>202</sup>/Y<sup>204</sup>). Tal y como se ilustra en la **Figura R-20**, el análisis reveló una tendencia a la reducción de la fosforilación para todas las proteínas analizadas. Estos resultados apoyarían una función de CD6 como molécula moduladora positiva (amplificadora) de la señalización del TCR tras el reconocimiento específico de antígeno por células T CD4<sup>+</sup> vía APCs.

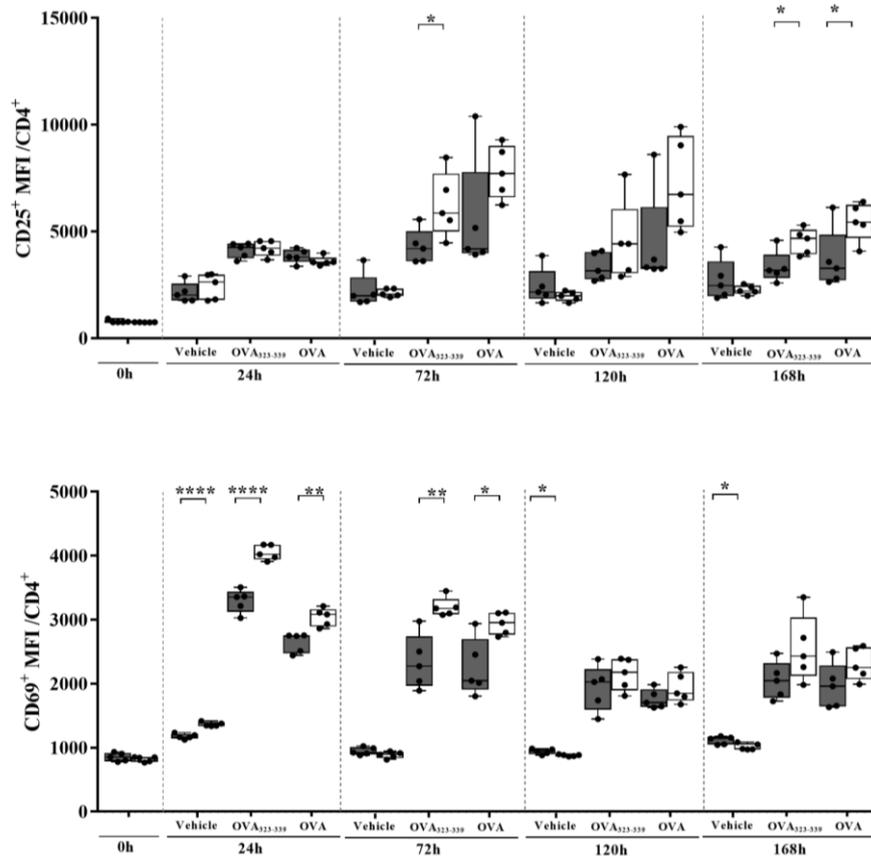


**Figura R-20. Análisis de eventos bioquímicos tempranos de señalización intracelular post formación de conjugados T-APC específicos para OVA entre células T CD4<sup>+</sup> OT-II *Cd6*<sup>-/-</sup> y OT-II *Cd6*<sup>+/+</sup> con BMDCs. (A)** Se muestra un experimento representativo del análisis por WB de las formas fosforiladas de CD3ζ (Y<sup>83</sup>), PLCγ (Y<sup>783</sup>) y ERK 1/2 (T<sup>202</sup>/Y<sup>204</sup>) y actina (control de carga) en extractos de conjugados de células T CD4<sup>+</sup> de ratones OT-II *Cd6*<sup>-/-</sup> y OT-II *Cd6*<sup>+/+</sup> con BMDCs cargadas con péptido OVA<sub>323-339</sub> (ratio 5:1). **(B-E)** Se muestra la intensidad relativa de la fosforilación de cada una de las proteínas señalizadoras analizadas, normalizadas con respecto al control de actina. Se muestran (n=4) los resultados de un experimento independiente realizado (test T de *Student*).

Otro parámetro de activación linfocitaria analizado en los experimentos con conjugados T-APC fue la expresión de los marcadores CD25 y CD69. A tal efecto se cocubaron células T de ratones OT-II *Cd6*<sup>-/-</sup> y OT-II *Cd6*<sup>+/+</sup> con BMDCs maduras cargadas con péptido OVA<sub>323-339</sub> o con proteína OVA completa y se monitorizó por citometría de flujo el porcentaje de células positivas y el canal medio de intensidad de fluorescencia

(MFI) para CD25 y CD69 a diferentes tiempos (0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 y 168 h). Tal y como se ilustra en la **Figura R-21**, se observó un menor aumento a diferentes tiempos (especialmente a tiempos tardíos) del porcentaje de células positivas y/o del MFI, tanto para CD25 como, especialmente, para CD69 en células T CD4<sup>+</sup> de ratones OT-II *Cd6*<sup>-/-</sup> con respecto a OT-II *Cd6*<sup>+/+</sup>. Estos datos apoyarían un efecto modulador positivo (amplificador) de la expresión de CD6 sobre la señalización del TCR tras el reconocimiento específico de antígeno por células T CD4<sup>+</sup> vía APCs. Cabe señalar no obstante de que las células OT-II *Cd6*<sup>-/-</sup> no estimuladas (vehículo) expresaban unos niveles, aunque bajos, significativamente mayores de CD25 y CD69 que las OT-II *Cd6*<sup>+/+</sup> lo que apoyaría un estado basal de activación superior.

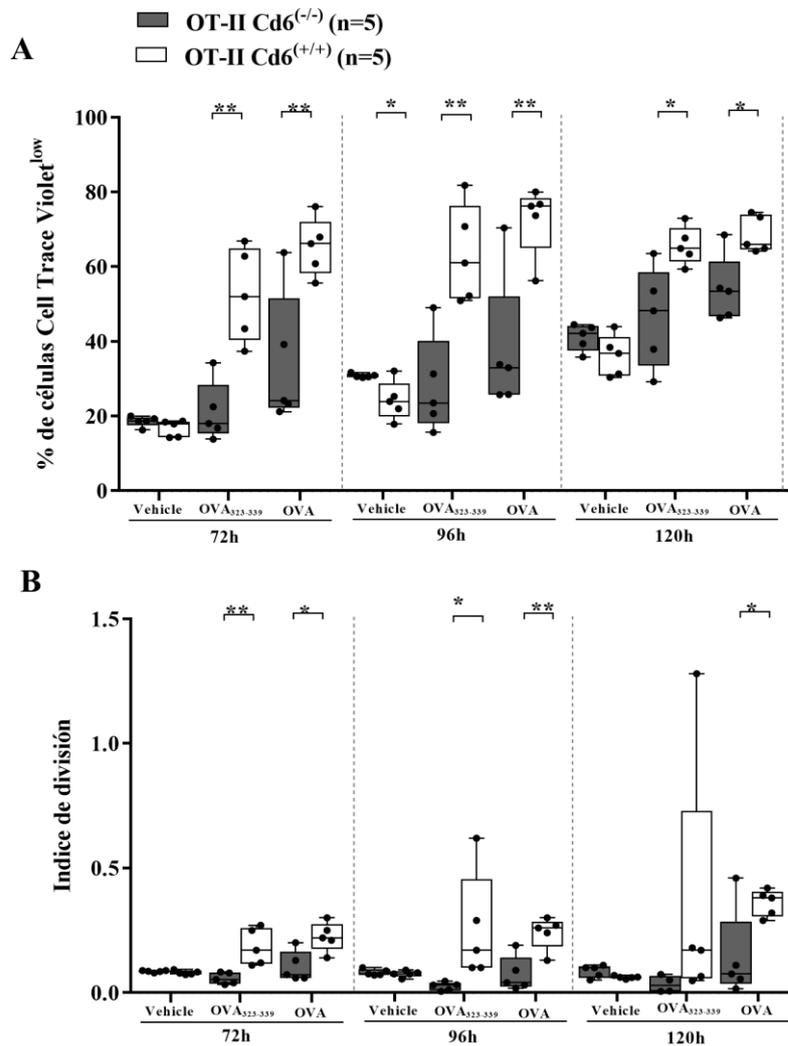


**B**

**Figura R-21. Análisis de marcadores de superficie de activación linfocitaria temprana post formación de conjugados T-APC específicos para OVA entre células T CD4<sup>+</sup> OT-II *Cd6*<sup>-/-</sup> y OT-II *Cd6*<sup>+/+</sup> con BMDCs.** Células T CD4<sup>+</sup> aisladas por selección negativa de bazo de ratones OT-II *Cd6*<sup>-/-</sup> y OT-II *Cd6*<sup>+/+</sup> se co-incubaron con BMDCs maduras cargadas con péptido OVA<sub>323-339</sub> y se analizaron por citometría de flujo para medir la expresión en superficie de CD25 y CD69. Como control se monitorizaron los valores de ambos marcadores en células T CD4<sup>+</sup> no expuestas a OVA<sub>323-339</sub> o expuestas a la proteína OVA completa. (A) Porcentaje de células CD25<sup>+</sup> (arriba) y CD69<sup>+</sup> (abajo) en la fracción de células T CD4<sup>+</sup>. (B) Canal medio de intensidad de fluorescencia de células CD25<sup>+</sup> (arriba) y CD69<sup>+</sup> (abajo) en la fracción de células T CD4<sup>+</sup>. Se muestran los resultados de un experimento representativo (n=5) de tres independientes realizados. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*,  $p < 0.0001$  (test T de Student).

Finalmente, se analizó otro fenómeno de activación linfocitaria tardía como es la proliferación celular. Para ello, las células T CD4<sup>+</sup> de ratones OT-II *Cd6*<sup>-/-</sup> y OT-II *Cd6*<sup>+/+</sup> se marcaron con Cell Trace Violet previo a la formación de conjugados con BMDCs maduras y cargadas con péptido OVA<sub>323-339</sub> o proteína OVA. A continuación, se analizó el porcentaje de células Cell Trace Violet<sup>low</sup> (proliferantes) y el índice de división mediante citometría de flujo a diferentes tiempos (72, 96, y 120 h). Tal y como ilustra la

**Figura R-22**, se observó una menor respuesta proliferativa de las células T CD4<sup>+</sup> de ratones OT-II *Cd6*<sup>-/-</sup> con respecto a las de OT-II *Cd6*<sup>+/+</sup>.

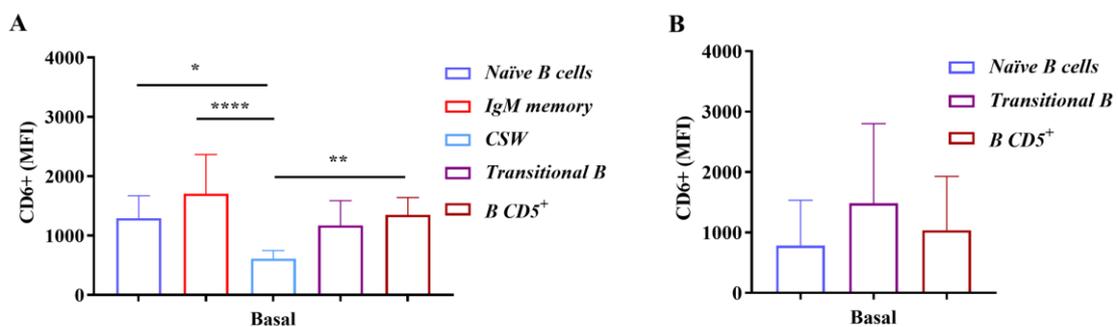


**Figura R-22. Análisis de proliferación linfocitaria post formación de conjugados T-APC específicos para OVA entre células T CD4<sup>+</sup> OT-II *Cd6*<sup>-/-</sup> y OT-II *Cd6*<sup>+/+</sup> con BMDCs.** Células T CD4<sup>+</sup> aisladas por selección negativa de bazo de ratones OT-II *Cd6*<sup>-/-</sup> y OT-II *Cd6*<sup>+/+</sup> se marcaron con Cell Trace Violet y se co-cultivaron con BMDCs maduras cargadas con péptido OVA<sub>323-339</sub>. Como control se monitorizaron los valores de ambos marcadores en células T CD4<sup>+</sup> no expuestas a OVA<sub>323-339</sub> o expuestas a la proteína OVA completa.. **(A)** Porcentaje de células T CD4<sup>+</sup>Cell Trace Violet<sup>low</sup> **(B)** Índice de división de las células T CD4<sup>+</sup>. Se muestran los resultados de un experimento representativo (n=5) de 3 independientes realizados. ns, no significativo; \*, *p*<0.05; \*\*, *p*< 0.01. (test T de Student).

En conclusión, los resultados del estudio de conjugados T-APC específicos de antígeno (OVA) apoyarían un papel de CD6 favorecedor de la formación y estabilización de la IS, así como potenciador de eventos subsiguientes de activación linfocitaria T CD4<sup>+</sup>(tempranos y tardíos), de acuerdo con trabajos previos publicados por diferentes grupos independientes (Gimferrer et al., 2004; Hassan et al., 2004; Zimmerman et al., 2006).

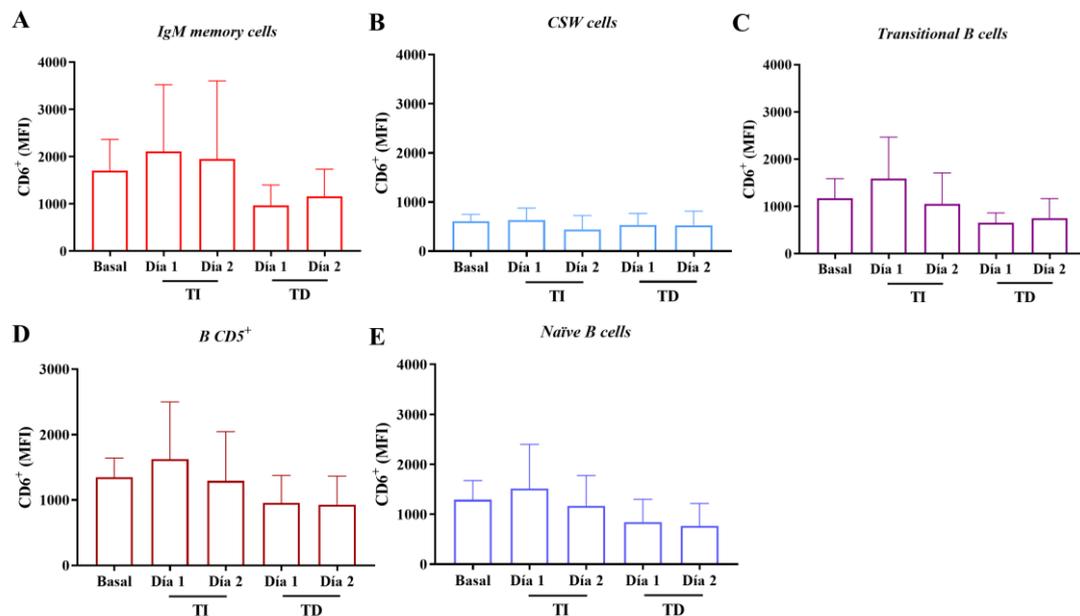
## 5. Análisis de la expresión de CD6 en subpoblaciones linfocitarias B de sangre periférica de adultos y recién nacidos.

La expresión y función del receptor CD6 se ha estudiado ampliamente en las células T. Por el contrario, existe escasa información de este receptor en las células B. Con este propósito, se evaluó la expresión de CD6 en diferentes subpoblaciones de células B humanas presentes en sangre periférica de adultos y de recién nacidos (cordón umbilical), en condiciones basales y post estimulación. Los resultados obtenidos evidencian una baja expresión de CD6 en todas las subpoblaciones de células B analizadas en estado basal: vírgenes o *naïve* ( $CD20^+CD27^-CD38^{low}IgD^+$ ), memoria IgM ( $CD27^+IgD^+IgM^+$ ),  $CD5^+$  ( $CD5^+CD27^-CD38^{low}IgD^+$ ), transicionales ( $CD27^-CD38^{high}$ ) y memoria con cambio de clase ( $CD27^+IgD^-IgM^-$ ; CSW, del inglés *class-switch memory cells*). Tal y como ilustra la **Figura R-23 A**, la expresión de CD6 en células CSW resultó ser significativamente menor que en células *naïve*, memoria IgM,  $CD5^+$  y transicionales de sangre periférica de adultos. Por su parte, el análisis de sangre periférica de cordón umbilical no mostró diferencias significativas en los niveles de CD6 de células B *naïve*,  $CD5^+$  y transicionales (**Figura R-23 B**).



**Figura R-23. Expresión de CD6 en diferentes subpoblaciones de células B humanas de sangre periférica de adultos y neonatos en condiciones basales.** (A) Expresión de CD6 en subpoblaciones de células B de sangre periférica de adultos (n=8): vírgenes o *naïve* ( $CD20^+CD27^-CD38^{low}IgD^+$ ), memoria IgM ( $CD27^+IgD^+IgM^+$ ),  $CD5^+$  ( $CD5^+CD27^-CD38^{low}IgD^+$ ), transicionales ( $CD27^-CD38^{high}$ ) y memoria con cambio de clase ( $CD27^+IgD^-IgM^-$ ; en inglés *class switch memory cells* o CSW). (B) Expresión de CD6+ en subpoblaciones de células B de sangre periférica de cordón umbilical (n= 7): vírgenes o *naïve*,  $CD5^+$  y transicionales. Se muestra la media  $\pm$  SD del canal medio de fluorescencia (MFI) de CD6+. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*\*,  $p < 0.0001$  (análisis de varianza (ANOVA) de una vía y test de Tukey's de comparaciones múltiples).

Estudios previos en células T humanas han demostrado que su activación mediante estímulos policlonales (AcMos anti-CD3 más anti-CD28 o PHA) induce una disminución de la expresión de CD6 de membrana asociada a degradación proteolítica por metaloproteasas extracelulares (Carrasco et al., 2017). De forma análoga, se analizó si la activación de células B humanas induce cambios en los niveles de expresión de CD6 de membrana. A tal fin, se aislaron células CD19<sup>+</sup> provenientes de sangre periférica de adultos sanos y se activaron durante 24 y 48 h con estímulos policlonales T-dependientes (TD; anti-Igs, CD40L-HA y anti-HA) y T-independientes (TI; CpG-B ODNs *type*). Como se muestra en la **Figura R-24**, no se observaron diferencias significativas tras la activación TD o TI en ninguna de las subpoblaciones de células B estudiadas. No obstante, se objetivó una tendencia a un aumento de expresión en las primeras 24 h post estimulación TI que decaía a las 48 h. La tendencia fue inversa (disminución) a las 24 y 48 h post estimulación TD. Este estudio también se realizó con células B provenientes de sangre de cordón umbilical, pero debido a la baja viabilidad de las muestras no se obtuvieron células suficientes para realizar los estudios de activación de células B. Sólo 2 muestras de un total de 7 se obtuvieron células suficientes, las cuales aumentaron la expresión de CD6<sup>+</sup> bajo estimulación TI (**datos no mostrados**).

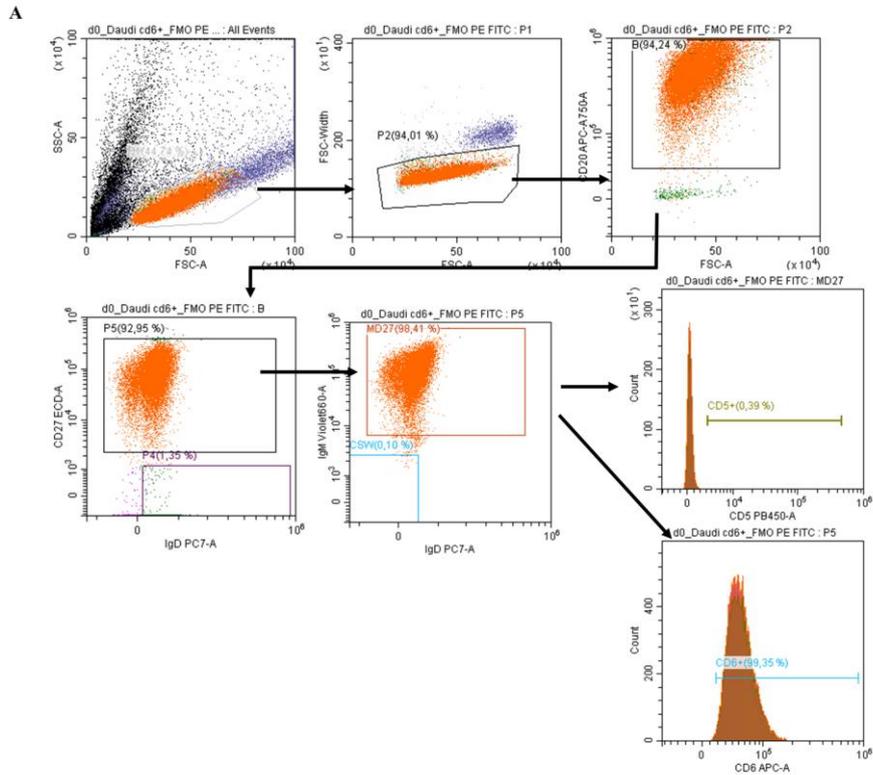


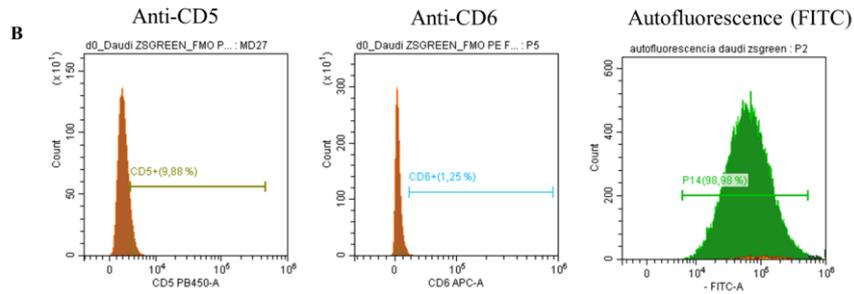
**Figura R-24. Expresión de CD6 en células B humanas de sangre periférica de adultos post estimulación T-independiente (TI) y T-dependiente (TD).** Células CD19<sup>+</sup> de sangre periférica de adultos (n=5) se cultivaron durante 24 y 48 h en condiciones de estimulación TI (CpG-B ODNs *type* B) y TD (anti-Igs, CD40L-HA y anti-HA). Se muestra la expresión de CD6<sup>+</sup> analizada por citometría de flujo en células B (A) memoria IgM (CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>), (B) memoria con cambio de clase (CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>; CSW), (C) transicionales (CD27<sup>+</sup>CD38<sup>high</sup>), (D) CD5<sup>+</sup> (CD5<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD38<sup>low</sup>

IgD<sup>+</sup>) y (E) vírgenes o *naïve* (CD20<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>CD38<sup>low</sup>IgD<sup>+</sup>). Se muestra la media  $\pm$  SD del canal medio de intensidad de fluorescencia (MFI). Análisis de varianza (ANOVA) de una vía y test de Tukey's de comparaciones múltiples.

## 6. Análisis del perfil transcriptómico resultante de la expresión de CD6 en células Daudi

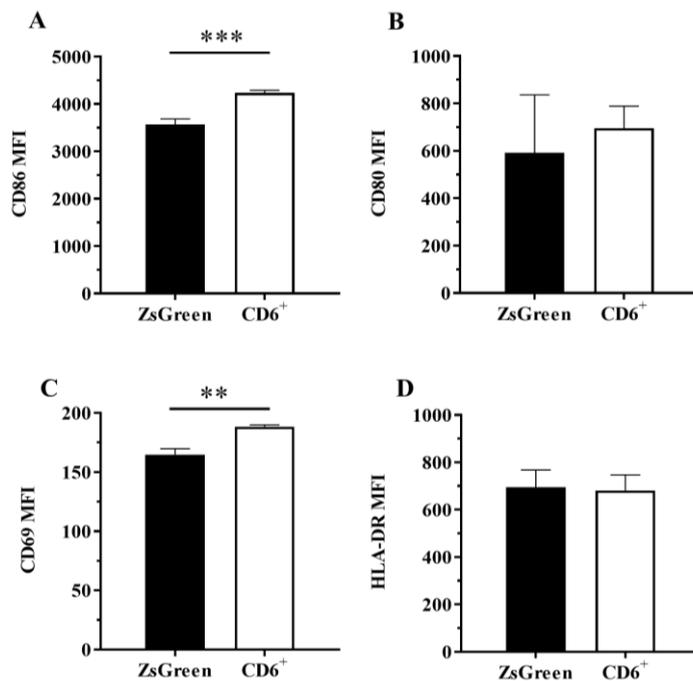
Estudios transcriptómicos previos han demostrado que la expresión de CD5 en células Daudi (una la línea celular B derivada de un linfoma de Burkitt) induce un perfil de expresión génica similar al que se observa en células de LLC cuando se comparan con el de células B normales (Gary-Gouy et al., 2007) Con estos antecedentes, se decidió analizar el impacto de la expresión de CD6 sobre el perfil de expresión génica de la línea celular Daudi (CD5<sup>-</sup> y CD6<sup>-</sup>). Para ello se clonó el ADNc de CD6 humano y de la proteína control ZsGreen en el vector lentiviral de segunda generación (pLVX-puro) y se generaron partículas lentivirales completas para la transducción y posterior selección por *cell sorting* de células Daudi que expresaban establemente niveles elevados de CD6 (Figura R-25 A) y ZsGreen (medido en el canal de FITC) (Figura R-25 B).





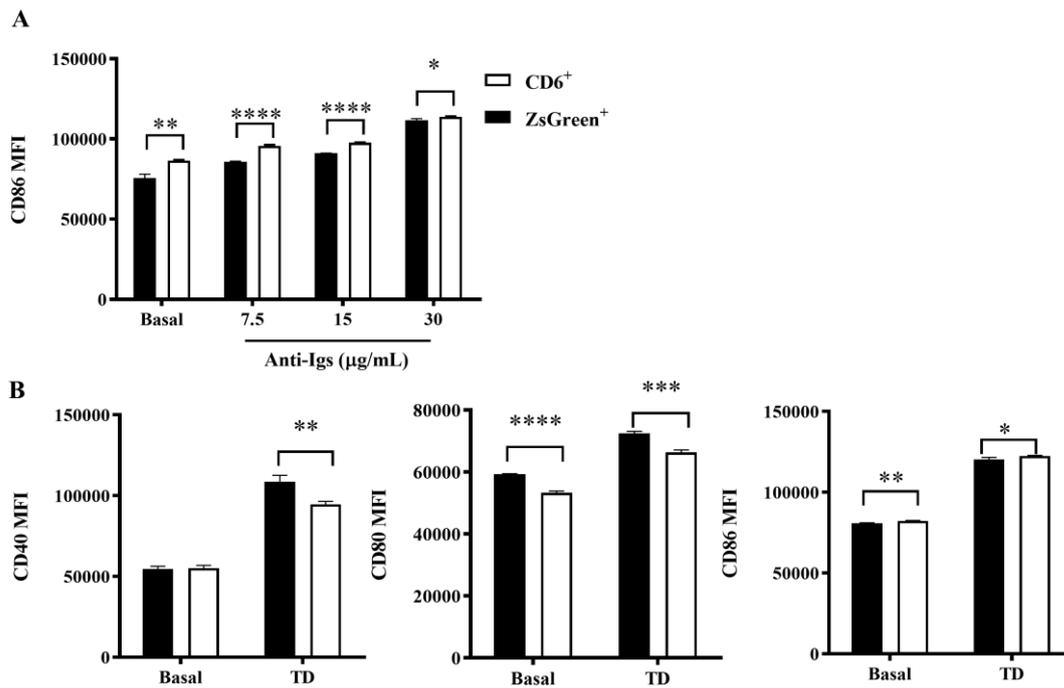
**Figura R-25. Expresión de CD6<sup>+</sup> y ZsGreen<sup>+</sup> en células Daudi transducidas lentiviralmente.** (A) Estrategia de *gating* usada para el análisis de la expresión de CD5 y CD6 humano en células Daudi transducidas con lentivirus codificantes para CD6 humano. (B) Análisis de la expresión de CD5 (izquierda) y CD6 (Centro) humano y autofluorescencia medida en el canal de FITC (derecha) en células Daudi transducidas con lentivirus codificantes para ZsGreen.

A continuación, se analizó por citometría de flujo la expresión de marcadores de activación en células Daudi en estado basal y post activación. Tal y como ilustra la **Figura R-26**, las células Daudi-CD6<sup>+</sup> presentaban en estado basal un aumento significativo de la expresión de CD69 y CD86 con respecto a células control ZsGreen<sup>+</sup>, mientras que la expresión de CD80 y HLA-DR fue equivalente en ambos tipos celulares.



**Figura R-26. Análisis de marcadores de activación B en células Daudi-CD6<sup>+</sup> y -ZsGreen<sup>+</sup> en condiciones basales.** Células Daudi-CD6<sup>+</sup> y -ZsGreen<sup>+</sup> fueron cultivadas durante 24 h sin estímulo y luego analizadas por citometría de flujo para la expresión de marcadores de activación (A) CD86, (B) CD80, (C) CD69 y (D) HLA-DR. Se muestra el canal medio de fluorescencia (*Median*) de CD86<sup>+</sup>, CD80<sup>+</sup>, CD69<sup>+</sup> y HLA-DR<sup>+</sup>. Se muestran (n=3) los resultados (media ± SD) representativos de dos experimentos independientes realizados. \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ; Test T de *Student*.

La estimulación de células Daudi-CD6<sup>+</sup> y -ZsGreen<sup>+</sup> con diferentes concentraciones de anticuerpos anti-Igs (7.5, 15 y 30 µg/mL) indujo aumentos de expresión de CD86 en ambos tipos celulares, aunque los niveles fueron significativamente mayores en células Daudi-CD6<sup>+</sup> (**Figura R-27 A**) Una situación similar se observó cuando se analizó la expresión de CD86 post estimulación T-dependiente (TD; anti-Igs, CD40L-HA y anti-HA) (**Figura R-27 B**). Sin embargo, los niveles de CD40 y CD80 se encontraron disminuidos significativamente en las mismas células (Daudi-CD6<sup>+</sup>) con respecto a las células control (Daudi-ZsGreen<sup>+</sup>).

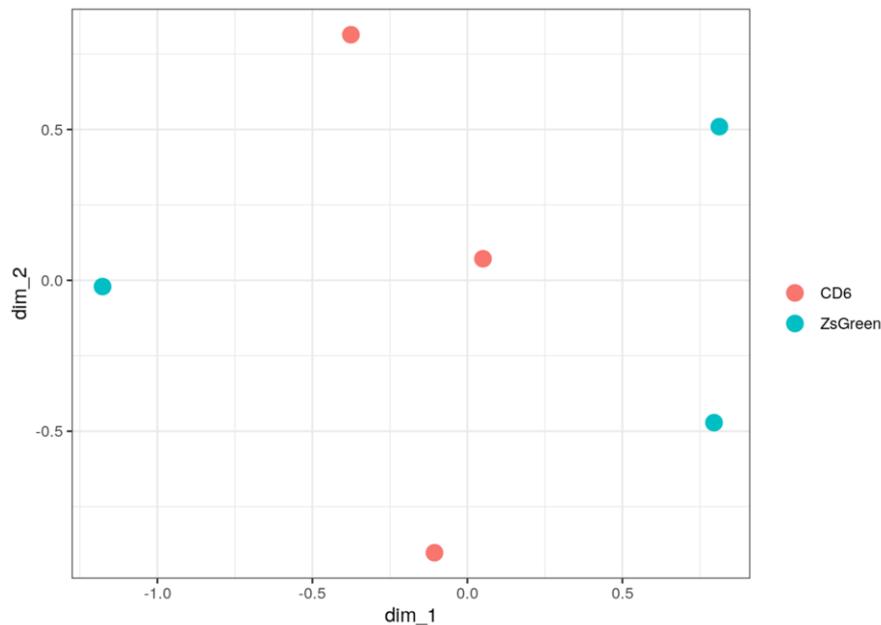


**Figura R-27. Análisis de la expresión de CD86 post estimulación policlonal de células Daudi-CD6<sup>+</sup> y -ZsGreen<sup>+</sup>.** (A) Células Daudi-CD6<sup>+</sup> y -ZsGreen<sup>+</sup> cultivadas durante 24 h en presencia o ausencia de diferentes concentraciones de anti-Igs fueron analizadas por citometría de flujo para la expresión de CD86. (B) Ídem en células cultivadas 24 h en presencia o ausencia de estimulación TD (anti-Igs, CD40L-HA y anti-HA) se analizó la expresión de CD40, CD80 y CD86. Se muestra (n=3) la media ± SD del canal medio de fluorescencia (MFI) de triplicados de un (A) o tres (B) experimentos realizados. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*\*,  $p < 0.0001$  (test T de Student).

Los datos parciales hasta aquí obtenidos indicarían que, en estado basal, la expresión de CD6 en una línea celular B modularía positivamente la expresión de ciertos marcadores de activación como CD69 y moléculas co-estimuladoras como CD86, mientras modularía de forma neutra (CD40, HLA-DR) o incluso negativa (CD80) la de otros marcadores similares. En caso de activación con estímulos B policlonales (anti-Igs

solo o junto con CD40L), la expresión de CD6 continuaría modulando positivamente la expresión de CD86, pero negativamente la de CD40 y CD80. Estos datos, aunque preliminares, indicarían que la expresión de CD6 sería capaz de modular el patrón de expresión génica de una línea celular B tanto en condiciones de reposo como post estimulación.

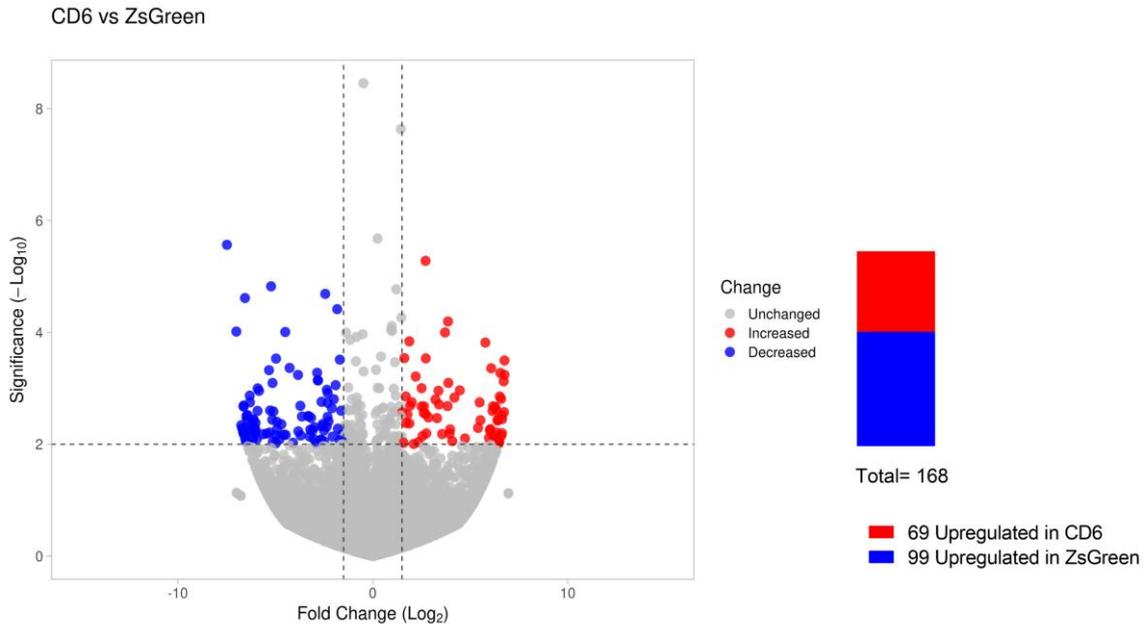
Para profundizar en estos resultados decidimos analizar y comparar el transcriptoma de células Daudi-CD6<sup>+</sup> y células control Daudi-ZsGreen<sup>+</sup> mediante técnicas de secuenciación masiva de ARNm (*RNA-seq*). Con esta finalidad, se cultivaron ambos tipos celulares durante 24 h en ausencia de estímulos y, a continuación, se obtuvieron triplicados técnicos de ARNm de cada uno de ellos para su secuenciación y posterior análisis bioinformático. Un primer análisis exploratorio por Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) no mostró diferencias observables entre grupos (**Figura R- 28**), sugiriendo una ausencia o baja magnitud de cambios globales desencadenados por la expresión de CD6.



**Figura R-28.** Análisis de escalado *Uniform Manifold Approximation and Projection* (UMAP) de muestras de RNA de células Daudi transducidas con CD6 y ZsGreen basado en los conteos crudos de genes del *RNA-seq*. Se representa un UMAP *plot* considerando todas las muestras (3 réplicas técnicas)

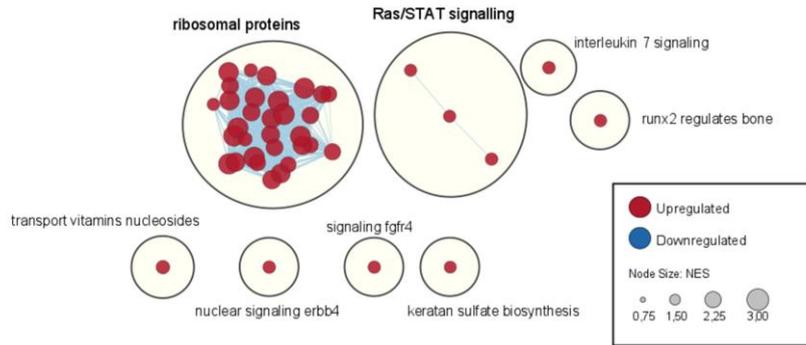
Los análisis de la expresión de genes diferencialmente expresados se determinaron con el método DESeq. De los 20.565 genes identificados, 69 presentaban una expresión

aumentada (upregulados) ( $FC > 1.5$  y  $p\text{ value} < 0.01$ ) mientras que 99 presentaban una expresión disminuida (downregulados) ( $FC < -1.5$  y  $p\text{ value} < 0.01$ ) en células Daudi-CD6<sup>+</sup> comparadas con Daudi-ZsGreen<sup>+</sup> (**Figura R-29**).



**Figura R-29. Análisis de genes diferencialmente expresados de células Daudi-CD6<sup>+</sup> vs -ZsGreen<sup>+</sup> en condiciones basales.** *Volcano plot* que representa la sumatoria de los genes diferencialmente expresados considerando un *log Fold change* [FC] 1.5 y un valor *p-value* a  $< 0.01$  (*DESeq*). Los puntos de color rojo representan un aumento de expresión para Daudi-CD6<sup>+</sup> y los puntos de color azul representan un aumento de expresión correspondientes para Daudi-ZsGreen<sup>+</sup>. El gráfico muestra un total de 168 genes están diferencialmente expresados, de los cuales 69 están sobreexpresados en las células Daudi CD6<sup>+</sup>, mientras que 99 genes en las células Daudi-ZsGreen<sup>+</sup>.

Posteriormente se realizó un análisis de enriquecimiento funcional por *gene set enrichment analysis* (GSEA) para procesos biológicos utilizando la base de datos *Reactome* y, con la finalidad de agruparlas por funciones similares, se realizó una representación de red con *Cytoscape* y la aplicación de *EnrichmentMap*. En la **Figura R-30** se muestran categorías que resultaron significativas para la comparación entre células Daudi-CD6<sup>+</sup> y -ZsGreen<sup>+</sup> en condiciones basales. Se observó un total de 8 agrupaciones de vías de señalización, sobreexpresadas en células Daudi-CD6<sup>+</sup>, siendo las principales las de proteínas ribosomales y la señalización de Ras/STAT.



**Figura R-30. Mapa comparativo de enriquecimiento funcional GSEA de células Daudi-CD6<sup>+</sup> y -ZsGreen<sup>+</sup> en condiciones basales.** Representación de *Cytoscape* de las categorías que resultaron significativas entre la comparación de células Daudi-CD6<sup>+</sup> y -ZsGreen<sup>+</sup> en condiciones basales. Cada círculo representa una vía de la base de datos *Reactome* de GSEA y las líneas representan la interconexión de las vías que comparten genes. El tamaño de los círculos depende de NES (*normalized enrichment score*). Los círculos de color rojo representan un aumento de expresión para Daudi-CD6<sup>+</sup> y los círculos de color azul representan un aumento de expresión correspondientes para Daudi-ZsGreen<sup>+</sup>. Punto de corte: *p value corregido por FDR* < 0.1 y clasificados usando NES.

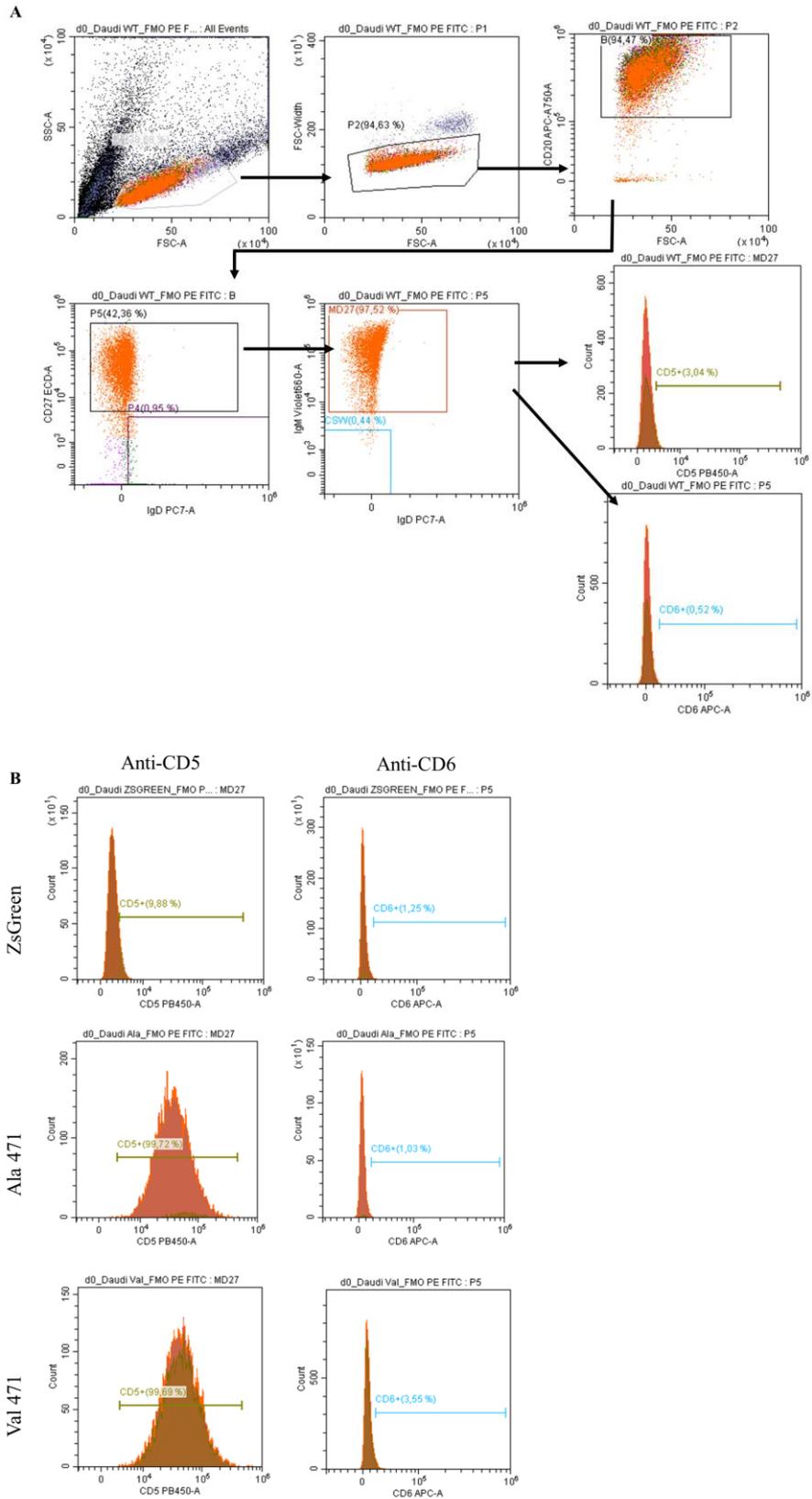
Los resultados de este análisis indicarían que la sola expresión de CD6 sería capaz de inducir cambios en el perfil de expresión génica de una línea celular B en condiciones basales. Más concretamente, induciría un aumento de la transcripción de genes relacionados con procesos anabólicos y de señalización celular.

## 7. Análisis del perfil transcriptómico resultante de la expresión de las isoformas Ala471 y Val471 de CD5 en células Daudi

Tal y como se ha mencionado anteriormente, estudios transcriptómicos previos han demostrado que la expresión de CD5 en células Daudi induce un fenotipo similar al de células B-1a y cambios en su perfil de expresión génica similares al que se observa en células de LLC (Gary-Gouy et al., 2002, 2007). Por otro lado, estudios previos de nuestro grupo han demostrado que las variantes resultantes del polimorfismo de *CD5* rs2229177 (introduce una sustitución de la Ala471 ancestral por Val en el dominio citoplasmático, justo a continuación del su motivo *ITAM-like*) tienen una diferente capacidad de señalización y, por tanto, de inhibición de la señal del TCR (la variante Ala471 tiene menor capacidad señalizadora y, en consecuencia, menor capacidad inhibidora de la señal del TCR que la variante Val471) (Carnero-Montoro et al., 2012). En línea con su posible

relevancia funcional, estas variantes de CD5 se comportan como factores pronósticos o modificadores de enfermedad en individuos afectados de enfermedades inflamatorias inmunomediadas (IMID) y neoplásicas (Cenit et al., 2014; Delgado et al., 2017; Potrony et al., 2016).

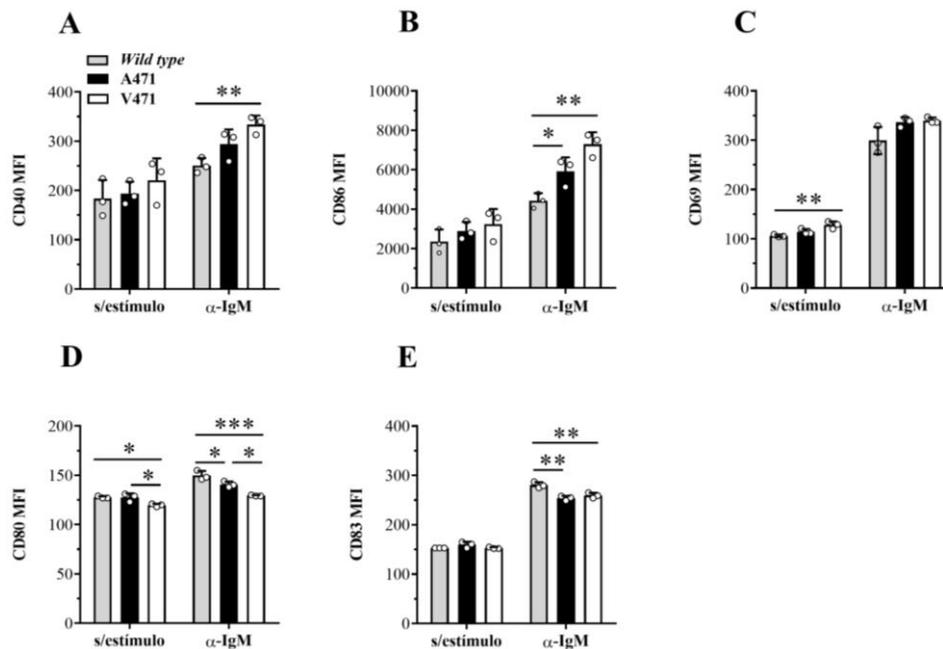
Con estos antecedentes se decidió analizar el impacto de la expresión de las variantes Ala471 y Val471 de CD5 humano sobre el perfil de expresión génica de la línea celular linfocitoide B Daudi. Mediante transducción lentiviral y posterior *cell sorting* se obtuvieron células Daudi que expresan establemente niveles elevados y equivalentes de las variantes Ala471 o Val471 de CD5. Tanto las células Daudi parentales (*wild-type*) como las transducidas con dichas variantes se fenotiparon para diferentes marcadores de linaje B (IgD, IgM, IgD, CD20, CD27, CD5 y CD6) y se pudo observar que todas ellas eran positivas para los marcadores CD20, CD27 e IgM y negativas para CD6 e IgD. En cuanto a la expresión de CD5, se observó que más del 99% de las líneas celulares transducidas con las variantes Ala471 y Val471 expresan CD5. Como era esperable, el fenotipado fue negativo para CD5 en las células Daudi parentales (*wild type*) y Daudi control transducidas con el mismo vector lentiviral de segunda generación (pLVX-puro) pero codificando para la proteína ZsGreen (**Figura R-31**).



**Figura R-31. Fenotipado de células Daudi parentales y transducidas lentiviralmente para la expresión de las variantes Ala471 y Val471 de CD5 y de la proteína control ZsGreen. (A) Estrategia usada para la selección (*gating*) de células Daudi parentales, que incluye los marcadores: CD27, IgD, IgM, CD20, IgD, CD5 y CD6 (B) Expresión de**

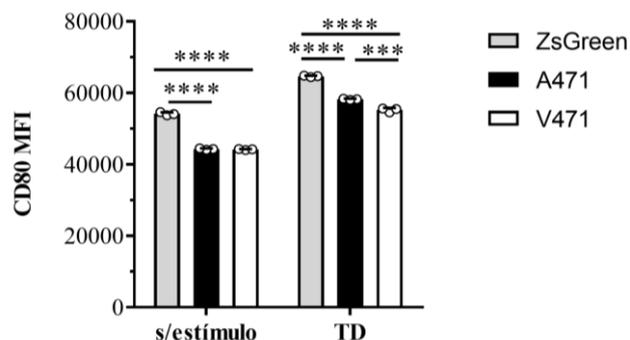
CD5 y CD6 en células Daudi transducidas con vectores lentivirales que codifican para la proteína ZsGreen y para las variantes Ala471 y Val471 de CD5.

Posteriormente, células Daudi parentales (*wild type*) y que expresan las isoformas Ala471 o Val471 de CD5 se cultivaron durante 24 h en presencia o ausencia de anti-human IgM F(ab')<sub>2</sub> para analizar la expresión de marcadores de activación (CD69, CD80, CD83 y CD86) mediante citometría de flujo post-estimulación vía BCR. En comparación a la situación basal (s/estímulo), la estimulación con anti-human IgM F(ab')<sub>2</sub> indujo aumentos de expresión para todos los marcadores analizados tanto células parentales como transducidas con las variantes de CD5 (**Figura R-32**). Post-estimulación con anti-human IgM F(ab')<sub>2</sub>, se observó que la expresión de CD40 y CD86 fue superior en células transducidas con variantes de CD5 que en las parentales, mientras que la de CD80 y CD83 fue inferior. La única diferencia significativa entre células transducidas con una u otra variante de CD5 fue para la expresión de CD80 post-estimulación.



**Figura R-32. Análisis de la expresión de marcadores de activación en células Daudi parentales y transducidas con las variantes Ala471 y Val471 de CD5.** Células Daudi parentales (*Wild type*) y transducidas con variantes Ala471 y Val471 de CD5, fueron cultivadas durante 24 h sin estímulo o con anti-IgM F(ab')<sub>2</sub> (10 µg/mL) y luego analizadas mediante citometría de flujo para la expresión de marcadores de activación CD40, CD86, CD69, CD80 y CD83. Se muestra la media ± SD del canal medio de intensidad de fluorescencia (MFI) de un experimento representativo (n=3) de dos realizados. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$  (análisis de varianza (ANOVA) de una vía y test de Tukey's de comparaciones múltiples).

Cuando se utilizó un estímulo de células B dependiente de células T (anti-Igs, CD40-L y anti-HA), también se observó la misma diferencia significativa de expresión de CD80 entre las variantes de CD5 (**Figura R-33**).

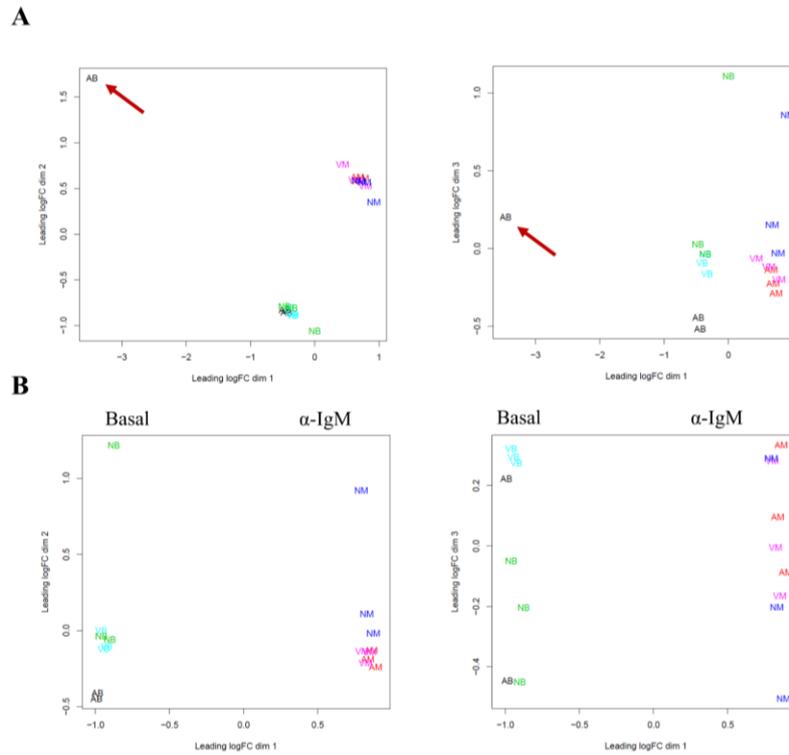


**Figura R-33. Análisis de la expresión de CD80 en células Daudi transducidas con ZsGreen y variantes Ala471 y Val471 de CD5.** Células Daudi transducidas con lentivirus codificantes para la proteína ZsGreen o las variantes Ala471 y Val471 de CD5, fueron cultivadas durante 24 h en presencia o ausencia de un estímulo T-dependiente (TD; 0.03  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  anti-Igs, 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  CD40-L y 5  $\text{ng}/\text{mL}$  anti-HA) y luego analizadas por citometría de flujo para la expresión del marcador CD80. Se muestra la media  $\pm$  SD del canal medio de fluorescencia (MFI) de un experimento representativo ( $n=3$ ) de dos realizados. \*\*\*,  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*,  $p < 0.0001$  (análisis de varianza (ANOVA) de una vía y test de Tukey's de comparaciones múltiples).

Este grupo de resultados sugieren que la expresión de las variantes de CD5 modularía la respuesta de las células B, como se deduce de la observación de diferentes niveles de expresión de marcadores de activación B post estimulación con anti-human IgM F(ab')<sub>2</sub>. Para validar esta idea y obtener información sobre los mecanismos moleculares subyacentes, se procedió a analizar el perfil transcriptómico de células Daudi parentales o transducidas con las variantes Ala 471 y Val 471 de CD5, cultivadas en ausencia o presencia de anti-human IgM F(ab')<sub>2</sub>. A tal efecto se extrajo ARN de triplicados técnicos de cada una de ellas y se sometió a secuenciación masiva (*RNA-seq*) para su posterior análisis bioinformático. En primer lugar, se realizó un análisis exploratorio de escalado multidimensional (MDS *plot*) de todas las muestras. Este análisis reveló un valor atípico que no se agrupaba con las muestras de su misma categoría, que correspondía a uno de los triplicados de la variante Ala471 en condición basal, posiblemente, como consecuencia de algún problema en la muestra que se tradujo en un sesgo en el mapeo de las lecturas de la secuenciación (**Figura R-34 A**). Luego de la secuenciación también se observaron diferencias, por ejemplo, en el porcentaje de lecturas que corresponden a regiones codificantes de proteínas y en el contenido de ARN

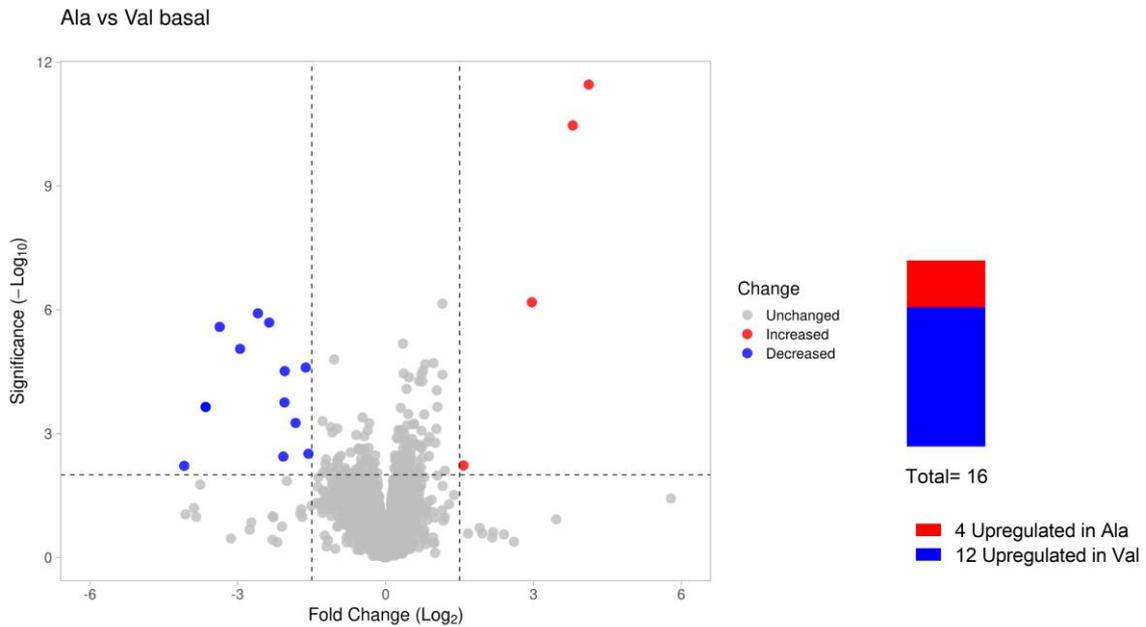
ribosomal (**datos no mostrados**). Por lo tanto, se decidió descartar este valor atípico y continuar los análisis sin él.

La Figura **R-34 B** muestra el MDS *plot* con la correlación de valores de las librerías de *RNA-seq* descartando el valor atípico y agrupando las muestras según su condición (basal o anti-human IgM F(ab')<sub>2</sub>).



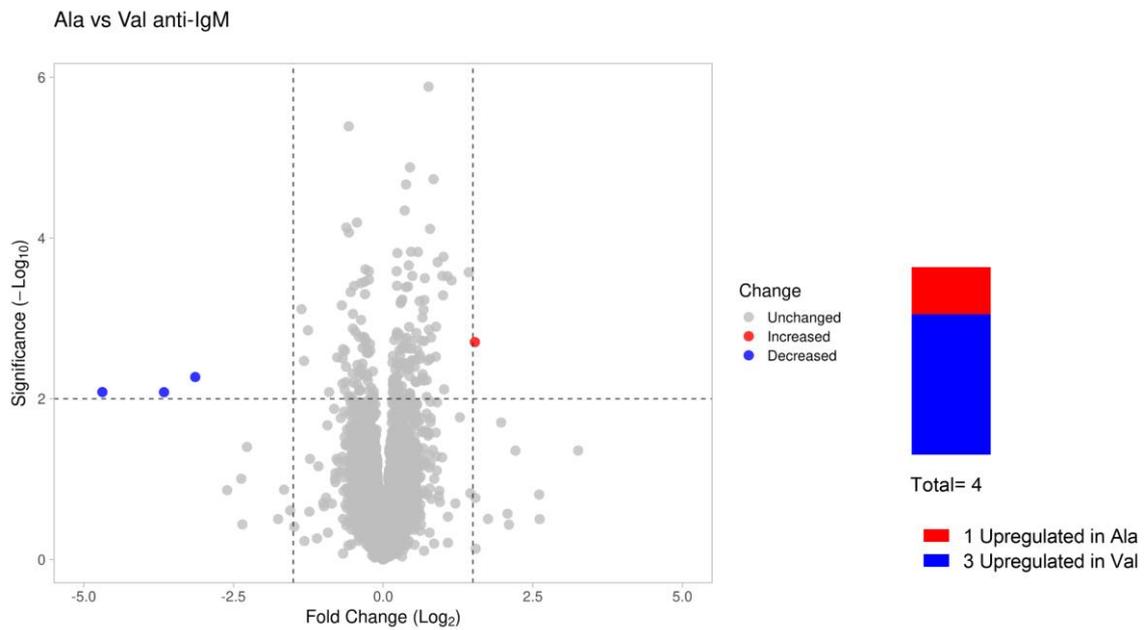
**Figura R-34. Análisis de escalado multidimensional (MDS *plot*) de muestras de RNA de células Daudi parentales (*wild type*) y transducidas con variantes de CD5 basado en los conteos crudos de genes del *RNA-seq*.** (A) Se representa un MDS *plot* con la correlación de valores de las librerías de *RNA-seq* considerando todas las muestras (3 réplicas técnicas), dim 1 y 2 (izquierda) y dim1 y dim3 (derecha). (B) Se representa un MDS *plot* con la correlación de valores de las librerías de *RNA-seq* sin el valor atípico, dim 1 y 2 (izquierda) y dim1 y dim3 (derecha). AB: variante Ala471 en condiciones basales; AM: variante Ala471 estimulada con anti-human IgM F(ab')<sub>2</sub>; VB: variante Val471 en condiciones basales; VM: variante Val471 estimulada con anti-human IgM F(ab')<sub>2</sub>; NB: células Daudi parentales (*wild type*) en condiciones basales; NM: *idem* estimulada con anti-human IgM F(ab')<sub>2</sub>. Las distancias corresponden a las diferencias en el coeficiente de variación biológica entre las muestras.

Los análisis de la expresión de genes diferencialmente expresados se determinaron con el método *lima-voom*. De los 12.440 genes identificados 4 fueron upregulados (FC > 1.5 y *p value* < 0.01) mientras que 12 fueron downregulados (FC < -1.5 y *p value* < 0.01) en células Daudi con la variante Ala 471 comparadas con las de la variante Val 471, ambas en condiciones basales (**Figura R-35**).



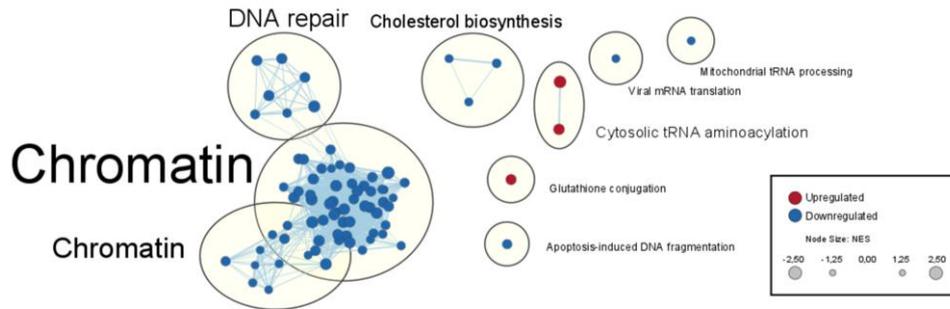
**Figura R-35. Análisis de genes diferencialmente expresados de células Daudi-CD5 Ala471 vs -CD5 Val471 en condiciones basales.** *Volcano plot* que representa la sumatoria de los genes diferencialmente expresados considerando un  $\log$  Fold change  $|FC| \geq 1.5$  y valor  $p$ -value  $a < 0.01$  (*limma model*). Los puntos de color rojo representan un aumento de expresión para la variante Ala471 de CD5 y los puntos de color azul representan un aumento de expresión correspondientes para la variante Val471 de CD5. El gráfico de barras muestra un total de 16 genes están diferencialmente expresados, de los cuales 4 están sobreexpresados por la variante Ala 471, mientras que 12 genes por la variante Val 471.

En el análisis de las mismas células estimuladas con anti-human IgM  $F(ab')_2$ , de los 12.440 genes identificados 1 fueron upregulados ( $FC > 1.5$  y  $p \text{ value} < 0.01$ ) mientras que 3 fueron downregulados ( $FC < -1.5$  y  $p \text{ value} < 0.01$ ) en las células Daudi con la variante Ala 471 comparadas con la variante Val 471 (**Figura R-36**).



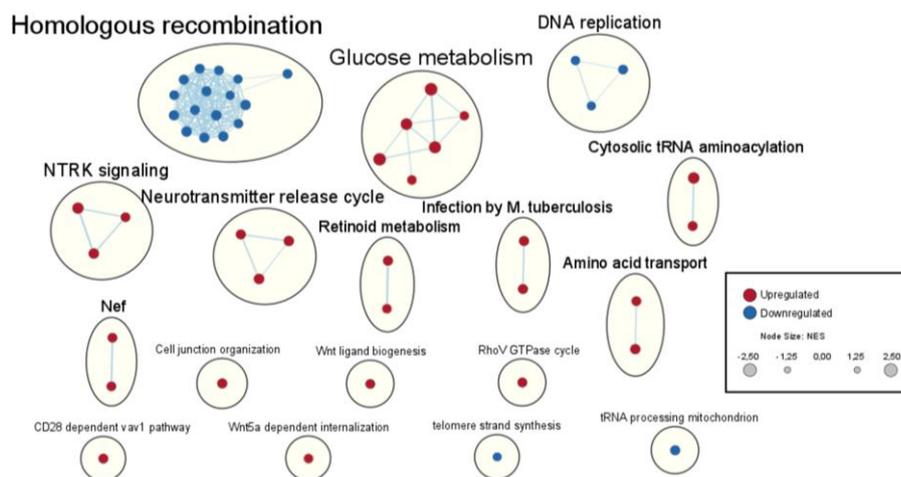
**Figura R-36. Análisis de genes diferencialmente expresados de células Daudi-CD5 Ala471 vs -CD5 Val471 estimuladas con anti-human IgM F(ab')<sub>2</sub>.** *Volcano plot* que representa la sumatoria de los genes diferencialmente expresados considerando un  $\log$  Fold change |FC| 1.5 y valor  $p$ -value  $a < 0.01$  (*limma model*). Los puntos de color rojo representan un aumento de expresión para la variante Ala471 de CD5 y los puntos de color azul representan un aumento de expresión correspondientes para la variante Val471 de CD5. El gráfico de barras muestra un total de 4 genes están diferencialmente expresados, de los cuales 1 están sobreexpresados por la variante Ala471, mientras que 3 genes por la variante Val471.

Posteriormente se realizó un análisis de enriquecimiento funcional por *gene set enrichment analysis* (GSEA) para procesos biológicos utilizando la base de datos *Reactome* y, con la finalidad de agruparlas por funciones similares, se realizó una representación de red con *Cytoscape* y la app *EnrichmentMap*. En la **Figura R-37** se muestran categorías que resultaron significativas para la comparación entre células Daudi-CD5 Ala471 y Val471 en condiciones basales. Se observó un total de 8 agrupaciones de procesos biológicos, siendo los principales los de cromatina, reparación de DNA y síntesis de colesterol. Estos conjuntos de vías funcionales se encuentran sobreexpresadas en células Daudi-CD5 Val471.



**Figura R-37.** Mapa comparativo de enriquecimiento funcional GSEA de células Daudi transducidas con variantes Ala471 y Val471 de CD5 y analizadas en condiciones basales. Representación de *Cytoscape* de las categorías que resultaron significativas entre la comparación de células Daudi-CD5 Ala471 y CD5 Val471 en condiciones basales. Cada círculo representa una vía de la base de datos *Reactome* de GSEA y las líneas representan la interconexión de las vías que comparten genes. El tamaño de los círculos depende de NES (*normalized enrichment score*). Los círculos de color rojo representan un aumento de expresión para la variante Ala471 de CD5 y los círculos de color azul representan un aumento de expresión correspondientes para Val471 de CD5. Punto de corte: *p value corregido por FDR* < 0.1 y clasificados usando NES.

En la **Figura R-38** se muestran categorías que resultaron significativas para la comparación entre células Daudi-CD5 Ala471 y Val471 estimuladas con anti-human IgM F(ab')<sub>2</sub>. Se observó un total de 17 agrupaciones de procesos biológicos, siendo los principales las de recombinación homóloga y del metabolismo de la glucosa. Las agrupaciones de recombinación homóloga, replicación del ADN, síntesis de telómeros, ARNt mitocondrial se encuentran sobreexpresadas en células Daudi-CD5 Val471, mientras que las agrupaciones de vías de señalización del metabolismo de la glucosa, transporte de aminoácidos, NTRK, neurotransmisor, retinoide, tuberculosis, ARNt, Nef, unión celular, Wnt, Rho, CD28 amino se encuentran sobreexpresadas en células Daudi-CD5 Ala471.



**Figura R-38.** Mapa comparativo de enriquecimiento funcional GSEA de células Daudi transducidas con variantes Ala471 y Val471 de CD5 y estimuladas con anti-human IgM F(ab')<sub>2</sub>. Representación de *Cytoscape* de las categorías que resultaron significativas para la comparación entre células Daudi Ala471 y Val471 estimuladas con anti-human IgM F(ab')<sub>2</sub>. Cada círculo representa una vía de la base de datos *Reactome* de GSEA y las líneas representan la interconexión de las vías que comparten genes. El tamaño de los círculos depende de NES (*normalized enrichment score*). Los círculos de color rojo representan un aumento de expresión para la variante Ala471 de CD5 y los círculos de color azul representan un aumento de expresión correspondientes para Val471. Punto de corte: *p value* corregido por *FDR* < 0.1 y clasificados usando NES.

Las células Daudi que expresan las variantes Ala471 o Val471 de CD5 presentaron diferencias relevantes en la expresión génica diferencial en función de la variante de CD5, lo que demuestra la importancia de una sustitución no sinónima en su dominio citoplasmático de CD5 y su impacto en la señalización celular. El resumen de los análisis de enriquecimiento funcional se muestra en la **Tabla R-1**.

En el caso de la variante Val471, en condiciones basales se observó un incremento de las vías que regulan la síntesis del colesterol y en condiciones con anti-human IgM F(ab')<sub>2</sub> se encuentran sobreexpresadas las vías de fragmentación del ADN, ARNt mitocondrial, ARNm viral, recombinación homóloga, replicación del ADN, síntesis de los telómeros y ARNt mitocondrial. Estos resultados se correlacionan con los anteriormente comunicados por Gary-Gouy et al., en donde la expresión de CD5 potenciaba las vías metabólicas de síntesis de colesterol y adipogénesis en comparación con las células que no expresaban este receptor (Gary-Gouy et al., 2007). Por otro lado, en la isoforma CD5-Ala471 en condiciones basales se observó una sobreexpresión de las vías de señalización relacionadas a la aminoacilación del ARNt y conjugación de glutatión, mientras que en condiciones de estimulación con anti-human IgM F(ab')<sub>2</sub> se

observó un incremento de las vías de señalización como NTRK, Wnt, Rho, Vav1, Nef, metabolismo de la glucosa y transporte de aminoácidos. Estos resultados se correlacionan con los anteriormente comunicados por Whitley KV et al., en donde la expresión de CD5 frenaba el metabolismo de la glucosa y el transporte y metabolismo de aminoácidos en linfocitos T (Whitley et al., 2022).

Los resultados de este análisis se resumen en la **Tabla R-1** y apoyarían la idea de que la expresión de distintas variantes de CD5 es capaz de inducir cambios diferenciales en el perfil de expresión génica en una línea celular linfoide B tanto en condiciones basales como durante la activación linfocitaria.

**Tabla R-1. Resumen del análisis transcriptómico comparativo aquí realizado en células Daudi transducidas variantes Ala471 y Val471 de CD5 y analizadas en condiciones basales o post estimulación con anti-human IgM F(ab')<sub>2</sub>.**

<b>Variante</b>	<b>Funcionalidad reportada</b>	<b>Resultados transcriptómicos</b>
<b>Ala</b>	Menor señalización vía CD5 Menor supresión	(b) aminoacilación del ARNt, conjugación de glutatión (IgM) Metabolismo de la glucosa, transporte de aminoácidos, NTRK, liberación de neurotransmisores, metabolismo de retinoides, infección por tuberculosis, aminoacilación del ARNt, unión celular y vías Nef, Wnt, Rho, CD28.
<b>Val</b>	Mayor señalización vía CD5 Mayor supresión	(b) Reparación del ADN, organización de la cromatina, síntesis del colesterol (IgM) Fragmentación del ADN, ARNt mitocondrial, ARNm viral Recombinación homóloga, replicación del ADN, síntesis de los telómeros, ARNt mitocondrial

Los resultados obtenidos en condición basal se señalan con (b), mientras que los obtenidos en condición de estimulación con anti-IgM con (IgM).

## **V. DISCUSIÓN**



### **1. Análisis las propiedades inmunomoduladoras de CD6 en condiciones de estimulación fisiológica antígeno-específica tanto *in vivo* e *in vitro*.**

*CD6*, al igual que su paralogo *CD5*, codifican glicoproteínas de membrana que se les atribuye un papel modulador relevante durante el proceso del desarrollo linfocitario en los órganos linfoides primarios (timo y médula ósea), así como de la activación linfocitaria, en respuesta al reconocimiento de antígenos en los órganos linfoides secundarios (ganglios linfáticos) y, por tanto, de las respuestas inmunitarias en general en contextos de infección, cáncer o autoinmunidad. En el caso de *CD5*, actualmente existe un consenso incuestionado sobre su papel modulador negativo en la activación linfocitaria que se caracteriza por atenuar las señales intracelulares generadas por el receptor clonotípico de las células T y B (TCR y BCR) (Burgueño-Bucio et al., 2019; Voisinne et al., 2018). Sin embargo, los primeros estudios funcionales de este receptor realizados con potentes activadores linfocitarios policlonales (AcMos contra receptores linfocitarios, lectinas mitogénicas, ésteres de forbol e ionóforos de calcio) abogaban un papel co-estimulador para *CD5* (Alberola-Ila et al., 1992; Ceuppens & Baroja, 1986; Ledbetter et al., 1985). Fue sólo a partir de la generación de ratones *knockout* para *CD5* (*Cd5<sup>-/-</sup>*) cuando se pudo dilucidar su papel de forma incuestionable, insospechado hasta ese momento, como co-receptor inhibidor (Bikah et al., 1996; Tarakhovsky et al., 1995).

En cuanto al receptor *CD6*, su función ha sido controversial durante largo tiempo, pero actualmente se le atribuye un papel regulador “dual” en la modulación de la activación linfocitaria, con características moduladoras positivas o negativas en función del sistema experimental utilizado (Gonçalves et al., 2018). La historia de los estudios sobre la función de *CD6* no difieren de la mencionada para *CD5* (Pinto & Carmo, 2013). En los primeros estudios fueron utilizados mismos activadores policlonales más arriba mencionados, que exhibían a *CD6* con una función co-estimuladora (Gangemi et al., 1989; Morimoto et al., 1988; Osorio et al., 1994; Osorio, Rottenberg, et al., 1998; Swack et al., 1991), aunque posteriores estudios empezaban a aportar evidencias en sentido contrario, es decir, como potencial regulador negativo (inhibidor) (Oliveira et al., 2012; Orta-Mascaró et al., 2016). Nuevamente, fue la disponibilidad de ratones *knockout* para *CD6* (*Cd6<sup>-/-</sup>*) la que aportó evidencias adicionales en favor de su papel como co-receptor inhibidor (Y. Li et al., 2017; Orta-Mascaró et al., 2016). No obstante, un estudio reciente

sobre la composición del signalosoma de CD6, refuerza su papel como receptor “dual” al identificar su asociación tanto con moléculas efectoras intracelulares amplificadoras de la señal liberada por el receptor clonotípico, como de moléculas atenuadoras de dicha señal (Mori et al., 2021).

Todos estos esfuerzos por dilucidar la función señalizadora de CD6 se han hecho con sistemas experimentales, principalmente *in vitro*, que implican la estimulación con potentes activadores policlonales de los linfocitos T. Nos referimos a la utilización de AcMos contra una o varias moléculas linfocitarias (TCR/CD3, CD2, CD4, CD28) en presencia o ausencia de agentes co-estimuladores adicionales como lectinas, ésteres de forbol, ionóforos o citocinas (Zimmerman et al., 2006). Todos ellos conllevan una estimulación supra-fisiológica de los linfocitos, que difiere (tanto en intensidad como duración) de la generada como consecuencia del reconocimiento específico de antígenos (complejos MHC-péptido) por parte del TCR y que, por tanto, podría enmascarar o distorsionar el papel modulador fisiológico de co-receptores linfocitarios como CD6.

Con esta premisa, se decidió reevaluar el análisis de la función moduladora de CD6 utilizando distintos sistemas experimentales *in vitro* e *in vivo*, que tienen en común la estimulación fisiológica de los linfocitos T inducida por un antígeno específico. A tal efecto utilizamos el modelo de ratones transgénicos OT-II que se caracteriza por la presencia de linfocitos T CD4<sup>+</sup> con un TCR $\alpha\beta$  específico para un péptido de ovoalbúmina (OVA<sub>323-339</sub>) presentado en el contexto de MHC clase II (I-A<sup>b</sup>) (Barnden et al., 1998). Sin embargo, reconocemos que este modelo es una “aproximación” experimental a la situación fisiológica, dado que los ratones OT-II tienen una ratio CD4<sup>+</sup>:CD8<sup>+</sup> y una frecuencia de células T específicas de antígeno mucho mayor que en condiciones normales (en individuos no inmunizados cerca de un <0.001% después de la vacunación es aproximadamente un 0.01% de células T, dependiendo de la inmunodominancia del epítipo evaluado) (Leung et al., 2013). A pesar de eso, los ratones OT-II han demostrado su utilidad para estudiar, especialmente *in vivo*, muchos aspectos de la fisiología de las células T, como son la interacción TCR-ligando, la activación celular T, la selección tímica, la presentación cruzada de antígenos y la inducción de tolerancia T central y periférica (Leung et al., 2013).

En nuestro caso generamos una nueva línea de ratones OT-II deficientes para la expresión de CD6 (OT-II *Cd6*<sup>-/-</sup>), con la finalidad de analizar comparativamente con

ratones OT-II *wild type* (OT-II *Cd6<sup>+/+</sup>*) en sistemas experimentales *in vitro* e *in vivo* ampliamente utilizados en investigación inmunológica. Los estudios *in vitro* incluyeron, por un lado, la estimulación *ex vivo* de suspensiones de esplenocitos totales con OVA y, por otro, la formación de conjugados de células T-APC (concretamente de células T CD4<sup>+</sup> y células dendríticas maduras derivadas de médula ósea) específicos de OVA para, en ambos casos, analizar parámetros tempranos y tardíos de la activación linfocitaria. Los estudios de validación *in vivo* consistieron en la inducción de un modelo de hipersensibilidad retardada (DTH) inducido por OVA.

### **Modelo *in vitro* de estimulación de esplenocitos totales**

El modelo de estimulación *ex vivo* de esplenocitos totales con antígeno OVA permite estudiar la respuesta de células T CD4<sup>+</sup> antígeno-específicas bajo las influencias de un entorno celular complejo y similar al que existe en los órganos linfoides secundarios, que incluye la presencia de diferentes tipos y subtipos celulares T, B, NK, Mφ y DCs. Los resultados obtenidos en este modelo experimental indican que el reconocimiento específico de OVA por células T CD4<sup>+</sup> OT-II *Cd6<sup>-/-</sup>* induce la expresión de niveles más elevados de marcadores tempranos de activación linfocitaria T (CD25<sup>+</sup> y CD69<sup>+</sup>) que en las OT-II *Cd6<sup>+/+</sup>*. En esta misma línea, las células T CD4<sup>+</sup> OT-II *Cd6<sup>-/-</sup>* mostraron una mayor proliferación celular y producción de citocinas (IL-2 e IFN-γ) inducida por OVA que las OT-II *Cd6<sup>+/+</sup>*. Por otro lado, las células T CD4<sup>+</sup> OT-II *Cd6<sup>-/-</sup>* también mostraron la inducción de niveles más elevados de ARNm de marcadores más tardíos de activación linfocitaria T como son Fas, FasL y PD-1, que se relacionan con fenómenos de AICD. A pesar de esto último, no se observaron diferencias significativas a nivel de apoptosis entre las células T CD4<sup>+</sup> activadas de ratones OT-II *Cd6<sup>-/-</sup>* y OT-II *Cd6<sup>+/+</sup>*. Todos estos hallazgos serían indicativos de una sobreactivación linfocitaria como consecuencia de la expresión deficiente de CD6 y, por tanto, compatible con una función señalizadora negativa (inhibitoria) de CD6, de acuerdo con datos previos publicados en ratones *Cd6<sup>-/-</sup>* convencionales con diferentes fondos genéticos (C57BL/6 y DBA/1) (Y. Li et al., 2017; Orta-Mascaró et al., 2016). No obstante, dicha sobreactivación sería de una intensidad insuficiente como para inducir una susceptibilidad aumentada a la apoptosis (AICD), a diferencia de lo reportado en el caso de la deficiencia de CD5 (Burgueño-Bucio et al., 2019; Tabbekh et al., 2013). Este dato es importante dado que

explicaría por qué ratones  $Cd5^{-/-}$  presentan fenotipos atenuados cuando se les induce procesos autoinmunitarios experimentales *in vivo* (p.ej., colitis inducida por DSS o EAE) a pesar de generar linfocitos hiper-autorreactivos, pero también más propensos a fenómenos de AICD (Axtell et al., 2004; Dasu et al., 2008).

La ausencia de diferencias a nivel de apoptosis en respuesta a la estimulación con OVA (o AcMo anti-CD3) de células T  $CD4^{+}$  OT-II  $Cd6^{-/-}$  y OT-II  $Cd6^{+/+}$  diferiría también de lo reportado en linfocitos T de ratones  $Cd6^{-/-}$  DBA/1 estimulados con combinaciones de AcMos anti-CD3 y anti-CD28 (Y. Li et al., 2017). En estas condiciones las células T de ratones  $Cd6^{-/-}$  expresan niveles más elevados de marcadores de activación linfocitaria (CD25 y CD69) y de apoptosis (Anexina V) pero menores de proliferación celular (incorporación de BrdU) que las de ratones  $Cd6^{+/+}$ . Nuestra interpretación es que condiciones supra-fisiológicas de estimulación inducen fenómenos de AICD que no se observan cuando se utiliza la estimulación con antígenos específicos y, por tanto, condiciones más próximas a las fisiológicas.

### **Modelo de hipersensibilidad retardada inducida por OVA**

Con la finalidad de validar *in vivo* los resultados obtenidos en los ensayos de estimulación *in vitro* de esplenocitos de ratones OT-II  $Cd6^{-/-}$  y OT-II  $Cd6^{+/+}$  con OVA se estudió la respuesta de éstos frente a un modelo de hipersensibilidad retardada (DTH) inducida por OVA (Szczepanik et al., 2003). Este modelo se caracteriza por una primera fase de sensibilización al antígeno (OVA) en la que se generan y expanden células T  $CD4^{+}$  específicas productoras de citocinas proinflamatorias tipo Th1 (p.ej., IFN- $\gamma$ ) tanto efectoras como memoria, que quedan disponibles para un futuro encuentro con el mismo antígeno (Fong & Mosmann, 1989; Szczepanik et al., 2003). En caso de reexposición al antígeno, células Th1 específicas generadas durante ese primer encuentro se reactivan y producen una reacción inflamatoria en el sitio de entrada en un plazo de 24-72 h, caracterizada por una gran infiltración de células mononucleares, con predominio de induración sobre el edema (Kumar et al., 2021).

Es importante señalar que el modelo de DTH utilizado implica la inmunización de los animales por vía intradérmica (*i.d.*) con el antígeno en solución salina y en ausencia de adyuvantes. De esta forma se pretendió evitar efectos inespecíficos producidos por los

adyuvantes que podrían complicar la interpretación de los resultados más allá de la respuesta estrictamente antígeno específica. En estas condiciones de ausencia de adyuvancia se observó que los ratones OT-II *Cd6<sup>-/-</sup>* presentan una forma exacerbada de DTH inducida por OVA en comparación con los OT-II *Cd6<sup>+/+</sup>*. Entre los hallazgos que avalan esta afirmación se encuentra el mayor grosor de las orejas en los ratones OT-II *Cd6<sup>-/-</sup>* asociado un mayor edema e infiltración celular. Este tipo de fenómenos se atribuye a un aumento de permeabilidad vascular local y de la activación endotelial con expresión aumentada de moléculas de adhesión endotelial como ICAM-1 y VCAM-1 que favorece el reclutamiento de células T (Kops et al., 1984; McHale et al., 1999). Por otro lado, el análisis de los ganglios drenantes locorreregionales permitió evidenciar un aumento de la expresión de genes de citocinas y factores de transcripción de tipo Th1 de los ratones OT-II *Cd6<sup>-/-</sup>*, lo que fue confirmado por estudios de inmunohistoquímica que evidenciaron una mayor expresión de IFN- $\gamma$ , así como de IL-22. Finalmente, la re-estimulación *ex vivo* con OVA de células T CD4<sup>+</sup> de bazo de ratones OT-II *Cd6<sup>-/-</sup>* previamente sometidos al modelo de DTH, permitió confirmar nuevamente una respuesta proliferativa mayor que la de ratones OT-II *Cd6<sup>+/+</sup>*.

Este grupo de resultados *in vivo* estaría de acuerdo con nuestras observaciones *in vitro* que apoyan una función moduladora negativa de CD6 de la activación de antígeno-específica de células T CD4<sup>+</sup>. Por el contrario, estaría en aparente desacuerdo con los resultados obtenidos en modelos experimentales de autoinmunidad con ratones *Cd6<sup>-/-</sup>* en fondo DBA/1, los cuales presentan formas atenuadas de encefalitis (EAE, *Experimental Autoimmune Encephalitis*), uveítis (EAU, *Experimental Autoimmune Uveitis*) o artritis (CIA, *Collagen-Induced Arthritis*) autoinmunitarias (Y. Li et al., 2017, 2020; L. Zhang et al., 2018). La inducción de estos modelos experimentales de autoinmunidad se caracteriza por la combinación de autoantígenos con potentes adyuvantes como el adyuvante completo e incompleto de Freund (CFA e IFA, respectivamente) y de productos microbianos como *M. tuberculosis*. Esto podría conllevar un entorno apropiado para desencadenar una potente activación (supra-óptima) de los linfocitos autorreactivos que, en ausencia de las señales inhibitorias de CD6, conduciría a apoptosis por exceso de activación (AICD) y, por tanto, a formas atenuadas de enfermedad experimental. Esta situación de AICD no tendría lugar durante la estimulación (*in vitro* e *in vivo*) en condiciones similares a lo fisiológico, como sucede durante el reconocimiento de OVA

en ausencia de adyuvancia y explicaría la forma exacerbada de DTH por OVA en los ratones OT-II *Cd6<sup>-/-</sup>* en fondo C57BL/6.

Cabe mencionar que cuando se utilizan ratones C57BL/6 deficientes para CD6 que no expresan TCR transgénicos (*Cd6<sup>-/-</sup>*) se observan fenotipos exacerbados o atenuados en función del modelo de autoinmunidad experimental utilizado (CIA y EAE, respectivamente) (Y. Li et al., 2017; Orta-Mascaró et al., 2016). Como se ha mencionado anteriormente, estos modelos de autoinmunidad (CIA y EAE) se inducen mediante la exposición a autoantígenos (colágeno y mielina) en presencia de potentes agentes adyuvantes (CFA/IFA y *M. tuberculosis*) que pueden resultar en una mayor o menor activación linfocitaria en función tanto del antígeno como de las características genéticas de la cepa de ratones utilizados, así como de los mecanismos patogénicos específicos de cada modelo experimental. Por tanto, nos encontramos en una situación compleja en la que la deficiencia de CD6 y, consecuentemente, su función inhibidora o atenuadora de la activación linfocitaria puede resultar en distintos fenotipos experimentales *in vivo* en función las condiciones experimentales que acabamos de mencionar. Por otro lado, la deficiencia de CD6 (tanto en ratones *Cd6<sup>-/-</sup>* como OT-II *Cd6<sup>-/-</sup>*) lleva asociada cambios cuantitativos y cualitativos de ciertas subpoblaciones linfocitarias funcionalmente relevantes ( $T_{reg}$ ,  $CD4^+T_{EM}$ ,  $CD8^+T_{CM}$ , B-1a, MZB) (Català, Velasco-de Andrés, Casadó-Llombart, et al., 2022; Orta-Mascaró et al., 2016) que pueden jugar un papel inductor o regulador más o menos relevante en la etiopatogenia de cada modelo experimental dando lugar a fenotipos atenuados o exacerbados en función de ello.

### **Modelo de estimulación *in vitro* de conjugados T-APC**

Los resultados *in vitro* e *in vivo* obtenidos durante el estudio de ratones OT-II *Cd6*<sup>-/-</sup> abogan por una función moduladora negativa (inhibidora o atenuadora) de las señales generadas por el reconocimiento específico de antígenos. No obstante, estos resultados estarían en contradicción con los obtenidos en estudios de formación de conjugados T-APC publicados por distintos grupos (Gimferrer et al., 2004; Hassan et al., 2004; Zimmerman et al., 2006). En estos estudios se demostraba que el bloqueo de la interacción de CD6 con su ligando CD166/ALCAM mediante AcMos (anti-CD6 o anti-ALCAM) o proteínas recombinantes solubles (shCD6, CD6-Fc, ALCAM-Fc) inhibe la formación efectiva y la maduración de la IS, así como las respuestas linfoproliferativas subsiguientes, de lo cual se deduciría que CD6 tendría una función moduladora positiva (potenciadora) de la activación linfocitaria. Cabe señalar que en estos estudios con conjugados T-APC se ponen en contacto linfocitos T (CD4<sup>+</sup> primarias o líneas linfoblastoides T; ambas CD6<sup>+</sup>) con células presentadoras de antígeno (DCs primarias maduras o líneas linfoblastoides B; ambas MHC clase II<sup>+</sup> y ALCAM<sup>+</sup>) en presencia de superantígenos (*Staphylococcus enterotoxin B*, SEB) que desencadenaría una muy potente (supra-fisiológica) activación linfocitaria T policlonal, de características cualitativa y cuantitativamente diferentes a la inducida durante el reconocimiento específico de antígenos.

En base a todo ello se incluyeron estudios de conjugados T-APC en condiciones de estimulación antígeno específica, para lo cual se co-cultivaron células T CD4<sup>+</sup> de ratones OT-II *Cd6*<sup>-/-</sup> o OT-II *Cd6*<sup>+/+</sup> y células DCs derivadas de médula ósea (BMDCs) maduras y cargadas con OVA. En caso de haber reconocimiento específico del antígeno por el complejo TCR/CD3, además de formarse una IS madura (identificable por la translocación del MTOC a la zona de contacto T-APC) se producen señales intracelulares y respuestas proliferativas que dependen de la afinidad del TCR por el antígeno presentado y del balance entre las moléculas accesorias co-estimuladoras e -inhibidoras (Lanzavecchia & Sallusto, 2001).

De acuerdo con datos previos publicados, el receptor CD6 se acumula en la zona central de la IS (cSMAC) y está asociado físicamente con el complejo TCR/CD3 (Gimferrer et al., 2004; Zimmerman et al., 2006). De la misma forma, nuestros resultados demostraron que la traslocación del MTOC a la proximidad de la IS se ve significativamente disminuida en células T CD4<sup>+</sup> OT-II *Cd6*<sup>-/-</sup>, apoyando la idea de que la interacción de CD6 con su ligando CD166/ALCAM es importante para la correcta formación y maduración de la IS. Esta afirmación se confirmó al añadir la proteína CD6 soluble (shCD6) la que disminuyó significativamente la traslocación del MTOC en los conjugados con células T CD4<sup>+</sup> OT-II *Cd6*<sup>+/+</sup>. Esto situaría a este receptor en una posición óptima para modular la señalización y participar en los procesos de activación celular.

Por otro lado, el análisis por *Western blot* de eventos tempranos resultantes de la formación de conjugados T-APC específicos para OVA, mostró una tendencia a una menor fosforilación de moléculas importantes en la propagación de señales intracelulares de activación como son CD3 $\zeta$  (Y<sup>83</sup>), PLC $\gamma$  (Y<sup>783</sup>) y ERK 1/2 (T<sup>202</sup>/Y<sup>204</sup>) en el caso de células T CD4<sup>+</sup> OT-II *Cd6*<sup>-/-</sup>. Esto indicaría que CD6 contribuye a la formación de complejos moleculares que amplifican las señales del complejo TCR/CD3 reclutando moléculas activadoras (p.ej., SLP-76) y, por tanto, tendría una función moduladora positiva (amplificadora) de la activación linfocitaria. Nuevamente, esta afirmación estaría avalada por los datos de menor expresión de marcadores de membrana de activación linfocitaria (CD25 y CD69), así como de una menor proliferación observada en los conjugados con células T CD4<sup>+</sup> OT-II *Cd6*<sup>-/-</sup>.

En resumen, los resultados obtenidos con conjugados T-APC antígeno (OVA)-específicos estarían de acuerdo con estudios previos de diferentes grupos en los que se utilizaron superantígenos (p. ej., enterotoxina estafilocócica B (SEB)) como agentes inductores de dichos conjugados. En ambas condiciones experimentales (antígeno y superantígeno), CD6 aportaría, por un lado, contactos adhesivos que favorecerían la formación y maduración de la IS y, por otro, señales adicionales que amplificarían las señales activadoras generadas por el receptor clonotípico y sus moléculas asociadas (complejo TCR/CD3).

### **CD6: ¿un receptor con propiedades funcionales duales?**

Las respuestas inmunitarias requieren una coordinación perfecta de todas las células y moléculas que participan en las diferentes fases. Los linfocitos T son importantes protagonistas en la inducción y regulación de las respuestas inmunitarias (Hernández, 2009). El grado de expansión clonal y la respuesta efectora de las células T es en gran medida proporcional a la dosis y la intensidad de la señal generada por el reconocimiento del antígeno. Este escalado de la respuesta se logra mediante la integración temporal de la señalización del TCR y de moléculas accesorias con función reguladora reclutadas durante la presentación antigénica (Mayya & Dustin, 2016). Una respuesta subóptima de las células T, ya sea en la expansión clonal o en la expresión de moléculas efectoras, puede dar lugar, por ejemplo, a una infección crónica o a escape tumoral (Tschärke et al., 2015). Por el contrario, una respuesta exagerada, especialmente la expansión clonal, puede causar un daño tisular excesivo y potencialmente iniciar reacciones autoinmunitarias (Enouz et al., 2012).

En la presente Tesis hemos utilizado diferentes modelos experimentales *in vitro* e *in vivo* de estudio de la respuesta inmunitaria frente a un mismo antígeno específico (OVA) para así analizar el papel funcional (regulador positivo o negativo) del receptor CD6. Por lo tanto, no podemos atribuir a este importante factor (la señal generada por el reconocimiento del antígeno) las diferencias observadas entre los distintos modelos analizados. La potenciación o atenuación de la respuesta linfocitaria antígeno-específica por parte de CD6 dependería de otros factores, no menos importantes, como podrían ser el tipo y estado funcional de las células que intervienen directamente la presentación y el reconocimiento antigénico, así como de factores dependientes del microambiente en el que esos acontecimientos tienen lugar.

Es evidente que existen claras diferencias cuantitativas y cualitativas a nivel de las interacciones celulares y moleculares establecidas entre las APCs y los linfocitos en los sistemas experimentales utilizados. Así, los estudios de estimulación antígeno-específica *in vitro* con suspensiones de esplenocitos totales implican la utilización de un sistema celular que imita en gran medida la complejidad del microambiente de los órganos linfoides secundarios – el lugar por excelencia especializado en la puesta en

marcha de las respuestas inmunitarias. En dichas suspensiones existen diferentes tipos de células presentadoras (M $\phi$ , DCs, B) y respondedoras (Th, Tc, T<sub>reg</sub>) que poseen diferentes estados de maduración y activación funcional y que influyen y reciben las influencias de otras células linfoides (NK, NKT, T $\gamma$ ), mieloides (PMN, Mastocitos) y estromales (fibroblastos) también presentes y que aportan factores solubles o contactos celulares adicionales. En estas condiciones experimentales, observamos que la introducción del antígeno (OVA) hace que las células T CD4<sup>+</sup> específicas reciban señales de activación que se ven atenuadas en presencia de CD6. Existiría la posibilidad de que la integración de todas las señales que reciben las células T CD4<sup>+</sup> en este escenario daría lugar a la formación de complejos multimoleculares que favorecerían la interacción preferente de CD6 con moléculas inhibitoras (UBASH3A, SHIP1) dando como resultado la atenuación neta de la respuesta de activación linfocitaria. Esta atenuación sería ventajosa dado que permitiría poner en marcha la respuesta linfocitaria sin que se induzcan fenómenos de AICD que limitarían la duración y la eficacia de la misma.

Por otro lado, los estudios de estimulación antígeno-específica *in vitro* con conjugados T-APC implican la utilización de un sistema celular reduccionista y descontextualizado que no remeda adecuadamente la complejidad del microambiente de los órganos linfoides secundarios. En este escenario, la integración de las señales que reciben las células T CD4<sup>+</sup> purificadas por parte de BMDCs maduras generadas *in vitro* daría lugar a la formación de complejos multimoleculares que favorecerían la interacción preferente de CD6 con moléculas activadoras (SLP-76, ZAP-70, VAV1), dando como resultado neto la potenciación de la respuesta de activación linfocitaria. Dicho de otro modo, los linfocitos que expresan CD6 tienen una ventaja en las interacciones TCR/CD3-pMHC sobre los deficientes en CD6, favoreciendo la formación de la IS y los fenómenos de activación linfocitaria subsiguientes. Este escenario sería similar al observado en estudios también reduccionistas de conjugados T-APC utilizando líneas linfoblastoides T (Jurkat) y B (Raji), respectivamente, en presencia de superantígenos (SEB) (Gimferrer et al., 2004; Zimmerman et al., 2006).

La interpretación y conciliación que acabamos de hacer de los resultados obtenidos está basada en los estudios de la composición del signalosoma de CD6, según los cuales CD6 se comportaría como un receptor multifuncional que, además de proporcionar contactos adhesivos facilitadores de la formación de la IS, puede reclutar y

enriquecer en moléculas atenuadoras o amplificadoras, según las circunstancias, a los complejos multimoleculares que se generan durante el reconocimiento antigénico. No obstante, aceptando como correcta la interpretación hecha de los resultados obtenidos en cada sistema experimental, quedaría por dilucidar cuál de los dos escenarios se aproximaría más a la situación fisiológica y permitiría asignar definitivamente a CD6 un papel modulador positivo o negativo de la activación linfocitaria. A este respecto, consideramos que tienen un importante peso específico los resultados obtenidos en el modelo *in vivo* de DTH inducido por OVA en ausencia de adyuvancia alguna. Estos resultados permitirían desequilibrar la balanza en favor de una función de CD6 netamente moduladora negativa de la respuesta inmunitaria. Esta afirmación también vendría avalada por estudios experimentales *in vivo* en los que la administración de un AcMo murino anti-CD6 humano (UMCD6) a ratones “humanizados” para CD6 (manipulados genéticamente para que sus linfocitos expresen CD6 humano en lugar de murino) conduce una atenuación de procesos experimentales de base autoinmunitaria como son EAE, UEA o CIA (Y. Li et al., 2017, 2020; L. Zhang et al., 2018). La base molecular que explicaría dicha atenuación sería la internalización de la molécula CD6 por parte del AcMo UMCD6, lo que privaría a los linfocitos patogénicos autorreactivos de la función moduladora negativa de CD6 y, por tanto, a la inducción de fenómenos de AICD.

A diferencia de lo que ocurre con CD5, las funciones de señalización de CD6 también dependen de su ectodominio, de forma que CD6 actuaría como un transductor que conecta estímulos extracelulares con respuestas intracelulares. El principal ligando conocido de CD6 es CD166/ALCAM, el cual está ampliamente expresado en diferentes tipos celulares incluyendo APCs (M. A. Bowen et al., 1995). Su presencia y niveles de expresión en cada modelo experimental son esperables que modulen la activación linfocitaria. Esto también aplicaría, en mayor o menor medida, a otros ligandos de CD6 como son Gal-1 y -3 que tienen una amplia distribución tisular y, por tanto, también estarían presentes en los sistemas experimentales *in vitro* aquí utilizados. Así, por ejemplo, Gal-1, se expresa en timo (Perillo et al., 1995), células T y B activadas (Zuñiga et al., 2001) y células T<sub>reg</sub> (Garín et al., 2007). Asimismo, las células DCs derivadas de monocitos (moDC, del inglés *Monocyte-Derived Dendritic Cells*) expresan Gal-1, Gal-3 y Gal-9 (de La Fuente et al., 2012). Se sabe que la presencia y niveles de galectinas regulan las respuestas linfocitarias. En concreto, Gal-1 producida por células B activadas induce la apoptosis de células T, pero no de células B, constituyendo un posible

mecanismo por el que las células B pueden regular la función y la supervivencia de las células T (Zuñiga et al., 2001). Las células T<sub>reg</sub> también expresan Gal-1 cuando se activan y el bloqueo de Gal-1 reduce significativamente los efectos inhibidores de las células T<sub>reg</sub> humanas y de ratón (Garín et al., 2007). En el caso de las DCs se ha visto que la disminución de expresión de Gal-1, contribuye a la exacerbación de respuestas efectoras Th1/Th17 (de La Fuente et al., 2012). Todo ello sugiere la presencia y los niveles de galectinas pueden condicionar los fenómenos de activación observados en los distintos modelos experimentales. Las galectinas interactúan con carbohidratos presentes en múltiples glicoproteínas de membrana linfocitaria T (CD3, CD7, CD43, CD45, etc.) incluido CD6 (Escoda-Ferran et al., 2014). Gracias a su estructura dimérica (Gal-1) o multimérica (Gal-3), pueden entrecruzarlas y formar complejos multiméricos de señalización intracelular que modulan la activación linfocitaria en sentido positivo (activación) o negativo (apoptosis) (Jin et al., 2021). En el caso específico de CD6, Gal-1 y Gal-3 interfieren las interacciones adhesivas mediadas por la pareja CD6-CD166/ALCAM y la expresión de CD6 interfiere la apoptosis inducida por ambas galectinas en linfocitos T activados (Escoda-Ferran et al., 2014). Por todo ello, es importante considerar la contribución de las interacciones mediadas por galectinas u otras proteínas reguladoras presentes en el microambiente celular a la hora de abordar el papel funcional de CD6 en distintos modelos experimentales *in vitro* e *in vivo* de activación linfocitaria.

Aunque nadie duda de la utilidad de los estudios *in vitro* para analizar las respuestas inmunitarias específicas, esto no es impedimento para que los estudios *in vivo* validen o no sus resultados. Las múltiples variables que pueden influir en la percepción de la señal de reconocimiento antigénico *in vivo* pueden conducir a que las respuestas finalmente se atenúen o exacerben, independientemente de la magnitud intrínseca de dicha señal (Corse et al., 2011). Por otro lado, entender el comportamiento de los linfocitos T como células interdependientes y que actúan según interacciones a nivel poblacional, puede ofrecer valiosas pistas para entender su funcionamiento en diferentes contextos *in vivo* (infecciosos, autoinmunitarios o tumorales). El control de la activación, expansión y diferenciación de las células inmunitarias está determinado principalmente por la competencia por factores tróficos de supervivencia y de otros factores limitantes. Sin embargo, los beneficios de las interacciones y funciones de forma cooperativa pueden

a menudo superar los beneficios de cada célula que actúa de forma autónoma (Amado et al., 2013; Doğaner et al., 2016; Uhl & Gérard, 2020; Zenke et al., 2020).

No está claro si las células T actúan independientemente unas de otras o incluso de otros tipos celulares o si sus comportamientos están coordinados. En la actualidad la comprensión de la regulación de las respuestas de las células T se centra en gran medida en los mecanismos extrínsecos a la población de células T convencionales. Por ejemplo, las señales proporcionadas por las DCs y las células T<sub>reg</sub>, las cuales son capaces de estimular y restringir, respectivamente, las células T convencionales. Existirían también mecanismos intrínsecos por los que los miembros de una población se controlan mutuamente y la fuerza de las señales reguladoras aumenta con el tamaño de la población. Es importante destacar que la regulación intrínseca y extrínseca de la población no se excluye mutuamente. Esto significa que una capa de regulación intrínseca a las células T convencionales podría integrar las señales extrínsecas proporcionadas por las DCs y las células T<sub>reg</sub> (Zenke et al., 2020). Se ha denominado “*quorum*” al concepto por el que las células pueden percibir mutuamente y ajustar su comportamiento en consecuencia (Waters & Bassler, 2005). De esta forma, las células regulan su comportamiento en función de la abundancia celular, la densidad y el estado de activación, permitiendo a la población actuar como una entidad multicelular. La regulación del *quorum* programa la dinámica de la población a pesar de la heterogeneidad de las células individuales y, de hecho, integra esta variabilidad como un componente esencial del control de la población ya que un comportamiento idéntico de todas las células llevaría a la extinción de la población en el momento en que la tasa de muerte superara la tasa de división (You et al., 2004). Según el concepto de “*quorum*”, se formarían nichos donde las células experimentan condiciones similares y existe comunicación intercelular, como de retroalimentación a través de receptores que regulan la dinámica de expansión clonal. En el caso de las células T CD4<sup>+</sup>, los mecanismos de control de la población aún están difusamente definidos. No obstante, el estudio de células T CD8<sup>+</sup> activadas y sus interacciones con múltiples tipos celulares ha permitido caracterizar dos circuitos retroalimentación antagónicos, en donde la co-estimulación de estas células T comenzó con la expresión de CD80 y CD86 que impulsó un circuito de retroalimentación positiva mediado por CD28 e IL-2, promoviendo la supervivencia. Mientras, que estas mismas moléculas también indujeron la expresión de CTLA-4 de forma mediada por IL-2 y dependiente de la densidad celular, creando así un circuito de retroalimentación inhibitorio anidado que limitó la expansión de

las células T (Zenke et al., 2020). Esto demostraría que los miembros de la población se perciben mutuamente y ajustan su comportamiento en consecuencia (Waters & Bassler, 2005), evitando una expansión excesiva que pueda conllevar a una inmunopatología devastadora.

En función de estos conceptos y de la información disponible sobre CD6, se podría especular que este receptor participaría modulando los mecanismos intrínsecos de la comunicación intercelular en función del contexto celular. Esa capacidad moduladora de CD6 residiría en su potencial para interactuar tanto con reguladores positivos (SLP-76, ZAP70, VAV1) como negativos (UBASH3A/STS-2, SHIP1) de la activación linfocitaria (Mori et al., 2021). La dualidad de CD6 se pondría de manifiesto cuando se evalúa su función en el contexto de diferentes modelos de enfermedad en ratones con diferentes fondos genéticos. Así, ratones C57BL/6 deficientes para CD6 experimentan una forma exacerbada de CIA, lo que apoyaría una función inhibidora de CD6 (Orta-Mascaró et al., 2016). Por el contrario, los mismos ratones experimentan formas atenuadas de EAE y de psoriasis inducida por imiquimod, apoyando una función activadora de CD6 (Consuegra-Fernández, Julià, et al., 2018; Consuegra-Fernández, Martínez-Florensa, et al., 2017). Por su parte, ratones DBA/1 deficientes para CD6, experimentan formas atenuadas de EAE, UEA y CIA (Y. Li et al., 2017, 2020; L. Zhang et al., 2018). Cabe señalar aquí que los ratones C57BL/6 son en general más resistentes que los DBA/1 a la inducción de los distintos modelos de autoinmunidad antes mencionados, y eso puede constituir un factor importante en la disparidad de respuestas observadas.

En cualquier caso, la disparidad también observada en los estudios *in vivo* que acabamos de mencionar da una idea de la complejidad del papel desempeñado por CD6 en la fisiología de las células T. Dicha complejidad debe ser tenida muy en cuenta a la hora de trasladar a la clínica los resultados obtenidos en modelos experimentales murinos de enfermedades autoinmunitarias. En base a ellos, se considera hoy día a CD6 como una nueva diana terapéutica en autoinmunidad, así como también en cáncer (Gurrea-Rubio & Fox, 2022). De hecho, la inmunoterapia con un AcMo humanizado anti-CD6 humano (Itolizumab) está ya en fase de ensayo clínico con aparente éxito en psoriasis y artritis reumatoide (Dogra et al., 2020; Rodríguez et al., 2018). Sin embargo, el modo de acción de los AcMos terapéuticos anti-CD6 esté lejos de ser comprendido, lo que refleja las

incertidumbres y las controversias que aún rodean las funciones mecánicas y biológicas de CD6.

En este trabajo confirmamos mediante nuestro modelo de estimulación antigénica específica, es decir, en presencia de señales de intensidad y duración fisiológicas como las generadas durante el reconocimiento antigénico por el receptor clonotípico de los linfocitos, la importancia del contexto celular como un factor determinante de la naturaleza de las señales transmitidas a través de CD6, el que ahora se puede definir como un receptor dual o ambivalente de las células T.

## **2. Analizar cambios en el perfil transcriptómico de células linfoides inducidos por la expresión de variantes funcionalmente relevantes de CD5, así como por la expresión de CD6.**

### **Identificación de la expresión de CD6 en las subpoblaciones de células B humanas en recién nacidos y adultos**

La relevancia de la expresión de CD6 en la función de las células B se mantiene poco explorado. Se había descrito una alta expresión de CD6 en las células B-1a (CD5<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup>) de amígdalas, que a la vez expresan CD5 (Alonso et al., 2010). Además, dos estudios reportaron la expresión de CD6 en células de leucemia linfocítica crónica (B-CLL) (Bertha Beatriz Socarrás Ferrer et al., 2009; Osorio et al., 1997). Por último, en ratones se demostró que CD6 se expresa en células B-1a provenientes de sangre periférica y bazo, pero no en células del B-1a del peritoneo (Enyindah-Asonye, Li, Xin, et al., 2017).

Este estudio aporta por primera vez, información de la expresión de CD6 en las diferentes subpoblaciones de células B humanas, tanto en recién nacidos como en adultos. Se demostró que los niveles de expresión de CD6 permanecen bajos en todas las subpoblaciones de células B en condiciones basales o en ausencia de estimulación. Sin embargo, cuando estas células son estimuladas, ya sea con estímulos T-dependientes o T-independientes, la expresión de este receptor aumenta, aunque no alcanza valores estadísticamente significativos. Esto ocurre en ambas poblaciones de estudio, aunque en adultos existe una mayor expresión en células *naïve*, células de memoria IgM y B CD5<sup>+</sup> que la expresión de CD6<sup>+</sup> en las células CSW. Estos resultados van en la misma línea de lo demostrado por Osorio et al., en donde células leucémicas de LLC-B expresan CD6 y tras la activación con *Staphylococcus aureus* Cowan I (SAC) y IL-2, estas células aumentan la expresión de CD6 (Osorio et al., 1997).

Para entender el rol de CD6 en las células B, se evaluaron marcadores de activación en células Daudi que expresan CD6 en condiciones basales, y se observó un aumento significativo de la expresión de CD69<sup>+</sup> y CD86<sup>+</sup>. Cuando estas células fueron estimuladas a diferentes concentraciones de anti-Igs, también se observa un aumento de la expresión del marcador CD86<sup>+</sup>, pero a medida que aumenta la concentración del estímulo, se reducen las diferencias significativas. Por el contrario, cuando utilizados una

combinación de estímulos T dependientes CD40<sup>+</sup> y CD80<sup>+</sup> se encuentran disminuidos, con un aumento de expresión de CD86<sup>+</sup>. Un estudio demuestra que existen diferencias en la señalización entre CD80 y CD86, tras la activación linfocitaria CD80 (y CD40) proporciona señales negativas para la proliferación y secreción de IgG en células B normales y linfomas de células B, y por el contrario, CD86 fomenta la actividad de las células B (Suvas et al., 2002). Estos resultados indican que CD6 tiene una función inmunomoduladora en las células B, la cual sería dependiente de la potencia del estímulo. Recordando la capacidad de esta molécula en regular tanto positiva como negativamente el BCR, en nuestro sistema experimental favorecería la reclusión de moléculas relacionadas con la activación celular. Algo importante de señalar, que el estudio de Suvas et al, indica que CD80 tiene funciones duales, en donde en linfomas aumenta la expresión de Fas y FasL, y a su vez, induce apoptosis. En cambio, en células B normales, no logra inducir Fas y FasL o apoptosis. La naturaleza dual de los eventos de señalización también se ha informado en el caso de la activación CD40, y que podría ocurrir también con CD6 (Funakoshi et al., 1994).

Una de las importancias de estudiar este receptor en células B, es su potencial aplicabilidad clínica en tratamientos en las células B leucémicas. Hasta la fecha, escasos estudios demuestran un posible papel, el primero de estos, demostró en células de pacientes con LLC-B que el AcMo murino ior-t1A, inhibe la apoptosis inducida tras estimulación con anti-IgM (Osorio et al., 1997; Osorio, Jondal, et al., 1998). Una década más tarde al primer estudio, mediante ingeniería genética se obtuvo una versión humanizada de ese AcMo murino (ior-t1A) anti-CD6 humano, designado T1h. Este anticuerpo monoclonal T1h (Itolizumab) reconoce moléculas CD6 expresadas en células tumorales de pacientes con leucemia de LLC-B y es capaz de inducir apoptosis de estas células, pero no en linfocitos normales (CD19<sup>+</sup> CD20<sup>+</sup>) (*Pharmaceutical Compositions Capable of Inducing Apoptosis in Tumour Cells, Useful for Diagnosis and Treatment of b-Chronic Lymphocytic Leukaemia*, 2007). Interesantemente, una desventaja importante en los tratamientos con anticuerpos monoclonales con especificidad a otras moléculas de las células B, como CD52 y CD20, es que su efecto terapéutico antitumoral es muy limitado, induciendo también la eliminación de los linfocitos normales del individuo (Nüchel et al., 2005). Esta falta de especificidad es un factor de riesgo para la aparición frecuente de infecciones en los pacientes tratados (Ravandi & O'Brien, 2006). Según nuestros resultados, la expresión de CD6 en todas las subpoblaciones de células B normales es bajo, incluso

tras la estimulación de estas células las diferencias no fueron significativas con respecto a los niveles basales. Un estudio en células B de pacientes con LLC-B CD6<sup>+</sup> CD5<sup>+</sup> se observó una sobreexpresión de CD6 en comparación a los niveles de células B de adultos sanos, lo que podría explicar su específica eficacia (Bertha Beatriz Socarrás Ferrer et al., 2009).

Posteriormente, se realizó un primer estudio clínico de fase I para evaluar la seguridad de la administración del Itolizumab en pacientes con SL CD6<sup>+</sup> (leucemia linfocítica crónica- B, linfoma no hodgkiniano B, linfoma T cutáneo y leucemia T) y obtener resultados preliminares del efecto terapéutico. Este estudio fue ejecutado en el Instituto de Hematología e Inmunología (IHI), La Habana, Cuba (Izquierdo Cano et al., 2014). Se incluyeron 4 pacientes con LLC-B (media 69 años) y al momento de la inclusión todos los pacientes se encontraban en un estadio III-IV de la enfermedad y previamente habían recibido varios esquemas de tratamiento. Los resultados fueron favorables, en donde todos los pacientes tuvieron alguna mejoría clínica, tras 12 semanas de tratamiento y fue bien tolerado. Sin embargo, los autores destacan que usar dosis más altas podría mejorar la respuesta clínica, al igual que lo observado con otros anticuerpos monoclonales que han demostrado mejor eficacia en dosis altas.

Por otra parte, se ha demostrado que las deleciones en las bandas cromosómicas 11q22-q23 son una de las aberraciones cromosómicas más frecuentes en la LLC-B. Los pacientes que padecen LLC-B con deleción 11q se caracterizan por una gran afectación de los ganglios linfáticos, una rápida progresión de la enfermedad y una corta supervivencia. Este estudio demostró que las células de LLC-B con deleción 11q presentaban niveles significativamente inferiores tanto de moléculas de adhesión (ej. CD11a/CD18, PECAM-1 y LFA-3) como de receptores involucrados en señalización celular (CD6, CD45, CD35 y CD39) que se correlacionaban con una menor supervivencia (Sembries et al., 1999).

A pesar de que existen algunos estudios clínicos, la función de este receptor en células B no ha sido bien caracterizada. Nuestros resultados transcriptómicos con las células Daudis revelan que CD6 estaría implicado es la sobreexpresión de vías de señalización relacionadas a proteínas ribosomales, señalización vía Ras/STAT, vía de señalización de la interleucina 7, el factor de transcripción Runx2 que regula los huesos,

síntesis de queratán sulfato, señalización de fgfr4, señalización nuclear del receptor tirosina quinasa ErbB4

Con los recientes avances en las inmunoterapias dirigidas a las células T y/o B, los receptores co-inhibidores/ co-estimuladores son de creciente interés para los inmunólogos debido a sus potenciales propiedades inmunomoduladoras de las funciones linfocitarias. En el caso de CD6, constituye un marcador biológico de interés en la evaluación del pronóstico en la LLC y la posibilidad establecerse como una potente alternativa terapéutica. Sin embargo, para evitar resultados clínicos no deseados, es importante considerar un análisis funcional de este receptor linfocitario en diversos contextos fisiológicos. Así como en las células T, es probable que también se caracterice por tener una función ambivalente. Nuestros resultados aportan la necesidad de evaluar la función de este receptor en cada subpoblación de células B, ya que la mayoría de los estudios los agrupa con los marcadores CD19<sup>+</sup> CD20<sup>+</sup>, evitando su correcta identificación. Además, se considerará las diferencias de la expresión de CD6 en células B de humanos y ratón. Esta ausencia de correlación se debe considerar en los estudios en modelos experimentales murinos, que deseen continuar los estudios del rol de esta molécula en las células B.

Los resultados bajo nuestras condiciones de estimulación indicarían que el receptor CD6 participaría modulando de forma positiva la activación de células B, es decir, actuando como un co-estimulador del BCR. Sin embargo, se debe mencionar que cuando aumenta la potencia del estímulo las diferencias disminuyen. Una hipótesis de esta situación sería que CD6 comenzaría a reclutar efectores intracelulares inhibidores para evitar una sobreactivación celular. Lo que correspondería con los estudios del *signalosoma*, el cual indica que CD6 puede reclutar efectores de señales intracelulares estimuladoras (SLP76, ZAP70, VAV1), pero también moléculas inhibitoras (UBASH3A/STS-2) reguladoras de la activación de las células T (Mori et al., 2021). Por otro lado, también podría ocurrir que CD6 no logre tener una potencia suficiente para inhibir la activación en contextos de estimulación supra-fisiológicas o continuas.

### **Cambios en expresión génica de las isoformas Ala471 y Val471 de CD5 en células Daudi**

Existen evidencias de que el SNP rs2229177C>T de CD5 (Ala471>Val), se ha seleccionado positivamente en la evolución de algunas poblaciones humanas, lo cual hablaría en favor de un papel relevante de CD5 en la regulación de las respuestas inmunitarias contra agentes ambientales (Moreno-Estrada et al., 2009). Dada la compleja función del receptor CD5 y su capacidad para modular diferentes procesos inmunológicos, es difícil definir con precisión cómo las diferencias entre las variantes podrían traducirse en una ventaja fenotípica. Otra prueba que demuestra la relevancia de este SNP, es el alelo derivado Val471 (en estado homocigoto) asociado a un mejor pronóstico de la leucemia linfocítica crónica (Sellick et al., 2008).

El receptor CD5, además de otras funciones puede actuar como un receptor de patrones moleculares asociados a patógenos (Soldevila et al., 2011), concretamente su ectodominio se une a componentes conservados de la pared celular de los hongos, los  $\beta$ -glucanos, y que dicha interacción induce tanto la activación de MAPK como la liberación de citocinas (Vera et al., 2009). Dado a que este SNP tiene ubicación citoplasmática, es probable que module la posterior activación y/o diferenciación de los linfocitos hacia una respuesta inmune más adaptativa. Por el momento, no se conoce que evento dio lugar a esta selección natural de la población asiática oriental y nativa americana. En este sentido,

no se descarta la presencia de otros ligandos actualmente no identificados y que estén involucrados en el papel adaptativo de esta variante.

Cada vez hay más pruebas que demuestran la importancia clínica de la variación de los genes CD5. Sin embargo, los mecanismos moleculares que conducen a dicha variación son poco conocidos. En el caso del SNP rs2229177C>T de CD5 (Ala471>Val), pocos estudios han permitido conocer sus implicaciones en los primeros eventos de señalización. En transfectantes de células COS7 que expresan la variante Ala471, la estimulación de CD5 con mAbs anti-CD5 dio lugar a una menor fosforilación de MAPK en comparación con los transfectantes Val471. También, se ha visto que los linfocitos T de individuos con la variante de Ala471 (rs2229177CC), presentan respuestas linfoproliferativas superiores a los portadores de la variante Val471 (rs2229177TT) en respuesta a AcMo anti-CD3 o a *zymosan* (Carnero-Montoro et al., 2012; Cenit et al., 2014). Así mismo, se observó diferencias similares en transfectantes con la variante Ala471 en células HEK293 estimuladas con *Zymosan* (una partícula fúngica rica en  $\beta$ -glucano) (Carnero-Montoro et al., 2012). Estos estudios proporcionan información sobre el papel de las isoformas de CD5, pero presentan la limitación experimental de utilizar un tipo celular que no corresponde a células T y B y por el otro lado, el uso de células primarias de donantes es un modelo de estudio más representativo de lo fisiológico, pero con una gran variabilidad genómica individual que no se restringe sólo al SNP en estudio.

En nuestro modelo de células Daudi que expresan las isoformas Ala471 o Val471 de CD5, observamos diferencias relevantes en la expresión génica diferencial en función de la variante de CD5. En el caso de CD5-Val471, según nuestros resultados esta isoforma tiene una mayor capacidad de señalización supresora y el transcriptoma de las células Daudi que expresan esta variante, presentan un incremento de las vías que regulan la síntesis del colesterol. Esto se correlacionaría con un reciente estudio, que demuestra que el metabolismo del colesterol es fundamental en la mediación de la capacidad reguladora de las células B humanas, a través del control de expresión de IL-10 (Bibby et al., 2020).

Por otra parte, existen estudios que relacionan el receptor CD5 con la capacidad de inducir la producción de DAG en células T, mediante dos vías, dependiente e independiente del TCR. La vía relacionada con el TCR depende del reclutamiento y la activación de la fosfolipasa C específica de la fosfatidilcolina (PC-PLC), mientras que la vía independiente del TCR induce la síntesis de *novo* de DAG, a través de una vía que no

es la PC-PLC (Simarro et al., 1997, 1999). Además, uno de los hallazgos más relevantes de este estudio fue la demostración de un requisito funcional de la región distal de CD5 para regular la producción de DAG, pero que en ese momento no fue aclarado. Según nuestros resultados, la ubicación de este SNP podría modular esta vía y su potencia dependería de la variante, en donde el DAG generado conlleva la activación de esfingomielinasa ácida (A-SMasa) (Cifone et al., 1995) y sus metabolitos resultantes (ceramidas) han sido implicados en la activación de otros elementos de señalización aguas abajo (PKC- $\zeta$ , NF- $\kappa$ B, etc.) y en la modulación de los efectos celulares pleiotrópicos (desde la proliferación y diferenciación celular hasta la detención del crecimiento y la apoptosis) (Hannun, 1996).

Por otro lado, la isoforma CD5-Ala471 es una variante que tiene menor capacidad de señalización supresora y el transcriptoma de las células Daudi correspondiente, presenta un incremento de las vías de señalización como NTRK, Wnt, Rho, Vav1, Nef, metabolismo de la glucosa y transporte de aminoácidos. Esto se podría explicar, a través de lo observado tras la activación de células T *naive*, que inducen un cambio metabólico consistente con un aumento de las vías glucolíticas en detrimento de las vías del colesterol (Almeida et al., 2016; Menk et al., 2018). Asimismo, un estudio demuestra que la deficiencia de CD5 aumentaría la actividad metabólica de los linfocitos T circulantes favoreciendo el transporte de metabolitos, la glucólisis, la síntesis de aminoácidos y respiración celular (Whitley et al., 2022). Estos datos se aproximarían a nuestros resultados con la isoforma de CD5-Ala471 que se caracteriza por tener una menor capacidad señalizadora supresora.

La relevancia clínica de este SNP es su asociación en diferentes patologías inmunitarias, entre los cuales están los portadores homocigotos del haplotipo ancestral P224-A471 (CC) que se asocian a formas clínicamente más agresivas de lupus eritematoso sistémico que el haplotipo P224-V471 (CT) (Cenit et al., 2014). También, se analizó la influencia de este SNP en pacientes con LLC, en donde los pacientes con LLC homo o heterocigotos para el alelo ancestral A471 (C) de CD5 tienen una SLP significativamente prolongada, pero exclusivamente en los casos con una prolina en lugar de una leucina en la posición 224 (P224L) y con genes IGHV mutados (LLC menos agresiva) (Delgado et al., 2017). De igual manera, pacientes con melanoma y con este haplotipo P224- A471 presentan un mejor pronóstico y una mayor expectativa de vida

(Potrony et al., 2016). Con nuestros datos aportamos a la explicación molecular de este fenómeno, en base a que los estudios transcriptómicos indicarían que la variante Ala471 es menos eficiente para transmitir señales inhibitorias durante la activación del TCR/BCR (Carnero-Montoro et al., 2012; Cénit et al., 2014; Soldevila et al., 2011). Estos resultados apoyan la noción de que CD5 no es sólo un marcador fenotípico, sino un actor relevante en la biología celular de la célula B, por ende, también en diferentes patologías autoinmunitarias y neoplásicas. Nuestros resultados revelan las implicaciones de una sustitución no sinónima en su dominio citoplasmático a nivel molecular y su impacto a nivel del metabolismo y señalización celular, por este motivo, proponemos que se incluya este SNP durante el diagnóstico y pronóstico de pacientes con patologías autoinmunes o tumorales.

## **VI. CONCLUSIONES**



1. CD6 is a highly complex molecule, which acts during lymphocyte activation by orchestrating both extracellular and intracellular signals, mainly through its ectodomain and long cytoplasmic tail.
2. CD6 is a receptor with ambivalent function and can deliver either positive or negative intracellular signaling, depending on the cellular context.
3. CD6 is involved in the immune synapse, co-localizing with the TCR and participating in the stabilization of these interactions, through the binding to its CD166/ALCAM ligand.
4. CD6 expression levels are low in all B-cell subsets from adult peripheral blood (Naïve B cells, IgM memory cells, Class switched memory, Transitional B, B CD5<sup>+</sup>) and human neonatal B cell subsets (Naïve B, Transitional B, B CD5<sup>+</sup>). However, when these cells under TD or TI mimicking conditions were stimulated, CD6 expression increased in all B-cell subsets, but not significantly.
5. CD6 in our experimental system promoted the reclusion of molecules related to cell activation, acting as a BCR co-stimulator.
6. CD5 is not just a phenotypic marker on B cells, but it also could modulate the transcriptome with effects on metabolite transport, glycolysis, and amino acid synthesis. The more recently derived Pro224-Val471 allele increases metabolic activity (cholesterol synthesis), by acting as a very strong negatively modulating the antigen-receptor (BCR), compared to the ancestral CD5 Pro224-Ala471.



## **VII. REFERENCIAS**

## Referencias

- Aibar, J., Martínez-Florensa, M., Castro, P., Carrasco, E., Escoda-Ferran, C., Fernández, S., Butjosa, M., Hernández, C., Rinaudo, M., Lozano, F., & Nicolás, J. M. (2015). Pattern of soluble CD5 and CD6 lymphocyte receptors in critically ill patients with septic syndromes. *Journal of Critical Care*, *30*(5), 914–919. <https://doi.org/10.1016/J.JCRC.2015.04.120>
- Alberola-Ila, J., Places, L., Cantrell, D. A., Vives, J., & Lozano, F. (1992). *human T cell activation and proliferation. Intracellular events involved in CD5-induced.* <http://www.jimmunol.org/content/148/5/1287>
- Almeida, L., Lochner, M., Berod, L., & Sparwasser, T. (2016). Metabolic pathways in T cell activation and lineage differentiation. *Seminars in Immunology*, *28*(5), 514–524. <https://doi.org/10.1016/J.SMIM.2016.10.009>
- Alonso, R., Buors, C., le Dantec, C., Hillion, S., Pers, J. O., Saraux, A., Montero, E., Marianowski, R., Loisel, S., Devauchelle, V., Youinou, P., & Renaudineau, Y. (2010). Aberrant expression of CD6 on B-cell subsets from patients with Sjögren's syndrome. *Journal of Autoimmunity*, *35*(4), 336–341. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2010.07.005>
- Amado, I. F., Berges, J., Luther, R. J., Mailhé, M. P., Garcia, S., Bandeira, A., Weaver, C., Liston, A., & Freitas, A. A. (2013). IL-2 coordinates IL-2-producing and regulatory T cell interplay. *The Journal of Experimental Medicine*, *210*(12), 2707–2720. <https://doi.org/10.1084/JEM.20122759>
- Andrés, M. de V., Català, C., Casadó-Llobart, S., Martínez-Florensa, M., Simões, I., García-Luna, J., Mourglia-Ettlin, G., Zaragoza, Ó., Carreras, E., & Lozano, F. (2020). The Lymphocytic Scavenger Receptor CD5 Shows Therapeutic Potential in Mouse Models of Fungal Infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *65*(1). <https://doi.org/10.1128/AAC.01103-20>
- Arasanz, H., Gato-Cañas, M., Zuazo, M., Ibañez-Vea, M., Breckpot, K., Kochan, G., & Escors, D. (2017). PD1 signal transduction pathways in T cells. *Oncotarget*, *8*(31), 51936. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.17232>

- Aruffo, A., Melnick, M. B., Linsley, P. S., & Seed, B. (1991). The lymphocyte glycoprotein CD6 contains a repeated domain structure characteristic of a new family of cell surface and secreted proteins. *The Journal of Experimental Medicine*, *174*(4), 949–952. <https://doi.org/10.1084/JEM.174.4.949>
- Ashraf, M. Z., & Sahu, A. (2012). Scavenger receptors: a key player in cardiovascular diseases. *Biomolecular Concepts*, *3*(4), 371–380. <https://doi.org/10.1515/BMC-2012-0003>
- Axtell, R. C., Webb, M. S., Barnum, S. R., & Raman, C. (2004). Cutting edge: critical role for CD5 in experimental autoimmune encephalomyelitis: inhibition of engagement reverses disease in mice. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *173*(5), 2928–2932. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.173.5.2928>
- Azzam, H. S., DeJarnette, J. B., Huang, K., Emmons, R., Park, C.-S., Sommers, C. L., El-Khoury, D., Shores, E. W., & Love, P. E. (2001). Fine Tuning of TCR Signaling by CD5. *The Journal of Immunology*, *166*(9), 5464–5472. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.166.9.5464>
- Azzam, H. S., Grinberg, A., Lui, K., Shen, H., Shores, E. W., & Love, P. E. (1998). CD5 Expression Is Developmentally Regulated By T Cell Receptor (TCR) Signals and TCR Avidity. *Journal of Experimental Medicine*, *188*(12), 2301–2311. <https://doi.org/10.1084/JEM.188.12.2301>
- Bamberger, M., Santos, A. M., Gonçalves, C. M., Oliveira, M. I., James, J. R., Moreira, A., Lozano, F., Davis, S. J., & Carmo, A. M. (2011). A New Pathway of CD5 Glycoprotein-mediated T Cell Inhibition Dependent on Inhibitory Phosphorylation of Fyn Kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, *286*(35), 30324. <https://doi.org/10.1074/JBC.M111.230102>
- Barber, E. K., Dasgupta, J. D., Schlossman, S. F., Trevillyan, J. M., & Rudd, C. E. (1989). The CD4 and CD8 antigens are coupled to a protein-tyrosine kinase (p56lck) that phosphorylates the CD3 complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *86*(9), 3277–3281. <https://doi.org/10.1073/PNAS.86.9.3277>
- Barnden, M. J., Allison, J., Heath, W. R., & Carbone, F. R. (1998). Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain

- genes under the control of heterologous regulatory elements. *Immunology and Cell Biology*, 76(1), 34–40. <https://doi.org/10.1046/J.1440-1711.1998.00709.X>
- Basset, C., Holton, J., O'mahony, R., & Roitt, I. (2003). Innate immunity and pathogen-host interaction. *Vaccine*, 21. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(03\)00195-6](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(03)00195-6)
- Berland, R., & Wortis, H. H. (2002). ORIGINS AND FUNCTIONS OF B-1 CELLS WITH NOTES ON THE ROLE OF CD5. *Annu. Rev. Immunol*, 20, 253–300. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.100301.064833>
- Bertha Beatriz Socarrás Ferrer, L. I., Lázaro del Valle Pérez I, L. O., Consuelo Macías Abraham, D. I., Vianed Marsán Suárez, D. I., Miriam Sánchez Segura, D. I., Rosa María Lam, D. I., Ruby Alonso Ramírez, L. I., & Montero Casimiro DrC Porfirio Hernández Ramírez I, E. I. (2009). Expresión fenotípica de las moléculas CD5 y CD6 en la leucemia linfoide crónica B-CD5+ The B-CD5+ chronic lymphoid leukemia related to the phenotype expression. *Inmunología y Medicina Transfusional*, 25(1). <http://scielo.sld.cu>
- Biancone, L., Bowen, M. A., Lim, A., Aruffo, A., Andres, G., & Stamenkovic, I. (1996). Identification of a novel inducible cell-surface ligand of CD5 on activated lymphocytes. *The Journal of Experimental Medicine*, 184(3), 811–819. <https://doi.org/10.1084/JEM.184.3.811>
- Bibby, J. A., Purvis, H. A., Hayday, T., Chandra, A., Okkenhaug, K., Rosenzweig, S., Aksentijevich, I., Wood, M., Lachmann, H. J., Kemper, C., Cope, A. P., & Perucha, E. (2020). Cholesterol metabolism drives regulatory B cell IL-10 through provision of geranylgeranyl pyrophosphate. *Nature Communications* 2020 11:1, 11(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17179-4>
- Bikah, G., Carey, J., Ciallella, J. R., Tarakhovsky, A., & Bondada, S. (1996). CD5-mediated negative regulation of antigen receptor-induced growth signals in B-1 B cells. *Science*, 274(5294), 1906–1909. <https://doi.org/10.1126/science.274.5294.1906>
- Bikah, G., Lynd, F. M., Aruffo, A. A., Ledbetter, J. A., & Bondada, S. (1998). A role for CD5 in cognate interactions between T cells and B cells, and identification of a novel ligand for CD5. *International Immunology*, 10(8), 1185–1196. <https://doi.org/10.1093/INTIMM/10.8.1185>

- Blaize, G., Daniels-Treffandier, H., Aloulou, M., Rouquié, N., Yang, C., Marcellin, M., Gador, M., Benamar, M., Ducatez, M., Song, K. D., Burlet-Schiltz, O., Saoudi, A., Love, P. E., Fazilleau, N., de Peredo, A. G., & Lesourne, R. (2020). CD5 signalosome coordinates antagonist TCR signals to control the generation of Treg cells induced by foreign antigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *117*(23), 12969–12979. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1917182117/-/DCSUPPLEMENTAL>
- Bonet, L., Farnós, M., Martínez-Florensa, M., Martínez, V. G., & Lozano, F. (2013). Identification of functionally relevant phosphorylatable serine clusters in the cytoplasmic region of the human CD6 lymphocyte surface receptor. *FEBS Letters*, *587*(14), 2205–2213. <https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2013.05.043>
- Bonilla, F. A., & Oettgen, H. C. (2010). Adaptive immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *125*(2 SUPPL. 2), S33–S40. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.017>
- Borrello, M. A., Palis, J., & Phipps, R. P. (2001). The relationship of CD5+ B lymphocytes to macrophages: insights from normal biphenotypic B/macrophage cells. *International Reviews of Immunology*, *20*(1), 137–155.
- Bott, C. M., Doshi, J. B., Morimoto, C., Romain, P. L., & Fox, D. A. (1993). Activation of human T cells through CD6: functional effects of a novel anti-CD6 monoclonal antibody and definition of four epitopes of the CD6 glycoprotein. *International Immunology*, *5*(7), 783–792. <https://doi.org/10.1093/INTIMM/5.7.783>
- Bowen, M. A., Patel, D. D., Li, X., Modrell, B., Malacko, A. R., Wang, W. C., Marquardt, H., Neubauer, M., Pesando, J. M., Francke, U., Haynes, B. F., & Aruffo, A. (1995). Cloning, mapping, and characterization of activated leukocyte-cell adhesion molecule (ALCAM), a CD6 ligand. *Journal of Experimental Medicine*, *181*(6), 2213–2220. <https://doi.org/10.1084/JEM.181.6.2213>
- Bowen, M. A., Whitney, G. S., Neubauer, M., Starling, G. C., Palmer, D., Zhang, J., Nowak, N. J., Shows, T. B., & Aruffo, A. (1997). Structure and chromosomal location of the human CD6 gene: detection of five human CD6 isoforms. *The Journal of Immunology*, *158*(3).

- Bowen, M., Whitney, G., Neubauer, M., Starling, G., Palmer, D., Zhang, J., Nowak, N., Shows, T., & Aruffo, A. (1997). Structure and chromosomal location of the human CD6 gene: detection of five human CD6 isoforms. *Undefined*.
- Boyse, E. A., Old, L. J., & Stockert, E. (1968). An approach to the mapping of antigens on the cell surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *60*(3), 886–893. <https://doi.org/10.1073/PNAS.60.3.886/ASSET/394612C9-003D-4848-9255-A7E2A252A655/ASSETS/PNAS.60.3.886.FP.PNG>
- Braun, M., Müller, B., ter Meer, D., Raffegerst, S., Simm, B., Wilde, S., Spranger, S., Ellwart, J., Mosetter, B., Umansky, L., Lerchl, T., Schendel, D. J., & Falk, C. S. (2011). The CD6 scavenger receptor is differentially expressed on a CD56 dim natural killer cell subpopulation and contributes to natural killer-derived cytokine and chemokine secretion. *Journal of Innate Immunity*, *3*(4), 420–434. <https://doi.org/10.1159/000322720>
- Brockdorff, J., Williams, S., Ciment Couture, C., & Mustelin, T. (n.d.). *Dephosphorylation of ZAP-70 and inhibition of T cell activation by activated SHP1*. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199908\)29:08](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199908)29:08)
- Bröker, B. M., Klajman, A., Youinou, P., Jouquan, J., Worman, C. P., Murphy, J., Mackenzie, L., Quartey-Papafio, R., Blaschek, M., Collins, P., Lal, S., & Lydyard, P. M. (1988). Chronic lymphocytic leukemic (CLL) cells secrete multispecific autoantibodies. *Journal of Autoimmunity*, *1*(5), 469–481. [https://doi.org/10.1016/0896-8411\(88\)90068-6](https://doi.org/10.1016/0896-8411(88)90068-6)
- Brück, C., Golumba-Nagy, V., Yan, S., Esser, R. L., Thiele, J., Stahl, D., Pesch, C. th, Steinbach-Knödgen, E., & Kofler, D. M. (2022). Th1 and Th17 cells are resistant towards T cell activation-induced downregulation of CD6. *Clinical Immunology*, *238*, 109025. <https://doi.org/10.1016/J.CLIM.2022.109025>
- Budamakuntla, L., Shree-Lakshmi, H. V. M., Bansal, A., & Kumar, S. (2019). Spotlight on itolizumab in the treatment of psoriasis – current perspectives from India. *Psoriasis: Targets and Therapy*, *9*, 19. <https://doi.org/10.2147/PTT.S154073>
- Bürckstümmer, T., Baumann, C., Blüml, S., Dixit, E., Dürnberger, G., Jahn, H., Planyavsky, M., Bilban, M., Colinge, J., Bennett, K. L., & Superti-Furga, G. (2009).

- An orthogonal proteomic-genomic screen identifies AIM2 as a cytoplasmic DNA sensor for the inflammasome. *Nature Immunology*, *10*(3), 266–272. <https://doi.org/10.1038/NI.1702>
- Burgueño-Bucio, E., Mier-Aguilar, C. A., & Soldevila, G. (2019). The multiple faces of CD5. *Journal of Leukocyte Biology*, *105*(5), 891–904. <https://doi.org/10.1002/JLB.MR0618-226R>
- Butler, N. S., Moebius, J., Pewe, L. L., Traore, B., Doumbo, O. K., Tygrett, L. T., Waldschmidt, T. J., Crompton, P. D., & Harty, J. T. (2011). Therapeutic blockade of PD-L1 and LAG-3 rapidly clears established blood-stage Plasmodium infection. *Nature Immunology* *2011 13:2*, *13*(2), 188–195. <https://doi.org/10.1038/ni.2180>
- Caballero, A., Filgueira, L. M., Betancourt, J., Sánchez, N., Hidalgo, C., Ramírez, A., Martínez, A., Despaigne, R. E., Escalona, A., Diaz, H., Meriño, E., Ortega, L. M., Castillo, U., Ramos, M., Saavedra, D., García, Y., Lorenzo, G., Cepeda, M., Arencibia, M., ... Crombet, T. (2020). Treatment of COVID-19 patients with the anti-CD6 antibody itolizumab. *Clinical & Translational Immunology*, *9*(11). <https://doi.org/10.1002/CTI2.1218>
- Calvo, J., Places, L., Padilla, O., Vilà, J. M., Vives, J., Bowen, M. A., & Lozano, F. (1999). Interaction of recombinant and natural soluble CD5 forms with an alternative cell surface ligand. *European Journal of Immunology*, *29*(7), 2119–2129. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199907\)29:07<2119::AID-IMMU2119>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199907)29:07<2119::AID-IMMU2119>3.0.CO;2-F)
- Calvo, J., Vildà, J. M., Places, L., Simarro, M., Padilla, O., Andreu, D., Campbell, K. S., Aussel, C., & Lozano, F. (1998). Human CD5 Signaling and Constitutive Phosphorylation of C-Terminal Serine Residues by Casein Kinase II. *The Journal of Immunology*, *161*(11).
- Cardenas, L., Carrera, A. C., Yague, E., Pulido, R., Sánchez-Madrid, F., & de Landázuri, M. O. (1990). Phosphorylation-dephosphorylation of the CD6 glycoprotein renders two isoforms of 130 and 105 kilodaltons. Effect of serum and protein kinase C activators. *The Journal of Immunology*, *145*(5).

- Carmo, A. M. (2016). Heads Or Tails: Betting On CD6 As a Resurged Target For Autoimmune Diseases and Sepsis. *Current Drug Targets*, 17(6), 618. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27017998>
- Carmo, A. M., Castro, M. A. A., & Arosa, F. A. (1999). CD2 and CD3 Associate Independently with CD5 and Differentially Regulate Signaling Through CD5 in Jurkat T Cells. *The Journal of Immunology*, 163(8).
- Carmo, A. M., Mason, D. W., & Beyers, A. D. (1993). Physical association of the cytoplasmic domain of CD2 with the tyrosine kinases p56lck and p59fyn. *European Journal of Immunology*, 23(9), 2196–2201. <https://doi.org/10.1002/EJI.1830230922>
- Carnero-Montoro, E., Bonet, L., Engelken, J., Bielig, T., Martínez-Florensa, M., Lozano, F., & Bosch, E. (2012). Evolutionary and functional evidence for positive selection at the human CD5 immune receptor gene. *Molecular Biology and Evolution*, 29(2), 811–823. <https://doi.org/10.1093/molbev/msr251>
- Carpino, N., Turner, S., Mekala, D., Takahashi, Y., Zang, H., Geiger, T. L., Doherty, P., & Ihle, J. N. (2004). Regulation of ZAP-70 activation and TCR signaling by two related proteins, Sts-1 and Sts-2. *Immunity*, 20(1), 37–46. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(03\)00351-0](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(03)00351-0)
- Carrasco, E., Escoda, C., Alvarez-Fernández, C., Sanchez-Palomino, S., Carreras, E., Gatell, J. M., Gallart, T., García, F., Climent, N., & Lozano, F. (2014). A Role for Scavenger-like Lymphocyte Receptor CD6 in HIV-1 Viral Infection. *AIDS Research and Human Retroviruses*. <https://doi.org/10.1089/aid.2014.5085.abstract>
- Carrasco, E., Escoda-Ferran, C., Climent, N., Miró-Julià, C., Simões, I. T., Martínez-Florensa, M., Sarukhan, A., Carreras, E., & Lozano, F. (2017). Human CD6 down-modulation following T-cell activation compromises lymphocyte survival and proliferative responses. *Frontiers in Immunology*, 8(JUN), 769. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00769>
- Carsetti, R., Rosado, M. M., & Wardemann, H. (2004). Peripheral development of B cells in mouse and man. *Immunological Reviews*, 197, 179–191. <https://doi.org/10.1111/J.0105-2896.2004.0109.X>
- Casadó-Llombart, S., Ajami, T., Consuegra-Fernández, M., Carreras, E., Aranda, F., Armiger Bsc, N., Alcaraz, A., Mengual, L., & Lozano, F. (2022). Gene variation

impact on prostate cancer progression: Lymphocyte modulator, activation, and cell adhesion gene variant contribution. *The Prostate*.  
<https://doi.org/10.1002/PROS.24407>

Casadó-Llombart, S., Ajami, T., Consuegra-Fernández, M., Carreras, E., Aranda, F., Armiger, N., Alcaraz, A., Mengual, L., & Lozano, F. (2022). Gene variation impact on prostate cancer progression: Lymphocyte modulator, activation, and cell adhesion gene variant contribution. *The Prostate*, 82(14), 1331–1337.  
<https://doi.org/10.1002/PROS.24407>

Casadó-Llombart, S., Gheitasi, H., Ariño, S., Consuegra-Fernández, M., Armiger-Borràs, N., Kostov, B., Ramos-Casals, M., Brito-Zerón, P., & Lozano, F. (2022). Gene Variation at Immunomodulatory and Cell Adhesion Molecules Loci Impacts Primary Sjögren's Syndrome. *Frontiers in Medicine*, 9.  
<https://doi.org/10.3389/FMED.2022.822290>

Casadó-Llombart, S., Velasco-de Andrés, M., Català, C., Leyton-Pereira, A., Gutiérrez-Cózar, R., Suárez, B., Armiger, N., Carreras, E., Esteller, M., Ricart, E., Ordás, I., Gisbert, J. P., Chaparro, M., Esteve, M., Márquez, L., Busquets, D., Iglesias, E., García-Planella, E., Martín-Arranz, M. D., ... Piqueras, M. (2022). Experimental and genetic evidence for the impact of CD5 and CD6 expression and variation in inflammatory bowel disease. *Frontiers in Immunology*, 0, 5478.  
<https://doi.org/10.3389/FIMMU.2022.966184>

Castro, M. A. A., Oliveira, M. I., Nunes, R. J., Fabre, S., Barbosa, R., Peixoto, A., Brown, M. H., Parnes, J. R., Bismuth, G., Moreira, A., Rocha, B., & Carmo, A. M. (2007a). Extracellular Isoforms of CD6 Generated by Alternative Splicing Regulate Targeting of CD6 to the Immunological Synapse. *The Journal of Immunology*, 178(7), 4351–4361. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.178.7.4351>

Castro, M. A. A., Oliveira, M. I., Nunes, R. J., Fabre, S., Barbosa, R., Peixoto, A., Brown, M. H., Parnes, J. R., Bismuth, G., Moreira, A., Rocha, B., & Carmo, A. M. (2007b). Extracellular isoforms of CD6 generated by alternative splicing regulate targeting of CD6 to the immunological synapse. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 178(7), 4351–4361. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.178.7.4351>

- Català, C., Velasco-de Andrés, M., Casadó-Llombart, S., Leyton-Pereira, A., Carrillo-Serradell, L., Isamat, M., & Lozano, F. (2022). *Innate immune response to peritoneal bacterial infection*. <https://doi.org/10.1016/BS.IRCMB.2022.04.014>
- Català, C., Velasco-de Andrés, M., Leyton-Pereira, A., Casadó-Llombart, S., Sáez Moya, M., Gutiérrez-Cózar, R., García-Luna, J., Consuegra-Fernández, M., Isamat, M., Aranda, F., Martínez-Florensa, M., Engel, P., Mourglia-Ettlin, G., & Lozano, F. (2022). CD6 deficiency impairs early immune response to bacterial sepsis. *IScience*, 25(10), 105078. <https://doi.org/10.1016/J.ISCI.2022.105078>
- Cenit, M. C., Martínez-Florensa, M., Consuegra, M., Bonet, L., Carnero-Montoro, E., Armiger, N., Caballero-Baños, M., Arias, M. T., Benitez, D., Ortego-Centeno, N., de Ramón, E., Sabio, J. M., García-Hernández, F. J., Tolosa, C., Suárez, A., González-Gay, M. A., Bosch, E., Martín, J., & Lozano, F. (2014). Analysis of ancestral and functionally relevant CD variants in systemic lupus erythematosus patients. *PLoS ONE*, 9(11), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113090>
- Ceuppens, J. L., & Baroja, M. L. (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. *The Journal of Immunology*, 137(6).
- Chappell, P. E., Garner, L. I., Yan, J., Metcalfe, C., Hatherley, D., Johnson, S., Robinson, C. v., Lea, S. M., & Brown, M. H. (2015). Structures of CD6 and Its Ligand CD166 Give Insight into Their Interaction. *Structure(London, England:1993)*, 23(8), 1426. <https://doi.org/10.1016/J.STR.2015.05.019>
- Charo, J., Finkelstein, S. E., Grewal, N., Restifo, N. P., Robbins, P. F., & Rosenberg, S. A. (2005). Bcl-2 Overexpression Enhances Tumor-Specific T-Cell Survival. *Cancer Research*, 65(5), 2001. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-2006>
- Chitteti, B. R., Bethel, M., Kacena, M. A., & Srour, E. F. (2013). CD166 and regulation of hematopoiesis. *Current Opinion in Hematology*, 20(4), 273–280. <https://doi.org/10.1097/MOH.0B013E32836060A9>
- Cho, J. H., & Sprent, J. (2018). TCR tuning of T cell subsets. *Immunological Reviews*, 283(1), 129–137. <https://doi.org/10.1111/IMR.12646>

- Chu, H., & Mazmanian, S. K. (2013). Innate immune recognition of the microbiota promotes host-microbial symbiosis. *Nat Immunol*, *14*(7), 668–675. <https://doi.org/10.1038/ni.2635>
- Cifone, M. G., Roncaioli, P., de Maria, R., Camarda, G., Santoni, A., Ruberti, G., & Testi, R. (1995). Multiple pathways originate at the Fas/APO-1 (CD95) receptor: sequential involvement of phosphatidylcholine-specific phospholipase C and acidic sphingomyelinase in the propagation of the apoptotic signal. *The EMBO Journal*, *14*(23), 5859–5868. <https://doi.org/10.1002/J.1460-2075.1995.TB00274.X>
- Collins, A. v., Brodie, D. W., Gilbert, R. J. C., Iaboni, A., Manso-Sancho, R., Walse, B., Stuart, D. I., van der Merwe, P. A., & Davis, S. J. (2002). The Interaction Properties of Costimulatory Molecules Revisited. *Immunity*, *17*(2), 201–210. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(02\)00362-X](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(02)00362-X)
- Consuegra-Fernández, M., Aranda, F., Simões, I., Orta, M., Sarukhan, A., & Lozano, F. (2015). CD5 as a target for immune-based therapies. *Critical Reviews in Immunology*. <https://doi.org/10.1615/CritRevImmunol.2015013532>
- Consuegra-Fernández, M., Isamat, M., & Lozano, F. (2017). Commentary: CD6 as a potential target for treating multiple sclerosis. *Frontiers in Immunology*, *8*(SEP), 1217. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2017.01217/XML/NLM>
- Consuegra-Fernández, M., Julià, M., Martínez-Florensa, M., Aranda, F., Català, C., Armiger-Borràs, N., Arias, M. T., Santiago, F., Guilabert, A., Esteve, A., Muñoz, C., Ferrándiz, C., Carrascosa, J. M., Pedrosa, E., Romaní, J., Alsina, M., Mascaró-Galy, J. M., & Lozano, F. (2018). Genetic and experimental evidence for the involvement of the CD6 lymphocyte receptor in psoriasis. *Cellular and Molecular Immunology*, *15*(10), 898–906. <https://doi.org/10.1038/cmi.2017.119>
- Consuegra-Fernández, M., Lin, F., Fox, D. A., & Lozano, F. (2018). Clinical and experimental evidence for targeting CD6 in immune-based disorders. In *Autoimmunity Reviews* (Vol. 17, Issue 5, pp. 493–503). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2017.12.004>
- Consuegra-Fernández, M., Martínez-Florensa, M., Aranda, F., de Salort, J., Armiger-Borràs, N., Lozano, T., Casares, N., Lasarte, J. J., Engel, P., & Lozano, F. (2017). Relevance of CD6-mediated interactions in the regulation of peripheral T-cell

- responses and tolerance. *Frontiers in Immunology*, 8(MAY).  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00594>
- Contor, H., & Boyse, E. A. (1975). Functional subclasses of T-lymphocytes bearing different Ly antigens. I. The generation of functionally distinct T-cell subclasses is a differentiative process independent of antigen. *The Journal of Experimental Medicine*, 141(6), 1376–1389. <https://doi.org/10.1084/JEM.141.6.1376>
- Corse, E., Gottschalk, R. A., & Allison, J. P. (2011). Strength of TCR–Peptide/MHC Interactions and In Vivo T Cell Responses. *The Journal of Immunology*, 186(9), 5039–5045. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1003650>
- Cortés, F., Deschaseaux, F., Uchida, N., Labastie, M. C., Frieria, A. M., He, D., Charbord, P., & Péault, B. (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(3), 826–837. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V93.3.826>
- da Glória, V. G., Martins de Araújo, M., Mafalda Santos, A., Leal, R., de Almeida, S. F., Carmo, A. M., & Moreira, A. (2014). T Cell Activation Regulates CD6 Alternative Splicing by Transcription Dynamics and SRSF1. *The Journal of Immunology*, 193(1), 391–399. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1400038/-/DCSUPPLEMENTAL>
- Dasu, T., Qualls, J. E., Tuna, H., Raman, C., Cohen, D. A., & Bondada, S. (2008). CD5 plays an inhibitory role in the suppressive function of murine CD4(+) CD25(+) T(reg) cells. *Immunology Letters*, 119(1–2), 103–113. <https://doi.org/10.1016/J.IMLET.2008.05.008>
- de La Fuente, H., Perez-Gala, S., Bonay, P., Cruz-Adalia, A., Cibrian, D., Sanchez-Cuellar, S., Dauden, E., Fresno, M., García-Diez, A., & Sanchez-Madrid, F. (2012). Psoriasis in humans is associated with down-regulation of galectins in dendritic cells. *The Journal of Pathology*, 228(2), 193–203. <https://doi.org/10.1002/PATH.3996>
- de Velde, H. van, von Hoegen, I., Luo, W., Parnes, J. R., & Thielemans, K. (1991). The B-cell surface protein CD72/Lyb-2 is the ligand for CDS. *Nature*, 351(6328), 662–665. <https://doi.org/10.1038/351662a0>

- Delgado, J., Bielig, T., Bonet, L., Carnero-Montoro, E., Puente, X. S., Colomer, D., Bosch, E., Campo, E., & Lozano, F. (2017). Impact of the functional CD5 polymorphism A471V on the response of chronic lymphocytic leukaemia to conventional chemotherapy regimens. *British Journal of Haematology*, *177*(1), 147–150. <https://doi.org/10.1111/bjh.14037>
- Dennehy, K. M., Broszeit, R., Ferris, W. F., & Beyers, A. D. (n.d.). *Thymocyte activation induces the association of the proto-oncoprotein c-cbl and ras GTPase-activating protein with CD5*. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199805\)28:05](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199805)28:05)
- Dennehy, K. M., Ferris, W. F., Veenstra, H., Zuckerman, L. A., Killeen, N., & Beyers, A. D. (2001). Determination of the tyrosine phosphorylation sites in the T cell transmembrane glycoprotein CD5. *International Immunology*, *13*(2), 149–156. <https://doi.org/10.1093/INTIMM/13.2.149>
- Devaud, C., Yong, C. S. M., John, L. B., Westwood, J. A., Duong, C. P. M., House, C. M., Denoyer, D., Li, J., Darcy, P. K., & Kershaw, M. H. (2014). Foxp3 Expression in Macrophages Associated with RENCA Tumors in Mice. *PLoS ONE*, *9*(9), 108670. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0108670>
- Dhirapong, A., Lleo, A., Leung, P., Gershwin, M. E., & Liu, F. T. (2009). The immunological potential of galectin-1 and -3. *Autoimmunity Reviews*, *8*(5), 360–363. <https://doi.org/10.1016/J.AUTREV.2008.11.009>
- Díaz, Y., Ramos-Suzarte, M., Martín, Y., Calderón, N. A., Santiago, W., Viñet, O., la O, Y., Oyarzábal, J. P. A., Pérez, Y., Lorenzo, G., Cepeda, M., Saavedra, D., Mazorra, Z., Estevez, D., Lorenzo-Luaces, P., Valenzuela, C., Caballero, A., Leon, K., Crombet, T., & Hidalgo, C. J. (2020). Use of a Humanized Anti-CD6 Monoclonal Antibody (Itolizumab) in Elderly Patients with Moderate COVID-19. *Gerontology*, *66*(6), 553–561. <https://doi.org/10.1159/000512210>
- Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., & Gingeras, T. R. (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, *29*(1), 15–21. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTS635>

- Doğaner, B. A., Yan, L. K. Q., & Youk, H. (2016). Autocrine Signaling and Quorum Sensing: Extreme Ends of a Common Spectrum. *Trends in Cell Biology*, 26(4), 262–271. <https://doi.org/10.1016/J.TCB.2015.11.002>
- Dogra, S., D, S., & Rajagopalan, M. (2020). Anti-CD6 mAbs for the treatment of psoriasis. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 1–7. <https://doi.org/10.1080/14712598.2020.1776254>
- EL, R., R, G., JM, R., M, W., AC, P., RE, H., KA, F., JF, D., H, L., FS, R., & SF, S. (1982). Reconstitution after transplantation with T-lymphocyte-depleted HLA haplotype-mismatched bone marrow for severe combined immunodeficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(19), 6047–6051. <https://doi.org/10.1073/PNAS.79.19.6047>
- Ellinghaus, D., Jostins, L., Spain, S. L., Cortes, A., Bethune, J., Han, B., Park, Y. R., Raychaudhuri, S., Pouget, J. G., Hübenthal, M., Folseraas, T., Wang, Y., Esko, T., Metspalu, A., Westra, H. J., Franke, L., Pers, T. H., Weersma, R. K., Collij, V., ... Franke, A. (2016). Analysis of five chronic inflammatory diseases identifies 27 new associations and highlights disease-specific patterns at shared loci. *Nature Genetics*. <https://doi.org/10.1038/ng.3528>
- Enouz, S., Carrié, L., Merkler, D., Bevan, M. J., & Zehn, D. (2012). Autoreactive T cells bypass negative selection and respond to self-antigen stimulation during infection. *The Journal of Experimental Medicine*, 209(10), 1769–1779. <https://doi.org/10.1084/JEM.20120905>
- Enyindah-Asonye, G., Li, Y., Ruth, J. H., Spassov, D. S., Hebron, K. E., Zijlstra, A., Moasser, M. M., Wang, B., Singer, N. G., Cui, H., Ohara, R. A., Rasmussen, S. M., Fox, D. A., & Lin, F. (2017). CD318 is a ligand for CD6. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1704008114>
- Enyindah-Asonye, G., Li, Y., Xin, W., Singer, N. G., Gupta, N., Fung, J., & Lin, F. (2017). CD6 Receptor Regulates Intestinal Ischemia/Reperfusion-induced Injury by Modulating Natural IgM-producing B1a Cell Self-renewal. *The Journal of Biological Chemistry*, 292(2), 661–671. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.749804>

- Escoda-Ferran, C., Carrasco, E., Caballero-Baños, M., Miró-Julià, C., Martínez-Florensa, M., Consuegra-Fernández, M., Martínez, V. G., Liu, F. T., & Lozano, F. (2014). Modulation of CD6 function through interaction with Galectin-1 and -3. *FEBS Letters*, *588*(17), 2805–2813. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.05.064>
- Feng, J., Xu, H., Cinquina, A., Wu, Z., Chen, Q., Zhang, P., Wang, X., Shan, H., Xu, L., Zhang, Q., Sun, L., Zhang, W., Pinz, K. G., Wada, M., Jiang, X., Hanes, W. M., Ma, Y., & Zhang, H. (2021). Treatment of Aggressive T Cell Lymphoblastic Lymphoma/leukemia Using Anti-CD5 CAR T Cells. *Stem Cell Reviews and Reports*, *17*(2), 652–661. <https://doi.org/10.1007/S12015-020-10092-9>
- Fenutría, R., Martinez, V. G., Simões, I., Postigo, J., Gil, V., Martínez-Florensa, M., Sintes, J., Naves, R., Cashman, K. S., Alberola-Ila, J., Ramos-Casals, M., Soldevila, G., Raman, C., Merino, J., Merino, R., Engel, P., & Lozano, F. (2014). Transgenic expression of soluble human CD5 enhances experimentally-induced autoimmune and anti-tumoral immune responses. *PloS One*, *9*(1), e84895. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084895>
- Filgueira, L. M., Cervantes, J. B., Lovelle, O. A., Herrera, C., Figueredo, C., Caballero, J. A., Sánchez, N., Berrio, J., Lorenzo, G., Cepeda, M., Ramos, M., Saavedra, D., Añe-Kouri, A. L., Mazorra, Z., Leon, K., Crombet, T., & Caballero, A. (2021). An anti-CD6 antibody for the treatment of COVID-19 patients with cytokine-release syndrome: report of three cases. *Immunotherapy*, *13*(4), 289–295. <https://doi.org/10.2217/IMT-2020-0235>
- Flühmann, B., Muff, R., Hunziker, W., Fischer, J. A., & Born, W. (1995). A human orphan calcitonin receptor-like structure. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *206*(1), 341–347. <https://doi.org/10.1006/BBRC.1995.1047>
- Fong, T. A., & Mosmann, T. R. (1989). The role of IFN-gamma in delayed-type hypersensitivity mediated by Th1 clones. *The Journal of Immunology*, *143*(9).
- Friedlein, G., Hage, F. el, Vergnon, I., Richon, C., Saulnier, P., Lécluse, Y., Caignard, A., Boumsell, L., Bismuth, G., Chouaib, S., & Mami-Chouaib, F. (2007). Human CD5 Protects Circulating Tumor Antigen-Specific CTL from Tumor-Mediated Activation-Induced Cell Death. *The Journal of Immunology*, *178*(11), 6821–6827. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.178.11.6821>

- Fulton, R. B., Hamilton, S. E., Xing, Y., Adam Best, J., Goldrath, A. W., Hogquist, K. A., & Jameson, S. C. (2015). The TCR's sensitivity to self peptide-MHC dictates the ability of naive CD8 + T cells to respond to foreign antigens. *Nature Immunology* *VOLUME, 16*. <https://doi.org/10.1038/ni.3043>
- Funakoshi, S., Longo, D. L., Beckwith, M., Conley, D. K., Tsarfaty, G., Tsarfaty, I., Armitage, R. J., Fanslow, W. C., Spriggs, M. K., & Murphy, W. J. (1994). Inhibition of human B-cell lymphoma growth by CD40 stimulation. *Blood*, *83*(10), 2787–2794. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V83.10.2787.2787>
- Gangemi, R. M., Swack, J. A., Gaviria, D. M., & Romain, P. L. (1989). Anti-T12, an anti-CD6 monoclonal antibody, can activate human T lymphocytes. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *143*(8), 2439–2447. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2794503/>
- Garaud, S., le Dantec, C., Berthou, C., Lydyard, P. M., Youinou, P., & Renaudineau, Y. (2008). Selection of the alternative exon 1 from the cd5 gene down-regulates membrane level of the protein in B lymphocytes. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *181*(3), 2010–2018. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.181.3.2010>
- Garcia Santana, C. A., Tung, J. W., & Gulnik, S. (2014). Human treg cells are characterized by low/negative CD6 expression. *Cytometry Part A*, *85*(10), 901–908. <https://doi.org/10.1002/CYTO.A.22513>
- Garín, M. I., Chu, N. C., Golshayan, D., Cernuda-Morollón, E., Wait, R., & Lechler, R. I. (2007). Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells. *Blood*, *109*(5), 2058–2065. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2006-04-016451>
- Garton, K. J., Gough, P. J., & Raines, E. W. (2006). Emerging roles for ectodomain shedding in the regulation of inflammatory responses. *Journal of Leukocyte Biology*, *79*(6), 1105–1116. <https://doi.org/10.1189/JLB.0106038>
- Gary-Gouy, H., Harriague, J., Bismuth, G., Platzer, C., Schmitt, C., & Dalloul, A. H. (2002). Human CD5 promotes B-cell survival through stimulation of autocrine IL-10 production. *Blood*, *100*(13), 4537–4543. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2002-05-1525>
- Gary-Gouy, H., Sainz-Perez, A., Marteau, J.-B., Marfaing-Koka, A., Delic, J., Merle-Beral, H., Galanaud, P., & Dalloul, A. (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. *The Journal of Immunology*, 179(7), 4335–4344. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.7.4335>
- Gimferrer, I., Calvo, M., Mittelbrunn, M., Farnós, M., Sarrias, M. R., Enrich, C., Vives, J., Sánchez-Madrid, F., & Lozano, F. (2004). Relevance of CD6-Mediated Interactions in T Cell Activation and Proliferation. *The Journal of Immunology*, 173(4), 2262–2270. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.4.2262>
- Gimferrer, I., Farnós, M., Calvo, M., Mittelbrunn, M., Enrich, C., Sánchez-Madrid, F., Vives, J., & Lozano, F. (2003). The accessory molecules CD5 and CD6 associate on the membrane of lymphoid T cells. *Journal of Biological Chemistry*, 278(10), 8564–8571. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209591200>
- Gimferrer, I., Ibáñez, A., Farnós, M., Sarrias, M.-R., Fenutría, R., Roselló, S., Zimmermann, P., David, G., Vives, J., Serra-Pagès, C., & Lozano, F. (2005). The Lymphocyte Receptor CD6 Interacts with Syntenin-1, a Scaffolding Protein Containing PDZ Domains. *The Journal of Immunology*, 175(3), 1406–1414. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.175.3.1406>
- Gogolin-Ewens, K., Meeusen, E., Lee, C. -S., & Brandon, M. (1989). Expression of CD5, a lymphocyte surface antigen on the endothelium of blood vessels. *European Journal of Immunology*, 19(5), 935–938. <https://doi.org/10.1002/EJI.1830190522>
- Gonçalves, C. M., Henriques, S. N., Santos, R. F., & Carmo, A. M. (2018). CD6, a rheostat-type signalosome that tunes T cell activation. *Frontiers in Immunology*, 9(December), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02994>
- Gurrea-Rubio, M., & Fox, D. A. (2022). The dual role of CD6 as a therapeutic target in cancer and autoimmune disease. *Frontiers in Medicine*, 9, 2973. <https://doi.org/10.3389/FMED.2022.1026521/BIBTEX>
- Haas, K. M., & Estes, D. M. (2001). The identification and characterization of a ligand for bovine CD5. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 166(5), 3158–3166. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.166.5.3158>
- Hannun, Y. A. (1996). Functions of Ceramide in Coordinating Cellular Responses to Stress. *Science*, 274(5294), 1855–1859. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.274.5294.1855>

- Hassan, N. J., Barclay, A. N., & Brown, M. H. (2004). Frontline: Optimal T cell activation requires the engagement of CD6 and CD166. *European Journal of Immunology*, 34(4), 930–940. <https://doi.org/10.1002/EJI.200424856>
- Hassan, N. J., Simmonds, S. J., Clarkson, N. G., Hanrahan, S., Puklavec, M. J., Bomb, M., Barclay, A. N., & Brown, M. H. (2006). CD6 regulates T-cell responses through activation-dependent recruitment of the positive regulator SLP-76. *Molecular and Cellular Biology*, 26(17), 6727–6738. <https://doi.org/10.1128/MCB.00688-06>
- Havelock Wortis, H. (2002). Origin and Functions of B-1 Cells with Notes on the Role of CD5. *Article in Annual Review of Immunology*. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.100301.064833>
- Hem, C. D., Ekornhol, M., Granum, S., Sundvold-Gjerstad, V., & Spurkland, A. (2017). CD6 and Linker of Activated T Cells are Potential Interaction Partners for T Cell-Specific Adaptor Protein. *Scandinavian Journal of Immunology*, 85(2), 104–112. <https://doi.org/10.1111/sji.12513>
- Hernández, A. S. (2009). Células colaboradoras (TH1, TH2, TH17) y reguladoras (Treg, TH3, NKT) en la artritis reumatoide. *Reumatología Clínica*, 5(SUPPL. 1), 1–5. <https://doi.org/10.1016/J.REUMA.2008.11.012>
- Hippen, K. L., Tze, L. E., & Behrens, T. W. (2000). Cd5 Maintains Tolerance in Anergic B Cells. *Journal of Experimental Medicine*, 191(5), 883–890. <https://doi.org/10.1084/JEM.191.5.883>
- Hollander, 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(2), 1148–1151. <https://doi.org/10.1073/PNAS.78.2.1148>
- Ibáñez, A., Sarrias, M.-R., Farnós, M., Gimferrer, I., Serra-Pagès, C., Vives, J., & Lozano, F. (2006). Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway Activation by the CD6 Lymphocyte Surface Receptor. *The Journal of Immunology*, 177(2), 1152–1159. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.177.2.1152>
- Imboden, J. B., June, C. H., McCutcheon, M. A., & Ledbetter, J. A. (1990). Stimulation of CD5 enhances signal transduction by the T cell antigen receptor. *The Journal of Clinical Investigation*, 85(1), 130–134. <https://doi.org/10.1172/JCI114402>

- Izquierdo Cano, L. M., Espinosa Estrada, E. E., Hernández Padrón, C., Ramón Rodríguez, L. G., Ávila Cabrera, O. M., Hernández Ramírez, P., Montero Casimiro, J. E., & Hernández Casaña, P. (2014). Anticuerpo monoclonal humanizado itolizumab (anti-cd6) en síndromes linfoproliferativos cd 6+. Experiencia preliminar. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 30(3), 0–0. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-02892014000300008&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892014000300008&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
- Jaseb, K., Purrahan, D., Shahrabi, S., Ghanavat, M., Rezaeean, H., & Saki, N. (2019). Prognostic significance of aberrant CD5 expression in B-cell leukemia. *Oncology Reviews*, 13(1), 77–82. <https://doi.org/10.4081/ONCOL.2019.400>
- Jayaraman, P., Jacques, M. K., Zhu, C., Steblenko, K. M., Stowell, B. L., Madi, A., Anderson, A. C., Kuchroo, V. K., & Behar, S. M. (2016). TIM3 Mediates T Cell Exhaustion during Mycobacterium tuberculosis Infection. *PLoS Pathogens*, 12(3). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1005490>
- Jin, Q. Y., Li, Y. S., Qiao, X. H., Yang, J. W., & Guo, X. L. (2021). Targeting galectins in T cell-based immunotherapy within tumor microenvironment. *Life Sciences*, 277, 119426. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2021.119426>
- Julenius, K., Mølgaard, A., Gupta, R., & Brunak, S. (2005). Prediction, conservation analysis, and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites. *Glycobiology*, 15(2), 153–164. <https://doi.org/10.1093/GLYCOB/CWH151>
- Kamoun, M., Kadin, M. E., Martin, P. J., Nettleton, J., & Hansen, J. A. (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. *The Journal of Immunology*, 127(3).
- Kato, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Matsui, K., Uematsu, S., Jung, A., Kawai, T., Ishii, K. J., Yamaguchi, O., Otsu, K., Tsujimura, T., Koh, C. S., Reis E Sousa, C., Matsuura, Y., Fujita, T., & Akira, S. (2006). Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature*, 441(7089), 101–105. <https://doi.org/10.1038/NATURE04734>
- Kemp, K. L., Levin, S. D., Bryce, P. J., & Stein, P. L. (2010). Lck mediates Th2 differentiation through effects on T-bet and GATA-3. *Journal of Immunology*

- (Baltimore, Md. : 1950), 184(8), 4178–4184.  
<https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.0901282>
- Kigerl, K. A., de Rivero Vaccari, J. P., Dietrich, W. D., Popovich, P. G., & Keane, R. W. (2014). Pattern recognition receptors and central nervous system repair. *Experimental Neurology*, 258, 5–16.  
<https://doi.org/10.1016/J.EXPNEUROL.2014.01.001>
- Kikuchi, T., Uehara, S., Ariga, H., Tokunaga, T., Kariyone, A., Tamura, T., & Takatsu, K. (2006). Augmented induction of CD8+ cytotoxic T-cell response and antitumour resistance by T helper type 1-inducing peptide. *Immunology*, 117(1), 47–58.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2005.02262.x>
- Kim, D. H., Sandoval, D., Reed, J. A., Matter, E. K., Tolod, E. G., Woods, S. C., & Seeley, R. J. (2008). The role of GM-CSF in adipose tissue inflammation. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 295(5).  
<https://doi.org/10.1152/AJPENDO.00061.2008>
- Kishimoto, H., & Sprent, J. (1999). Several Different Cell Surface Molecules Control Negative Selection of Medullary Thymocytes. *Journal of Experimental Medicine*, 190(1), 65–74. <https://doi.org/10.1084/JEM.190.1.65>
- Kopp, E. B., & Medzhitov, R. (1999). The Toll-receptor family and control of innate immunity. *Current Opinion in Immunology*, 11(1), 13–18.  
[https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(99\)80003-X](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(99)80003-X)
- Kops, S. K., van Loveren, H., Rosenstein, R. W., Ptak, W., & Askenase, P. W. (1984). Mast cell activation and vascular alterations in immediate hypersensitivity-like reactions induced by a T cell-derived antigen-binding factor. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 50(4), 421–434.  
<https://europepmc.org/article/med/6608629>
- Kreymborg, K., Etzensperger, R., Dumoutier, L., Haak, S., Rebollo, A., Buch, T., Heppner, F. L., Renaud, J.-C., & Becher, B. (2007). IL-22 is expressed by Th17 cells in an IL-23-dependent fashion, but not required for the development of autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 179(12), 8098–8104. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.179.12.8098>

- Krupashankar, D. S., Dogra, S., Kura, M., Saraswat, A., Budamakuntla, L., Sumathy, T. K., Shah, R., Gopal, M. G., Narayana Rao, T., Srinivas, C. R., Bhat, R., Shetty, N., Manmohan, G., Sai Krishna, K., Padmaja, D., Pratap, D. V. S., Garg, V., Gupta, S., Pandey, N., ... Ganapathi, P. C. (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. *Journal of the American Academy of Dermatology*, *71*(3), 484–492. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2014.01.897>
- Kumar, V., Abbas, A. K., Aster, J. C., & Perkins, J. A. (2021). Robbins y Cotran, patología estructural y funcional. *Elsevier Wordmark*. <https://www.elsevier.com/books/robbins-y-cotran-patologia-estructural-y-funcional/kumar/978-84-9113-911-9>
- Lankester, A. C., van Schijndel, G. M. W., Cordell, J. L., van Noesel, C. J. M., & van Lier, R. A. W. (1994). CD5 is associated with the human B cell antigen receptor complex. *European Journal of Immunology*, *24*(4), 812–816. <https://doi.org/10.1002/EJI.1830240406>
- Lanzavecchia, A., & Sallusto, F. (2001). Antigen decoding by T lymphocytes: from synapses to fate determination. *Nature Immunology 2001 2:6*, *2*(6), 487–492. <https://doi.org/10.1038/88678>
- Larkin, J., Chiarion-Sileni, V., Gonzalez, R., Grob, J. J., Cowey, C. L., Lao, C. D., Schadendorf, D., Dummer, R., Smylie, M., Rutkowski, P., Ferrucci, P. F., Hill, A., Wagstaff, J., Carlino, M. S., Haanen, J. B., Maio, M., Marquez-Rodas, I., McArthur, G. A., Ascierto, P. A., ... Wolchok, J. D. (2015). Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *The New England Journal of Medicine*, *373*(1), 23–34. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA1504030>
- Law, C. W., Chen, Y., Shi, W., & Smyth, G. K. (2014). Voom: Precision weights unlock linear model analysis tools for RNA-seq read counts. *Genome Biology*, *15*(2), 1–17. <https://doi.org/10.1186/GB-2014-15-2-R29/FIGURES/11>
- le Dantec, C., Alonso, R., Fali, T., Montero, E., Devauchelle, V., Saraux, A., Pers, J. O., & Renaudineau, Y. (2013). Rationale for treating primary Sjögren's syndrome patients with an anti-CD6 monoclonal antibody (Itolizumab). *Immunologic*

*Research*, 56(2–3), 341–347. <https://doi.org/10.1007/S12026-013-8423-X/FIGURES/4>

Lecomte, O., Bock, J. B., Birren, B. W., Vollrath, D., & Parnes, J. R. (1996). Molecular linkage of the mouse CD5 and CD6 genes. *Immunogenetics* 1996 44:5, 44(5), 385–390. <https://doi.org/10.1007/BF02602784>

Ledbetter, J. A., Martin, P. J., Spooner, C. E., Wofsy, D., Tsu, T. T., Beatty, P. G., & Gladstone, P. (1985). Antibodies to Tp67 and Tp44 augment and sustain proliferative responses of activated T cells. *The Journal of Immunology*, 135(4).

Ledbetter, J. A., Rouse, R. v., Micklem, H. S., & Herzenberg, L. A. (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. *The Journal of Experimental Medicine*, 152(2), 280–295. <https://doi.org/10.1084/JEM.152.2.280>

Lenz, L. L. (2009). CD5 sweetens lymphocyte responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(5), 1303. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0812579106>

Leung, S., Smith, D., Myc, A., Morry, J., & Baker, J. R. (2013). OT-II TCR transgenic mice fail to produce anti-ovalbumin antibodies upon vaccination. *Cellular Immunology*, 282(2), 79–84. <https://doi.org/10.1016/J.CELLIMM.2012.12.006>

Li, B., & Dewey, C. N. (2011). RSEM: Accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics*, 12(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-323/TABLES/6>

Li, H., Burgueno-Bucio, E., Xu, S., Das, S., Olguin-Alor, R., Elmets, C. A., Athar, M., Raman, C., Soldevila, G., & Xu, H. (2019). CD5 on dendritic cells regulates CD4+ and CD8+ T cell activation and induction of immune responses. *PloS One*, 14(9). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0222301>

Li, Y., Ruth, J. H., Rasmussen, S. M., Athukorala, K. S., Weber, D. P., Amin, M. A., Campbell, P. L., Singer, N. G., Fox, D. A., & Lin, F. (2020). Targeting CD6 Attenuates Murine Collagen Induced Arthritis. *Arthritis & Rheumatology*, 0–2. <https://doi.org/10.1002/art.41288>

- Li, Y., Singer, N. G., Whitbred, J., Bowen, M. A., Fox, D. A., & Lin, F. (2017). CD6 as a potential target for treating multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(10), 2687–2692. [https://doi.org/10.1073/PNAS.1615253114/SUPPL\\_FILE/PNAS.201615253SI.PDF](https://doi.org/10.1073/PNAS.1615253114/SUPPL_FILE/PNAS.201615253SI.PDF)
- Liechtenstein, T., Dufait, I., Bricogne, C., Lanna, A., Pen, J., Breckpot, K., & Escors, D. (2012). PD-L1/PD-1 Co-Stimulation, a Brake for T cell Activation and a T cell Differentiation Signal. *Journal of Clinical & Cellular Immunology, Suppl 12*(S12). <https://doi.org/10.4172/2155-9899.S12-006>
- Liu, F. T. (2005). Regulatory roles of galectins in the immune response. *International Archives of Allergy and Immunology*, *136*(4), 385–400. <https://doi.org/10.1159/000084545>
- M. Kofler, D., Farkas, A., von Bergwelt-Baildon, M., & A. Hafler, D. (2016). The Link Between CD6 and Autoimmunity: Genetic and Cellular Associations. *Current Drug Targets*. <https://doi.org/10.2174/1389450117666160201105934>
- Macián, F., García-Cózar, F., Im, S. H., Horton, H. F., Byrne, M. C., & Rao, A. (2002). Transcriptional Mechanisms Underlying Lymphocyte Tolerance. *Cell*, *109*(6), 719–731. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00767-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00767-5)
- Martín, P., Gómez, M., Lamana, A., Marín, A. M., Cortés, J. R., Ramírez-Huesca, M., Barreiro, O., López-Romero, P., Gutiérrez-Vázquez, C., de La Fuente, H., Cruz-Adalia, A., & Sánchez-Madrid, F. (2010). The leukocyte activation antigen CD69 limits allergic asthma and skin contact hypersensitivity. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *126*(2). <https://doi.org/10.1016/J.JACI.2010.05.010>
- Martínez, V. G., Moestrup, S. K., Holmskov, U., Mollenhauer, J., & Lozano, F. (2011). The Conserved Scavenger Receptor Cysteine-Rich Superfamily in Therapy and Diagnosis. *Pharmacological Reviews*, *63*(4), 967–1000. <https://doi.org/10.1124/PR.111.004523>
- Martínez-Florensa, M., Català, C., Velasco-de Andrés, M., Cañadas, O., Fraile-ágreda, V., Casadó-Llobart, S., Armiger-Borràs, N., Consuegra-Fernández, M., Casals, C., & Lozano, F. (2018). Conserved bacterial-binding peptides of the scavenger-like

- human lymphocyte receptor CD6 protect from mouse experimental sepsis. *Frontiers in Immunology*, 9(APR), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00627>
- Martínez-Florensa, M., Consuegra-Fernández, M., Aranda, F., Armiger-Borràs, N., di Scala, M., Carrasco, E., Pachón, J., Vila, J., González-Aseguinolaza, G., & Lozano, F. (2017). Protective Effects of Human and Mouse Soluble Scavenger-Like CD6 Lymphocyte Receptor in a Lethal Model of Polymicrobial Sepsis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(1), e01391-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.01391-16>
- Martínez-Florensa, M., Consuegra-Fernández, M., Martínez, V. G., Cañadas, O., Armiger-Borràs, N., Bonet-Roselló, L., Farrán, A., Vila, J., Casals, C., & Lozano, F. (2014). Targeting of Key Pathogenic Factors From Gram-Positive Bacteria by the Soluble Ectodomain of the Scavenger-Like Lymphocyte Receptor CD6. *The Journal of Infectious Diseases*, 209(7), 1077–1086. <https://doi.org/10.1093/INFDIS/JIT624>
- Masuda, K., & Kishimoto, T. (2016). CD5: A New Partner for IL-6. *Immunity*, 44(4), 720–722. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.03.011>
- Matson, C. A., Choi, S., Livak, F., Zhao, B., Mitra, A., Love, P. E., & Singh, N. J. (2020). CD5 dynamically calibrates basal NF- $\kappa$ B signaling in T cells during thymic development and peripheral activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(25), 14342–14353. [https://doi.org/10.1073/PNAS.1922525117/SUPPL\\_FILE/PNAS.1922525117.SAPP.PDF](https://doi.org/10.1073/PNAS.1922525117/SUPPL_FILE/PNAS.1922525117.SAPP.PDF)
- Mayer, B., Funke, I., Seed, B., Riethmiiller, G., & Weiss, E. (1990). Expression of the CD6 T lymphocyte differentiation antigen in normal human brain. *Journal of Neuroimmunology*, 29, 193–202.
- Mayya, V., & Dustin, M. L. (2016). What Scales the T Cell Response? *Trends in Immunology*, 37(8), 513–522. <https://doi.org/10.1016/J.IT.2016.06.005>
- McHale, J. F., Harari, O. A., Marshall, D., & Haskard, D. O. (1999). Vascular Endothelial Cell Expression of ICAM-1 and VCAM-1 at the Onset of Eliciting Contact Hypersensitivity in Mice: Evidence for a Dominant Role of TNF- $\alpha$ . *The Journal of Immunology*, 162(3).

- Menk, A. v., Scharping, N. E., Moreci, R. S., Zeng, X., Guy, C., Salvatore, S., Bae, H., Xie, J., Young, H. A., Wendell, S. G., & Delgoffe, G. M. (2018). Early TCR Signaling Induces Rapid Aerobic Glycolysis Enabling Distinct Acute T Cell Effector Functions. *Cell Reports*, 22(6), 1509–1521. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2018.01.040>
- Miles, S., Velasco-de-Andrés, M., Lozano, F., & Mourglia-Ettlin, G. (2020). Interactome analysis of CD5 and CD6 ectodomains with tegumental antigens from the helminth parasite *Echinococcus granulosus sensu lato*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 3718–3728. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2020.08.219>
- Moreno-Estrada, A., Tang, K., Sikora, M., Marquès-Bonet, T., Casals, F., Navarro, A., Calafell, F., Bertranpetit, J., Stoneking, M., & Bosch, E. (2009). Interrogating 11 fast-evolving genes for signatures of recent positive selection in worldwide human populations. *Molecular Biology and Evolution*, 26(10), 2285–2297. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp134>
- Moreno-Manuel, A., Jantus-Lewintre, E., Simões, I., Aranda, F., Calabuig-Fariñas, S., Carreras, E., Zúñiga, S., Saenger, Y., Rosell, R., Camps, C., Lozano, F., & Sirera, R. (2020). CD5 and CD6 as immunoregulatory biomarkers in non-small cell lung cancer. *Translational Lung Cancer Research*, 9(4), 1074–1083. <https://doi.org/10.21037/TLCR-19-445>
- Mori, D., Grégoire, C., Voisinne, G., Celis-Gutierrez, J., Aussel, R., Girard, L., Camus, M., Marcellin, M., Argenty, J., Bulet-Schiltz, O., Fiore, F., de Peredo, A. G., Malissen, M., Roncagalli, R., & Malissen, B. (2021). The T cell CD6 receptor operates a multitask signalosome with opposite functions in T cell activation. *Journal of Experimental Medicine*, 218(2). <https://doi.org/10.1084/JEM.20201011>
- Morimoto, C., Rudd, C. E., Letvin, N. L., Hagan, M., & Schlossman, S. F. (1988). 2H1-a novel antigen involved in T lymphocyte triggering. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 140(7), 2165–2170. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2895150/>
- Mourglia-Ettlin, G., Miles, S., Velasco-De-Andrés, M., Armiger-Borràs, N., Cucher, M., Dematteis, S., & Lozano, F. (2018). The ectodomains of the lymphocyte scavenger

- receptors CD5 and CD6 interact with tegumental antigens from *Echinococcus granulosus sensu lato* and protect mice against secondary cystic echinococcosis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12(11), 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006891>
- Nazimek, K., Bryniarski, K., Ptak, W., Kormelink, T. G., & Askenase, P. W. (2020). Orally Administered Exosomes Suppress Mouse Delayed-Type Hypersensitivity by Delivering miRNA-150 to Antigen-Primed Macrophage APC Targeted by Exosome-Surface Anti-Peptide Antibody Light Chains. *International Journal of Molecular Sciences* 2020, Vol. 21, Page 5540, 21(15), 5540. <https://doi.org/10.3390/IJMS21155540>
- Nica, M., Castro, A. A., Nunes, R. J., Oliveira, M. I., Tavares, P. A., Simão, C., Parnes, J. R., Moreira, A., & Carmo, A. M. (2003). OX52 is the rat homologue of CD6: evidence for an effector function in the regulation of CD5 phosphorylation. *Journal of Leukocyte Biology*, 73(1), 183–190. <https://doi.org/10.1189/JLB.0902437>
- Nüchel, H., Frey, U. H., Röth, A., Dührsen, U., & Siffert, W. (2005). Alemtuzumab induces enhanced apoptosis in vitro in B-cells from patients with chronic lymphocytic leukemia by antibody-dependent cellular cytotoxicity. *European Journal of Pharmacology*, 514(2–3), 217–224. <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2005.03.024>
- Oliveira, M. I., Gonçalves, C. M., Pinto, M., Fabre, S., Santos, A. M., Lee, S. F., Castro, M. A. A., Nunes, R. J., Barbosa, R. R., Parnes, J. R., Yu, C., Davis, S. J., Moreira, A., Bismuth, G., & Carmo, A. M. (2012). CD6 attenuates early and late signaling events, setting thresholds for T-cell activation. *European Journal of Immunology*, 42(1), 195–205. <https://doi.org/10.1002/EJI.201040528>
- Ordoñez-Rueda, D., Lozano, F., Sarukhan, A., Raman, C., Garcia-Zepeda, E. A., & Soldevila, G. (2009a). Increased numbers of thymic and peripheral CD4+ CD25+Foxp3+ cells in the absence of CD5 signaling. *European Journal of Immunology*, 39(8), 2233–2247. <https://doi.org/10.1002/EJI.200839053>
- Ordoñez-Rueda, D., Lozano, F., Sarukhan, A., Raman, C., Garcia-Zepeda, E. A., & Soldevila, G. (2009b). Increased numbers of thymic and peripheral CD4+

- CD25+Foxp3+ cells in the absence of CD5 signaling. *European Journal of Immunology*, 39(8), 2233–2247. <https://doi.org/10.1002/EJI.200839053>
- Orta-Mascaró, M., Consuegra-Fernández, M., Carreras, E., Roncagalli, R., Carreras-Sureda, A., Alvarez, P., Girard, L., Simões, I., Martínez-Florensa, M., Aranda, F., Merino, R., Martínez, V. G., Vicente, R., Merino, J., Sarukhan, A., Malissen, M., Malissen, B., & Lozano, F. (2016). CD6 modulates thymocyte selection and peripheral T cell homeostasis. *Journal of Experimental Medicine*, 213(8), 1387–1397. <https://doi.org/10.1084/jem.20151785>
- Osman, N., Ley, S. C., & Crumpton, M. J. (1992). Evidence for an association between the T cell receptor/CD3 antigen complex and the CD5 antigen in human T lymphocytes. *European Journal of Immunology*, 22(11), 2995–3000. <https://doi.org/10.1002/EJI.1830221135>
- Osorio, L. M., de Santiago, A., Aguilar-Santelises, M., Mellstedt, H., & Jondal, M. (1997). CD6 ligation modulates the Bcl-2/Bax ratio and protects chronic lymphocytic leukemia B cells from apoptosis induced by anti-IgM. *Blood*, 89(8), 2833–2841. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V89.8.2833>
- Osorio, L. M., Garcia, C. A., Jondal, M., & Chow, S. C. (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. *Cellular Immunology*, 154(1), 123–133. <https://doi.org/10.1006/CIMM.1994.1062>
- Osorio, L. M., Jondal, M., & Aguilar-Santelises, M. (1998). Regulation of B-CLL apoptosis through membrane receptors and Bcl-2 family proteins. *Leukemia and Lymphoma*, 30(3–4), 247–256. <https://doi.org/10.3109/10428199809057538>
- Osorio, L. M., Rottenberg, M., Jondal, M., & Chow, S. C. (1998). Simultaneous cross-linking of CD6 and CD28 induces cell proliferation in resting T cells. *Immunology*, 93(3), 358–365. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2567.1998.00442.X>
- Osorio, L. M., Santiago, A. de, Aguilarsantelises, M., Mellstedt, H., & Jondal, M. (1996). CD6 ligation modulates BCL-2/BAX ratio and protects B-CLL cells from apoptosis induced by ANTI-IgM. *Biochemical Society Transactions*, 24(4). <https://doi.org/10.1042/bst024614s>

- Ou-Yang, C., Zhu, M., Fuller, D. M., Sullivan, S. A., Chuck, M. I., Ogden, S., Li, Q.-J., & Zhang, W. (2012). Role of LAT in the granule-mediated cytotoxicity of CD8 T cells. *Molecular and Cellular Biology*, 32(14), 2674–2684. <https://doi.org/10.1128/MCB.00356-12>
- Padilla, O., Calvo, J., Vila, J. M., Arman, M., Gimferrer, I., Places, L., Arias, M. T., Pujana, M. A., Vives, J., & Lozano, F. (2000). Genomic organization of the human CD5 gene. *Immunogenetics* 2000 51:12, 51(12), 993–1001. <https://doi.org/10.1007/S002510000235>
- Park, T. J., Kim, H. J., Kim, J. H., Bae, J. S., Cheong, H. S., Park, B. L., & Shin, H. D. (2013). Associations of CD6, TNFRSF1A and IRF8 polymorphisms with risk of inflammatory demyelinating diseases. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 39(5), 519–530. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2990.2012.01304.X>
- Perez-Villar, J. J., Whitney, G. S., Bowen, M. A., Hewgill, D. H., Aruffo, A. A., & Kanner, S. B. (1999). CD5 negatively regulates the T-cell antigen receptor signal transduction pathway: involvement of SH2-containing phosphotyrosine phosphatase SHP-1. *Molecular and Cellular Biology*, 19(4), 2903–2912. <https://doi.org/10.1128/MCB.19.4.2903>
- Perillo, N. L., Pace, K. E., Seilhamer, J. J., & Baum, L. G. (1995). Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature* 1995 378:6558, 378(6558), 736–739. <https://doi.org/10.1038/378736a0>
- Pharmaceutical compositions capable of inducing apoptosis in tumour cells, useful for diagnosis and treatment of b-chronic lymphocytic leukaemia.* (2007).
- Phoon, R. K. S., Kitching, A. R., Odobasic, D., Jones, L. K., Semple, T. J., & Holdsworth, S. R. (2008). T-bet deficiency attenuates renal injury in experimental crescentic glomerulonephritis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 19(3), 477–485. <https://doi.org/10.1681/ASN.2007030392>
- Pinto, M., & Carmo, A. M. (2013). CD6 as a therapeutic target in autoimmune diseases: successes and challenges. *BioDrugs : Clinical Immunotherapeutics, Biopharmaceuticals and Gene Therapy*, 27(3), 191–202. <https://doi.org/10.1007/S40259-013-0027-4>

- Plas, D. R., Johnson, R., Pingel, J. T., Matthews, R. J., Dalton, M., Roy, G., Chan, A. C., & Thomas, M. L. (1996). Direct regulation of ZAP-70 by SHP-1 in T cell antigen receptor signaling. *Science (New York, N.Y.)*, 272(5265), 1173–1176. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.272.5265.1173>
- Platnich, J. M., & Muruve, D. A. (2019). NOD-like receptors and inflammasomes: A review of their canonical and non-canonical signaling pathways. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 670, 4–14. <https://doi.org/10.1016/J.ABB.2019.02.008>
- Pospisil, R., Silverman, G. J., Marti, G. E., Aruffo, A., Bowen, M. A., & Mage, R. G. (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. *Leukemia & Lymphoma*, 36(3–4), 353–365. <https://doi.org/10.3109/10428190009148857>
- Potrony, M., Carreras, E., Aranda, F., Zimmer, L., Puig-Butille, J. A., Tell-Martí, G., Armiger, N., Sucker, A., Giménez-Xavier, P., Martínez-Florensa, M., Carrera, C., Malvehy, J., Schadendorf, D., Puig, S., & Lozano, F. (2016). Inherited functional variants of the lymphocyte receptor CD5 influence melanoma survival. *International Journal of Cancer*, 139(6), 1297–1302. <https://doi.org/10.1002/ijc.30184>
- PrabhuDas, M., Bowdish, D., Drickamer, K., Febbraio, M., Herz, J., Kobzik, L., Krieger, M., Loike, J., Means, T. K., Moestrup, S. K., Post, S., Sawamura, T., Silverstein, S., Wang, X.-Y., & el Khoury, J. (2014). Standardizing scavenger receptor nomenclature. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 192(5), 1997–2006. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1490003>
- Qin, S., Xu, L., Yi, M., Yu, S., Wu, K., & Luo, S. (2019). Novel immune checkpoint targets: moving beyond PD-1 and CTLA-4. *Molecular Cancer* 2019 18:1, 18(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/S12943-019-1091-2>
- Qiu, J., Heller, J. J., Guo, X., Chen, Z. M. E., Fish, K., Fu, Y. X., & Zhou, L. (2012). The aryl hydrocarbon receptor regulates gut immunity through modulation of innate lymphoid cells. *Immunity*, 36(1), 92–104. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2011.11.011>

- Rabinovich, G. A. (1999). Galectins: an evolutionarily conserved family of animal lectins with multifunctional properties; a trip from the gene to clinical therapy. *Cell Death & Differentiation* 1999 6:8, 6(8), 711–721. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400535>
- Raman, C., & Kimberly, R. P. (2022). *TCR/CD3-Mediated Activation on Mature and Immature T Cells: Implication in Regulation of CD5-Associated CK2 Activity Cutting Edge: Differential CD5-Dependent*. <http://www.jimmunol.org/content/161/11/5817>
- Raman, C., Kuo, A., Deshane, J., Litchfield, D. W., & Kimberly, R. P. (1998). Regulation of casein kinase 2 by direct interaction with cell surface receptor CD5. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(30), 19183–19189. <https://doi.org/10.1074/JBC.273.30.19183>
- Ramos-Casals, M., Font, J., García-Carrasco, M., Calvo, J., Places, L., Padilla, O., Cervera, R., Bowen, M. A., Lozano, F., & Ingelmo, M. (2001). High circulating levels of soluble scavenger receptors (sCD5 and sCD6) in patients with primary Sjögren's syndrome. *Rheumatology*, 40(9), 1056–1059. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/40.9.1056>
- Rasmussen, T. A., Anderson, J. L., Wightman, F., & Lewin, S. R. (2017). Cancer Therapies in HIV Cure Research. *Current Opinion in HIV and AIDS*, 12(1), 96. <https://doi.org/10.1097/COH.0000000000000328>
- Ravandi, F., & O'Brien, S. (2006). Immune defects in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII*, 55(2), 197–209. <https://doi.org/10.1007/S00262-005-0015-8>
- Robinson, W. H., de Vegvar, H. E. N., Prohaska, S. S., Rhee, J. W., & Parnes, J. R. (1995). Human CD6 possesses a large, alternatively spliced cytoplasmic domain. *European Journal of Immunology*, 25(10), 2765–2769. <https://doi.org/10.1002/EJI.1830251008>
- Robinson, W. H., Prohaska, S. S., Santoro, J. C., Robinson, H. L., & Parnes, J. R. (1995). Identification of a mouse protein homologous to the human CD6 T cell surface protein and sequence of the corresponding cDNA. *The Journal of Immunology*, 155(10).

- Rodríguez, P. C., Prada, D. M., Moreno, E., Aira, L. E., Molinero, C., López, A. M., Gómez, J. A., Hernández, I. M., Martínez, J. P., Reyes, Y., Milera, J. M., Hernández, M. v., Torres, R., Avila, Y., Barrese, Y., Viada, C., Montero, E., & Hernández, P. (2018). The anti-CD6 antibody itolizumab provides clinical benefit without lymphopenia in rheumatoid arthritis patients: results from a 6-month, open-label Phase I clinical trial. *Clinical and Experimental Immunology*, *191*(2), 229–239. <https://doi.org/10.1111/CEI.13061>
- Rodriguez, P. C., Torres-Moya, R., Reyes, G., Molinero, C., Prada, D., Lopez, A. M., Hernandez, I. M., Hernandez, M. v., Martinez, J. P., Hernandez, X., Casaco, A., Ramos, M., Avila, Y., Barrese, Y., Montero, E., & Hernandez, P. (2012). A clinical exploratory study with itolizumab, an anti-CD6 monoclonal antibody, in patients with rheumatoid arthritis. *Results in Immunology*, *2*, 204–211. <https://doi.org/10.1016/J.RINIM.2012.11.001>
- Roncagalli, R., Hauri, S., Fiore, F., Liang, Y., Chen, Z., Sansoni, A., Kanduri, K., Joly, R., Malzac, A., Lähdesmäki, H., Lahesmaa, R., Yamasaki, S., Saito, T., Malissen, M., Aebbersold, R., Gstaiger, M., & Malissen, B. (2014). Quantitative proteomic analysis of signalosome dynamics in primary T cells identifies the CD6 surface receptor as a Lat-independent TCR signaling hub. *Nature Immunology*, *15*(4), 384. <https://doi.org/10.1038/NI.2843>
- Rozovski, U., Harris, D. M., Li, P., Liu, Z., Jain, P., Veletic, I., Ferrajoli, A., Burger, J., O'brien, S., Bose, P., Thompson, P., Jain, N., Wierda, W., Keating, M. J., & Estrov, Z. (2017). Constitutive Phosphorylation of STAT3 by the CK2-BLNK-CD5 Complex. *Molecular Cancer Research: MCR*, *15*(5), 610. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-16-0291>
- Ruth, J. H., Gurrea-Rubio, M., Athukorala, K. S., Rasmussen, S. M., Weber, D. P., Randon, P. M., Gedert, R. J., Lind, M. E., Amin, M. A., Campbell, P. L., Tsou, P. S., Mao-Draayer, Y., Wu, Q., Lanigan, T. M., Keshamouni, V. G., Singer, N. G., Lin, F., & Fox, D. A. (2021). CD6 is a target for cancer immunotherapy. *JCI Insight*, *6*(5). <https://doi.org/10.1172/JCI.INSIGHT.145662>
- Sarhan, M. A., Pham, T. N. Q., Chen, A. Y., & Michalak, T. I. (2012). Hepatitis C Virus Infection of Human T Lymphocytes Is Mediated by CD5. *Journal of Virology*, *86*(7), 3723–3735. <https://doi.org/10.1128/jvi.06956-11>

- Sarrias, M. R., Farnós, M., Mota, R., Sánchez-Barbero, F., Ibáñez, A., Gimferrer, I., Vera, J., Fenutría, R., Casals, C., Yélamos, J., & Lozano, F. (2007). CD6 binds to pathogen-associated molecular patterns and protects from LPS-induced septic shock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(28), 11724–11729. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702815104>
- Sarrias, M. R., Grønlund, J., Padilla, O., Madsen, J., Holmskov, U., & Lozano, F. (2004). The Scavenger Receptor Cysteine-Rich (SRCR) Domain: An Ancient and Highly Conserved Protein Module of the Innate Immune System. *Critical Reviews & Trade; in Immunology*, *24*(1), 1–37. <https://doi.org/10.1615/CRITREVIMMUNOL.V24.I1.10>
- Sarukhan, A., Martinez-Florensa, M., Escoda-Ferran, C., Carrasco, E., Carreras, E., & Lozano, F. (2016). Pattern Recognition by CD6: A Scavenger-Like Lymphocyte Receptor. *Current Drug Targets*, *17*(6), 640–650. <https://doi.org/10.2174/1389450116666150316224308>
- Sellick, G. S., Wade, R., Richards, S., Oscier, D. G., Catovsky, D., & Houlston, R. S. (2008). Scan of 977 nonsynonymous SNPs in CLL4 trial patients for the identification of genetic variants influencing prognosis. *Blood*, *111*(3), 1625–1633. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2007-08-110130>
- Sembries, S., Pahl, H., Stilgenbauer, S., Döhner, H., & Schriever, F. (1999). Reduced Expression of Adhesion Molecules and Cell Signaling Receptors by Chronic Lymphocytic Leukemia Cells With 11q Deletion. *Blood*, *93*(2), 624–631. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V93.2.624>
- Sen, G., Bikah, G., Venkataraman, C., & Bondada, S. (n.d.). *Negative regulation of antigen receptor-mediated signaling by constitutive association of CD5 with the SHP-1 protein tyrosine phosphatase in B-1 B cells*. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199910\)29:10](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199910)29:10)
- Shaw, A. S., & Dustin, M. L. (1997). Making the T cell receptor go the distance: A topological view of T cell activation. *Immunity*, *6*(4), 361–369. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80279-4](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80279-4)
- Shi, Y., Liu, H., Liu, H., Yu, Y., Zhang, J., Li, Y., Luo, G., Zhang, X., & Xu, N. (2020). Increased expression levels of inflammatory cytokines and adhesion molecules in

- lipopolysaccharide-induced acute inflammatory apoM<sup>-/-</sup> mice. *Molecular Medicine Reports*, 22(4), 3117–3126. <https://doi.org/10.3892/MMR.2020.11426>
- Shibru, B., Fey, K., Fricke, S., Blaudszun, A. R., Fürst, F., Weise, M., Seiffert, S., Weyh, M. K., Köhl, U., Sack, U., & Boldt, A. (2021). Detection of Immune Checkpoint Receptors – A Current Challenge in Clinical Flow Cytometry. *Frontiers in Immunology*, 12, 2587. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.694055/BIBTEX>
- Simarro, M., Calvo, J., Vilà, J. M., Places, L., Padilla, O., Alberola-Ila, J., Vives, J., & Lozano, F. (1999). Signaling Through CD5 Involves Acidic Sphingomyelinase, Protein Kinase C- $\zeta$ , Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase, and c-Jun NH2-Terminal Kinase. *The Journal of Immunology*, 162(9).
- Simarro, M., Pelassy, C., Calvo, J., Places, L., Aussel, C., & Lozano, F. (1997). The cytoplasmic domain of CD5 mediates both TCR/CD3-dependent and -independent diacylglycerol production. *The Journal of Immunology*, 159(9).
- Simões, I. T., Aranda, F., Carreras, E., Velasco-de Andrés, M., Casadó-Llombart, S., Martínez, V. G., & Lozano, F. (2017). Immunomodulatory effects of soluble CD5 on experimental tumor models. *Oncotarget*, 8(64), 108156–108169. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22564>
- Simões, I. T., Aranda, F., Casadó-Llombart, S., Velasco-De Andrés, M., Català, C., Álvarez, P., Consuegra-Fernández, M., Orta-Mascaró, M., Merino, R., Merino, J., Alberola-Ila, J., González-Aseguinolaza, G., Carreras, E., Martínez, V., & Lozano, F. (2020). Multifaceted effects of soluble human CD6 in experimental cancer models. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 8(1). <https://doi.org/10.1136/jitc-2019-000172>
- Singer, N. G., Richardson, B. C., Powers, ¶ D, Hooper, F., Lialios, F., Endres, J., Bott, C. M., & Fox, D. A. (1996). Role of the CD6 glycoprotein in antigen-specific and autoreactive responses of cloned human T lymphocytes. *Immunology*, 88(4), 537. [/pmc/articles/PMC1456636/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1456636/)
- Soldevila, G., Raman, C., & Lozano, F. (2011). The immunomodulatory properties of the CD5 lymphocyte receptor in health and disease. *Current Opinion in Immunology*, 23(3), 310. <https://doi.org/10.1016/J.COI.2011.03.003>

- Sui, S., Li, Z., Tan, J., Wang, L., Luo, G., Zeng, C., Luo, O. J., Chen, C., & Li, Y. (2022). Low Expression of CD5 and CD6 Is Associated with Poor Overall Survival for Patients with T-Cell Malignancies. *Journal of Oncology*, 2022, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2022/2787426>
- Surette, F. A., Guthmiller, J. J., Li, L., Sturtz, A. J., Vijay, R., Pope, R. L., McClellan, B. L., Pack, A. D., Zander, R. A., Shao, P., Lan, L. Y. L., Fernandez-Ruiz, D., Heath, W. R., Wilson, P. C., & Butler, N. S. (2021). Extrafollicular CD4 T cell-derived IL-10 functions rapidly and transiently to support anti-Plasmodium humoral immunity. *PLoS Pathogens*, 17(2). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1009288>
- Suvas, S., Singh, V., Sahdev, S., Vohra, H., & Agrewala, J. N. (2002). Distinct role of CD80 and CD86 in the regulation of the activation of B cell and B cell lymphoma. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(10), 7766–7775. <https://doi.org/10.1074/JBC.M105902200>
- Swack, J. A., Mier, J. W., Romain, P. L., Hull, S. R., & Rudd, C. E. (1991). Biosynthesis and post-translational modification of CD6, a T cell signal-transducing molecule. *Journal of Biological Chemistry*, 266(11), 7137–7143.
- Swaminathan, B., Cuapio, A., Alloza, I., Matesanz, F., Alcina, A., García-Barcina, M., Fedetz, M., Fernández, Ó., Lucas, M., Órpez, T., Pinto-Medel, M. J., Otaegui, D., Olascoaga, J., Urcelay, E., Ortiz, M. A., Arroyo, R., Oksenberg, J. R., Antigüedad, A., Tolosa, E., & Vandembroeck, K. (2013). Fine Mapping and Functional Analysis of the Multiple Sclerosis Risk Gene CD6. *PLOS ONE*, 8(4), e62376. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0062376>
- Szczepanik, M., Akahira-Azuma, M., Bryniarski, K., Tsuji, R. F., Kawikova, I., Ptak, W., Kiener, C., Campos, R. A., & Askenase, P. W. (2003). B-1 B Cells Mediate Required Early T Cell Recruitment to Elicit Protein-Induced Delayed-Type Hypersensitivity. *The Journal of Immunology*, 171(11), 6225–6235. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.171.11.6225>
- Tabbekh, M., Franciszkiewicz, K., Haouas, H., Lécluse, Y., Benihoud, K., Raman, C., & Mami-Chouaib, F. (2011). Rescue of Tumor-Infiltrating Lymphocytes from Activation-Induced Cell Death Enhances the Antitumor CTL Response in CD5-

- Deficient Mice. *The Journal of Immunology*, 187(1), 102–109.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1004145>
- Tabbekh, M., Mokrani-Hammani, M., Bismuth, G., & Mami-Chouaib, F. (2013). T-cell modulatory properties of CD5 and its role in antitumor immune responses. *Oncoimmunology*, 2(1). <https://doi.org/10.4161/ONCI.22841>
- Tarakhovsky, A., Kanner, S. B., Hombach, J., Ledbetter, J. A., Müller, W., Killeen, N., & Rajewsky, K. (1995). A role for CD5 in TCR-mediated signal transduction and thymocyte selection. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.7542801>
- Tibaldi, E., Brunati, A. M., Zonta, F., Frezzato, F., Gattazzo, C., Zambello, R., Gringeri, E., Semenzato, G., Pagano, M. A., & Trentin, L. (2011). Lyn-mediated SHP-1 recruitment to CD5 contributes to resistance to apoptosis of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia*, 25(11), 1768–1781.  
<https://doi.org/10.1038/LEU.2011.152>
- Tscharke, D. C., Croft, N. P., Doherty, P. C., & la Gruta, N. L. (2015). Sizing up the key determinants of the CD8(+) T cell response. *Nature Reviews. Immunology*, 15(11), 705–716. <https://doi.org/10.1038/NRI3905>
- Uhl, L. F. K., & Gérard, A. (2020). Modes of Communication between T Cells and Relevance for Immune Responses. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(8). <https://doi.org/10.3390/IJMS21082674>
- van Kempen, L. C. L. T., van den Oord, J. J., van Muijen, G. N. P., Weidle, U. H., Bloemers, H. P. J., & Swart, G. W. M. (2000). Activated leukocyte cell adhesion molecule/CD166, a marker of tumor progression in primary malignant melanoma of the skin. *The American Journal of Pathology*, 156(3), 769–774.  
[https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64943-7](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64943-7)
- Velasco-de Andrés, M., Casadó-Llombart, S., Català, C., Leyton-Pereira, A., Lozano, F., & Aranda, F. (2020). Soluble CD5 and CD6: Lymphocytic Class I Scavenger Receptors as Immunotherapeutic Agents. *Cells*, 9(12).  
<https://doi.org/10.3390/CELLS9122589>
- Velasco-de-Andrés, M., Català, C., Casadó-Llombart, S., Simões, I., Zaragoza, O., Carreras, E., & Lozano, F. (2021). The lymphocyte scavenger receptor CD5 plays a

- nonredundant role in fungal infection. *Cellular and Molecular Immunology*, *18*(2), 498. <https://doi.org/10.1038/S41423-020-0434-7>
- Vera, J., Fenutria, R., Cañadas, O., Figueras, M., Mota, R., Sarrias, M. R., Williams, D. L., Casals, C., Yelamos, J., & Lozano, F. (2009). The CD5 ectodomain interacts with conserved fungal cell wall components and protects from zymosan-induced septic shock-like syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(5), 1506–1511. [https://doi.org/10.1073/PNAS.0805846106/SUPPL\\_FILE/0805846106SI.PDF](https://doi.org/10.1073/PNAS.0805846106/SUPPL_FILE/0805846106SI.PDF)
- Vilà, J. M., Gimferrer, I., Padilla, O., Onica Arman, M., Places, L., Simarro, M., Vives, J., & Lozano, F. (n.d.). *Residues Y429 and Y463 of the human CD5 are targeted by protein tyrosine kinases*. <https://doi.org/10.1002/1521-4141>
- Voisinne, G., García-Blesa, A., Chaoui, K., Fiore, F., Bergot, E., Girard, L., Malissen, M., Bulet-Schiltz, O., Gonzalez de Peredo, A., Malissen, B., & Roncagalli, R. (2016). Co-recruitment analysis of the CBL and CBLB signalosomes in primary T cells identifies CD5 as a key regulator of TCR-induced ubiquitylation. *Molecular Systems Biology*, *12*(7), 876. <https://doi.org/10.15252/MSB.20166837>
- Voisinne, G., Gonzalez de Peredo, A., & Roncagalli, R. (2018). CD5, an Undercover Regulator of TCR Signaling. *Frontiers in Immunology*, *9*. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2018.02900>
- Wada, M., Zhang, H., Fang, L., Feng, J., Tse, C. O., Zhang, W., Chen, Q., Sha, S., Cao, Y., Chen, K. H., Pinz, K. G., Chen, X., Fan, X. X., Jiang, X., & Ma, Y. (2020). Characterization of an Anti-CD5 Directed CAR T-Cell against T-Cell Malignancies. *Stem Cell Reviews and Reports*, *16*(2), 369–384. <https://doi.org/10.1007/S12015-019-09937-9>
- Wagner, M., Bilinska, M., Pokryszko-Dragan, A., Sobczynski, M., Cyrul, M., Kusnierczyk, P., & Jasek, M. (2014). ALCAM and CD6 — multiple sclerosis risk factors. *Journal of Neuroimmunology*, *276*(1–2), 98–103. <https://doi.org/10.1016/J.JNEUROIM.2014.08.621>
- Waters, C. M., & Bassler, B. L. (2005). Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *21*, 319–346. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.CELLBIO.21.012704.131001>

- Whitley, K. v., Freitas, C. M. T., Moreno, C., Haynie, C., Bennett, J., Hancock, J. C., Cox, T. D., Pickett, B. E., & Weber, K. S. (2022). CD5 Deficiency Alters Helper T Cell Metabolic Function and Shifts the Systemic Metabolome. *Biomedicines* 2022, Vol. 10, Page 704, 10(3), 704. <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES10030704>
- Whitney, G. S., Starling, G. C., Bowen, M. A., Modrell, B., Siadak, A. W., & Aruffo, A. (1995). The membrane-proximal scavenger receptor cysteine-rich domain of CD6 contains the activated leukocyte cell adhesion molecule binding site. *Journal of Biological Chemistry*, 270(31), 18187–18190. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.31.18187>
- Wright, C. R., Brown, E. L., della Gatta, P. A., Fatouros, I. G., Karagounis, L. G., Terzis, G., Mastorakos, G., Michailidis, Y., Mandalidis, D., Spengos, K., Chatzinikolaou, A., Methenitis, S., Draganidis, D., Jamurtas, A. Z., & Russell, A. P. (2015). Regulation of Granulocyte Colony-Stimulating Factor and Its Receptor in Skeletal Muscle is Dependent Upon the Type of Inflammatory Stimulus. *Journal of Interferon & Cytokine Research : The Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 35(9), 710–719. <https://doi.org/10.1089/JIR.2014.0159>
- Wu, P. C., Tsai, C. L., Gordon, G. M., Jeong, S., Itakura, T., Patel, N., Shi, S., & Elizabeth Fini, M. (2015). Chondrogenesis in scleral stem/progenitor cells and its association with form-deprived myopia in mice. *Molecular Vision*, 21, 138. [/pmc/articles/PMC4323720/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26111111/)
- Wykes, M. N., & Lewin, S. R. (2018). Immune checkpoint blockade in infectious diseases. *Nature Reviews. Immunology*, 18(2), 91–104. <https://doi.org/10.1038/NRI.2017.112>
- Xu, Y., Liu, Q., Zhong, M., Wang, Z., Chen, Z., Zhang, Y., Xing, H., Tian, Z., Tang, K., Liao, X., Rao, Q., Wang, M., & Wang, J. (2019). 2B4 costimulatory domain enhancing cytotoxic ability of anti-CD5 chimeric antigen receptor engineered natural killer cells against T cell malignancies. *Journal of Hematology & Oncology*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/S13045-019-0732-7>
- Yanaba, K., Bouaziz, J.-D., Matsushita, T., Tsubata, T., & Tedder, T. F. (2009). The Development and Function of Regulatory B Cells Expressing IL-10 (B10 Cells)

- Requires Antigen Receptor Diversity and TLR Signals. *The Journal of Immunology*, 182(12), 7459–7472. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900270>
- Yang, J., & Xu, L. (2016). Elevated IL-23R Expression and Foxp3+Rorgt+ Cells in Intestinal Mucosa During Acute and Chronic Colitis. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 22, 2785–2792. <https://doi.org/10.12659/MSM.896827>
- Yang, Y. H., Morand, E. F., Getting, S. J., Paul-Clark, M., Liu, D. L., Yona, S., Hannon, R., Buckingham, J. C., Perretti, M., & Flower, R. J. (2004). Modulation of inflammation and response to dexamethasone by Annexin 1 in antigen-induced arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 50(3), 976–984. <https://doi.org/10.1002/ART.20201>
- Yee, C. S. K., Yao, Y., Xu, Q., McCarthy, B., Sun-Lin, D., Tone, M., Waldmann, H., & Chang, C.-H. (2005). Enhanced production of IL-10 by dendritic cells deficient in CIITA. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 174(3), 1222–1229. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.174.3.1222>
- Yin, X., Yu, H., Jin, X., Li, J., Guo, H., Shi, Q., Yin, Z., Xu, Y., Wang, X., Liu, R., Wang, S., & Zhang, L. (2017). Human Blood CD1c+ Dendritic Cells Encompass CD5high and CD5low Subsets That Differ Significantly in Phenotype, Gene Expression, and Functions. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 198(4), 1553–1564. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1600193>
- You, L., Cox, R. S., Weiss, R., & Arnold, F. H. (2004). Programmed population control by cell-cell communication and regulated killing. *Nature*, 428(6985), 868–871. <https://doi.org/10.1038/NATURE02491>
- Zenke, S., Palm, M. M., Braun, J., Gavrillov, A., Meiser, P., Böttcher, J. P., Beyersdorf, N., Ehl, S., Gerard, A., Lämmermann, T., Schumacher, T. N., Beltman, J. B., & Rohr, J. C. (2020). Quorum Regulation via Nested Antagonistic Feedback Circuits Mediated by the Receptors CD28 and CTLA-4 Confers Robustness to T Cell Population Dynamics. *Immunity*, 52(2), 313–327.e7. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2020.01.018>
- Zhang, L., Li, Y., Qiu, W., Bell, B. A., Dvorina, N., Baldwin, W. M., Singer, N., Kern, T., Caspi, R. R., Fox, D. A., & Lin, F. (2018). Targeting CD6 for the treatment of

- experimental autoimmune uveitis. *Journal of Autoimmunity*, 90, 84–93.  
<https://doi.org/10.1016/J.JAUT.2018.02.004>
- Zhang, N., & He, Y.-W. (2005). The antiapoptotic protein Bcl-xL is dispensable for the development of effector and memory T lymphocytes. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 174(11), 6967–6973.  
<https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.174.11.6967>
- Zheng, M., Zhang, L., Yu, H., Hu, J., Cao, Q., Huang, G., Huang, Y., Yuan, G., Kijlstra, A., & Yang, P. (2016). Genetic polymorphisms of cell adhesion molecules in Behcet's disease in a Chinese Han population. *Scientific Reports*, 6(April), 1–9.  
<https://doi.org/10.1038/srep24974>
- Zimmerman, A. W., Joosten, B., Torensma, R., Parnes, J. R., van Leeuwen, F. N., & Figdor, C. G. (2006). Long-term engagement of CD6 and ALCAM is essential for T-cell proliferation induced by dendritic cells. *Blood*, 107(8), 3212–3220.  
<https://doi.org/10.1182/BLOOD-2005-09-3881>
- Zuckerman, E., Slobodin, G., Kessel, A., Sabo, E., Yeshurun, D., Halas, K., & Toubi, E. (2002). Peripheral B-cell CD5 expansion and CD81 overexpression and their association with disease severity and autoimmune markers in chronic hepatitis C virus infection. *Clinical and Experimental Immunology*, 128(2), 353–358.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2002.01844.x>
- Zuñiga, E., Rabinovich, G. A., Iglesias, M. M., & Gruppi, A. (2001). Regulated expression of galectin-1 during B-cell activation and implications for T-cell apoptosis. *Journal of Leukocyte Biology*, 70(1), 73–79.  
<https://doi.org/10.1189/JLB.70.1.73>