



UNIVERSITAT DE BARCELONA

**U**

**B**

**UNITAT D'IMMUNOLOGIA  
DEPARTAMENT DE BIOLOGIA CEL·LULAR I ANATOMIA PATOLÒGICA  
FACULTAT DE MEDICINA  
UNIVERSITAT DE BARCELONA**

**ESTUDI DE RECEPTORS LEUCOCITARIS DE LA  
FAMÍLIA DEL CD150.  
IDENTIFICACIÓ I CARACTERITZACIÓ DELS  
LLIGANDS DE CD84 I CD229.**

**Memòria presentada per  
Xavier Romero Ros  
per optar al grau de  
Doctor en Química.**

**DIRECTOR**

**Dr. Pablo Engel Rocamora**

**Barcelona, Maig de 2005**



A Mentxu



## AGRAÏMENTS

Aquest treball de Tesi han estat cinc anys i mig amb moltíssimes experiències compartides que no es poden descriure en quatre ratlles. Són moltes les persones que he trobat pel camí i a les que vull agrair el seu ajut i complicitat.

En primer lloc, agrair a tota la gent que ha col·laborat en aquest projecte sense l'ajut dels quals no haguès estat possible. En particular, al Dr Pablo Engel per l'esforç il·limitat que ha dipositat en aquesta Tesi i per intentar transmetre'm la seva forma de pensar. Pablo ha estat un plaer treballar amb tu. Aquest agraïment, el vull estendre als co-autors dels articles de la Tesi per la seva valuosa col·laboració.

A uns companys de laboratori fantàstics: Marga, Sandra, Ifigènia, Míriam, Irene i Jordi. I aquells que també han estat en el laboratori i ara estan dispersats pel món de Deu: Anna, Juani, Núria, Vicky, Isa, Bego i Enric.

A Lluís, company de fatigues, a Anna Aldea i Dani Benítez pel seu suport i amistat. Als amics de Biologia i de Química per aguantar-me els rotllos. A Manolo, pel seu entusiasme. Al grup del Dr Terhorst pel seu bon acolliment. Al grup de Ramon Vilella per ajudar-me en tot el que els he demanat. Moltes gràcies als serveis de confocal i al de bioinformàtica, moltes gràcies Maria pel teu ajut amb els experiments.

Però el més profund agraïment és per a la Mentxu, la que sense cap dubte ha aguantat l'inaguantable i que és, en definitiva, la que en tot moment ha sortit mal parada pel temps que sempre li he robat. Moltes gràcies pel teu recolzament i amor.

Per últim, vull dedicar aquest treball a la meva família a qui els ho dec tot.



# ÍNDIX

	pàgina
<b>ABREVIATURES .....</b>	<b>XIII</b>
<b>1. INTRODUCCIÓ .....</b>	<b>1</b>
<b>1. Introducció .....</b>	<b>3</b>
<b>2. La Superfamília de les Immunoglobulines (SFIg).....</b>	<b>4</b>
2.1 L'evolució dels dominis de la SFIg .....	4
2.2 Estructura dels dominis de la SFIg .....	6
2.3 Diversitat funcional de la SFIg .....	9
2.4 Els lligands dels membres de la SFIg .....	11
<b>3. Receptors leucocitaris de la família del CD150.</b>	
<b>Característiques generals .....</b>	<b>14</b>
3.1 Localització i estructura genòmica .....	15
3.2 Estructura de les molècules de la família del CD150 .....	17
3.3 Lligands de la família del CD150 .....	23
3.4 Interacció amb el virus del xarampió .....	24
3.5 Interacció amb FimH .....	25
<b>4. Síndrome de la immunodeficiència proliferativa lligada al cromosoma X (XLP) .....</b>	<b>27</b>
4.1 El gen defectuós amb malalts de XLP .....	28
4.2 SAP (SLAM associated protein) .....	29
4.3 SAP com a molècula bloquejadora .....	30
4.4 Interacció de SAP amb CD150 i la cinasa FYN .....	31
4.5 La família d'adaptadors SAP i EAT-2 .....	33
4.6 Ratolins deficients en SAP .....	35

	<b>pàgina</b>
<b>5. Descripció dels membres de la família del CD150: CD84, CD150 (SLAM), CD229(Ly9) i CD244(2B4) .....</b>	<b>38</b>
<b>5.1 CD84 .....</b>	<b>38</b>
5.1.1 Distribució en cèl·lules i teixits .....	38
5.1.2 Molècules associades .....	40
5.1.3 CD84 murí .....	41
<b>5.2 CD150 (SLAM-Signaling lymphocyte activation molecule) .....</b>	<b>40</b>
5.2.1 Distribució en cèl·lules i teixits .....	41
5.2.2 Lligands i molècules associades .....	42
5.2.3 Funció .....	43
5.2.4 CD150 murí .....	44
5.2.5 Ratolins deficients en CD150 .....	44
<b>5.3 CD229 .....</b>	<b>45</b>
5.3.1 Distribució en cèl·lules i teixits .....	46
5.3.2 Lligands i molècules associades .....	47
5.3.3 CD229 murí .....	48
<b>5.4 CD244 .....</b>	<b>48</b>
5.4.1 Distribució en cèl·lules i teixits .....	49
5.4.2 Lligands i molècules associades .....	49
5.4.3 Funció .....	50
5.4.4 CD244 murí .....	51
5.4.5 Ratolins deficients en CD244 .....	52
 <b>2. OBJECTIUS .....</b>	 <b>55</b>



	<b>pàgina</b>
<b>3. RESULTATS</b> .....	<b>59</b>
<b>Article n°1</b> .....	<b>61</b>
Resum article n°1 .....	<b>62</b>
<b>Article n°2</b> .....	<b>63</b>
Resum article n°2 .....	<b>64</b>
<b>Article n°3</b> .....	<b>65</b>
Resum article n°3 .....	<b>66</b>
<b>4. DISCUSSIÓ</b> .....	<b>67</b>
<b>5. CONCLUSIONS</b> .....	<b>83</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>87</b>



## ABREVIATURES

<b>AA</b>	Aminoàcid
<b>Ab</b>	Anticòs ( <i>Antibody</i> )
<b>APC</b>	Cèl·lula presentadora d'antigen ( <i>Antigen presenting cell</i> )
<b>BCR</b>	Receptor de cèl·lules B ( <i>B cell receptor</i> )
<b>BLAME</b>	<i>B lymphocyte activator macrophage expressed</i>
<b>C</b>	Constant
<b>CAM</b>	<i>Cell adhesion molecules</i>
<b>CEA</b>	Antigen carcino embrionari ( <i>Carcinoma embrionary antigen</i> )
<b>COS</b>	Línia cel·lular de mico d'origen renal
<b>C-terminal</b>	Extrem carboxiterminal d'una proteïna
<b>CTL</b>	Limfòcits T citolítics ( <i>Cytolytic T lymphocyte</i> )
<b>CTLA-4</b>	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4</i>
<b>DC</b>	Cèl·lules dendrítiques
<b>DCi</b>	Cèl·lules dendrítiques immadures
<b>DCm</b>	Cel·lules dendrítiques madures
<b>DNA</b>	Àcid desoxirribonucleic
<b>EAT-2</b>	<i>EWS-activated transcript 2</i>
<b>EBV</b>	Virus d'Epstein Barr
<b>EGF</b>	<i>Epidermal growth factor</i>
<b>ERK</b>	Cinasa regulada per senyals extracel·lulars
<b>FcR</b>	Receptors de la regió constant de les immunoglobulines
<b>FL</b>	Molècula sencera ( <i>Full lenght</i> )
<b>GHR</b>	<i>Growth hormone receptor</i>
<b>GPI</b>	Unions glicofosfatidilinositol ( <i>glycosydil phosphotidyl inositol</i> )
<b>HA</b>	Hemoglutinina
<b>ICAM</b>	<i>Interaction cell adhesion molecule</i>
<b>ICOS</b>	<i>Inducible costimulator</i>
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferó gamma
<b>Ig</b>	Immunoglobulina
<b>IL</b>	Interleuquina
<b>IP3</b>	Inositol trifosfat

<b>ITAM</b>	<i>Immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
<b>ITIM</b>	<i>Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif</i>
<b>JNK</b>	C-Jun N-terminal Cinasa
<b>Kb</b>	Kilobases
<b>KD</b>	Kilodaltons
<b>KIR</b>	<i>Killer inhibitory receptor</i>
<b>LAT</b>	<i>Linker for activation of T cell</i>
<b>LCMV</b>	<i>Lymphocytic choriomeningitis virus</i>
<b>LES</b>	Lupus eritromatós sistèmic
<b>LFA</b>	<i>Lymphocyte function associated</i>
<b>LPS</b>	Lipopolisacarid
<b>MAG</b>	Glicoproteïna associada a mielina
<b>MAPK</b>	<i>Mitogen activated protein Kinases</i>
<b>M-CSF</b>	<i>Macrophage-colony-stimulating factor</i>
<b>MHC I</b>	Molècula del complex major d'histocompatibilitat de classe I ( <i>Major histocompatibility complex</i> )
<b>MHC II</b>	Molècula del complex major d'histocompatibilitat de classe II
<b>MLCK</b>	Miosina
<b>MV</b>	Virus del xarampió (Maesla virus)
<b>NCAM</b>	<i>Neural cell adhesion molecule</i>
<b>NCR</b>	Receptors de citotoxicitat natural ( <i>natural cytotoxic receptors</i> )
<b>NFAT</b>	Factor nuclear de cèl·lula T activada
<b>NFKB</b>	Factor nuclear estimulador $\kappa$ de la cèl·lula B
<b>NITR</b>	<i>Novel immunotype receptor</i>
<b>NK</b>	Limfòcits agressors naturals ( <i>natural killer</i> )
<b>NKT</b>	Cèl·lules T agressores naturals
<b>NO</b>	Òxid nítric
<b>N-terminal</b>	Extrem aminoterminal d'una proteïna
<b>PBLs</b>	Leucòcits de sang perifèrica ( <i>peripheral blood leukocytes</i> )
<b>PECAM</b>	<i>Platelet endothelial cell adhesion molecule</i>
<b>PI-3K</b>	Fosfatidilinositol 3-cinasa
<b>PIP2</b>	Fosfatidilinositol bifosfat
<b>PKC</b>	Proteïna cinasa C
<b>PL</b>	Pèptid líder

<b>PLC<math>\gamma</math></b>	Fosfolipasa C $\gamma$
<b>RAG</b>	<i>Recombination-activated genes</i>
<b>RNA<sub>m</sub></b>	Àcid ribonucleic missatger
<b>SAP</b>	<i>SLAM associated protein</i>
<b>SFIg</b>	Superfamília de les immunoglobulines
<b>SH2</b>	Domini 2 d'homologia amb la cinasa src
<b>SH3</b>	Domini 3 d'homologia amb la cinasa src
<b>SH2D1A</b>	Molècula adaptadora que conté el domini SH2 ( <i>src homology 2 domain-containing adaptor protein</i> )
<b>SHIP</b>	Inositol fosfatasa que conté el domini SH2
<b>SHP-1</b>	Tirosina fosfatasa-1 que conté el domini SH2
<b>SHP-2</b>	Tirosina fosfatasa-2 que conté el domini SH2
<b>Siglec</b>	Molècula sialoadhesina
<b>SLAM</b>	<i>Signaling lymphocyte activation molecule</i>
<b>SMAC</b>	Complex supramolecular d'activació
<b>Src</b>	Proteïnes relacionades amb el virus del sarcoma de Rous
<b>T<math>\gamma\delta</math></b>	Limfòcits T $\gamma\delta$
<b>T<sub>FH</sub></b>	Cèl·lules T ajudadores foliculars
<b>TCR</b>	Receptor de la cèl·lula T ( <i>T cell receptor</i> )
<b>Th</b>	Cèl·lules T ajudadores
<b>TLK</b>	Teloquina
<b>TLR</b>	<i>Toll like receptors</i>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosi tumoral - $\alpha$ ( <i>Tumor necrosis factor -<math>\alpha</math></i> )
<b>TNM</b>	Conectina
<b>3'UTR</b>	Regió no traduïda ubicada en l'extrem 3' de l'mRNA
<b>5'UTR</b>	Regió no traduïda ubicada en l'extrem 5' de l'mRNA
<b>V</b>	Variable
<b>VCAM</b>	<i>Vascular cell adhesion molecule</i>
<b>VIH</b>	Virus de la immunodeficiència humana
<b>XLP</b>	Síndrome limfoproliferatiu lligat al cromosoma X ( <i>X-linked lymphoproliferative disease</i> )



# ***1. INTRODUCCIÓ***





## 1. INTRODUCCIÓ

La resposta immune és orquestrada per interaccions dinàmiques entre molècules expressades en la membrana de diferents tipus de leucòcits. Les interaccions efectives entre els receptors i els seus lligands inicien una cascada de senyalització a l'interior de la cèl·lula mitjançada per cinases, fosfatases, adaptadors i segons missatgers com ara el calci intracel·lular. Aquests aconteixements determinen la resposta cel·lular: diferenciació, activació, proliferació, anèrgia, apoptosi, producció de citocines i/o citotoxicitat (1).

Aquesta resposta immune requereix d'una elevada especificitat i d'un estricte control de la seva intensitat i duració. Un grup de molècules claus per a l'activació dels limfòcits són els receptors específics per a l'antígen o receptors clonotípics, que inclouen el receptor de cèl·lula T (TCR) i el receptor de cèl·lula B (BCR). Tanmateix, es requereix d'una estimulació addicional per a l'activació de les cèl·lules T i B, mitjançada per les molècules co-estimuladores, com el CD28 en cèl·lules T i el CD40 en cèl·lules B. A més a més, altres receptors tals com ara els receptors de factors de creixement, receptors de citocines i quimiocines, receptors relacionats amb la família del TNF, molècules d'adhesió i receptors de la recentment descrita família del CD150, entre d'altres, modifiquen quantitativament i qualitativa la resposta iniciada pels receptors clonotípics. Per altra banda, les cèl·lules del sistema immune també expressen receptors amb la capacitat de prevenir activacions o de finalitzar la resposta immune, com ara el CTLA-4 (*Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4*) en cèl·lules T, el Fc $\gamma$ RIIB en cèl·lules B i els KIRs (*Killer inhibitory receptors*) en cèl·lules NK (2,3,4).

Molts dels receptors que s'expressen en la superfície de les cèl·lules del sistema immune i que es troben involucrats en la resposta cel·lular, pertanyen a la superfamília de les immunoglobulines, entre ells els receptors de la família del CD150. L'estudi de l'expressió d'aquests receptors, així com la identificació dels lligands amb els quals interaccionen i la caracterització d'aquesta interacció, són punts claus per entendre la seva funció.

## 2. SUPERFAMÍLIA DE LES IMMUNOGLOBULINES (SFIg)

Un gran nombre de receptors que participen en el reconeixement antigènic, en l'adhesió i en l'activació cel·lular, comparteixen el mateix plegament d'estructura terciària (5). Aquest plegament comú, que s'anomena domini immunoglobulina (Ig), és el tret característic de les proteïnes de la superfamília de les immunoglobulines (SFIg). Aquestes proteïnes es troben presents en diferents espècies i teixits, amb una gran variabilitat en la composició d'aminoàcids i amb una gran diversitat de funcions biològiques (6, 7).

### 2.1 L'evolució dels dominis de la SFIg

Poc després de la dilucidació de la seqüència i estructura dels anticossos, va esdevenir evident que l'evolució havia incorporat els dominis Ig en una gran varietat de molècules del sistema immune (TCR  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ , complex major d'histocompatibilitat (MHC I, II), etc.). Al mateix temps, s'observà que el domini Ig també estava present en molècules no relacionades amb el sistema immune, com ara els receptors implicats en l'adhesió cel·lular (*CAM-cell adhesion molecules*) necessàries pel desenvolupament dels axons neuronals. Amb tot, es demostrava l'existència d'un gran nombre de gens que contenen seqüències codificants per dominis Ig involucrats en el reconeixement molecular i en l'adhesió cel·lular.

Recentment, les anàlisis genòmiques mostren que les proteïnes amb dominis immunoglobulina són extremadament abundants (aproximadament del 2% en el cas del genoma humà). La SFIg representa el 35% dels receptors de membrana leucocitaris, amb més de 150 molècules diferents que hi pertanyen. Tanmateix, el domini Ig ha estat identificat en organismes molt diferents com mamífers, aus, peixos, esponges, llevats i fins i tot, han estat identificades algunes proteïnes que tenen certa homologia amb els dominis Ig en procariotes (6).

Basant-se en el quantios nombre de molècules de la SFIg involucrades en processos d'adhesió, Willians et al (1988) van suggerir l'existència d'un gen ancestral

comú que codificava per una proteïna originària de la SFIg, constituïda per un únic domini Ig extracel·lular amb l'habilitat d'interaccionar de forma homotípica. Van proposar que aquesta proteïna tindria la funció d'adhesió cel·lular. Posteriorment, la duplicació i diversificació d'aquest gen ancestral donaria lloc a proteïnes amb capacitat per interaccionar de forma heterotípica i per assolir noves funcions.

Un nou pas evolutiu el trobem en l'adquisició d'una nova funció per les SFIg: el reconeixement antigènic. Les glicoproteïnes ancestrals de la SFIg podrien haver mitjançat els primers exemples d'al·loreconeixement en colònies d'invertebrats. Recoltzant aquesta hipòtesi trobem proteïnes polimòrfiques amb dominis Ig expressades en la superfície dels metazoos *Hydra vulgaris* i *Geodia cydonium* implicats en el rebuig entre individus de la mateixa espècie (8). Així doncs, trobem aquesta notable analogia entre l'acceptació-rebuig de transplantaments en vertebrats i el fenomen fusió-rebuig en les colònies d'invertebrats. Per tant, és possible fer la conjectura de que el complex sistema immune dels vertebrats pot derivar d'un al·loreconeixement primitiu.

Cal destacar que amb l'aparició del sistema immune adaptatiu, que coincideix amb el pas d'animals invertebrats a animals vertebrats, es dona una veritable explosió en el nombre de molècules de la SFIg. Per exemple, el nombre de gens de la SFIg en la mosca és de 149 mentre que en humà és de 855 (9). Però aquesta explosió en el nombre de receptors de la SFIg no és deguda a l'aparició dels receptors clonotípics del sistema immune adaptatiu amb la funció de reconeixement (TCR i BCR), sinó a l'espectacular increment en el nombre de molècules implicades en l'adhesió i que participen en la resposta adaptativa i en la resposta immune adquirida.

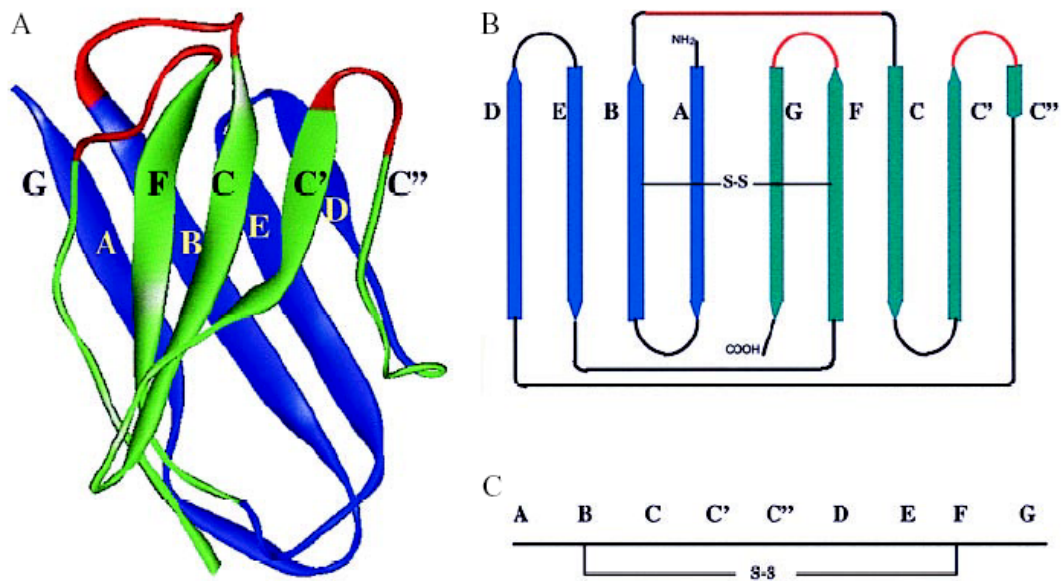
Sembla provable que els receptors antigènics (amb la capacitat única de reorganitzar els dominis Ig, i per tant de crear un repertori extensíssim pel reconeixement antigènic) provinguin d'un receptor ancestral comú que existia fa uns 500 milions d'anys. El gen que codificava per aquest receptor ancestral probablement patiria la inserció d'elements transposables dependents de l'enzim RAG (*Recombination-activated genes*), conferint-li la propietat del reordenament somàtic. Recentment s'ha caracteritzat una família de proteïnes anomenades NITR (*Novel immunotype receptor*) com a possibles precursors dels dominis variables de les Ig (10).

L'observació de molècules com ara la fibronectina tipus III, la caderina i els dominis de receptors per citocines, amb molt poca homologia amb les de la SFIg però que es pleguen de forma similar als dominis Ig, ha suggerit la possibilitat de dos processos evolutius diferents. Per una banda, un procés divergent, en què totes aquestes proteïnes provenen d'un gen ancestral comú que s'ha anat duplicant i diversificant, i per l'altra, un procés convergent, en què diferents proteïnes tendeixen cap al mateix plegament més estable (6,7).

Finalment, caldria preguntar-se per què els dominis Ig han esdevingut una estratègia evolutiva tan exitosa. Tot un seguit de propietats dels dominis Ig donen resposta a aquesta qüestió: l'estabilitat del plegament, la resistència a la proteòlisi, la capacitat per formar homodímers i heterodímers, la plasticitat en les formes d'interaccionar amb els seus lligands, l'habilitat per formar molècules constituïdes per suma de dominis Ig i/o altres tipus de dominis i la capacitat per adquirir noves funcions a part del reconeixement i l'adhesió. No s'ha d'oblidar el fet que la majoria de dominis Ig es troben codificats per un únic exó, cosa que dóna la base genètica per a la duplicació i la diversificació (9).

## **2.2 Estructura dels dominis de la SFIg.**

L'estructura dels dominis Ig, resolta mitjançant estudis cristal·logràfics, es caracteritza per contenir residus conservats al llarg d'una seqüència de 70 a 100 aminoàcids (AA). Aquests AA confereixen a la proteïna una conformació globular i compacta anomenada plegament immunoglobulina (Ig) (11). El plegament Ig és una estructura de tipus sandvitx on les làmines  $\beta$  estan distribuïdes en dues fulles. Cada fulla està formada per 3, 4 o 5 làmines  $\beta$  antiparal·leles de 5 a 10 AA. A cadascuna de les làmines  $\beta$  se l'anomena amb una lletra A, B, C, C', C'', D, E, F o G en funció de l'ordre d'aparició en la seqüència. Els AA de les làmines B, C, E i F constitueixen el nucli hidrofòbic amb els residus dirigits cap a l'interior de la molècula, mentre que els AA de les làmines A, C', D i G presenten residus hidrofílics dirigits cap a l'exterior. La majoria de dominis Ig contenen cisteïnes conservades que contribueixen a l'estabilització de la proteïna mitjançant ponts disulfur intracatenaris (7) (Fig 1).



**Fig 1. El plegament Ig.** (A) Representació del plegament d'un domini variable. (B) Esquema representatiu de les cadenes que formen les dues fulles  $\beta$  del plegament. (C) Representació linial de les cadenes. Figura de Barclay, PNAS, 99

En les immunoglobulines trobem dos tipus de dominis ben diferenciats: els dominis variables (V) responsables de la interacció amb l'antígen, i els dominis constants (C) mitjancers de les funcions efectores. A mesura que un major nombre de proteïnes de la SFIg va ésser seqüenciat, es va trobar que tenien un patró de làmines semblant al del domini V (encara que no compartien la seva variabilitat) i al del domini C. Per diferenciar-los dels dominis de les immunoglobulines, se'ls va classificar en dominis de tipus V i de tipus C, respectivament. El domini de tipus C és més curt que el de tipus V, per la manca de les làmines  $\beta$  C' i C''. Una segona diferència entre els dominis de tipus V i de tipus C són els ponts disulfur; en els dominis de tipus V trobem de 65 a 75 residus entre dues cisteïnes mentre que en els dominis de tipus C aquesta separació és de 55 a 60 residus i en alguns casos encara menor (12).

**Taula 1. Subclasses de plegament dels dominis Ig de la SFIg.** (Taula modificada de Halaby, *Protein engineering*, 99)

Subclasse	Proteïnes	Topologia	Total de làmines	Ponts disulfur
C1	Igs ,HLA, TCR	ABED/CFG	7	+
C2	CD2, CD4, CD150	ABE/C'CFG	7	+
C3	Dominis bacterians, SOD	A(A')BE/C'CFG	7 (8)	(+)
C4	Actinoxanthia/like	ABE/C'CFG	7	+
Fn3	Receptors de citocines	ABE/C'CFG	7	(+)
H	GOG, CYG, DPA1	ABE[C']CFG	7	-
V	TCR, CD8, CD4, CD2	A(A')BED/CC'(C'')FG	8 (a 10)	(+)
I	VCA, TLK,TNM	A(A')BED/C(C')FG	8 (a 9)	+

*Igs; Immunoglobulines. HLA; Human leukocyte antigen. TCR; T cell receptor. SOD; superoxyde dismutase. GOG; Galactose oxidase. CYG; Cyclodextrin glycosil transferase. DPA1; PapD. VCA; Vascular cell adhesion molecule. TLK; Telokine. TNM; Titin*

+ indica la presència en el domini corresponent.

- indica l'absència en el domini corresponent.

( ) indica que es pot trobar no present en alguns dominis de la subclasse.

[ ] làmina  $\beta$  disposada en mig de les dues fulles.

L'anàlisi d'un nombre creixent de membres de la SFIg ha permès ampliar la classificació estructural dels dominis Ig., especialment els del tipus C. Així doncs, el domini de tipus C de les molècules del sistema immune (TCR, MHC, Ab) s'anomena C1 i es troba constituït per 7 làmines  $\beta$  (ABED/CFG) mentre que el domini de tipus V en té 9 (ABED/CC'(C'')FG). Les làmines  $\beta$  ABED es pleguen en una mateixa fulla, mentre que les GFCC'(C'') es pleguen en la fulla oposada. També trobem un segon domini de tipus C anomenat C2, que es diferencia del domini C1 per la major semblança de les làmines E i F amb el domini V (13). El domini I (*intermediate*) (14) és un domini intermig entre el domini V (amb el que comparteix similitud estructural) i el domini C1 (amb el que comparteix similitud en la seqüència).

El domini S (15) és topològicament similar al C2. El domini H (*hybrid*) (15) és un domini híbrid entre el domini de tipus C i el de tipus S. El domini Fn3 és similar al C2, amb la diferència de que li manca un pont disulfur. Finalment, els dominis C3 i C4, que són els que provenen de la disgregació del domini S en dos dominis (7).

L'alineament de les seqüències dels diferents dominis ha demostrat que la seva semblança és baixa (aproximadament entre un 5 i un 15%). La similitud entre seqüències dels dominis de la SFIg decreix d'esquerra a dreta entre parelles de subclasses en la següent sèrie (C1 → V) → C2 → I → Fn3 → C4 → C3). No s'ha trobat una relació entre el tipus de domini i una funció determinada.

El nombre de dominis Ig que constitueixen els receptors de membrana leucocitària varien des d'un domini Ig com ara els receptors CD8 o CD47, fins a 17 dominis com és el cas de la molècula sialoadhesina (siglec-1). Més de la meitat dels receptors leucocitaris de la SFIg es troben constituïts per dos dominis Ig i això pot ser important per tal d'assegurar la distància correcta per a la interacció entre dues cèl·lules adjacents. Normalment, els dominis Ig es troben associats a altres dominis Ig dintre de la mateixa molècula, però algunes vegades els trobem associats a altres tipus de dominis com els EGF (*Epidermal growth factor*), els dominis de receptors de citocines o els de lectina de tipus C. Les proteïnes de membrana amb múltiples dominis Ig normalment tenen en la part N-terminal un domini de tipus V, seguit d'un o més dominis C2 (CD66, CD2, CD220, CD80, CD86, la família NITR o la família del CD150). En alguns casos, el domini de tipus V es troba localitzat entre dominis C2 (c/Kit, PDGFR, CSF1R) (9).

### **2.3 Diversitat funcional de la SFIg**

Sense cap dubte, un dels grans avantatges evolutius dels dominis Ig és la seva sorprenent capacitat per adoptar noves funcions. L'enorme variabilitat que pot incorporar en les seqüències dels dominis Ig sense produir grans modificacions en la seva estructura terciària (particularment apreciable en les anelles o "loops" que connecten les làmines β) ha permès la diversificació d'aquest tipus de molècules i la possibilitat

d'assolir noves funcions. Es podria pensar doncs, en els dominis Ig com a estructures "contenedores de funcions". Tanmateix, l'habilitat per formar molècules constituïdes per suma de dominis Ig i/o altres tipus de dominis també ha contribuït a ampliar el ventall de funcions de la SFIg (7).

1. Reconeixement de l'antigen. La variabilitat en les seqüències dels anticossos i altres molècules com BCR, TCR o MHC, ha permès al sistema immune respondre davant la ingent diversitat d'antígens.
2. Adhesió cel·lular. Moltes molècules d'adhesió de la SFIg com ara el CD54 (*Interacting cell adhesion molecule-1* (ICAM-1)), el CD106 (*Vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1)) i el CD31 (*Platelet endothelial cell adhesion molecule-1* (PECAM-1)) es veuen involucrades en les primeres fases de la resposta immunitària.
3. Receptors de citocines. Per exemple els receptors de IL-1, de M-CSF (*Macrophage-colony-stimulating factor*), del factor de cèl·lules mare i el de la eritropietina.
4. Transport de molècules. Exemples com els receptors de poly-Ig que transporten IgA a través de les parets de l'epiteli (transmigració) o l'hemociana que transporta cromòfors a través de diferents compartiments cel·lulars.
5. Morforegulació. Les proteïnes de la matriu extracel·lular es troben implicades en la integritat estructural d'un gran nombre de teixits. Per exemple la fibronectina actúa com a adhesiu per conservar la integritat estructural.
6. Molècules bacterianes i víriques. En els bacteris els dominis Ig els trobem implicats en l'ensamblatge del pili i/o en la seva síntesi. En els virus trobem proteïnes de superfície que augmenten la capacitat de disseminació o virulència.
7. Sistema nerviós. Molècules implicades en el desenvolupament neuronal com CD56 (*Neural cell adhesion molecule* (NCAM)), MAG (Glicoproteïna associada a mielina), CD90, etc.
8. Proteïnes musculars. La teloquina (TLK), la conectina (TNM) i la cinasa de la cadena lleugera de la miosina (MLCK), i altres.



Tanmateix, hi ha proteïnes que pertanyen a la SFIg i a les que encara no se'ls ha assignat cap funció biològica.

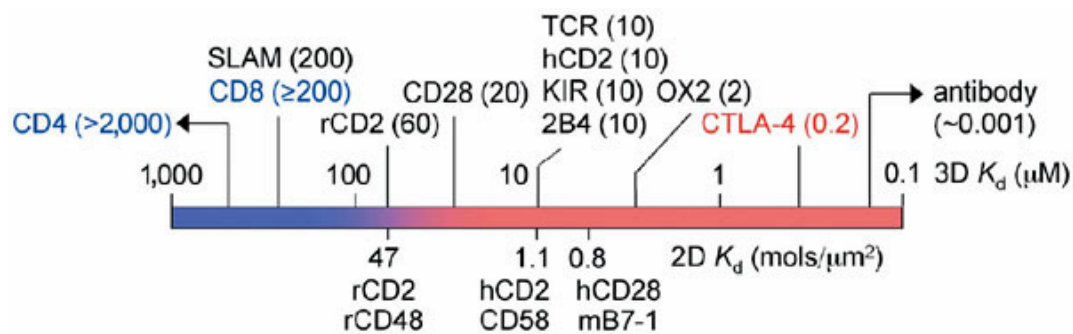
## 2.4 Els lligands dels membres de la SFIg

Els membres de la SFIg tenen una àmplia varietat de lligands, des de petites molècules com ara cromòfors, fins a molècules gegants com proteïnes del múscul. Les interaccions domini Ig-lligand es classifiquen en homofíliques, quan interaccionen amb si mateixes (Ex. Antígen Carcino Embrionari (CEA), CD31, NCAM, fascilin II i III), i heterofíliques quan interaccionen amb altres molècules. En aquest últim cas podem trobar molècules que interaccionen amb altres membres de la SFIg (Ex. el CD2 interaccionant amb el CD58), o amb altres tipus de dominis com ara les integrines (Ex. ICAM o VCAM interaccionant amb les integrines LFA (*Lymphocyte function associated*) o Mac-1, respectivament), o amb carbohidrats (Ex el CD22 o CD33 interaccionant amb àcids siàlics). Alguns dominis fins i tot són capaços d'interaccionar de forma homofílica i heterofílica (NCAM, CEA, etc.) (6)

La plasticitat de les interaccions de la SFIg també la trobem en la localització del lloc d'unió al lligand. Aquest es pot trobar en els "loops" (com en el cas de les immunoglobulines) o en les làmines  $\beta$  (com en MHC, CD4, CD8, etc.). A més a més, aquests llocs d'unió poden estar constituïts per una única cadena (CD2, CD4), per homodímers (CD8, CD28) o per heterodímers (BCR, TCR). En molts casos, el domini N-terminal és el que està directament implicat en la interacció (CD2, CD48, CD200, CD80, TCR, BCR, CD28) (9). També podem trobar interaccions que impliquin els dos primers dominis N-terminal (VCAM-1, ICAM-1) o altres dominis (16,17).

Una de les propietats dels anticossos és la seva elevada afinitat pels antígens. No obstant això, les interaccions trobades en altres membres de la SFIg són, en la seva majoria, de tipus feble. Les afinitats entre receptors expressats en la membrana de cèl·lules adjacents sovint són unes 1000 vegades inferiors a les trobades en la interacció anticòs-antígen (Fig 2). Encara que aquestes afinitats, mesurades en solució, són

particularment baixes, les interaccions que s'estableixen són funcionals ja que els receptors s'agrupen en àrees de la membrana cel·lular i augmenten l'avidesa pel seu receptor. Així ho demostren estudis funcionals de molècules com el CD2 (18). Aquestes interaccions de baixa afinitat, amb constants de dissociació entre 1 i 100  $\mu\text{M}$ , afavoreixen els contactes cel·lulars transitoris. Amb tot, trobem excepcions com el CTLA-4 que s'uneix a CD80 amb afinitats relativament altes ( $K_d=0.2 \mu\text{M}$ ), o en l'altre extrem, receptors com el CD4 que s'uneix a MHC II amb molt baixa afinitat ( $K_d>2000 \mu\text{M}$ ). La regulació de l'expressió de les proteïnes de la membrana cel·lular, juntament amb la jerarquitzaació de les seves afinitats, podrien explicar un mecanisme seqüencial que donaria lloc a la resposta cel·lular al llarg de diferents etapes de senyalització (18).



**Fig 2. Constants d'equilibri de les interaccions de membres de la SFIg.** Gradació de menor (blau) a major (vermell) afinitat (figura de Simon J. Davis, *Nature immunology*, 03).

Una de les característiques dels dominis Ig és la seva glicosilació. En alguns casos, pot arribar a representar un 60% del pes de la molècula (Ex. CD66 o CD200), mentre que en altres, aquesta glicosilació és nula (Ex. CD3 $\epsilon$ ). Els sucres poden imposar restriccions al moviment dels receptors i d'aquesta manera optimitzar la interacció amb lligands presents en la cèl·lula adjacent (19). La càrrega negativa de sucres rics amb àcids siàlics o mucina, degut a la repulsió amb la càrrega negativa de la superfície cel·lular, poden dirigir a la proteïna lluny de la membrana. D'aquesta manera podrien actuar els sucres presents a la part més propera a la membrana d'algunes molècules tals com el CD2 o ICAM-2 (20,17). Per altra banda, s'ha suggerit que els carbohidrats podrien tenir un paper "d'escut" en les glicoproteïnes, de manera que evitarien moltes

interaccions no desitjades (17). Els sucres també poden estar implicats en el plegament correcte de la proteïna i en el seu transport (19) i també podem intervenir directament en la interacció, com és el cas dels carbohidrats presents en els anticossos, que són necessaris per a la interacció de l'anticòs amb els receptors Fc.

### 3. RECEPTORS LEUCOCITARIS DE LA FAMÍLIA CD150. CARACTERÍSTIQUES GENERALS

La família del CD150 està inclosa en la superfamília de les immunoglobulines i comprèn 9 receptors de membrana implicats en la regulació de la resposta immunològica adquirida i innata. Els membres d'aquesta família són: CD48, CD84, CD150, CD229, CD244, BLAME, CS1, NTB-A i CD84-H1. (Taula 2)

*Taula 2. Nomenclatura i expressió dels membres de la família del CD150.*

Molècula	Altres nomenclatures	Expressió
<b>SLAMF1</b>	CD150, SLAM, IPO-3	Cèl·lules T memòria/efectora CD45RO <sup>hi</sup> , Ràpid increment de l'expressió en B, T i monòcits activats, DC madures
SLAMF2	<b>CD48</b> , BLAST-1, HM48-1, BCM-1, MRC OX-45, sgp/60	Cèl·lules B i T, cèl·lules transformades per EBV i Cèl·lules endotelials
SLAMF3	CD229, <b>Ly9</b> , Lgp 100	Cèl·lules B i T
SLAMF4	<b>CD84</b> , Ly9b	Cèl·lules B i T, monòcits i plaquetes
SLAMF5	CD244, <b>2B4</b> , NAIL, Nmrk, NKR2B4	NK, cèl·lules T CD8, monòcits i basòfils
<b>SLAMF6</b>	CS1, Novel Ly9, 19A24, CRACC, CD319	Cèl·lules B, T, NK i DC
<b>SLAMF7</b>	NTB-A, SF2000, KAL1b, Ly108	Cèl·lules B, T i NK
<b>SLAMF8</b>	BLAME, BCM-like	Macròfags, DC
<b>SLAMF9</b>	CD84-H1, SF2001, CD2-F10	DC, Macròfags, cèl·lules B i T.

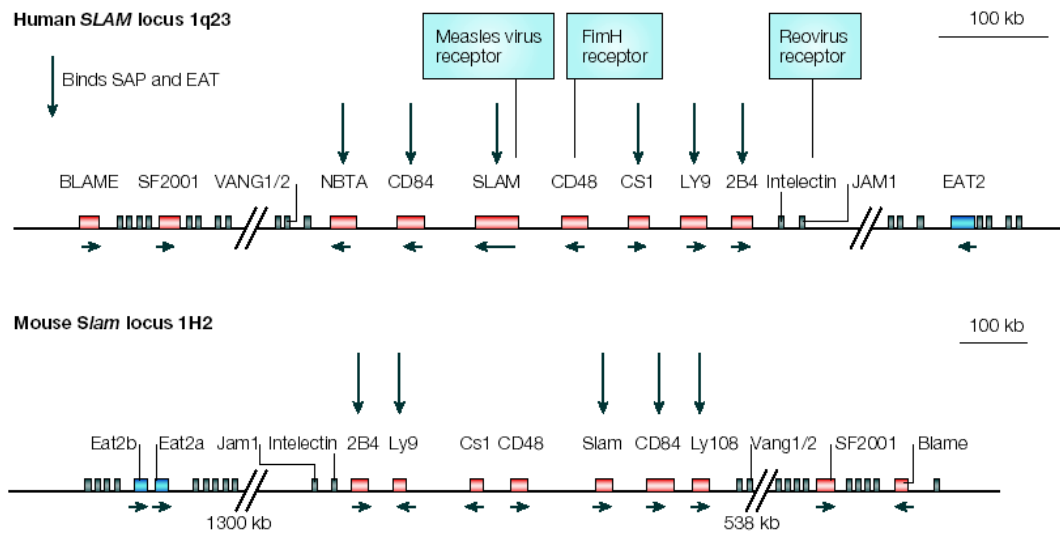
*En negreta la nomenclatura acceptada (HUGO).*

Els receptors de la família del CD150 es troben fonamentalment en el sistema immune (Taula 2), tot i que en alguns casos els trobem expressats en cèl·lules que no pertanyen al sistema hematopoiètic, com ara el CD150, expressat en una subpoblació de cèl·lules endotelials (21). A mesura que anem aprofundint en la caracterització d'aquestes molècules es demostra una distribució més àmplia que la inicialment descrita. Cadascuna de les molècules de la família del CD150 té una distribució característica en les cèl·lules del sistema hematopoiètic i al llarg dels diferents estadis del desenvolupament d'aquestes, la qual cosa pot indicar una funció no redundant d'aquests receptors en la regulació de la resposta immune adaptativa i innata.

### **3.1 Localització i estructura genòmica**

Tots els membres de la família del CD150 tenen en comú la localització cromosòmica en el braç llarg del cromosoma 1 (1q23) en humà i en la regió sintènica del cromosoma 1 en ratolí. Sis gens d'aquesta família es distribueixen al llarg d'unes 400 Kb en el que s'ha anomenat "locus SLAM", mentre que els gens de BLAME i CD84-H1(SF2001) queden fora d'aquest locus (Fig 3). La semblança entre seqüències i la mateixa localització cromosòmica fan pensar que els gens de la família del CD150 provenen d'un gen ancestral comú que s'ha anat duplicant i diversificant al llarg de l'evolució (22,23).

L'organització genòmica dels membres de la família es correspon amb la descrita per altres gens de la SFIg; cada domini Ig i la regió transmembrana es troben codificats per exons independents, mentre que la regió intracitoplasmàtica es troba codificada per un nombre variable d'exons (13). Aquesta organització permet l'aparició de formes generades per "splicing" alternatiu d'un o més exons. Així doncs, trobem formes en les que poden faltar dominis extracel·lulars com és el cas del CD229 (24), dominis intracitoplasmàtics com el CD244 (25) o produir-se formes solubles com el CD150 i CD244 (26, 27). D'aquesta manera es veu augmentada la diversitat estructural dels receptors de la família del CD150 i el seu possible espectre de funcions.



**Fig 3. Organització genòmica de la família del CD150.** Set gens de la família del CD150 es troben agrupats en un segment de 359Kb en humà i 392Kb en ratolí, en el que s'anomena "locus SLAM". Els tres membres restants de la família del CD150 es troben a la mateixa regió cromosòmica però fora d'aquest locus. Sis d'aquests gens codifiquen per proteïnes que s'uneixen als adaptadors SLAM-associated protein (SAP) i EAT-2. L'organització dels gens de la família del CD150 és idèntica en humà i ratolí, però l'orientació és diferent; els gens que en humà estan propers al centròmer, en ratolí estan situats més a prop del telòmer. Les caixes plenes representen els gens. Les fletxes negres indiquen la direcció de transcripció (Figura de P. Engel, Nature review, 03).

Els gens de la família tenen una organització intró-exó semblant i amb una mida d'entre 10 i 34 Kb. Sovint, es presenta un gran intró entre el primer i el segon exó que arriba fins a 27 Kb en el cas del CD48. En canvi, el CD229 presenta un primer intró relativament petit, inferior a 2Kb i és en la regió que codifica per la transmembrana d'aquesta molècula, on la distància entre exons és major (28). El nombre de segments codificants és variable, des de 4-5 exons en les molècules amb cues citoplasmàtiques curtes o ancorades a la membrana, fins a 10 exons com és el cas del CD229 o CD244. En les regions promotores d'aquests gens apareixen motius putatius d'unió a factors de transcripció específics de limfòcits i cèl·lules del sistema immune. Una característica

comú en la majoria dels gens de la família és la seva falta de caixes TATA i CAAT, però amb la presència d' un nombre elevat de llocs per a l'inici de la transcripció (28)

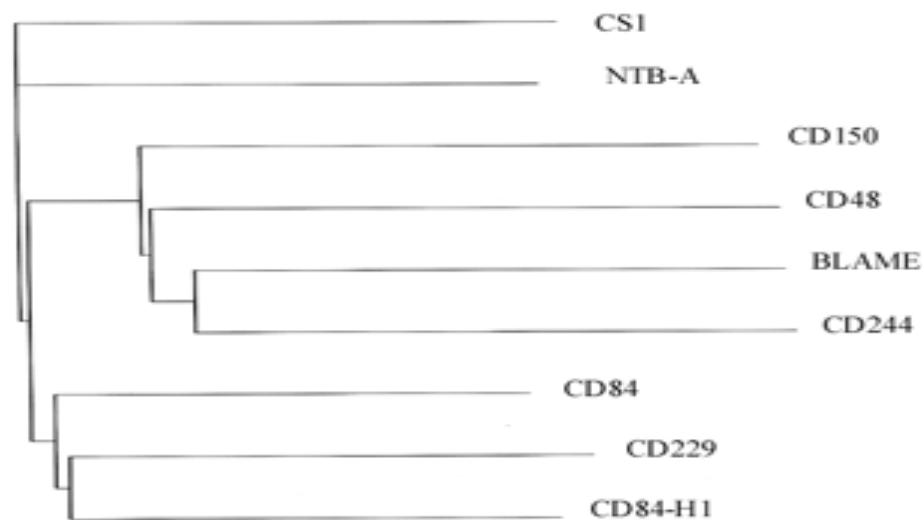
### 3.2 Estructura de les molècules de la família de CD150

Els gens de la família del CD150 codifiquen per glicoproteïnes de membrana de tipus I, amb un pes molecular d'entre 60 i 120 KD que presenten de 3 a 8 llocs de glicosilació en N (Asn-x-Ser-thr). La regió extracel·lular està formada per dos dominis: el domini N-terminal, que és un domini Ig de tipus V sense ponts disulfur, i el juxtaposat a la membrana, que és un domini Ig constant de tipus 2 (C2) amb 2 ponts disulfur intracatenaris putatius. En el cas del CD229, aquesta configuració domini variable-domini constant es veu repetida, presentant un total de 4 dominis: l' 1 i el 3 de tipus V, i el 2 i el 4 de tipus C2 (24) (Fig.4). Aquests receptors presenten un domini transmembrana hidrofòbic i un domini citoplasmàtic d'entre 70 i 180 AA, amb l'excepció de BLAME i CD84-H1 que tenen unes cues citoplasmàtiques curtes (29, 30) i CD48 que es troba ancorat a la membrana mitjançant una unió GPI ( *Glycosyl Phosphotydydyl Inositol*) (31).

Inicialment, es va classificar la família del CD150 dintre de la família del CD2, però tres fets diferencials han permès considerar-la com a una nova família: la major homologia entre els membres de la família de CD150 comparada amb els receptors CD2 i CD58, la localització cromosòmica en la regió 1q23 (mentre que CD58 i CD2 es troben en el braç curt del cromosoma 1, a la regió 1p13) i la presència de motius tirosina consensus en les cues citoplasmàtiques dels membres de la família del CD150. De fet, tant pel que fa a aspectes estructurals com funcionals, la família del CD150 comparteix més trets comuns amb la família del CEA (*Antigen Carcino Embrinari*) que amb la del CD2 i CD58 (amb les que comparteix menys d'un 16% d'identitat).



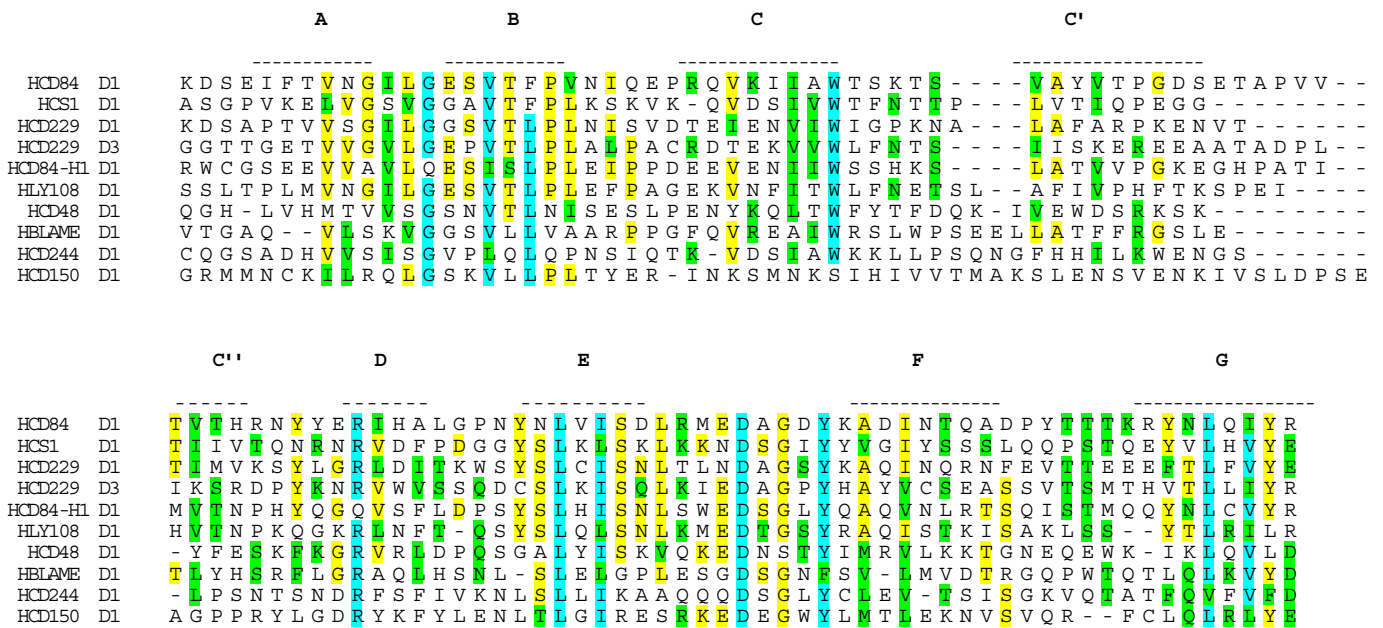




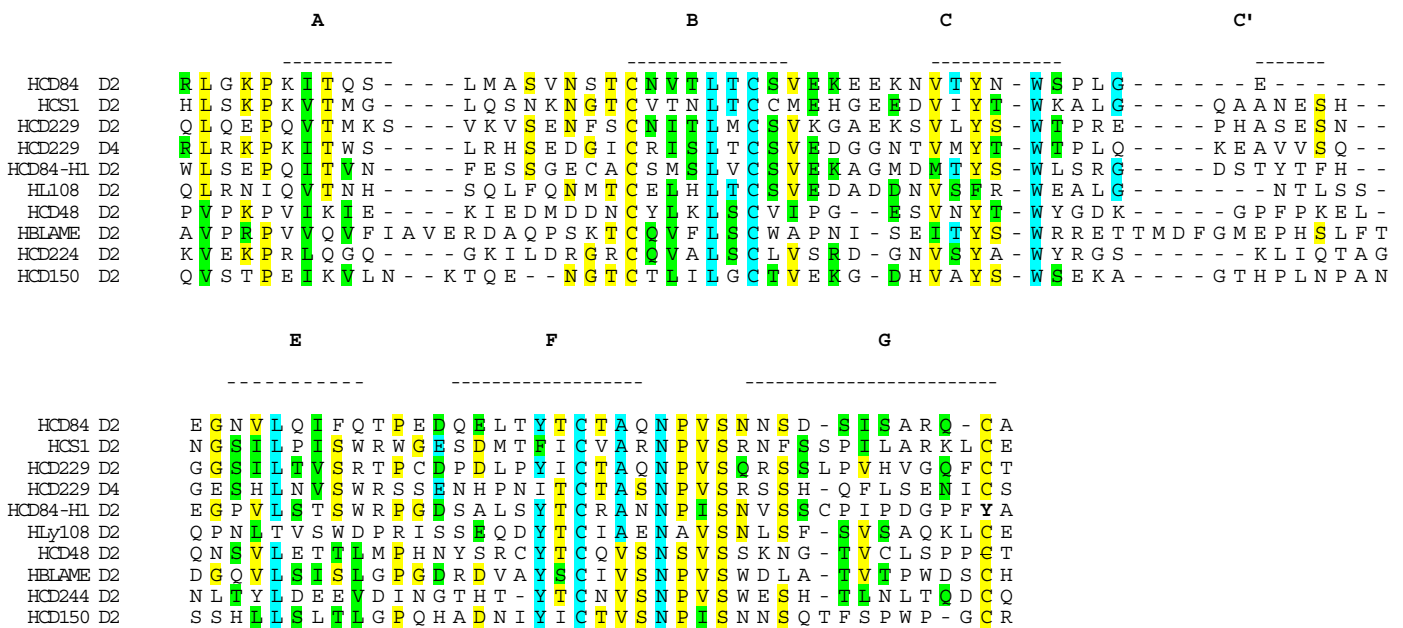
**Fig 5. Arbre filogènic dels ectodominis humans de la família del CD150.** (Predicció resultat de l'anàlisi mitjançant *ClustalW* i representats mitjançant *Treeview*).

Tots els dominis Ig tenen una sèrie de residus conservats que permeten a la proteïna el seu plegament característic. Així doncs, trobem el triptòfan conservat (W33) en la làmina C que està present en la mateixa posició en tots els membres de la SFIg. També es troba conservat el pont d'hidrogen que es forma entre el grup OH de la tirosina 82 (Y82) i l'oxígen del grup carboxi de l'àcid aspàrtic 78 (D78). Aquest mateix grup carboxi forma un pont salí amb l'arginina 59 (R59) localitzat a la làmina D. Tota una sèrie de residus hidrofòbics també es conserven en la majoria de membres de la SFIg; valina 16 (V16), leucina 18, 69 i 103 (L18, L69, L103) i la isoleucina 71 (I71). Un tret rellevant és que els residus cisteïna implicats en la formació de ponts disulfur no són essencials per mantenir el plegament Ig. Així doncs, els dominis variables de la família del CD150 no contenen les cisteïnes de les làmines B i F típiques de dominis immunoglobulina de tipus V. Aquestes cisteïnes són substituïdes per AA apolars V/L/A que es troben conservats en els diferents membres de la família del CD150 (Fig 6).

Immunoglobulin V-set domain



Immunoglobulin C2-set domain



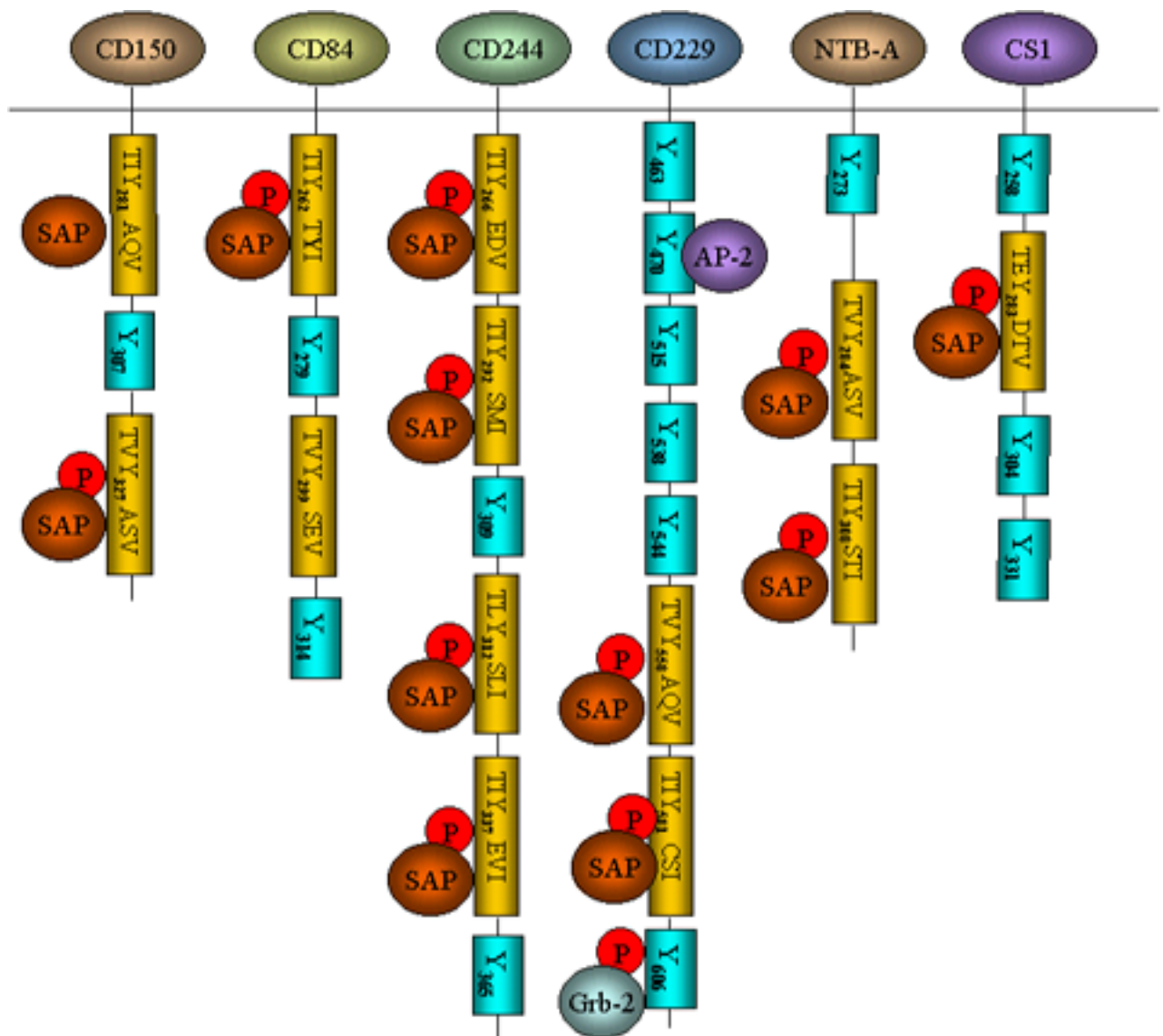
**Fig 6.** Alineament de la seqüència d'aminoàcids dels dominis Ig de la família del CD150. Les línies superiors marquen les làmines β. Els “gaps” s'indiquen amb guions, per afavorir l'òptim alineament de la seqüència. Per l'alineament fem servir Aling X program (Vector NTI suite). En blau es mostren els AA crítics conservats en la majoria de membres de la SFIg, en groc s'assenyalen els AA idèntics, mentre que els residus conservats en la família del CD150 es mostren en verd.

El segon domini Ig, de tipus C2, presenta dos ponts disulfur potencials en tots els membres de la família del CD150. Aquest segon domini Ig, més glicosilat, es troba més conservat entre els diferents membres de la família. Això probablement es deu a una pressió evolutiva més forta sobre aquest domini Ig, ja que substitucions o altres alteracions en la seva seqüència aminoacídica, poden alterar l'estructura i l'orientació global de la molècula, impedit-ne el seu funcionament correcte.

Els dominis citoplasmàtics presenten un o més motius tirosina amb la seqüència consensu T-I/V-Y-x-x-I/V (on T és treonina, I isoleucina, V valina, Y tirosina i X qualsevol altre residu), a excepció de BLAME, CD84-H1 i CD48 (32,33, 4). El motiu tirosina consensu ha esdevingut d'una importància cabdal per entendre el funcionament d'aquestes molècules. Recentment, s'ha descrit la interacció d'una proteïna citoplasmàtica anomenada SAP (*SLAM-associated protein*) amb els dominis tirosina de les cues citoplasmàtiques de CD150 (34), CD244 (35), CD84 i CD229 (36), NTB/A (37, 38) i CS1 (39). Defectes amb la proteïna SAP són els responsables de la immunodeficiència de nom síndrome d'immunodeficiència lligada al cromosoma X (XLP).

Recentment, s'ha caracteritzat la família d'adaptadors SAP que comprèn dos membres: SAP i EAT-2. Aquests adaptadors són proteïnes citoplasmàtiques que es troben constituïdes per un únic domini SH2 amb una petita cua carboxi-terminal de funció desconeguda (40). Aquests adaptadors s'associen als motius tirosina dels receptors de la família del CD150 i modulen la interacció de la seva cua citoplasmàtica amb fosfatases, quinases i altres adaptadors. Cada receptor pot donar lloc a un senyal particular determinat per la distribució dels motius tirosina al llarg de la seva cua citoplasmàtica, per la seqüència d'AA de cada motiu i pels AA que envolten a cadascun d'aquests motius (41)

La família d'adaptadors SAP juga un paper singular en la senyalització dels receptors de la família del CD150. Aquest paper no s'ha descrit en altres molècules de la SFIg. Altres grups d'adaptadors també intervenen en la senyalització dels receptors de la família del CD150. Aquest és el cas de CD229, on trobem que la seva cua citoplasmàtica s'associa a l'adaptador AP-2, modulant-ne la seva internalització.



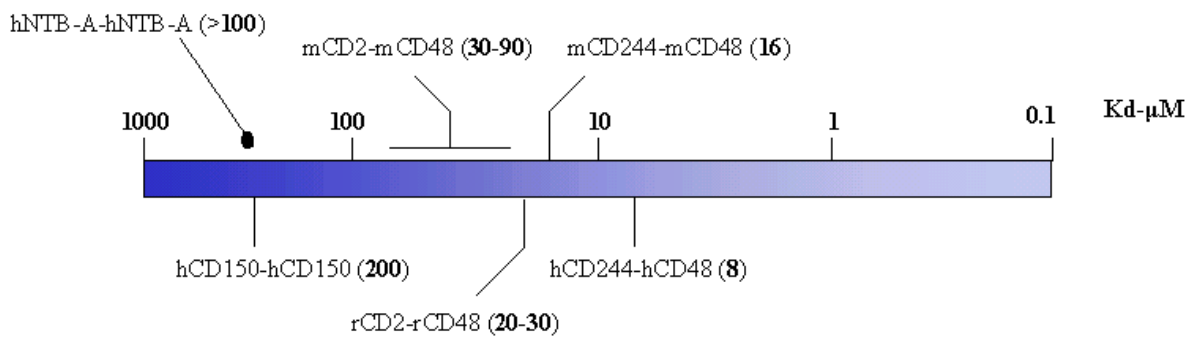
**Figura 7.** Esquema de les cues citoplasmàtiques dels receptors de la família del CD150 amb motius d'interacció amb SAP i EAT-2. Les seqüències consensu T-x (preferentment I/V)-Y-x-x-I/V es presenten en caixes de color groc. La tirosina central d'aquesta seqüència consensu requereix ser fosforilada per interaccionar amb SAP o EAT-2, amb l'excepció de Y281 de CD150. En el cas de CD244 els últims tres motius tirosina estan implicats en la interacció amb SAP. S'ha determinat la interacció de EAT-2 amb CD84, CD150, CD229, CD244 i NTB-A però els motius tirosina amb els que interacciona romanen sense mapar.

CD229 també s'associa a Grb-2, i actúa modulant l'activació de la cèl·lula (Martin M, JI, 05, in press). Així doncs, apareixen vies de senyalització iniciades pels receptors de la família de CD150 que poden ser independents de SAP o EAT-2 (Fig 7).

Cal esmentar que la senyalització que es dona en els receptors de la família del CD150 en humà pot ésser diferent que en ratolí. Aquest és el cas de l'associació de SAP amb CS1, que ha estat descrita en humà però no detectada en ratolí (39).

### 3.3 Lligands de la família de CD150.

S'ha proposat que els gens de la família del CD150 s'originaven a partir d'un gen ancestral que codificava per una proteïna amb la capacitat d'interaccionar de forma homotípica. Aquest gen ancestral s'hauria anat duplicant i diversificant al llarg de l'evolució (22, 23). Totes les parelles lligand-receptor que s'han descrit en la família del CD150, es troben constituïdes per membres d'aquesta mateixa família. Tot i que CD2 i CD58 no pertanyen a la família del CD150 els considerem en aquest breu apartat degut a que, juntament amb la família del CEA-*carcinoembryonic antigen*, són les molècules amb les que comparteixen una major homologia. De forma general, podem classificar les interaccions en heterofíliques i homofíliques. Per una banda les heterofíliques, com ara el CD48 interaccionant amb el CD244 (tant en ratolí com en humà) amb una afinitat relativament elevada (42, 43) i la interacció del CD48 humà amb el CD2 humà (44). L'habilitat de CD48 per interaccionar amb més d'un receptor és una característica que trobem en altres membres de la SFIg com el CD80 i CD86 interaccionant amb el CD28 i CTLA-4 (45, 46). Per altra banda trobem interaccions homofíliques, com en els casos del CD150, CS1 i NTB-A (47, 48, 49, 50) amb afinitats més baixes que les de les interaccions heterofíliques descrites per la família del CD150 (Fig 8).



**Figura 8.** Constants d'equilibri de les interaccions de membres de la família del CD150. *h*;humà, *r*;rata, *m*;ratolí.

S'han descrit formes solubles d'algunes de les molècules de la família del CD150, com és el cas del mateix CD150 (26) o el CD244 de rata (27). Aquestes molècules solubles podrien interaccionar amb els seus receptors de membrana modulant-ne la resposta immune.

### 3.4 La interacció amb el virus del xarampió

La co-evolució dels virus amb l'hoste no només ha donat forma al sistema immune, sinó que ha enriquit les estratègies víriques per poder infectar l'hoste. Una d'aquestes estratègies ha estat fer servir els dominis Ig dels receptors de membrana com a portal d'entrada a la cèl·lula. Així, trobem exemples com el VIH, els rinovirus i els poliovirus que s'uneixen respectivament als receptors CD4, CD54, CD155 i tots ells fan servir el domini Ig N-terminal dels receptors. Sorprenentment, el virus del xarampió ha desenvolupat aquesta habilitat per entrar a la cèl·lula emprant dos receptors: el CD46 i el CD150(51).

El virus del xarampió, altament contagiós, pertany a la família dels morvillivirus. Altres morvillivirus també fan servir el receptor CD150 per entrar a la cèl·lula, cosa que explica perquè aquesta família de virus són majoritàriament limfotròfics (52). D'altra banda, podrien existir altres receptors implicats en l'entrada del virus, ja que el CD46 i

el CD150 no expliquen tot el tropisme del virus del xarampió. La proteïna hemaglutinina (HA) del virus del xarampió és la responsable de la interacció amb CD46 i CD150 (53, 54). Els llocs d'unió de HA als dos receptors són diferents, ja que la substitució de l'AA 481 de l'HA impedeix l'unió a CD46 però no a CD150. El domini V del receptor CD150 humà és necessari i suficient per interaccionar amb la proteïna HA i permetre l'entrada del virus. Si el domini Ig de tipus V del CD150 humà és substituït pel domini Ig de tipus V del CD150 murí, aquesta quimera deixa d'actuar com a receptor de virus del xarampió. Això explica la inhabilitat de virus del xarampió per infectar les diferents soques de ratolins.

Recentment s'ha demostrat que el virus del xarampió infecta les cèl·lules dendrítiques gràcies al receptor CD150 expressat en la seva superfície. Aquesta infecció inhibeix l'expressió de molècules com ara el B7-1, B7-2, CD40 i MHC. Per tant, el reduït nombre de molècules coestimuladores contribueix a la immunosupressió induïda pel virus del xarampió (55)

### **3.5 La interacció amb FimH.**

El CD48 és responsable del reconeixement de patògens. S'ha observat que mastòcits i macròfags, mitjançant el receptor CD48, poden reconèixer i unir-se àvidament a diverses lectines FimH expressades en bacteries entèriques. El tractament de CD48 amb enzims glicosidases aboleixen la interacció amb FimH, cosa que demostra que la porció glicosilada de CD48 està directament implicada en aquest reconeixement. A més a més, la interacció de CD48 amb FimH indueix, per una banda, l'alliberament de factors proinflamatoris com el TNF- $\alpha$  i per l'altra, el procés d'endocitosis de la bactèria (56).

CD48 és una proteïna ancorada en la membrana per GPI. Aquest tipus de proteïnes es troben localitzades en compartiments lipídics anomenats caveoles. Les caveoles són riques en molècules que donen senyals a l'interior de la cèl·lula, tals com *GTP/binding proteins* i podrien mitjançar la senyalització de CD48. Experiments de microscopia confocal han demostrat la presència de CD48 en les caveoles dels mastòcits. A més a més, aquests materials caveolars s'han trobat envolcallant bacteries

entèriques. Així doncs, les caveoles semblen mitjançar l'entrada de bacteries fent servir aquest mecanisme d'interacció CD48 amb FimH. Cal destacar que la bactèria es troba en compartiments intracel·lulars que no es fusionen amb lisosomes i per tant segueixen una nova ruta, diferent a la clàssica ruta fago-lisosòmica. (56).



#### **4. SÍNDROME DE LA IMMUNODEFICIÈNCIA PROLIFERATIVA LLIGADA AL CROMOSOMA X (XLP).**

El síndrome de la immunodeficiència proliferativa lligada al cromosoma X (XLP) o malaltia de Duncan (també anomenat síndrome de Purtilo) és una immunodeficiència primària (57). Aquest desordre familiar, que només afecta a homes, va ser descrit per primer cop fa poc més de 25 anys i es caracteritza per tres fenotips destacats: mononucleosi infecciosa fulminant, limfomes de cèl·lules B i disgammaglobulinèmia (taula 4) (58, 59). En molts casos, els malalts poden desenvolupar més d'un fenotip a la vegada. El XLP afecta d'un a tres individus de cada  $10^6$  homes. Aquesta estimació probablement és inferior al nombre real d'homes que es troben afectats, ja que els desordres clínics del XLP es poden confondre amb altres malalties com la immunodeficiència comú variable (CVID) o la limfohistocitosi hemofagocítica (60, 61). No han estat detectades mutacions de SAP en limfomes esporàdics de tipus Burkitt (62)

La majoria de malalts joves amb XLP afectats per mononucleosi infecciosa moren a les poques setmanes de ser infectats amb el virus d'Epstein-Barr (EBV). Aquests individus presenten una excessiva proliferació de cèl·lules T CD8<sup>+</sup>, NK i macròfags, i una incapacitat de produir una resposta humoral correcta contra EBV. També s'ha detectat l'anormalitat en la resposta citotòxica de les cèl·lules CD8 i NK per eliminar cèl·lules infectades amb EBV(58). Com a conseqüència, els limfòcits s'infiltraen en els òrgans del malalt, provocant la necrosi hepàtica i la fallida del moll de l'os (63). Curiosament, els malalts de XLP poden sobreviure a altres infeccions víriques, inclosos altres hèrpes virus.

L'EBV és normalment el detonant de la limfoproliferació aguda en malalts de XLP afectats per mononucleosi infecciosa, però no és necessari per causar la disgammaglobulinèmia ni l'aparició de limfomes (59). Quan aquests malalts presenten disgammaglobulinèmies es pot observar una disminució de Ig al llarg dels anys, cosa que fa pensar en el desenvolupament de la malaltia per efectes acumulatius de factors ambientals (58). Altres alteracions trobades en aquests malalts són la quantitat

pràcticament indetectable d'anticossos contra tètanus o difteria després de repetides immunitzacions, i la incapacitat per produir el canvi isotípic a IgG després d'una segona immunització amb el bacteriòfag X174 (64).

**Taula 3. Fenotips del síndrome limfoproliferatiu lligat al cromosoma X (XLP).** (taula de P. Engel, *Nature Review of Immunology*, 03)

Fenotip	Prevalència (%)
<p><b>Mononucleosi infecciosa fulminant</b> Després de la infecció dels malalts XLP amb el virus d'Epstein-Barr (EBV) es dona una expansió policlonal de cèl·lules B i T. Com a conseqüència es produeix una destrucció del fetge i el moll d'os.</p>	50
<p><b>Limfomes de cèl·lules B</b> Non-Hodgkin limfomes de cèl·lules B, extranodals i normalment de tipus Burkitt. La majoria es troben en la regió ileocecal de l'intestí.</p>	30
<p><b>Disgammaglobulinèmia</b> Disgammaglobulinèmia adquirida i altres anormalitats en la síntesi d'immunoglobulines (de forma semblant a la immunodeficiència variable comú).</p>	30
<p><b>Manifestacions clíniques menys freqüents</b> Vasculitis, anèmia aplàstica, granulomatosi limfoide pulmonar, colitis i psoriasi</p>	3

Tanmateix, el risc de desenvolupar limfomes en els malalts amb XLP s'estima que és unes 200 vegades superior al de la resta de la població (65). Totes aquestes manifestacions fan que en els malalts amb XLP a l'edat de 10 anys la mortalitat sigui del 70% i a l'edat de 40 del 100% (59).

Els malalts amb disgammaglobulinèmia es tracten normalment amb immunoglobulines, però les altres manifestacions clíniques de XLP només es poden prevenir amb el transplantament al·logènic del moll de l'os (66).

## 4.1 El gen defectuós en malalts de XLP.

El gen alterat en malalts amb XLP va ésser identificat el 1998 per tres grups de manera independent (67, 68, 34). Aquest gen, designat amb els noms de SAP (SLAM associated protein) o SH2D1A (*src homology 2 domain-protein A1*), es localitza en el braç llarg del cromosoma X, en la regió Xq25, i conté quatre exons distribuïts al llarg de 25 Kb que codifiquen per una proteïna de 128 AA (pes molecular de 15 KD).

La majoria de les 50 mutacions que s'han trobat en malalts amb XLP s'han pogut classificar en tres categories: micro o macro delecions, mutacions que interfereixen en la transcripció o "splicing" que condueixen a un processament inadequat del RNA i mutacions puntuals que donen lloc a un codó d'aturada o a la substitució d'un AA. L'estudi de les mutacions puntuals demostren que SAP es veu alterat per dos mecanismes diferents. Per una banda, mutacions que afecten a la vida mitja de la proteïna i per tant demostren que SAP s'ha de trobar en nivells òptims pel seu funcionament correcte, i per l'altra, mutacions que afecten al lloc d'unió de SAP amb els motius tirosina. No s'ha pogut trobar cap correlació entre aquestes mutacions i la presència d'un fenotip determinat de XLP. De fet, mutacions idèntiques en una mateixa família han donat lloc a fenotips diferents (69, 70).

## 4.2 SAP (SLAM associated protein)

La proteïna SAP es troba constituïda per un domini SH2, flanquejat per 5 AA en l'extrem N-terminal i 24 AA en l'extrem C-terminal (34). La seva conformació consisteix en una làmina  $\beta$  central flanquejada per dues hèlix  $\alpha$  (71).

SAP es troba present en timòcits, en cèl·lules T de sang perifèrica, en cèl·lules NK, en cèl·lules NKT i en eosinòfils (72, 73, 74, 75). La seva expressió durant l'activació en cèl·lules T és controvertida (76, 77, 78, 73, 79). Tot i que diferents estudis han demostrat que SAP no es troba present en limfòcits B de sang perifèrica, s'ha detectat RNA missatger per SAP en cèl·lules B memòria (80, 81). Recentment, existeix la hipòtesi de que SAP es trobi expressat en un interval al llarg de la maduració de la

cèl·lula B i pugui estar involucrat en la diferenciació de les cèl·lules B mitjançada pels receptors de la família del CD150 (82).

La interacció de SAP amb les cues citoplasmàtiques de la família del CD150 ha estat caracteritzada mitjançant estudis cristal·logràfics. Encara que els dominis SH2 convencionals s'uneixen als seus lligands per dos punts d'unió mitjançant una tirosina fosforilada i alguns residus C-terminal de la tirosina, el domini SH2 de SAP interacciona amb tres llocs dels motius tirosina consensus: amb la tirosina central, amb la valina en posició +3 respecte la tirosina i amb la treonina en posició -2, interacció aquesta última, exclusiva de SAP (71, 69). SAP interacciona amb les cues citoplasmàtiques dels membres de la família del CD150 mitjançant aquests tres punts d'unió al motiu tirosina. Cal esmentar però, que mentre que la fosforilació de la primera tirosina de CD150 no és necessària per tal que es doni l'associació amb SAP (34), la resta de receptors de la família sí que requereixen de la fosforilació de les seves tirosines per poder interaccionar amb aquest adaptador (32).

### **4.3 SAP com a molècula bloquejadora**

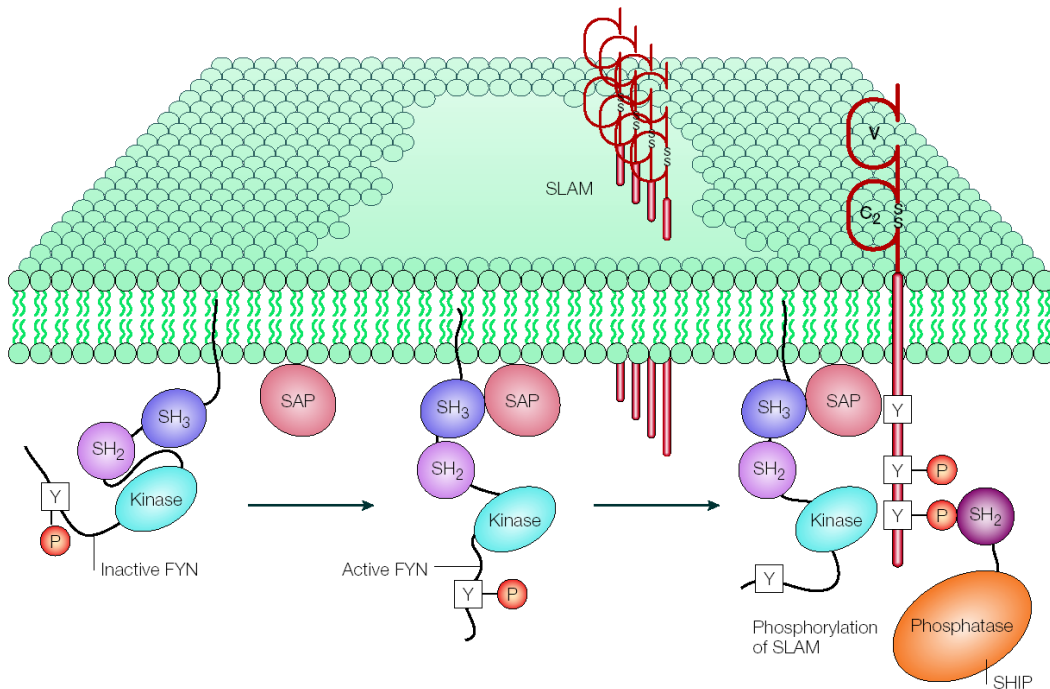
La presència d'un únic domini SH2 i la seva elevada afinitat per les cues citoplasmàtiques dels receptors de la família de CD150 fan de SAP una proteïna idònea per bloquejar les interaccions amb altres proteïnes constituïdes per dominis SH2 (Morra 01). S'ha demostrat que la fosfatasa SHP-2, que conté un domini SH2, només s'uneix a CD150 en absència de SAP, mentre que quan SAP hi és present competeix amb SHP-2, desplaçant-la (34, 83). No obstant això, no s'ha observat el mateix grau de bloqueig per tots els receptors de la família del CD150. Així doncs, la capacitat de bloqueig de SAP dependrà de les afinitats per les diferents tirosines dels receptors d'aquesta família i de la concentració local de SAP (4). Un exemple interessant el trobem en el CD244 (2B4), on la lligació d'aquesta molècula mitjançant anticossos en cèl·lules NK immadures (que no expressen SAP) dona lloc a una inhibició de l'activitat citotòxica, mentre que aquests mateixos anticossos en NK madures (que expressen SAP) indueixen citotoxicitat (84). Per tant, en cèl·lules NK, SAP podria bloquejar la interacció de la fosfatasa SHIP (fosfatasa amb efectes inhibidors sobre la citotoxicitat) i d'aquesta manera augmentar la

citotoxicitat, mentre que en absència de SAP, CD244 reclutaria SHIP i inhibiria la citotoxicitat (McNerney ME, Mol. Biol, 05)

#### **4.4 Interacció de SAP amb CD150 i la cinasa FYN.**

Pel que fa a l'estructura de SAP, amb un únic domini SH2 i una petita cua de 26 AA, es podria pensar que aquesta molècula actúa exclusivament com a element bloquejant, impedit l'unió de proteïnes amb motiu SH2 a la cua citoplasmàtica dels receptors de la família del CD150. Com a conseqüència quedaria descartat el seu paper com a adaptador clàssic, és a dir, fent de pont entre proteïnes per mitjançar la propagació de senyals a l'interior de la cèl·lula. No obstant això, les primeres evidències de que SAP podria reclutar cinases les trobem en els experiments de co-transfecció de SAP amb receptors de la família del CD150 en cèl·lules COS, on la presència de SAP induïx la fosforilació de la cua citoplasmàtica d'aquests receptors (34, 36). Altres treballs demostren que la fosforilació de CD150 i CD229, induïda per anticossos contra aquestes molècules, no es dona en timus procedents de ratolins deficients de SAP (85). A més a més, en timòcits de ratolins deficients de FYN incubats amb anticossos contra CD150 es dona una baixa fosforilació del receptor CD150. (86)

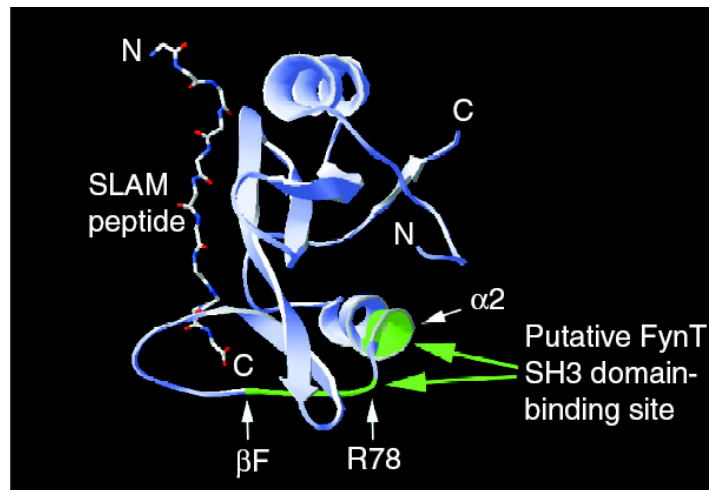
Estudis recents han demostrat que el domini SH2 de SAP s'uneix directament al domini SH3 de la cinasa FYN. D'aquesta manera SAP és essencial per al reclutament de cinases cap als receptors de la família del CD150, induint així la formació d'un complex ternari format per un receptor de la família del CD150, l'adaptador SAP i una cinasa (87, 88) (Fig 9). El domini SH2 de SAP inclou una nova superfície de contacte, no rica en prolines, que interacciona específicament amb el domini SH3 de FYN. Aquest nou motiu d'interacció es localitza entre la sisena làmina  $\beta$  (BF) i la segona hèlix  $\alpha$  del domini SH2 de SAP. És un motiu carregat positivament en la superfície externa del domini SH2, lluny de la cavitat de SH2 que interacciona amb la cua citoplasmàtica de CD150. La regió complementària de FYN es troba formada pel "loop" RT i les làmines  $\beta$  BCD. Aquesta superfície de contacte es solapa amb la zona d'unió canònica de SH3 al motiu Pro-x-x-Pro. A més a més, hi ha una distribució de càrregues negatives complementària a la superfície d'interacció positiva de SH2-SAP (Fig 10).



**Figura 9. Model d'activació i reclutament de FYN mitjançada per SAP.** L'associació de SAP amb CD150 (SLAM) promou el reclutament de FYN i induïx la seva activació. Posteriorment, FYN pot fosforilar altres residus tirosina de CD150 o altres molècules veïnes. (Fig de Engel P. *Nature review of Immunology*. 03).

Recentment, la producció d'un ratolí amb l'AA R72 de l'adaptador SAP substituït per una alanina, que bloqueja la unió de SAP amb FYN, demostra la importància de la via de senyalització SLAM-SAP-FYN en la producció de IL-4 (89).

Les cinases Src es mantenen en una conformació inhibida gràcies a interaccions intramoleculares del seu domini SH3 amb el domini cinasa i amb el segment d'unió de SH2 amb aquest domini cinasa (Fig 9). La unió del domini SH2 de SAP amb el domini SH3 de FYN competeix amb aquesta interacció intramolecular de la forma inactiva de FYN. D'aquesta manera, afavoreix el desplegament de la conformació de FYN i la seva activació. Experiments *In vitro* demostren que l'addició de SAP incrementa l'activitat catalítica de FYN. (86). Provablement, aquest mecanisme es dona en altres tipus cel·lulars diferents als limfòcits T, tals com les cèl·lules NK que co-expressen SAP i FYN (87).



**Figura 10.** Representació esquemàtica dels llocs d'unió SAP-FYN i SAP-motiu tirosina. (Figura de Latour S., *Nature Cell Biology*, 03)

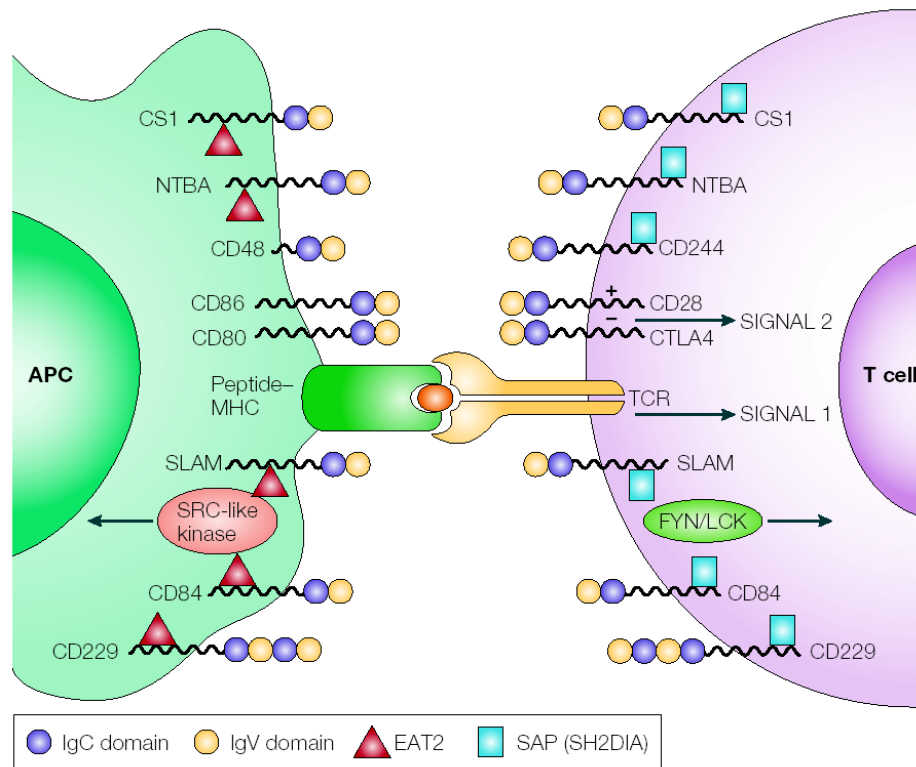
La cinasa FYN fosforila el receptor CD150 però també la fosfatasa SHIP i els adaptadors Dok1/2 i Shc. Com a resultat d'aquetes fosforilacions hi ha una disminució de la producció de IFN- $\gamma$  (86). Per altra banda, s'ha observat l'associació de SAP amb l'adaptador Dok1 fosforilat. Aquesta interacció podria bloquejar l'unió de Dok1 amb la fosfatasa SHP-2, perllongant la inhibició de la via Ras i bloquejant també la unió a l'inhibidor de la cinasa CsK (90).

#### 4.5 La família d'adaptadors SAP&EAT-2.

Degut a la importància de SAP en la transmissió de senyals dels receptors de la família del CD150 en cèl·lules T i NK, es va pensar que una molècula semblant podria regular la funció de les molècules de la família en altres tipus cel·lulars. Basant-se en comparacions de seqüències, es va trobar l'adaptador EAT-2 com a candidat (*EWS/FLI1 activated transcript 2*) ja que SAP comparteix un 45% d'AA idèntics amb aquest adaptador (91).

SAP i EAT-2 són proteïnes citoplasmàtiques que es troben constituïdes per un domini SH2 amb una petita cua carboxi-terminal de funció desconeguda (Morra, *EMBO*, 2001). Els gens que les codifiquen tenen una mateixa distribució exó-intró, indicant que probablement deriven d'un ancestre comú (40). Però, mentre que el gen de SAP es troba en el cromosoma X, el gen que codifica per EAT-2 es troba localitzat en el

cromosoma 1, tant en humà com en ratolí (fig 3). En ratolí, s'han identificat dos gens EAT-2 (EAT-2a, EAT-2b) que es diferencien per l'exó II i III però que són idèntics per l'exó I i IV. Aquests gens es troben molt junts en el genoma (26Kb) i codifiquen per proteïnes amb una homologia del 80%.



**Figure 11. Model de la interacció d'una cèl·lula T amb una cèl·lula presentadora d'antígens (APC).** La interacció de lligands-receptors entre membres de la família indueix la fosforilació de les cues citoplasmàtiques i l'associació de SAP i EAT-2 als motius tirosina consensus T-(I/V)-Y-X-X-(I/V). Aquests adaptadors recluten src cinases que poden modificar la senyalització generada pel complex TCR-pèptid-MHC i per les molècules coestimuladores (Figura de Engel, Nature review of Immunology, 03).

EAT-2 es troba expressat en macròfags, cèl·lules B i probablement en cèl·lules dendrítiques (DC). D'aquesta manera sembla que el buit funcional deixat per SAP en les cèl·lules presentadores (APC) queda cobert per EAT-2 (Fig 11).



EAT-2 s'uneix a la cua citoplasmàtica de CD150, CD84, CD229 i CD244. Aquesta associació es produeix en els mateixos residus tirosina d'interacció amb SAP i amb una afinitat comparable. No obstant això, sempre es requereix de la fosforilació dels residus tirosina. La interacció de EAT-2 amb els motius tirosina, de la mateixa manera que amb SAP, es dona mitjançant tres llocs d'unió. Això explica l'habilitat de EAT-2 per a actuar com a molècula bloquejant, impeding el reclutament de les fosfatases SHP-2 (91).

Per altra banda, EAT-2 deu activar i reclutar cinases, ja que la cotransfecció de receptors de la família del CD150 amb EAT-2 induïx la fosforilació d'aquests receptors. (91). Amb tot, cal esmentar que a EAT-2 li manca el domini d'unió de SAP amb la cinasa FYN, indicatiu de que SAP i EAT-2 deuen interaccionar amb cinases diferents.

#### 4.6 Ratolins deficients en SAP

Els ratolins deficients en SAP són una bona eina per estudiar els fenotips observats en els malalts amb XLP. Els primers estudis realitzats en aquests ratolins demostren que les cèl·lules T deficients en SAP tenen una polarització aberrant cap al fenotip Th2, que els hi confereix una major resistència a la infecció per *Leishmania major*. La susceptibilitat dels ratolins BALB/c al paràsit *Leishmania major* es deu, en part, a la ràpida resposta de les cèl·lules CD4 i NKT que produeixen gran quantitat de IL-4, evitant la superació de la infecció. Així doncs, en ratolins SAP deficients que han estat infectats per *Leishmania major*, la producció de IFN- $\gamma$  es veu incrementada respecte a ratolins WT, mentre que la producció de IL-4, IL-10 i IL-13 es veu molt reduïda, de la mateixa manera que la producció de IgE (92, 93).

Estudis recents s'endincen en el coneixement de les vies de senyalització de les cèl·lules T de ratolins SAP deficients i demostren que el defecte de producció de IL-4, en resposta a l'activació del TCR, és independent de la producció elevada de IFN- $\gamma$ . Aquestes cèl·lules tenen una inducció deficient del factor de transcripció GATA-3, tenen defectes en el reclutament de la PKC- $\theta$  i en la fosforilació de Bcl-10, també presenten defectes en la degradació de I $\kappa$ B- $\beta$  i en l'activació del factor de transcripció

NF- $\kappa$ B1/p50. Els mateixos defectes han estat observats en cèl·lules de ratolins deficients de Fyn, reforçant la hipòtesi d'aquesta via de producció de citocines Th2 per receptors de la família del CD150-SAP-Fyn que indueixen l'activació de PKC- $\theta$  / NF- $\kappa$ B (94). Per altra banda, estudis en ratolins amb mutacions en SAP que impedeixen la interacció amb Fyn i en ratolins deficients en SAP, Fyn o CD150, demostren que la via de senyalització SAP-Fyn està directament implicada en la producció de citocines Th2 (89)

També s'ha estudiat la resposta immune dels ratolins deficients en SAP davant les infeccions víriques. Com l'EBV no pot infectar les cèl·lules de ratolins, s'ha buscat un model d'infecció ben caracteritzat com el del virus de la coriomeningitis limfocítica (LCMV). Aquests ratolins infectats pel LCMV no poden superar la infecció i com a resultat tenen una elevada mortalitat. La melsa i el fetge tenen una excessiva acumulació de cèl·lules CD4 i CD8 productores de IFN- $\gamma$  ( 92) i es dona una resposta Th1 inapropiadament perllongada. A més a més, els ratolins SAP deficients infectats per LCMV poden generar una resposta primària forta però no generen cèl·lules plasmàtiques de vida llarga específiques contra el virus ni tampoc cèl·lules B memòria. La freqüència de cèl·lules CD4 al voltant dels pocs centres germinals que presenta el ratolí deficient són comparables a les del ratolí control, indicant que no hi ha problemes en la migració de les cèl·lules CD4. Experiments en els que es transfereixen combinacions de cèl·lules T i B de ratolins control i SAP deficients a ratolins irradiats, demostren que les cèl·lules B de ratolins SAP deficients són normals, mentre que el defecte es troba en les cèl·lules T CD4 (95).

En els ratolins deficients en SAP es detecten defectes en la formació de centres germinals, llocs anatòmics de la cooperació de les cèl·lules B amb cèl·lules T (95). Les cèl·lules T dels centres germinals són una de les principals fonts de IL-4 (J of Immunol 2003 Johanson), citocina alterada en els ratolins deficients en SAP. Tot fa pensar que hi ha alteracions en la capacitat de les cèl·lules T per enviar senyals a la cèl·lula B perquè aquesta es diferenciï en cèl·lules B memòria i cèl·lules plasmàtiques de vida llarga. És possible que en l'activació de la cèl·lula T deficient en SAP per la cèl·lula presentadora antigènica (cèl·lula B o DC) no s'indueixi l'expressió d'alguna molècula essencial per a la cooperació T-B que promouria el correcte desenvolupament de la cèl·lula B.

Per altra banda, s'ha demostrat que SAP és essencial per a una resposta humoral T dependent, però no és necessari per a una correcta resposta humoral T independent. Aquest fet resulta extremadament interessant per l'estudi d'enfermetats autoimmunes humorals tals com el Lupus Eritromatós Sistèmic (LES). Així doncs, s'observa que ratolins deficients en SAP presenten una protecció davant models experimentals de LES. En aquests ratolins hi ha una menor producció de factor reumatoid i d'anticossos contra cadena doble i simple de DNA (96). Aquest model de LES aprofita el fet de que no hi ha una correcta interacció T-B en ratolins deficients en SAP i per tant no es dona la producció d'autoanticossos. Un altre fet rellevant d'aquest estudi és que l'expressió de molècules de la família del CD150 com el propi CD150 o Ly108 es veu incrementada en aquest model de LES i per tant podrien estar implicades en el desenvolupament de la malaltia. A més a més, estudis recents mostren una associació entre el polimorfisme de gens de la família del CD150 i el desenvolupament del lupus murí (Wandstrat AE, Immunity, 04). És provable que les molècules de les famílies CD150-SAP es trobin implicades en altres malalties que requereixin de la resposta humoral dependent de cèl·lula T com ara la *miasthenia gravis* o al·lèrgies.

Recentment, s'ha observat que els ratolins SAP deficients tenen una manca total de cèl·lules NKT i el mateix succeeix amb els pacients amb XLP. Aquesta alteració també la trobem en ratolins Fyn deficients. Per tant, aquests resultats demostren la important implicació de la ruta de senyalització de receptors de la família del CD150-SAP-Fyn en la generació de les cèl·lules NKT. Els ratolins deficients PKC- $\theta^{-/-}$  i NF- $\kappa B^{-/-}$  presenten el mateix fenotip deficient en cèl·lules NKT, suggerint la implicació de totes aquestes molècules en una mateixa via de senyalització. L'absència de cèl·lules NKT probablement contribueix de manera important en el fenotip dels ratolins SAP $^{-/-}$ , incloent-hi una deficient resposta contra virus, una anormal activitat antitumoral i un afavoriment de la hipogammaglobulinèmia (74, 32, 97, 98).

## **5. DESCRIPCIÓ DELS MEMBRES DE LA FAMÍLIA DEL CD150: CD84, CD150(SLAM), CD229(Ly9) I CD244(2B4)**

### **5.1 CD84**

Aquesta proteïna de transmembrana de tipus I es troba constituïda per 328 AA, dels quals 21 formen part del pèptid líder. Els 307 AA que conté la proteïna madura tenen un pes molecular calculat de 34,4 kD. La part extracel·lular conté 4 llocs potencials de N-glicosilació (NXT/S) i varies serines i treonines que podrien ser glicosilades en O, conferint-li un pes molecular de 64 a 82 kD. La regió extracel·lular conté un domini Ig variable N-terminal i un domini Ig constant de tipus C2. La regió transmembrana hidrofòbica consta de 25 AA i la cua citoplasmàtica de 83 AA, dels quals 5 són tirosines que contenen 4 llocs possibles d'interacció amb dominis SH2 (99).

La comparació de seqüències de CD84 amb les de la família del CD150 revela que la major homologia la comparteix amb el CD229. El primer domini de CD229 mostra un 34.6% d'identitat amb el primer domini de CD84 i un 30.3% d'identitat amb el tercer domini de CD229, mentre que el segon domini de CD84 mostra un 38.9% d'identitat amb el segon domini de CD229 i un 33.3% amb el domini 4 de CD229 (99).

El gen de CD84 es troba en el braç llarg del cromosoma 1, en la regió 1q23 entre els gens de NTB-A i CD150 (100). Aquest gen està constituït per 8 exons; els tres primers exons codifiquen pel pèptid líder i pels dominis extracel·lulars del CD84, el quart exó codifica per la regió transmembrana i la resta d'exons per la part intracel·lular de la molècula (101).

#### **5.1.1 Distribució en cèl·lules i teixits**

El CD84 es troba expressat de manera predominant en teixits hematopoïètics, majoritàriament en ganglis limfàtics, melsa i leucòcits de sang perifèrica (PBLs), en menor quantitat en timus i molt poc en moll d'os. També es detecta en teixits no limfoides com en ronyó i en menor quantitat en pulmó. A nivell cel·lular, són els

limfòcits B, les plaquetes i els monòcits els que major quantitat n'expressen, encara que també es troba present en timòcits i limfòcits T (99). El CD84 es troba més expressat en cèl·lules B memòria que en "naive" (102). També s'ha descrit la seva expressió en cèl·lules dendrítiques derivades de monòcits (103), en la majoria de granulòcits i pel que fa a cèl·lules CD34+ precursors, s'expressa en el 65% de sang perifèrica i en el 30% de moll d'os. Sembla que el potencial proliferatiu de les cèl·lules CD34+ decreix amb l'increment d'expressió de CD84 (104). Recentment, fent servir estudis amb "microarrays" s'ha descrit que el CD84 es troba expressat de forma diferencial en una subpoblació T "helper" (Th) anomenada Th folicular ( $T_{FH}$ ). Aquests limfòcits  $T_{FH}$  són cèl·lules T no polaritzades que ajuden a la cèl·lula B en la producció d'anticossos. En els òrgans limfoides secundaris, les cèl·lules  $T_{FH}$  migren cap a zones riques en cèl·lules B gràcies a l'expressió del receptor de quimiocines CXCR5 (105). Noves anàlisis amb "microarrays" mostren que CD84 es troba en les cèl·lules de la microglia i que la seva expressió augmenta en ser infectades per prions causants de l'enfermetat de Creutzfeld-Jackson (106). Per altra banda, altres estudis realitzats mitjançant l'ús de microarrays per determinar biomarcadors en el rebuig agut de transplantament de pulmó, mostren la presència de CD84 en cèl·lules de rentats alveolars en una quantitat 5 vegades superior a la que es troba en aquells pacients en que no hi ha hagut rebuig (107).

### **5.1.2 Molècules associades**

La cua citoplasmàtica de CD84 conté dos motius tirosina consensus d'unió amb SAP i EAT-2. Aquesta associació de SAP amb CD84 és dependent de fosforilació i inhibeix la unió de SHP-2 amb la cua citoplasmàtica de CD84 (36, 102, 108). De la mateixa manera, també s'ha descrit l'associació de EAT-2 amb la cua citoplasmàtica de CD84 (91). Estudis realitzats amb mutants de les tirosines Y262 / 298 que presenten motius consensus d'unió a SAP i EAT-2 demostren que EAT-2 es pot unir a les dues tirosines, mentre que SAP tan sols s'uneix a la Y262. A més a més, la cinasa Lck es troba implicada en la fosforilació de la cua citoplasmàtica de CD84, com ho demostra la no fosforilació d'aquest receptor en línies Jurkat deficientes en Lck. La lligació de CD84 indueix la proliferació de cèl·lules T humanes prèviament estimulades amb anti-CD3. Aquest efecte també s'observa en cèl·lules T SAP deficientes provinents de malalts amb XLP. Això suggereix que CD84 pot intervenir en l'activació de cèl·lules T humanes per un mecanisme SAP independent (108).

### 5.1.3 CD84 murí

El gen que codifica per la molècula de CD84 murina va ser clonat d'una llibreria de macròfags. La proteïna comparteix un 57.3% d'identitat (88.7 % considerant AA conservats) amb el CD84 humà (109). La comparació entre dominis Ig de ratolí i humà mostren un 53.7% d'identitat amb el primer domini i un 67% en el segon (79,6% i 94.6% respectivament si contem AA conservats). Aquest segon domini té conservats els tres llocs de N-glicosilació respecte a la molècula humana (109), aquests sucres probablement mantenen l'eix de la proteïna perpendicular a la membrana citoplasmàtica i faciliten la interacció amb el seu lligand (19). La cua citoplasmàtica conserva tres tirosines, dos d'elles són motius d'interacció amb SAP i EAT-2. L'anàlisi per Northern Blot demostra una distribució en teixits molt semblant a la de la molècula humana amb algunes diferències com ara l'elevada expressió de CD84 murí en cèl·lules de moll d'os. A més a més, a diferència del Northern Blot en humà, en ratolí trobem dos bandes, una de 3.6 Kb i l'altra de 1.5 Kb que podrien ser degudes a dos formes de "splicing" o a la utilització de diferents senyals de poliadenilació (109).

## 5.2 CD150 (SLAM- Signaling lymphocyte activation molecule).

La proteïna CD150 dóna nom a la família i va ser caracteritzada utilitzant l'anticòs IPO-3 (110) generat per identificar marcadors de cèl·lules B activades (21). La proteïna detectada per aquest anticòs va ser anomenada SLAM (*Signaling lymphocyte activation molecule*) (111).

La molècula de CD150 es troba constituïda per 335 AA, 27 dels quals formen part del pèptid líder, 202 corresponen a la regió extracel·lular, 22 a la regió transmembrana i 77 al domini citoplasmàtic que conté 3 tirosines, de les quals 2 són motius consensus d'interacció amb dominis SH2. La regió extracel·lular conté 8 llocs potencials de N-glicosilació i està constituïda per un domini de tipus V a la regió N-terminal i un domini

C2 a la regió juxtaposada a la membrana. Aquesta proteïna té un pes molecular de 70 a 95 kD i després de ser tractada amb N-glicosilasa es redueix a 40 kD (111).

Han estat identificades dos isoformes més. Una isoforma secretada amb 30 AA menys que la proteïna completa i que corresponen a la regió transmembrana i una isoforma més curta de 298 AA, que es diferencia de la proteïna completa en la cua citoplasmàtica (26).

El gen de CD150 s'ha mapat en el braç llarg del cromosoma 1 a la banda 1q23 entre els gens del CD84 i el CD48. El gen es troba constituït per 7 exons, un que codifica per la regió 5'UT i el pèptid líder, els dos següents que codifiquen per la part extracel·lular, un exó que ho fa per la transmembrana i la resta per la part citoplasmàtica i la regió 3'UT. Les diferents isoformes del CD150 són conseqüència del "splicing" alternatiu dels seus exons (100).

### 5.2.1 Distribució en cèl·lules i teixits

CD150 s'expressa en timòcits, limfòcits T memòria CD45R0<sup>high</sup>, en cèl·lules dendrítiques i en alguns limfòcits B. L'expressió en limfòcits B, T i NK augmenta ràpidament després de ser activats (21, 111, 77). Les immunohistoquímiques de melsa i ganglis limfàtics demostren que CD150 es localitza en el citoplasma de les cèl·lules del centre germinal i en la superfície de les cèl·lules B del mantell, també es troba expressat en una subpoblació de cèl·lules endotelials (110, 21). CD150 es troba més expressat en cèl·lules Th1 que en cèl·lules Th2 (112). Malalts amb esclerosi múltiple presenten un patró de citocines Th1 més elevat que els dels individus sans. L'anàlisi fenotípic demostra que les cèl·lules CD4 d'aquests malalts expressen més CD150 que els individus control (113). Per altra banda, CD150 també es veu altament expressat en altres patologies on es dona una resposta del tipus Th1. Aquest és el cas de la infecció amb *Mycobacterium leprae* en pacients amb lepra tuberculoide, on s'observa que l'expressió de CD150 està correlacionada amb la resposta tipus Th1(114). La forma soluble de CD150 s'ha detectat en major quantitat en sèrum i en fluid sinovial de pacients que presenten nivells elevats de IgE comparada amb mostres de pacients control (115). Recentment, s'ha suggerit la utilització del CD150 com a marcador per identificar subpoblacions de cèl·lules reguladores CD4+CD25+ implicades en la

tolerància en alotransplantaments, on es descriu que l'activitat alosupressora està mitjançada per la fracció CD4+CD25+CD150+ (116). Per altra banda, també s'han detectat *in vivo* monòcits i macròfags que expressen CD150 en melsa i amígdals, que podrien estar localitzats en zones de cèl·lules T o centres germinals. Aquesta expressió transitòria de CD150 en monòcits és induïda per TLR (Toll like receptor) al lligar-se amb LPS i requereix de la MAPK p38 però no de ERK o JNK (117). CD150 s'expressa en cèl·lules dendrítiques madures i per tant, aquestes cèl·lules seran vehicles per a la infecció del virus del xarampió (118, 119).

CD150 es troba molt expressat en línies cel·lulars B limfoblastoïdes transformades amb el EBV, però en limfomes de Burkitt transformats amb EBV aquesta expressió és inferior. En la línia RPMI-8826, en les línies de cèl·lules T i les línies no limfoïdes no es detecta la presència de CD150 (21). CD150 s'expressa en leucèmia de cèl·lula peluda, limfomes de Hodgking i limfomes limfoblàstics del tipus non-Hodking, però no es detecta en neoplasmes de cèl·lules T, diferents leucèmies limfoblàstiques i no limfoïdes o en mielomes múltiples (21).

### 5.2.2 Lligands i molècules associades

CD150 interacciona homofilicament amb una baixa afinitat ( $K_d=200\mu M$ ) (47). A més a més, s'ha demostrat que CD150 interacciona amb la proteïna HA del virus del xarampió i d'aquesta manera permet la infecció de les cèl·lules del sistema immune (51, 120).

Els motius tirosina de la cua citoplasmàtica de CD150 interaccionen amb l'adaptador SAP, amb les fosfatases SHP-2 i SHIP i amb les cinases Fyn i Lck. SAP s'associa a CD150 a través de la Y281 independentment de la fosforilació d'aquesta tirosina, mentre que l'associació a Y327 és dependent de fosforilació. Aquesta associació de SAP bloqueja la interacció de la fosfatasa SHP-2 amb la cua citoplasmàtica de CD150 (34, 83). Tanmateix, s'ha demostrat que l'adaptador SAP uneix CD150 amb la cinasa Fyn (88, 87), induint la fosforilació del CD150 i de la fosfatasa veïna SHIP, que també s'uneix a CD150, i dels adaptadors Dok1, Dok2 i Shc. SHIP interacciona amb Dok2 que s'uneix a RasGAP formant un complex multiproteic. Aquest complex inhibirà la producció de IFN- $\gamma$  (86).



En cèl·lules B, després de la lligació del BCR, el CD150 es fosforila i s'associa amb la cinasa Fgr (de la família de les src cinases) i amb la fosfatasa SHIP (121). La presència de SAP en alguna subpoblació de cèl·lules B podria actuar regulant la interacció de les fosfatases SHIP vs SHP-2. S'observa que en línies cel·lulars B en presència de SAP, la immunoprecipitació de CD150 coprecipita SHIP i SAP, mentre que en línies B deficientes en SAP els anticossos contra CD150 només immunoprecipiten SHP-2 (122).

En macròfags, en la majoria de cèl·lules B i probablement en cèl·lules dendrítiques, aquesta funció observada per SAP podria ser mitjançada per EAT-2. La interacció de EAT-2 amb la cua citoplasmàtica de CD150 (91) probablement pot induir l'associació amb cinases diferents a Fyn i d'aquesta manera iniciar la senyalització en aquestes cèl·lules.

### **5.2.3 Funció**

La lligació del CD150 amb anticossos específics induïx la proliferació de la cèl·lula T d'una forma independent de IL-2 i CD28 (111). Els anticossos contra CD150, conjuntament amb els anticossos contra el TCR o amb els complexos MHC-pèptid en la superfície de cèl·lules presentadores, actuen en la estimulació de cèl·lules T "resting" per sintetitzar DNA i/o induir la producció de citocines (111). Tanmateix, els anticossos contra CD150 augmenten la producció de IFN- $\gamma$  en absència d'altres estímuls i redirigeixen la resposta immunitària de Th2 a un fenotip Th1 o Th0 (111, 123, 124, 125, 115). També augmenten la citotoxicitat mitjançada pel TCR i promouen l'alliberació de grànuls amb enzims lítics (126).

En limfòcits B, la isoforma soluble augmenta la proliferació induïda per Ab contra el CD40 i la producció de IgM, IgG i IgA (26). La lligació del CD150 en cèl·lula B induïx l'alliberació de calci intracel·lular (21). Els anticossos contra CD150 per ells mateixos són incapaços de induir la proliferació de cèl·lules B, i requereixen d'altres ajudes com ara anticossos contra CD40. Per altra banda, l'apoptosi en cèl·lules B mitjançada per CD95/Fas es veu augmentada per la lligació del CD150, fins i tot pot anul·lar el senyal de rescat de mort cel·lular induïda pel CD40 (121).

En cèl·lules dendrítiques, la lligació del CD150 indueix la secreció de citocines com ara IL-12 i IL-8 (118, 119).

#### **5.2.4 CD150 murí**

El gen murí de CD150 té una elevada homologia amb el gen humà en termes de seqüència nucleotídica (80% d'identitat) i pel que fa a la distribució intró-exó (7 exons distribuïts al llarg de 32 kb). El gen conté una caixa TATA a 478 nucleòtids “upstream” del codó ATG i conté diferents llocs d'unió potencials amb factors de transcripció que controlen l'expressió en el sistema hematopoiètic (Ex. AP-2, PU.1, IRF-1 o IRF-2). Aquest gen es troba localitzat en la regió 1H2.2-2.3 (100).

El CD150 murí té una expressió semblant a l'humà. Es troba expressat en timus i en menor quantitat en ganglis limfàtics i en melsa. Pràcticament no es detecta en cervell, colon, ronyó, fetge i intestí prim. En timus s'expressa de forma més elevada en dobles positius per decreïxer en CD8+ i CD4+. També s'expressa en cèl·lules B i T, i augmenta amb l'activació (100).

Tant en ratolí com en humà, la lligació de CD150 per anticossos incrementa la producció de citocines del tipus Th1, sense afectar la producció de citocines Th2 tals com IL-4 (125).

#### **5.2.5 Ratolins deficients en CD150**

Les anàlisis de cèl·lules T deficients en CD150 demostren que aquesta molècula actua modulant el senyal induït pel TCR. El CD150 interfereix negativament en la producció de IFN- $\gamma$  en cèl·lules CD8+ i en menor grau en cèl·lules CD4+. Per contra, la producció de IL-4 es veu augmentada per la presència de CD150 quan hi ha una activació del TCR en cèl·lules CD4+. De la mateixa manera, la presència de SAP interfereix negativament en la producció de IFN- $\gamma$  i augmenta la producció de IL-4. En el cas de la IL-4 es dona una reducció menys dràstica que en el ratolí SAP deficiència, probablement deguda a la implicació d'altres receptors de la família del CD150 en la senyalització via SAP per produir IL-4. Per tant, cal pensar que la via CD150/SAP actua

de forma coordinada en la producció d'aquestes citocines i contribueix a la diferenciació en cèl·lules Th1 i Th2 (127).

Curiosament, l'estimulació del TCR amb la presència d'anticossos contra CD150 dona lloc a un increment en IFN- $\gamma$  i el mateix efecte el trobem en ratolins CD150 deficients. Seria versemblant que l'anticòs actués bloquejant la interacció homotípica de CD150 o podria ser que l'anticòs de CD150 provoqués una agregació de la molècula reclutant-la fora de la seva localització natural. Trobem altres exemples tals com CTLA-4, on l'anticòs inicialment feia pensar que aquesta molècula tenia funcions coestimuladores però posteriorment el ratolí deficient demostrava el seu paper inhibidor (128).

En macròfags deficients en CD150, la inducció de IL-12, TNF- $\alpha$  i NO per LPS es veu afectada, mentre que hi ha una sobreproducció de IL-6. Per tant, la presència de CD150 en macròfags influeix negativament en la producció de IL-6 i augmenta la secreció de IL-12 i TNF- $\alpha$ . Tanmateix, s'ha demostrat que ratolins deficients en CD150 tenen problemes per eliminar el paràsit *Leishmania major*, cosa que concorda amb defectes en la producció de NO i els baixos nivells de IL-12 i TNF- $\alpha$  (127)

### 5.3 CD229 (Ly9)

CD229 és una glicoproteïna de transmembrana que consta de 665 AA, dels quals 47 codifiquen per un pèptid líder llarg. És una proteïna altament glicosilada amb un pes molecular de 120 KD (24). Dos trets estructurals fan que aquesta molècula sigui única dintre de la família del CD150. El primer tret característic és la part extracel·lular de CD229 que es troba constituïda per quatre dominis Ig; els dominis I i III de tipus variable (V-like) sense ponts disulfur i els dominis II i IV de tipus C2 amb dos ponts disulfur potencials (129). El fet de trobar aquesta repetició dels dominis V-C2 fa pensar que la molècula prové de la duplicació d'un gen originari que codificava per una proteïna amb dos dominis Ig. El segon tret diferencial és la presència de la cua citoplasmàtica més llarga dintre les molècules de la família del CD150 amb 179 AA i

un total de 15 treonines, 16 serines i 8 tirosines, 5 de les quals són possibles llocs d'unió a dominis SH2 (Y-x-x-I/V).

En el nostre laboratori s'han caracteritzat diferents isoformes de CD229. Les isoformes majoritàries obtingudes per RT-PCR que s'han seqüenciat són: la proteïna completa, la isoforma a la que li manca el primer domini ( iso CD229  $\Delta$ DI), la isoforma a la que li manca el quart domini (iso CD229  $\Delta$ DIV) (24) i la que té el primer domini unit a la transmembrana i a la cua citoplasmàtica. Per comprovar que aquestes isoformes detectades per PCR s'expressaven, es van caracteritzar mitjançant immunoprecipitació. Totes van ésser detectades menys la isoforma que només conté el primer domini. A més a més, es va observar una expressió diferencial de les isoformes en funció del teixit o tipus cel·lular. Així doncs, en PBLs s'expressava majoritàriament la isoforma sense el quart domini, mentre que en timus s'expressaven les isoformes amb tres dominis Ig als que els hi mancaven el quart o el primer dominis Ig. En línies B com Daudi o Raji trobavem expressades les formes de la proteïna completa i la que li mancava el quart domini (24), mentre que en cèl·lules Jurkat predominava la isoforma sense el quart domini.

El gen de CD229 es localitza en el braç llarg del cromosoma 1 entre el CD244 i el CD150, a la banda 1q23. Presenta un tamany de 31.3Kb i conté 10 exons. Els primers 6 exons codifiquen pel pèptid líder, pels 4 dominis Ig i per la regió transmembrana. La distància entre l'exó que codifica pel pèptid líder i el següent exó que codifica pel primer domini Ig és de 13.5kb.

### **5.3.1 Distribució en cèl·lules i teixits**

L'anàlisi mitjançant Northern Blot mostra una expressió força restringida a teixits limfoides tals com ganglis limfàtics, melsa, timus i leucòcits de sang perifèrica (PBLs), amb l'excepció de la placenta, probablement detectat perquè es tracta d'un teixit força vascularitzat on pot existir presència de cèl·lules sanguínies. Un altre fet diferencial de CD229 és la seva expressió molt més restringida comparada amb la resta de molècules de la família. El CD229 s'expressa en limfòcits B, T i escassament en cèl·lules NK (24). El CD229 també s'ha trobat altament expressat, juntament amb CD84 i l'adaptador SAP, en cèl·lules Th foliculars (105). El fet que SAP sigui indispensable per a la

correcta diferenciació en cèl·lules plasmàtiques de llarga vida i cèl·lules memòria, fan pensar que molècules que transmeten la seva senyalització mitjançant SAP i que es troben altament expressades en cèl·lules B i T, com ara el CD84 i el CD229, siguin excel·lents candidats per intervenir en aquesta interacció T-B i conduir cap a la correcta activació i diferenciació de la cèl·lula B.

### **5.3.2 Lligands i molècules associades**

La cua citoplasmàtica de CD229 conté 8 tirosines, dos de les quals formen part dels motius consensus d'unió als adaptadors SAP i EAT-2 (Y558, Y581). Aquests adaptadors s'uneixen a les tirosines fosforilades i inhibeixen l'associació de la fosfatasa SHP-2 amb la cua del receptor CD229 (36, 91). Recentment, s'ha descrit que en cèl·lules de timus i limfòcits T CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> de ratolins deficientes en SAP no es dona la fosforilació de la cua citoplasmàtica de CD229 o es veu molt reduïda. Així doncs, es pot arribar a pensar que SAP actua reclutant la cinasa Fyn o Lck per a la fosforilació de la cua citoplasmàtica de CD229 (85). Per altra banda, s'ha caracteritzat la interacció de la cua citoplasmàtica de CD229 amb la cadena  $\mu_2$  de l'adaptador AP-2, complexe que uneix les proteïnes de transmembrana a sots de clatrina. Aquest adaptador s'uneix a la Y470 no fosforilada (en el motiu YEKL) de la cua citoplasmàtica de CD229, mentre que AP-2 no s'uneix a cap altre membre de la família de CD150. La integritat d'aquest domini és necessària per a la internalització del CD229 però no per a l'associació amb SAP. CD229 s'uneix al complexe AP-2 en línies cel·lulars B i T, i s'internalitza ràpidament en cèl·lules T després de la lligació amb anticossos contra CD229. Aquesta internalització també es dona en cèl·lules B quan es fan servir fragments Fab, mentre que es veu aturada quan es fa servir l'anticòs complet, suggerint que els receptors Fc $\gamma$  controlen la internalització de CD229. A més a més, l'activació del CD3 o BCR incrementa la internalització del CD229 (130). Recentment, el nostre grup ha descrit la interacció de l'adaptador Grb-2 a la Y606 fosforilada de CD229 (Martín M, *JI*, 05, *in press*) i és possible que es trobin noves interaccions amb altres molècules associades a sots de clatrina.

### **5.3.3 CD229 murí (Ly9)**

La comparació de la seqüència d'AA de CD229 murí amb la d'humà mostra un 51% d'homologia (73% si considerem la substitució d'AA conservats). El gen que codifica pel Ly9 conté 10 exons distribuïts al llarg de 19kb. L'anàlisi de les regions codificants pel gen revelen 9 polimorfismes i 4 d'ells es localitzen en el primer domini Ig. El gen presenta llocs d'unió a factors de transcripció PU.1, Ikaros, GATA-2, NF-GMA, NFAT-1 i Oct-2, implicats en el desenvolupament i maduració dels limfòcits. La regió promotora no té caixes TATA o CAAT (28).

La proteïna CD229 murina s'expressa en timòcits i en cèl·lules B i T madures (131). Han estat descrits dos al·lels del CD229 murí: el Ly-9.1 que es troba en la majoria de cepes murines i el Ly9.2 que es troba en ratolins C57BL/6 i en cepes relacionades (C57BR, C57L i C58). Degut a que Ly-9 es troba molt expressat durant tots els estadis de la diferenciació dels limfòcits, els anticossos monoclonals contra l'al·lotip Ly-9.1 han estat utilitzats per determinar el grau de quimerisme de ratolins al·logènics.

## **5.4 CD244 (2B4)**

El receptor CD244 està format per 365 AA, dels quals 21 codifiquen pel pèptid líder i 24 formen la regió transmembrana. La proteïna madura conté 200 AA extracel·lulars amb 8 llocs potencials de N-glicosilació i una cua citoplasmàtica amb 120 AA (132). La regió extracel·lular es troba constituïda per un domini de tipus V i un domini de tipus C2, trets característics de la família del CD150. El pes molecular de CD244 és de 60-80KD, mentre que la proteïna sense glicosilar té un pes aproximat de 40KD.

El gen de CD244 es localitza en el braç llarg del cromosoma 1 en la banda 1q23, al costat del CD229 (59). L'organització genòmica és molt semblant a altres membres de la família. Aquest gen consta de 9 exons: els 4 primers exons codifiquen pel pèptid líder, pels dos dominis Ig i per la transmembrana, mentre que la resta d'exons

codifiquen per la part citoplasmàtica del CD244. Un tret característic del gen de CD244 és que el primer intró és força llarg, aproximadament 17 Kb. Per altra banda, s'observa que la transcripció del CD244 té múltiples llocs d'inici i el promotor no té una caixa TATA. També s'ha identificat un lloc d'unió pel factor de transcripció AP-1 (*activator protein-1*) a les posicions -106 i -100 del promotor i s'han trobat membres de la família JUN que regulen la transcripció del gen (133). La PKC s'activa amb l'estimulació del CD244 i juga un paper important en l'activació del AP-1(134).

#### 5.4.1 Distribució en cèl·lules i teixits

En teixits, l'expressió més elevada la trobem en melsa i PBLs, seguida de pulmó, fetge, testicles i intestí prim (132). El CD244 s'expressa en totes les cèl·lules NK, en la majoria dels limfòcits T $\gamma\delta$ , en tots els monòcits CD14+, en alguns timòcits CD8+, en la majoria de limfòcits CD8+  $\alpha\beta$  i en basòfils. No s'ha detectat en limfòcits B, ni en línies cel·lulars B (135). En cèl·lules CD8+, l'expressió de CD244 es correlaciona amb l'adquisició de capacitats efectores com ara l'expressió de granzime o perforina, la capacitat per produir IFN- $\gamma$  i la baixa expressió del "*homing receptor*" CCR7 (136).

#### 5.4.2 Lligands i molècules associades

El CD48 és el lligand de CD244 (42, 43) i s'expressa en limfòcits B, T, NK, monòcits i cèl·lules endotelials (137, 31). L'expressió de CD48 augmenta en cèl·lules B infectades per EBV, tret indicatiu del paper rellevant de la interacció del CD244 amb CD48 en el fenotip dels malats de XLP infectats per EBV.

La interacció CD244 amb el seu contra receptor CD48 indueix la fosforilació de la cua citoplasmàtica de CD244 que conté 6 tirosines, 4 de les quals compleixen la seqüència consensus d'unió a SAP i EAT-2. La presència de Fyn o Lck és essencial per induir la fosforilació de la cua citoplasmàtica de CD244 (138). S'ha demostrat l'associació dependent de fosforilació de SAP i EAT-2 a la cua citoplasmàtica de CD244 (35, 91). Recentment, s'ha mapat la interacció de SAP amb els 4 motius consensus de la cua citoplasmàtica de CD244. Per altra banda, s'ha descrit l'associació de la cua citoplasmàtica de CD244 a les fosfatases SHIP o SHP-2, en funció del tipus de

cèl·lula. Així doncs, l'associació de SHP-2 amb CD244 només s'ha detectat en cèl·lules transfectades amb CD244 (35, 139), on es demostra que SAP i la fosfatasa SHP-2 competeixen pels mateixos motius tirosina (35). Estudis recents en cèl·lules NK, indiquen que SAP probablement promou la fosforilació del CD244 mitjançant la cinasa FynT i d'aquesta manera s'inicia la cascada de senyalització amb la fosforilació de molècules com Vav-1 i en menor grau SHIP-1 i c-Cbl (41). Vav-1 intervé en el reordenament del citoesquelet i és possible que contribueixi d'aquesta manera a la citotoxicitat mitjançada pel CD244. Tanmateix, s'observa que els ratolins Vav-1 deficients tenen alterada la capacitat citotòxica mitjançada per CD244, però no la producció de IFN- $\gamma$ . Tot això indica que la producció de IFN- $\gamma$  i la citotoxicitat induïts per l'activació del CD244 són fenòmens que es donen per vies de senyalització diferents (140). Per tant, tot i trobar trets comuns amb la senyalització del CD150 com ara la fosforilació de les seves cues citoplasmàtiques mitjançant SAP-Fyn, s'observen diferències en les molècules que intervenen en la transmissió del senyal. Tot això fa pensar que els senyals promoguts pels diferents receptors de la família del CD150 són únics i que depenen de la disposició i naturalesa dels motius tirosina de les seves cues citoplasmàtiques. Els motius tirosina de cada receptor de la família del CD150 promouen la interacció amb un grup de molècules diferents i com a conseqüència donen lloc a un senyal particular per cada receptor (41).

Per altra banda, també s'ha descrit l'associació de l'adaptador LAT a la regió transmembrana de CD244 i que aquesta interacció és imprescindible per regular la citotoxicitat mitjançada per CD244 (141). La fosforilació de LAT indueix el reclutament de molècules com Grb-2 i PLC- $\gamma$  (142, 133) i inicia una cascada de senyalització que involucra molècules com ara Ras, Raf, ERK i p38 (133). Estudis recents demostren la implicació de PKC en la citotoxicitat mitjançada pel CD244, però no en la secreció de IFN- $\gamma$  (134).

### **5.4.3 Funció**

En cèl·lules NK, la lligació del CD244 amb anticossos augmenta la citotoxicitat, indueix la producció de IFN $\gamma$  i IL-8, augmenta la hidròlisis de fosfatidil inositol 4,5-bifostat (PIP-2), incrementa el calci intracel·lular (143, 132) i indueix la degranulació



(144). Resultats semblants s'obtenen quan es fa interaccionar el CD244 amb la proteïna de fusió del CD48. A més a més, s'ha demostrat que la citotoxicitat redirigida en cèl·lules NK, induïda per la lligació del CD244, no és exclusivament dependent de l'expressió del seu contra receptor CD48, sinó que depen de la co-activació de receptors de citotoxicitat natural (NCR) o CD16 (FcγRIII) (145). Per altra banda, s'observa que la co-lligació del CD244 i els receptors inhibidors KIR2DL1 o CD94/NKG2 bloquegen completament l'activació de la cèl·lula NK (146). Tot això fa pensar que CD244 actua com a co-receptor en cèl·lules NK per regular la producció de citocines i la lisi cel·lular no restringida per molècules de MHC.

Resultats recents mostren que el CD244 en cèl·lules NK humanes pot actuar com a receptor inhibidor o activador en funció de l'absència o presència de SAP. Així doncs, el CD244 actua com a molècula inhibidora en les primeres fases de la diferenciació de les cèl·lules NK, on SAP no es troba expressat, mentre que en les cèl·lules NK madures, on hi ha presència de SAP i dels receptors inhibidors que interaccionen amb el MHC I de la cèl·lula diana, el CD244 sembla actuar com a activador (84). La integritat dels dominis lipídics és essencial per a la funció activadora del CD244. El bloqueig del reclutament de receptors cap als dominis lipídics és un mecanisme general per tal que els receptors inhibidors controlin l'activitat NK (147). En malalts de XLP, la no presència de SAP en cèl·lules NK, podria induir un senyal inhibitori, fet que explicaria la marcada reducció de la citotoxicitat mitjançada pel CD244 i la impossibilitat per eliminar cèl·lules infectades per EBV (139, 148).

En cèl·lules  $T\gamma\delta$ , la lligació de CD244 indueix la seva proliferació i provoca un increment de l'expressió de *erg-1* i *c-fos* (149). El paper del CD244 en cèl·lules mieloides encara s'ha d'estudiar.

#### **5.4.4 CD244 murí**

Mentre que en humà només s'ha descrit una única forma, en ratolí s'han descrit dos isoformes generades per "splicing" alternatiu que es diferencien pel domini citoplasmàtic. A més a més, aquestes isoformes presenten activitats oposades: la forma llarga és inhibidora i la forma curta és activadora (150).

En ratolí, el CD244 s'expressa en totes les cèl·lules NK, en una subpoblació de cèl·lules NKT, en cèl·lules T CD8<sup>+</sup> i en una subpoblació de cèl·lules T $\gamma\delta$  (149). Entre totes les cèl·lules CD8 de la melsa, només d'un 1 a un 2% expressen CD244, i aquesta subpoblació té un fenotip de cèl·lula T memòria efectora.

En cèl·lules T CD8<sup>+</sup> de ratolí, el CD244 actua com a molècula coestimuladora en la citotoxicitat restringida per MHC. S'ha descrit que la interacció del CD244 amb el CD48 entre cèl·lules T veïnes, però no amb el CD48 expressat en la cèl·lula diana, pot augmentar la lisi de la cèl·lula diana (151). Estudis recents, mostren un increment en la proliferació de cèl·lules CD8<sup>+</sup> de ratolins transgènics pel TCR, gràcies a la interacció de CD244 amb CD48 (152). En altres estudis, les cèl·lules T CD244<sup>+</sup> aïllades de melsa de ratolí, proliferen més ràpidament en resposta a citocines, i una vegada es dona la lligació del CD244 hi ha una major producció de IFN- $\gamma$  (150). No obstant això, en cèl·lules T CD8<sup>+</sup> humanes no s'han observat efectes semblants, cosa que podria indicar una senyalització del CD244 diferent en humà i ratolí.

#### 5.4.5 Ratolins deficients en CD244

Els ratolins deficients en CD244 són fenotípicament normals, de la mateixa manera que les seves poblacions limfocitàries, inclòs el nombre de cèl·lules NK i el repertori de receptors expressats per aquestes cèl·lules. Curiosament, les dos isoformes del CD244 al interaccionar amb el seu contrareceptor presenten una activitat inhibidora de la citotoxicitat i a més a més, aquesta inhibició és independent de la presència o absència de SAP. Es demostra que l'eliminació de tumors *in vivo* és major en ratolins deficients en CD244 (153, 154)

Per tant, els resultats obtinguts en els ratolins deficients són contraris als trobats en la lligació del CD244 pels anticossos. Caldria suposar que aquests anticossos actuarien com a bloquejants de la funció inhibidora. El mateix succeïria amb altres receptors en cèl·lules NK com ara el CD69, ja que la lligació d'aquestes molècules *in vitro* dona lloc a una activació de les cèl·lules NK, però els ratolins deficients en CD69 indiquen que aquesta molècula actua com a regulador negatiu (155). El fet que existeixi tolerància de cèl·lules NK en ratolins deficients en MHC I, fa pensar que podrien existir receptors al

marge dels KiRs, Ly49, CD94, NKG2 amb capacitat inhibidora no restringits a molècules de MHC I (156). Possiblement aquestes molècules actuarien com una doble protecció de les cèl·lules NK, per evitar agressions contra cèl·lules del sistema hematopoiètic.



## ***2. OBJECTIUS***

---



## **1. Determinació i caracterització del lligand de CD84**

### **1.1 Determinació del lligand de CD84**

### **1.2 Identificació dels dominis immunoglobulina de CD84 implicats en la interacció amb el seu contrareceptor**

### **1.3 Efectes funcionals de la interacció de CD84 amb el seu lligand**

## **2. Determinació i caracterització del lligand de CD229**

### **2.1 Determinació del lligand de CD229**

### **2.2 Caracterització molecular de la interacció de CD229 amb el seu contrareceptor**

### **2.3 Localització de CD229 durant la formació de la sinapsi immunològica.**

## **3. Estudi de l'expressió dels receptors leucocitaris que s'uneixen als adaptadors SAP i EAT-2: CD84, CD150, CD229 i CD244.**





### ***3. RESULTATS***

---



### **3.1 Article n°1**

**CD84 functions as a homophilic adhesion molecule and enhances IFN- $\gamma$  secretion: Adhesion is mediated by Ig-like domain 1.**

Margarita Martin, Xavier Romero, Miguel Angel de la Fuente, Victoria Tovar, Nuria Zapater, Pilar Pizcueta, Jaime Bosch, i Pablo Engel.

The journal of Immunology (2001) 167: 3668-3676.

## Resum de l'article n°1

El CD84 és una molècula de membrana que pertany a la família del CD2 / CD150. La seva cua citoplasmàtica s'uneix a la proteïna adaptadora SAP (*signaling lymphocytic activation molecule-associated protein*) també anomenada SH2D1A, molècula alterada en el síndrome proliferatiu lligat al cromosoma X (XLP).

El receptor CD84 es troba expressat en cèl·lules B, monòcits i plaquetes. Nosaltres demostrem que també es troba expressat en timòcits i cèl·lules T. El CD84 es detecta en timòcits CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup>, i la seva expressió decreix durant la maduració dels timòcits. En cèl·lules T de sang perifèrica s'expressa de forma preferencial en limfòcits CD45RO<sup>+</sup>.

Amb la finalitat d'identificar el lligand de CD84, es va generar una proteïna de fusió soluble constituïda pels dominis extracel·lulars de CD84 i dos dominis immunoglobulina constants de la IgG humana (CD84-Ig). Degut a que ja havien estat descrites diverses interaccions entre membres de la mateixa família CD2 / CD150, es va assajar la interacció de la proteïna de fusió CD84-Ig amb cèl·lules COS transfectades amb els cDNAs de diferents membres de la família CD2 / CD150. La proteïna de fusió CD84-Ig interaccionava amb cèl·lules transfectades amb el cDNA de CD84, però no s'observava cap interacció amb la resta de membres de la família del CD2 / CD150. Així doncs, el CD84 interaccionava amb ell mateix. Els anticossos contra CD84 que reconeixien el primer domini V-like, bloquejaven la interacció de la proteïna de fusió de CD84 en les cèl·lules transfectades amb el cDNA de CD84 i en plaquetes. A més a més, els resultats obtinguts amb quimeres humà / murí dels dominis extracel·lulars de CD84, demostren que únicament el primer domini extracel·lular N-terminal és el responsable de la interacció homofíllica. La interacció CD84-CD84 és independent de la seva cua citoplasmàtica. Finalment, la co-lligació del CD84 amb anticossos contra CD84 o la proteïna de fusió CD84-Ig i anticossos contra CD3, incrementen la secreció de IFN- $\gamma$  en limfòcits humans. Així, CD84 interacciona de manera homotípica i actua com a molècula coestimuladora.

# CD84 Functions as a Homophilic Adhesion Molecule and Enhances IFN- $\gamma$ Secretion: Adhesion Is Mediated by Ig-Like Domain 1<sup>1</sup>

Margarita Martin,\* Xavier Romero,\* Miguel Angel de la Fuente,\* Victoria Tovar,\*  
Núria Zapater,\* Enric Esplugues,<sup>†</sup> Pilar Pizcueta,<sup>‡</sup> Jaime Bosch,<sup>‡</sup> and Pablo Engel<sup>2\*</sup>

CD84 is a member of the CD2 subset of the Ig superfamily of cell surface molecules. Its cytoplasmic tail binds to Src homology 2 domain-containing protein 1A (signaling lymphocytic activation molecule-associated protein), a protein encoded by the X-linked lymphoproliferative disease gene. It is preferentially expressed on B lymphocytes, monocytes, and platelets. We show that it is also expressed on thymocytes and T cells. CD84 was positive on CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> thymocytes, and its expression decreased with cell maturation. It is expressed on mature T cells preferentially on CD45RO<sup>+</sup>. To identify the CD84 ligand, we generated a soluble Ig fusion protein containing the human CD84 extracellular domains (CD84-Ig). Because receptor-ligand interactions occur between several members of this subfamily, we assayed CD84-Ig binding with all members of the CD2 family. CD84-Ig bound to CD84-transfected cells, whereas no binding was detected with cells expressing other CD2 subfamily receptors, showing that CD84 binds to itself. Anti-CD84 mAbs recognizing epitopes wholly within domain 1 of CD84 blocked the binding of the CD84-Ig fusion protein to CD84-transfected cells and platelets. Data from CD84 domain human/mouse chimeras further revealed that only the first extracellular domain of the molecule is involved in the ligand receptor recognition. The CD84-CD84 interaction was independent of its cytoplasmic tail. Finally, concurrent ligation of human CD84 with mAbs or CD84-Ig and CD3 enhanced IFN- $\gamma$  secretion in human lymphocytes. Thus, CD84 is its own ligand and acts as a costimulatory molecule. *The Journal of Immunology*, 2001, 167: 3668–3676.

The CD2 subfamily of cell surface molecules includes CD2, CD58, CD48, CD150 (signaling lymphocytic activation molecule), CD84, CD229 (Ly9), and CD244 (2B4). The receptors of this family, in particular CD2, CD244, and CD150, contribute to the activation of T cells and NK cells (1). Structural features based on the homology within the extracellular domains define membership in this subfamily. These glycoproteins have a similar pattern of conserved disulfide bonds that are characterized by the presence of one membrane-distal V set and one membrane-proximal C2-set of Ig superfamily domains, with the exception of CD229, which contains a tandem repeat of two V-C2 set domains (2). CD84 is expressed as a single-chain cell surface glycoprotein of 64,000–82,000, which is highly glycosylated (3). It was first identified as a differentiation Ag predominately expressed on B lymphocytes, monocytes, and platelets (4). Later it was observed that some T lymphocytes were also positive, but less intense (5). Human CD84 and other members of the family (CD48, CD150, CD244, and CD229) are situated in a segment of 250 kb

on chromosome 1q23, and the homologous mouse genes are located on the syntenic region of mouse chromosome 1 (3, 6). In contrast, CD2 and CD58 are situated in the short arm of human chromosome 1 (1p13) and mouse chromosome 3. It has been suggested that the members of the CD2-subset of Ig superfamily molecules diverged by gene duplication from a common ancestor originally encoding a homophilic cell adhesion molecule (7).

Several receptor-ligand interactions between members of this subfamily have been described. The first interaction reported was between human CD2 and CD58 (8). However, the ligand for rodent CD2 was identified as CD48 (9). Although human CD48 is also a ligand for human CD2, its affinity for CD2 is ~100-fold lower (10). Later, CD48 was shown to be a high affinity ligand for CD244 (11, 12). Recently, homophilic binding for CD150 has been reported (13, 14). The extracellular region of CD150 has been identified as a receptor for measles virus (15).

Another common feature of these receptors is that they induce cellular activation. Although the function of CD84 is unknown, other members of the subfamily such as CD2, CD244, and CD150 are known to activate lymphocytes, suggesting that the CD84 molecule is also involved in leukocyte activation. CD2 promotes cell adhesion, calcium flux, tyrosine phosphorylation of intracellular substrates, proliferation, cytokine production, and cytotoxicity (16). CD244 ligation on human NK results in cell adhesion, increased cytotoxicity, and cytokine secretion (17, 18). Anti-CD150 mAbs promote the proliferation of activated human T cells (13) and induce IFN- $\gamma$  secretion (19–21). The cytoplasmic domains of CD150 and CD244 are quite distinct from that of CD2. Whereas the CD2 cytoplasmic domain contains proline-rich sequences that may mediate signal transduction, CD150 and CD244 contain unique tyrosine-based motifs. The TxYxxV/I present in both receptors interacts with Src homology 2 domain containing tyrosine

\*Immunology Unit, Department of Cellular Biology and Pathology, Medical School, and Department of <sup>†</sup>Physiology, Faculty of Biology, University of Barcelona, and <sup>‡</sup>Liver Unit, Hospital Clinic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi y Sunyer, Barcelona, Spain

Received for publication April 2, 2001. Accepted for publication July 19, 2001.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

<sup>1</sup> This work was supported by Grants SAF97-0136 and SAF00-037 from the Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología. M.M. is supported by a fellowship from the Ministerio de Educación y Cultura. X.R. is a fellow of the Programa de Formació en la Recerca i la Docència (Universitat de Barcelona), and V.T. and N.Z. are fellows of the Programa Nacional de Formació de Personal Investigador.

<sup>2</sup> Address correspondence and reprint requests to Dr. Pablo Engel, Unidad de Inmunología, Departamento Biología Celular, Facultad de Medicina, C/Casanova 143, Barcelona E-08036, Spain. E-mail address: engel@medicina.ub.es

phosphatase (SHP)-2<sup>3</sup> and a novel Src homology 2-domain-containing protein 1A (SH2D1A), also referred to as signaling lymphocytic activation molecule-associated protein (SAP). Mutations of the SH2D1A gene cause a primary immunodeficiency called X-linked lymphoproliferative syndrome (XLP), which is characterized by increased susceptibility to EBV infection (22–24). The CD84 cytoplasmic region contains two tyrosine motifs identical with those found in CD150 and CD244. Recently, it has been shown that SHP-2 and SH2D1A (SAP) bind to the phosphorylated CD84 cytoplasmic tail (25).

Here we show that CD84 is expressed on thymocytes and T cells, mainly CD45RO<sup>+</sup>, and we provide the first evidence that CD84 binds to itself and its ligation leads to T cell activation and cytokine secretion.

## Materials and Methods

### Cells and reagents

Cell lines COS and NS<sub>1</sub> (murine myeloma cell line) were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA). PBMCs were isolated by Ficoll density gradient centrifugation from buffy coats of cells obtained from healthy donors. Thymocytes and platelets were isolated as described previously (26, 27). Thymi were obtained from three children (aged 3–7 yr) who underwent cardiac surgery. None of them presented a history of immunological diseases. The protocol was approved by the ethics committee of our institution. The following mAbs and reagents were obtained from BD PharMingen (San Diego, CA): anti-human IFN- $\gamma$  (clone NIB42), anti-human biotinylated IFN- $\gamma$  (clone 4SB3), anti-human CD3-allophycocyanin, CD19-FITC, CD2-PE, CD58-PE, CD4-FITC, CD8-PerCP, biotin anti-mouse  $\kappa$  L chain, IFN- $\gamma$  standard, and murine CD62-P-Ig. Anti-human CD45RO-FITC was obtained from Sigma (St. Louis, MO). The mAbs anti-human CD3 (clone 332A3) and CD48 (clone 156.4H9) were gifts from R. Vilella (Hospital Clinic, Barcelona, Spain). Anti-human CD150 (clone IPO-3) was obtained from Kamiya Biomedical (Seattle, WA), and anti-human 2B4-PE (clone C1.7) was purchased from Immunotech (Marseille, France). Human Ly-9 mAb (clone HLY-9.1.84) was produced in our laboratory, as was control Ab, anti-CD62P (clone 2.3) IgG1 isotype. Streptavidin-PE was obtained from Southern Biotechnology Associates (Birmingham, AL), and biotinylated anti-human and goat F(ab')<sub>2</sub> anti-mouse FITC were purchased from Caltag Laboratories (Burlingame, CA). Human cells and tissues were obtained in accordance with protocols approved by the ethics committee of the Hospital Clinic of Barcelona (Barcelona, Spain).

### CD84 Ab production

A panel of new anti-CD84 mAbs was generated by fusing NS<sub>1</sub> with spleen cells from BALB/c mice that had been immunized twice with 300.19 cells stably transfected with the CD84 full-length DNA. Twelve mAbs reactive with CD84-transfected cells, but not with untransfected cells, were produced. The mAbs were purified with a protein A column (Bio-Rad, Hercules, CA), and we selected the clones CD84.1.1 (IgG1- $\kappa$ ), CD84.1.21 (IgG2a- $\kappa$ ), CD84.1.7 (IgG1- $\kappa$ ), and CD84.2.151 (IgG1- $\kappa$ ). Fab were obtained using the Immunopure Fab and F(ab')<sub>2</sub> kit (Pierce, Rockford, IL)

<sup>3</sup> Abbreviations used in this paper: SHP, Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase; SH2D1A, Src homology 2 domain-containing protein 1A; SAP, signaling lymphocytic activation molecule-associated protein; XLP, X-linked lymphoproliferative disease.

Table II. Ability of test mAbs to block the binding of labeled mAbs to CD84-300.19 cells<sup>a</sup>

Test mAbs	Labeled mAbs			
	CD84.1.1	CD84.1.7	CD84.1.21	CD84.2.151
CD84.1.1	<b>97</b>	7	4	11
CD84.1.7	<b>87</b>	<b>98</b>	<b>74</b>	3
CD84.1.21	34	<b>94</b>	<b>97</b>	6
CD84.2.151	20	8	6	<b>100</b>

<sup>a</sup> Values represent the relative ability of the test mAbs to block the binding of the indicated labeled mAbs to CD84-300.19 cells. Numbers indicate the percentage decrease in the number of fluorescence-positive cells. These results are representative of those obtained in three experiments. Significant blocking is in boldface.

following the instructions of the manufacturer. Briefly, purified Abs (1 mg) were diluted in digestion buffer containing 40 mg cysteine-HCl in 2 ml ImmunoPure IgG1 digestion buffer (10 times) and applied to an immobilized ficin column. Fab were generated after 3–5 h of digestion at 37°C. They were eluted and separated from undigested IgG and Fc fragments using a protein A column. Their purity was assessed by SDS-PAGE, and the absence of reactivity with the anti-human IgG was shown by flow cytometry. Fab were used immediately after purification or frozen at –80°C.

### Construction of the CD84-Ig fusion protein

The CD84-Ig fusion protein containing the CD33 leader peptide and the Fc region of human IgG1 was obtained by inserting the human CD84 sequence corresponding to the two extracellular domains into the mammalian expression vector signal pIg-Tail (R&D Systems, Minneapolis, MN). The CD84 oligonucleotides used were: as a forward oligonucleotide, 5'-GAG CGG ATC CAA AAG ACT CAG AAA TCT TCA C-3'; and as a reverse oligonucleotide, 5'-CAC AGG ATC CAC TTA CCT GTA CGG AAG CCC ATT GCG ATG T-3'. Ly9-Ig was used as a control with the following oligonucleotides: 5'-AGG AAG ATC TAA AGG ACT CAG CCC CAA CAG TGG T-3' as a forward primer and 5'-AGG AAG ATC TAC TTA CCT GTT CTG GAG GCT CCT GGA TCT GTA C-3' as a reverse primer. The constructs were stably transfected in NS-1 cells by electroporation. Cells were cultured in INTEGRA CL 350 flasks (Integra Biosciences, Wallisellen, Switzerland), and the supernatants containing the fusion proteins were purified as described above for the anti-CD84 Abs.

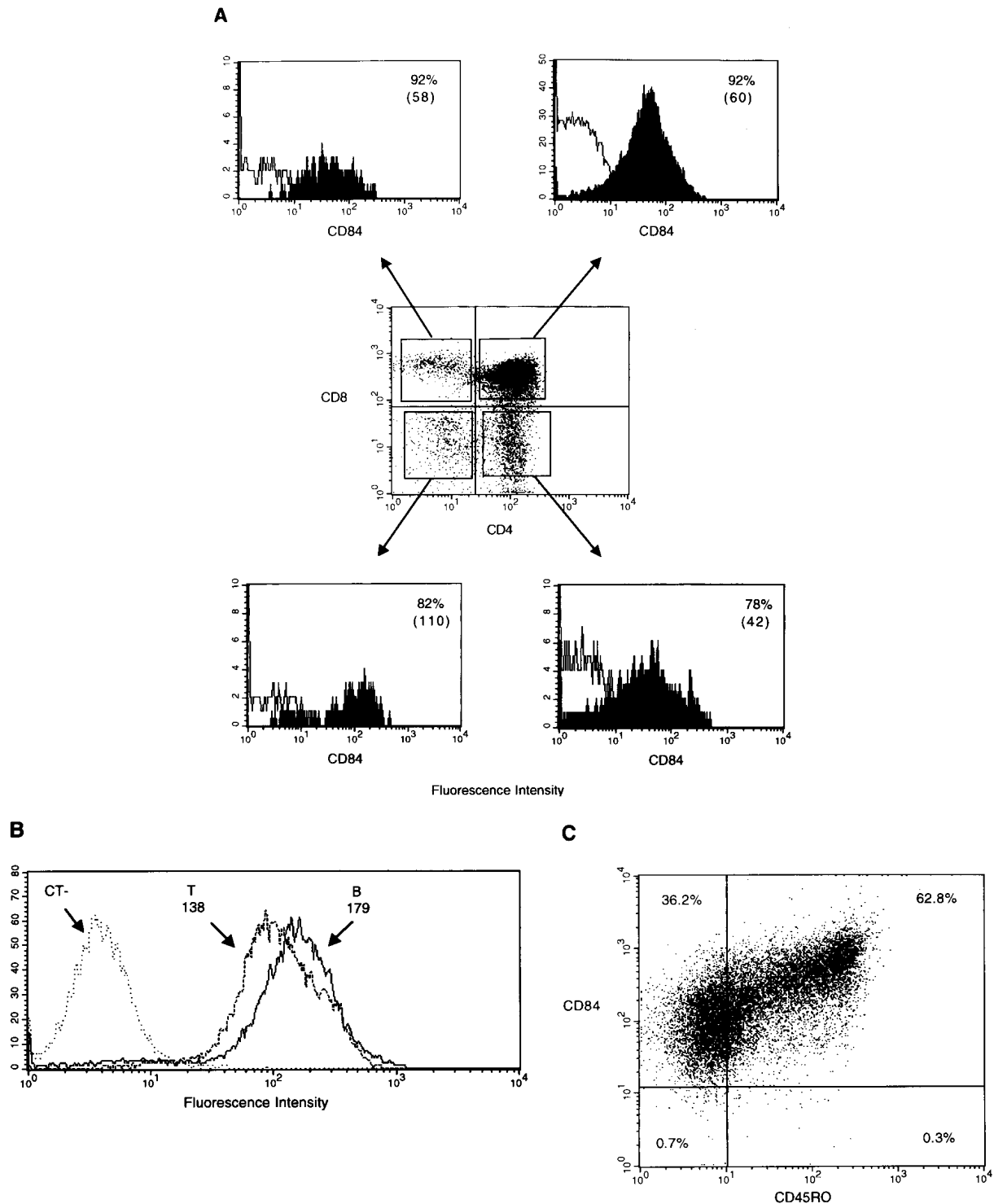
### Flow cytometry

Cells were stained with anti-human CD4-FITC, CD8-PerCP, and biotinylated anti-CD84 (clone CD84.1.1) for 30 min at 4°C. They were then washed with cold PBS and incubated with streptavidin-PE (1/400 final dilution) for 30 min at 4°C. Samples were washed and measured by FACS (FACSCalibur cytometer, BD Biosciences, San Jose, CA). Similarly, a triple staining was conducted with lymphocytes from peripheral blood using anti-human CD3-allophycocyanin, CD19-FITC, and biotinylated anti-CD84. To test CD84 expression on memory cells, lymphocytes were stained with CD3-allophycocyanin, CD45RO-FITC, and biotinylated anti-CD84. A parallel isotype control experiment was performed. When CD84-Ig fusion protein staining was assayed, cells were incubated with a biotinylated goat anti-human IgG as a second step at 4°C for 30 min. They were then washed, streptavidin-PE was added at a 1/400 final dilution, and incubation proceeded at 4°C for 30 min. Thereafter, they were washed and

Table I. Staining of human cells and transfectants with CD84 mAbs<sup>a</sup>

CD84 mAbs	Human Cells and Transfectants							
	B cells (%/MFI)	T cells (%/MFI)	CD45RO <sup>high</sup> T cells (%/MFI)	CD45RO <sup>low</sup> T cells (%/MFI)	RBC (%/MFI)	Platelets (%/MFI)	300.19 (%/MFI)	CD84-300.19 (%/MFI)
CD84.1.1 (IgG1)	94/199	87/96	98/153	79/63	<5/5	92/408	<5/5	100/1320
CD84.1.7 (IgG1)	93/226	89/145	98/162	75/57	<5/5	90/480	<5/5	100/1631
CD84.1.21 (IgG2a)	98/565	97/163	99/282	93/68	<5/5	94/423	<5/5	100/1800
CD84.2.151 (IgG1)	93/94	86/40	97/65	68/21	<5/5	94/371	<5/5	100/401

<sup>a</sup> B and T cells, CD45RO<sup>+</sup> T cells, RBC, platelets, and 300.19 cells untransfected and transfected with CD84 were labeled with biotinylated anti-CD84 Ab clones CD84.1.1, CD84.1.21, CD84.1.7, and CD84.2.151. Cells were washed and then incubated with streptavidin-PE. Values (percentage of positive cells and MFI) are representative of those obtained in three experiments.



**FIGURE 1.** CD84 is expressed on thymocytes, B cells, and T cells. *A*, Thymocytes were stained with anti-CD4-FITC, anti-CD8-PerCP, and biotinylated anti-CD84 (clone CD84.1.7) plus streptavidin-PE, and each population was studied. The MFI is indicated in each histogram. *B*, Lymphocytes from peripheral blood were stained with anti-CD3-allophycocyanin, CD19-FITC, and biotinylated anti-CD84 plus streptavidin. The MFI is shown in each histogram. *C*, CD45RO<sup>+</sup>-FITC and biotinylated anti-CD84 plus streptavidin-PE staining in lymphocytes from peripheral blood gated for CD3-allophycocyanin-positive cells. The percentage of positive cells is indicated.

immediately analyzed by FACS. Ten thousand cells were counted for each sample.

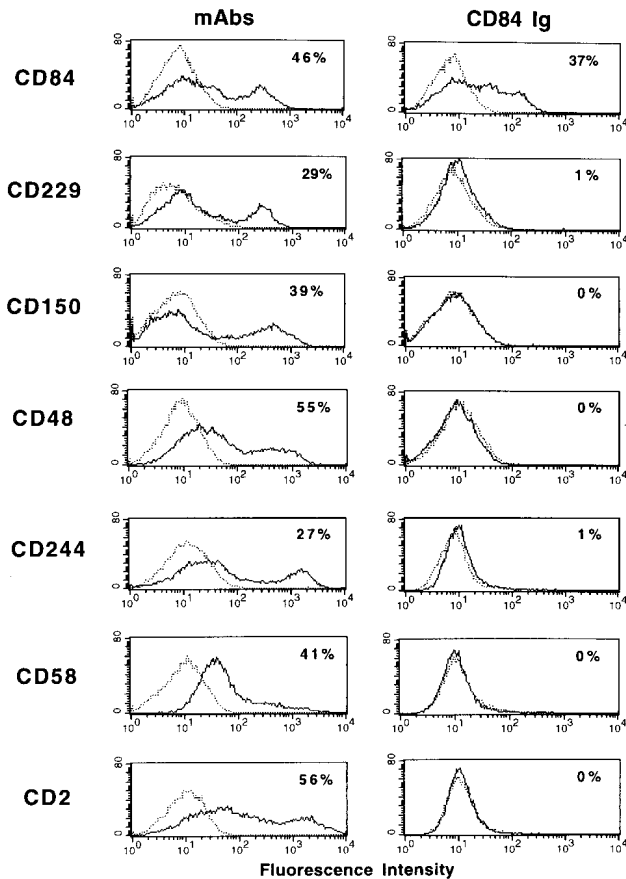
#### *COS transfection*

COS-7 cells were transfected with human CD84, CD229 (Ly9), CD150 (signaling lymphocytic activation molecule), CD48, CD2, CD58, and CD244 (2B4) cDNAs using the LipofectAMINE Plus reagent (Life Technologies, Rockville, MD). After 48 h of incubation, cells were labeled with

biotinylated mAbs against CD84 (CD84 1.1) or Ly-9 (HL9.1.84) or with PE-directed labeled Abs against CD150, CD48, CD2, CD58, or CD244 to detect the expression of the transfected molecules. CD84-Ig fusion protein binding assay was conducted as described above.

#### *Cross-blocking experiments*

The mAb cross-blocking was performed as described previously (28). Briefly, stably transfected CD84-300.19 cells were first incubated with



**FIGURE 2.** CD84 is a self ligand. COS-7 cells transfected with human CD84, CD229, CD150, CD48, CD244, CD58, and CD2 cDNA were labeled with CD84-Ig fusion protein. Protein expression was detected using specific Abs (*left*). CD84-Ig fusion protein binding was assayed (*right*). Immunostaining controls: isotype control (*left*) and C-Ig (CD62-P-Ig; *right*) are represented with dotted lines. The percentage of positive cells is indicated in each histogram.

10-fold saturating concentrations (determined after Ab titration and between 5 and 10  $\mu\text{g}$ ) of Fab of CD84 mAbs; then they were washed and stained with the CD84-Ig fusion protein at an optimal staining concentration. Thereafter, cells were incubated with a biotinylated anti-human Ab at 4°C for 30 min and then with streptavidin-PE (1/400 dilution). Samples were washed and measured by FACS. No cross-reactivity was detected between the Fab and the biotinylated secondary anti-human Ab. Fab irrelevant Ab and human Ly-9 Ig-fusion protein were used as controls.

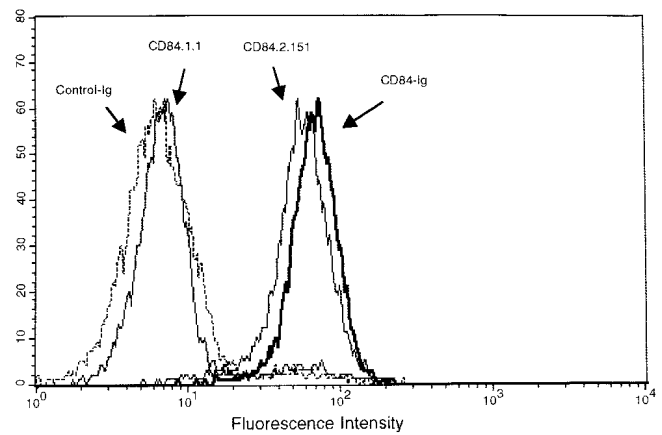
#### Domain mapping of the ligand-binding region

The 300.19 cells were stably transfected with human CD84 cDNA human/mouse chimeras. Mouse CD84 extracellular domain had replaced the first or second Ig-like domains of human CD84. The plasmid H1-M2 (human CD84 first domain and murine CD84 second domain) was constructed by substitution of the murine CD84 leader peptide and first domain with a fragment encoding the human CD84 leader peptide and domain 1 flanked by *Sall* sites on the murine CD84 cDNA cloned in pCI Neo vector. The plasmid M1-H2 (murine CD84 first domain and human CD84 second domain) was generated by ligation on *Sall* sites of the fragment encoding the leader peptide and domain 1 of the murine CD84 with the human CD84 cDNA, lacking the leader peptide and domain 1, cloned in pCI Neo.

The CD84 mutant lacking the cytoplasmic tail was generated by PCR using CD84 cloned in pCI Neo as a template and the following oligonucleotides: 5'-CCC AAG CTT TTC CAC AGA AGG TTA GAC-3' as forward and 5'-TGA GGC AGC TCA TTG TCT TCT CTT-3' as reverse. It was cloned in pCI Neo vector. These transfectants were stained with CD84 mAbs and the CD84-Ig fusion protein as described above.

#### Cytokine assay

To analyze IFN- $\gamma$  secretion, cells were activated as reported previously (19). PBMCs were activated with a suboptimal concentration of previously



**FIGURE 3.** The mAbs against CD84 block the CD84-CD84-Ig fusion protein interaction. The CD84-Ig fusion protein binds to stable CD84 transfectants (solid line). Control-Ig (CD229-Ig) did not bind to these cells (dotted line). The mAb CD84.1.1 (5  $\mu\text{g}$ ) completely blocked CD84-Ig binding, unlike mAb CD84.2.151 (10  $\mu\text{g}$ ; indicated by arrows). An irrelevant Ab did not affect the CD84-Ig binding, being undistinguishable from the CD84-Ig staining displayed in the graph (solid line).

titrated soluble anti-CD3 (data not shown) plus purified soluble CD84 mAb CD84.1.1, CD84.1.21, anti-CD150 (IPO-3), or control IgG at various concentrations. For CD84-Ig cytokine assays, an anti-human Fc Ig at 5 or 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  was bound to 96-well plates. After incubation overnight at 4°C, the excess Ab was washed with sterile PBS, and the CD84-Ig or control-Ig (20–50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) was added. Fusion proteins were incubated for 4 h at room temperature, and the plate was then washed to remove the unbound material before adding the cells and anti-CD3 to various concentrations. Supernatants were collected after 48 h of culture, and IFN- $\gamma$  levels were measured by sandwich ELISA. Primary and biotinylated secondary anti-human IFN- $\gamma$  Abs were used at the concentrations recommended by the manufacturer. The values reported are the mean of triplicate wells, and the SEM was <15%.

## Results

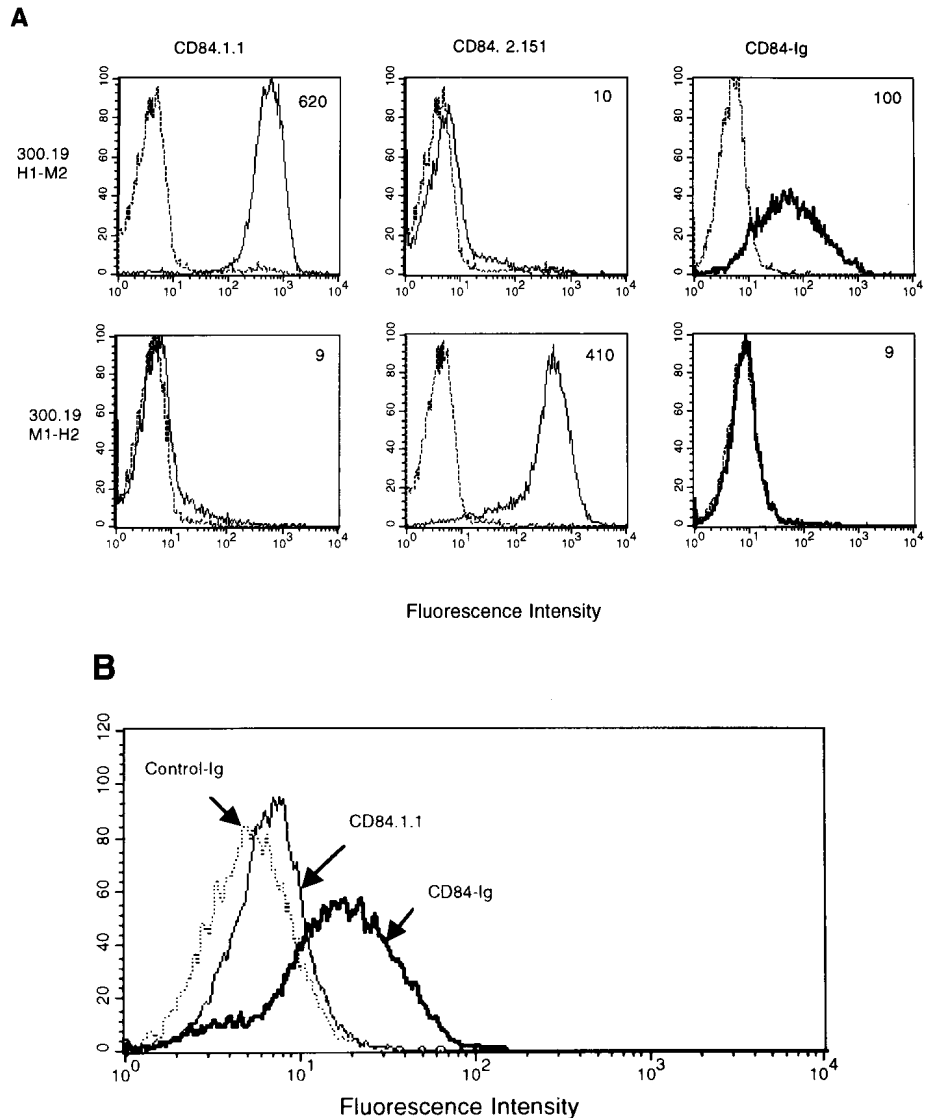
### Characterization of CD84 mAbs

A new panel of anti-CD84 mAbs was generated by immunizing the 300.19 murine pre-B cell line transfected with human CD84 cDNA. In this study we analyzed four CD84 mAbs reactive with CD84-transfected cells, but not untransfected 300.19 cells. CD84 mAbs (clones CD84.1.1, CD84.1.21, CD84.1.7, and CD84.2.151) similarly stained human cells and transfectants (Table I). All these Abs had the same pattern of staining, although the intensity of fluorescence was higher in the case of CD84.1.21. Cross-blocking experiments showed that these mAbs recognized four epitopes; three of them (CD84.1.1, CD84.1.7, and CD84.1.21) were overlapping (Table II).

### CD84 is expressed on thymocytes and T cells

CD84 was expressed on almost all thymocytes (Fig. 1A). It appears early during T cell differentiation, because CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> immature thymocytes express this molecule. CD84 expression was higher on CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> immature thymocytes than on double- or single-positive CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> thymocytes, as indicated by means of fluorescence. T lymphocytes were also positive for CD84, but the expression was lower than on B cells (Fig. 1B and Table I). On T cells, CD84 expression was higher on the CD45RO<sup>high</sup> memory cells subset (Fig. 1C and Table I). Our results show that CD84 is expressed not only on B cells, monocytes, and platelets, but also on thymocytes and T cells, indicating a broader role for CD84 in leukocyte function.





**FIGURE 4.** CD84 homophilic interaction involves only the first extracellular domain. *A*, The 300.19 cells stably transfected with human CD84 first extracellular domain and the murine CD84 second extracellular domain (H1-M2; *upper panel*) and cells transfected with murine CD84 first extracellular domain and human second extracellular domain (M1-H2; *lower panel*) were stained with anti-CD84 clone 1.1 (blocking CD84-Ig binding Ab; *left column*) or anti-CD84 clone 2.151 (non-blocking Ab; *middle column*). CD84-Ig binding was assayed (*right column*). MFI is represented in each histogram. *B*, The mAb CD84 1.1 completely blocked CD84-Ig binding (solid line indicated by arrows) in the H1-M2 chimera. An irrelevant Ab did not affect the CD84-Ig binding, being undistinguishable from the CD84-Ig staining displayed in the graph (solid line indicated by arrows). Control-Ig (CD229-Ig) did not bind to these cells (dotted line).

#### *CD84 binds to itself*

We studied the binding of CD84 to the described members of the CD2 subfamily. CD84-Ig binds to CD84-transfected cells, but no binding was detected on COS cells transfected with CD229, CD150, CD48, CD244, CD58, and CD2, showing that CD84 specifically binds to itself (Fig. 2). Our data indicate that CD84 is a self ligand, which is consistent with a previous report on homophilic binding for CD150 (14).

#### *Anti-CD84 mAbs compete with the CD84-Ig binding region*

The anti-CD84 mAbs generated were used to perform competition assays with CD84-Ig. CD84 Fab were obtained to avoid the bridge formation due to the simultaneous interaction of CD84 mAb between the fusion protein and the CD84 from the cell surface. The CD84.1.1 mAb completely blocked binding of the fusion protein, whereas CD84.1.7 and CD84.1.21 hindered it only partially, and CD84.2.151 did not affect it (Fig. 3). The CD84-Ig fusion protein binding is blocked by anti-CD84 mAbs, further demonstrating the homophilic interaction of this molecule.

#### *The CD84-CD84 interaction involved only the first extracellular domain of the receptor*

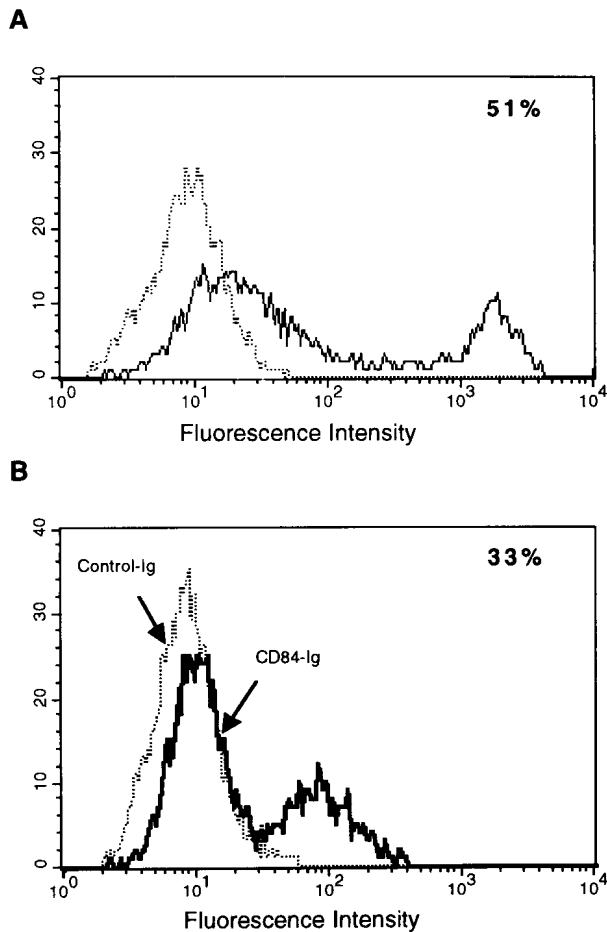
To elucidate the ligand binding region, we mapped the domain involved in CD84-CD84 binding using human/mouse chimeras

containing the first or second domain of the mouse CD84. CD84-Ig bound to the first human CD84 extracellular domain, but failed to bind to the second extracellular domain. The expressions of both chimeric receptors were comparable, as revealed by fluorescence (Fig. 4). Moreover, the Abs that blocked CD84-Ig binding recognized epitopes located in the first Ig-like domain, whereas CD84.2.151, which did not compete for CD84-Ig binding, recognized the second extracellular domain (Fig. 4).

To further characterize the CD84-CD84 interaction we assayed CD84-Ig binding to cells transfected with a truncated CD84 lacking the cytoplasmic tail. As shown in Fig. 5, CD84 mutant was expressed on the cell surface (*A*), and it was able to bind to CD84-Ig similarly to wild-type CD84 (*B*).

#### *CD84-CD84 interaction occurs on normal cells*

As shown in Fig. 6*A*, CD84-Ig bound to platelets, whereas no binding was detected with the control-Ig protein. This binding was completely blocked by mAb CD84.1.1, but not by mAb CD84.2.151. No binding of CD84-Ig to lymphocytes could be observed (data not shown). Note that platelets expressed higher CD84 levels (mean log fluorescence, 415) than T and B lymphocytes (mean log fluorescence intensities of 138 and 179; Figs. 1 and 6*B* and Table I). These data show that CD84-Ig binds to normal cells with high levels of CD84 surface expression.

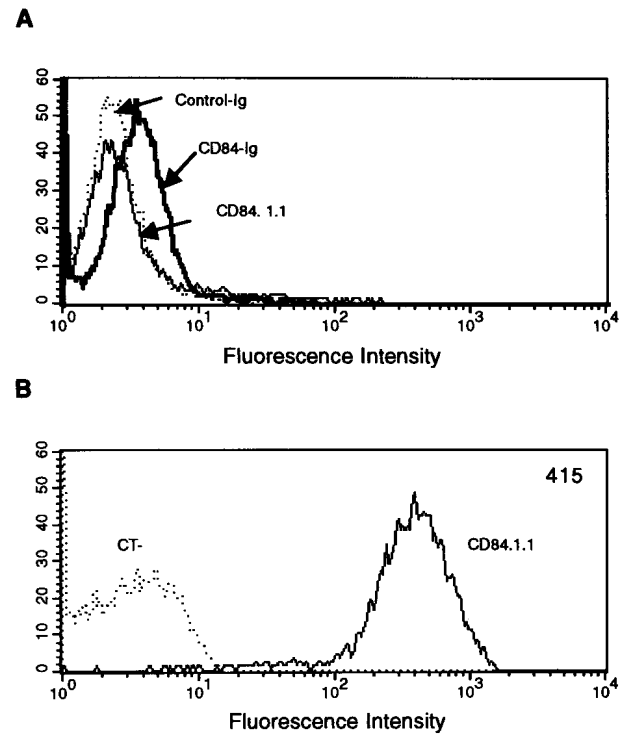


**FIGURE 5.** CD84-CD84 interaction is independent of its cytoplasmic tail. *A*, COS cells transfected with CD84 mutant lacking the cytoplasmic tail were stained with an mAb anti-CD84 (CD84.1.1; solid line) or an irrelevant Ab (dotted line). *B*, CD84-Ig (solid line) and control-Ig (CD229-Ig; dotted line) bindings were assayed on the transfected cells. The percentage of positive cells is indicated in each histogram.

#### CD84-CD84 interaction induces IFN- $\gamma$ production

The ligation of CD84 with anti-CD84 mAbs enhanced IFN- $\gamma$  secretion induced by suboptimal concentrations of anti-CD3 after 48 h of culture (Fig. 7*A*). IFN- $\gamma$  secretion levels were dose-dependent and equivalent to the levels induced by an anti-CD150 mAb, which was used as a positive control. CD84 mAb by itself did not enhance cytokine secretion, indicating that CD84 acts as a costimulatory molecule. Ligation of CD84 with Abs that recognized first (clone CD84.1.1) and second (clone CD84.2.151) extracellular domains induced similar effects on IFN- $\gamma$  induction after TCR triggering. The CD84 Abs generated (clones CD84. 1.1, CD84.1.21, CD84.1.7, and CD84.2.151) are able to induce IFN- $\gamma$  secretion.

Because the levels of IFN- $\gamma$  secretion induced by soluble CD84-Ig were difficult to evaluate due to the Fc fragment of the fusion protein as well as the ability of these molecules to interact with themselves, we cross-linked CD84-Ig to an anti-human Fc Ab previously bound to the plate. In this fashion, CD84-Ig, bound to the anti-human Fc Ab by its Fc fragment exposed the CD84 domains to the cell more efficiently. As shown in Fig. 7*B*, CD84-Ig consistently induces (2- to 3-fold) IFN- $\gamma$  secretion at several anti-CD3 suboptimal concentrations. IL-4 secretion was not detected under the same conditions (data not shown).



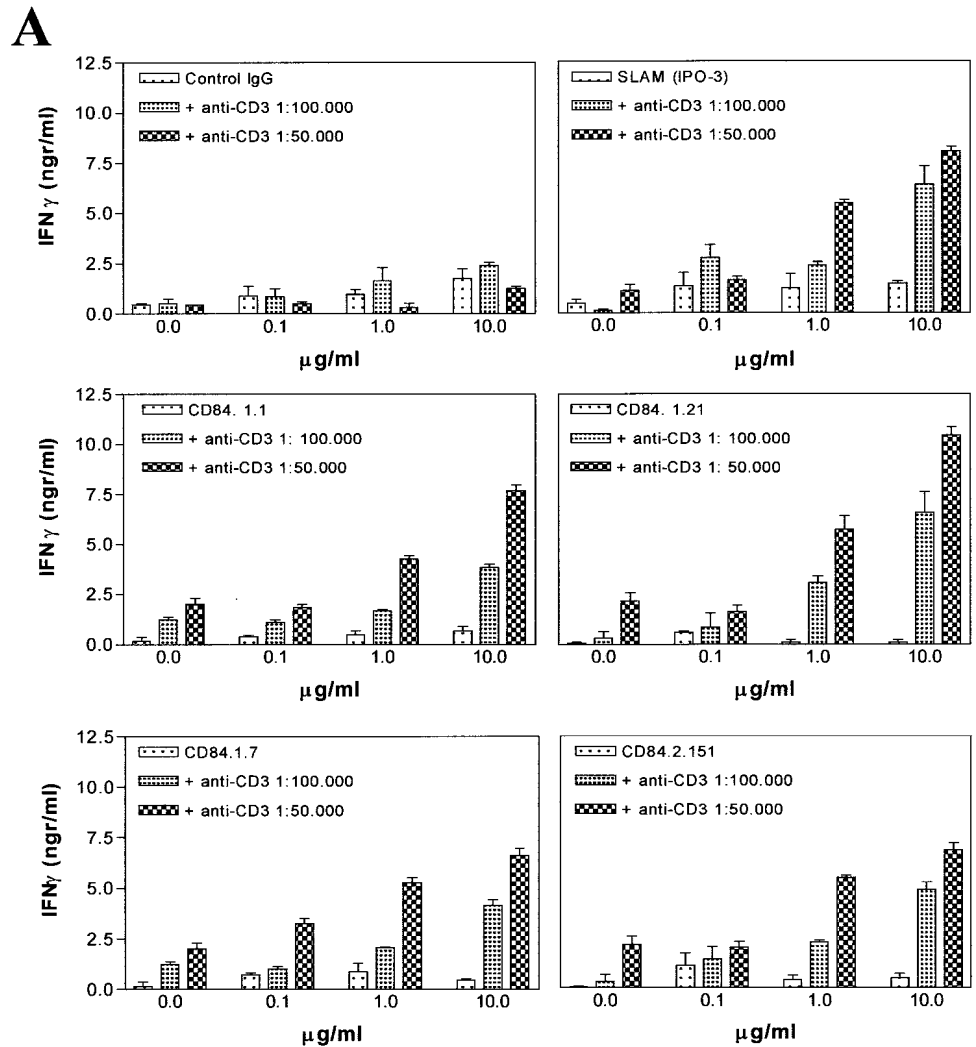
**FIGURE 6.** CD84 homophilic binding occurs on normal cells. *A*, CD84-Ig (solid line) and control-Ig (CD229-Ig; dotted line) bindings were assayed on platelets. The cross-blocking experiment was conducted with Ab CD84.1.1 as indicated by arrows. *B*, Platelets were stained with mAb CD84.1.1 (solid line) and an irrelevant Ab (dotted line). The MFI is indicated.

## Discussion

We present the first experimental evidence of CD84 homophilic interaction and its functional outcome. It has been postulated that the CD2 subset arose via successive duplications of a common ancestral gene originally encoding a homophilic cell adhesion molecule (29). The only known ligands of CD2-related cell surface receptors are other CD2 family members (8–14). In this study, we show that a soluble CD84-Fc fusion protein containing the two extracellular domains of CD84 binds to CD84-transfected cells, but not to cells transfected with the cDNA of the other members of the CD2 subfamily.

CD84-Ig binding to CD84-transfected cells was inhibited in the presence of specific mAbs against CD84. Epitope-mapping studies performed with these CD84 mAbs demonstrated that mAbs with epitopes wholly within domain 1 blocked CD84-mediated binding. This result is consistent with our data obtained using CD84 human/mouse chimeras, which showed that CD84-Ig binds to domain 1. The CD84-CD84 homophilic interaction is species-restricted, because human CD84 does not bind to murine CD84, although murine CD84 can bind to itself (data not shown), indicating that the homophilic interaction of this molecule occurs in different species. It has been determined that the domains involved in adhesion between CD2 and human CD58 and mouse CD48, and between 2B4 and CD48 are the N-terminal Ig V domains (1). These observations suggest that CD84 expressed on the surface of adjacent cells establishes head-to-head contacts. These data also agree with the finding that soluble CD2 crystals are dominated by homophilic head-to-head dimers and that these crystal contacts mimic the topology of the natural ligand interaction CD2-CD58 (30).

Because the cytoplasmic region of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31), another homophilic binding receptor of



**FIGURE 7.** CD84 triggering induces IFN- $\gamma$  secretion in the presence of suboptimal doses of anti-CD3. Lymphocytes from peripheral blood were activated with soluble anti-CD3 (clone 332A3) at suboptimal doses (1/50,000 and 1/100,000 dilution) and soluble CD84 Abs (clone CD84.1.1 and clone CD84.2.151), CD150 (IPO-3), or IgG control (same isotype as CD84 mAb) at concentrations ranging from 0.1 to 10  $\mu\text{g/ml}$  (A) or CD84-Ig or control-Ig (CD229-Ig) fusion proteins (20  $\mu\text{g/ml}$ ) cross-linked to anti-human Fc plate-bound Ab (5  $\mu\text{g/ml}$ ; B) for 48 h. Supernatants were collected, and IFN- $\gamma$  secretion was assayed. Triplicate determinations were performed. These data are representative of five experiments; the SD between experiments was <20%.

the Ig superfamily, has been shown to be critical for its binding (31), we tested the interaction of CD84-Ig with cells transfected with a CD84 mutant that lacks the cytoplasmic domain. Our results show that the cytoplasmic domain does not control its homophilic ligand-binding property, because CD84-Ig binding is not affected in the CD84 mutant.

Recently, it was reported that one of the members of the CD2 subset, CD150, binds to itself (14). Although CD150 self-associates with very low affinity, its functional significance has not been ruled out. Moreover, it has been reported that soluble and membrane-bound CD150 enhance B cell proliferation and Ig synthesis

(32). We cannot rule out additional counter-receptors for CD84 and CD150 among emerging members of the CD2 subfamily.

CD84-CD84 interaction takes place in normal cells. Because platelets are known to express higher levels of CD84 than lymphocytes, we tested the interaction of the fusion protein with these cells. CD84-Ig bound to platelets, and this binding was specifically blocked by CD84 mAb recognizing domain 1, but not domain 2. This demonstrates that the binding was specific and involved the first extracellular domain of the molecule, as we previously showed with CD84 chimeras. The fact that we did not observe CD84-CD84 binding on lymphocytes may have various explanations. One is that

the concentration of monomeric CD84-Ig available for binding to CD84 is far lower than the total concentration of fusion protein that minimizes binding to the cell receptor on the cell surface. A high density on the cell surface may be needed to detect binding. Another explanation is that most homophilic adhesion receptors interact with low affinities (14).

Ligation of CD84 with specific mAbs, such as CD2, CD150, and CD244 mAbs, modulates T cell activation (19–21, 33). The mAbs against CD84 increased IFN- $\gamma$  secretion through the TCR, similarly to CD150. All Abs against CD84 used had a functional effect. Thus, the induction of IFN- $\gamma$  was epitope independent. Moreover, CD84-CD84Ig interaction enhances IFN- $\gamma$  levels, showing that this homophilic interaction has functional significance. CD150 engagement enhances the Th1 cytokine production profile, and it can reverse the Th2 phenotype to Th1 (19). This suggests that during immune reactions CD150 triggering may also participate in directing expanding T cells toward a Th0/Th1 pathway. Interestingly, IL-4 secretion was not enhanced after CD84 triggering with either mAb or fusion protein. On this basis, we speculate that CD84 behaves similarly to CD150. In addition, altered CD150 expression has been described in autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis (34) and multiple sclerosis (35), in which dysregulation of IFN- $\gamma$  occurs. Similarly, CD84 expression may be affected. To date, the importance of CD84 signaling in T lymphocytes is derived from the observation that SH2D1A, a protein responsible for the XLP, binds to the cytoplasmic region of CD84 (25). XLP disease is characterized by three major phenotypes: fatal mononucleosis, B cell lymphomas, and dysgammaglobulinemia (36–38). SH2D1A protein binds to at least three other leukocyte cell surface receptors of the CD2 subset (CD150, CD244, and CD229), and its association prevents recruitment of the tyrosine phosphatase SHP-2 to their cytoplasmic tails, although the functional consequences of this event are still unclear (22, 24, 25). Comparative studies with normal lymphocytes and lymphocytes from XLP patients have revealed the functional requirements for SH2D1A-CD244-mediated activation of human NK cells function. CD244 fails to induce cytotoxicity in SAP-deficient cells from XLP patients, which may contribute to the pathogenesis and progression of the disease (39). In contrast, an inhibitory function of CD244 has been implicated in the inability of NK to kill EBV-infected cells in XLP patients (40). It appears, therefore, that CD84 signaling may also be involved in the molecular pathogenesis of XLP. Defects in IFN- $\gamma$  production after CD84 triggering in SH2D1A-deficient cells may impair viral clearance, as occurs with EBV infection in XLP patients; this has also been proposed for CD150 (41). This suggests that the complex phenotype of XLP could be due to a combination of altered signaling pathways initiated by these four cell surface receptors (42). Further biochemical and functional characterization of these receptors is essential to our understanding of the molecular basis of the disease.

Because CD84 is expressed on thymocytes, various subsets of T and B lymphocytes, monocytes, and platelets, the CD84-CD84 interaction extends the range of possible cellular interactions regulated by the homophilic binding of CD84.

## Acknowledgments

We thank Isabel Sánchez for assistance with the experiments, Dr. M. Streuli for providing 300.19 cells, Dr. Thorley Lawson for CD48 cDNA, and Dr. Vilella for mAbs.

## References

- Tangye, S. G., J. H. Phillips, and L. L. Lanier. 2000. The CD2-subset of the Ig superfamily of cell surface molecules: receptor-ligand pairs expressed by NK cells and other immune cells. *Semin. Immunol.* 12:149.
- Sandrin, M. S., T. P. Gumley, M. M. Henning, H. A. Vaughan, L. J. Gonez, J. A. Trapani, and I. F. McKenzie. 1992. Isolation and characterization of cDNA clones for mouse Ly-9. *J. Immunol.* 149:1636.
- de la Fuente, M. A., P. Pizcueta, M. Nadal, J. Bosch, and P. Engel. 1997. CD84 leukocyte antigen is a new member of the Ig superfamily. *Blood* 90:2398.
- Engel, P., N. Wagner, and T. F. Tedder. 1995. CDw84 workshop report. In *Leucocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens*, Vol. 1. S. F. Schlossman, L. Bousmell, W. Gilks, J. M. Harlan, T. Kishimoto, C. Morimoto, J. Ritz, S. Shaw, R. Silverstein, T. A. Springer, et al., eds. Oxford Univ. Press, Oxford, p. 699.
- de la Fuente, M. A., P. Pizcueta, and P. Engel. 1997. CD84 workshop panel report. In *Leucocyte Typing VI: White Cell Differentiation Antigens*, Vol. 1. T. Kishimoto, H. Kikutani, A. E. G. Kr. von dem Borne, S. M. Goyert, D. Y. Mason, M. Miyasaka, L. Moretta, K. Okumura, S. Shaw, T. A. Springer, K. Sugamura, and H. Zola, eds. Garland, New York and London, p. 193.
- de la Fuente, M. A., V. Tovar, P. Pizcueta, M. Nadal, J. Bosch, and P. Engel. 1999. Molecular cloning, characterization, and chromosomal localization of the mouse homologue of CD84, a member of the CD2 family of cell surface molecules. *Immunogenetics* 49:249.
- Kingsmore, S. F., C. A. Souryal, M. L. Watson, D. D. Patel, and M. F. Seldin. 1995. Physical and genetic linkage of the genes encoding Ly-9 and CD48 on mouse and human chromosomes 1. *Immunogenetics* 42:59.
- Selvaraj, P., M. L. Plunkett, M. Dustin, M. E. Sanders, S. Shaw, and T. A. Springer. 1987. The T lymphocyte glycoprotein CD2 binds the cell surface ligand LFA-3. *Nature* 326:400.
- Kato, K., M. Koyanagi, H. Okada, T. Takahashi, Y. W. Wong, A. F. Williams, K. Okumura, and H. Yagita. 1992. CD48 is a counter-receptor for mouse CD2 and is involved in T cell activation. *J. Exp. Med.* 176:1241.
- Arulanandam, A. R., P. Moingeon, M. F. Concino, M. A. Recny, K. Kato, H. Yagita, S. Koyasu, and E. L. Reinherz. 1993. A soluble multimeric recombinant CD2 protein identifies CD48 as a low affinity ligand for human CD2: divergence of CD2 ligands during the evolution of humans and mice. *J. Exp. Med.* 177:1439.
- Brown, M. H., K. Boles, P. Anton van der Merwe, V. Kumar, P. A. Mathew, and A. N. Barclay. 1998. 2B4, the natural killer and T cell immunoglobulin superfamily surface protein, is a ligand for CD48. *J. Exp. Med.* 188:2083.
- Latchman, Y., P. F. McKay, and H. Reiser. 1998. Identification of the 2B4 molecule as a counter-receptor for CD48. *J. Immunol.* 161:5809.
- Aversa, G., J. Carballido, J. Punnonen, C. C. Chang, T. Hauser, B. G. Cocks, and J. E. De Vries. 1997. SLAM and its role in T cell activation and Th cell responses. *Immunol. Cell Biol.* 75:202.
- Mavaddat, N., D. W. Mason, P. D. Atkinson, E. J. Evans, R. J. C. Gilbert, D. I. Stuart, J. A. Fennelly, A. N. Barclay, S. J. Davis, and M. H. Brown. 2000. Signaling lymphocytic activation molecule (SLAM, CDw150) is homophilic but self-associates with very low affinity. *J. Biol. Chem.* 275:28100.
- Tatsuo, H., N. Ono, K. Tanaka, and Y. Yanagi. 2000. SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature* 406:893.
- Meuer, S. C., R. E. Hussey, M. Fabbi, D. Fox, O. Acuto, K. A. Fitzgerald, J. C. Hodgdon, J. P. Protentis, S. F. Schlossman, and E. L. Reinherz. 1984. An alternative pathway of T-cell activation: a functional role for the 50-kd T11 sheep erythrocyte receptor protein. *Cell* 36:897.
- Valiante, N. M., and G. Trinchieri. 1993. Identification of a novel signal transduction surface molecule on human cytotoxic lymphocytes. *J. Exp. Med.* 178:1397.
- Nakajima, H., M. Cella, H. Langen, A. Friedlein, and M. Colonna. 1999. Activating interactions in human NK cell recognition: the role of 2B4-CD48. *Eur. J. Immunol.* 29:1676.
- Cocks, B. G., C. C. Chang, J. M. Carballido, H. Yssel, J. E. de Vries, and G. Aversa. 1995. A novel receptor involved in T-cell activation. *Nature* 376:260.
- Carballido, J. M., G. Aversa, K. Kalltoft, B. G. Cocks, J. Punnonen, H. Yssel, K. Thestrup-Pedersen, and J. E. de Vries. 1997. Reversal of human allergic T helper 2 responses by engagement of signaling lymphocytic activation molecule. *J. Immunol.* 159:4316.
- Castro, A. G., T. M. Hauser, B. G. Cocks, J. Abrams, S. Zurawski, T. Churakova, F. Zonin, D. Robinson, S. G. Tangye, G. Aversa, et al. 1999. Molecular and functional characterization of mouse signaling lymphocytic activation molecule (SLAM): differential expression and responsiveness in Th1 and Th2 cells. *J. Immunol.* 163:5860.
- Sayos, J., C. Wu, M. Morra, N. Wang, X. Zhang, D. Allen, S. van Schaik, L. Notarangelo, R. Geha, M. G. Roncarolo, et al. 1998. The X-linked lymphoproliferative-disease gene product SAP regulates signals induced through the co-receptor SLAM. *Nature* 395:462.
- Coffey, A. J., R. A. Brooksbank, O. Brandau, T. Oohashi, G. R. Howell, J. M. Bye, A. P. Cahn, J. Durham, P. Heath, P. Wray, et al. 1998. Host response to EBV infection in X-linked lymphoproliferative disease results from mutations in an SH2-domain encoding gene. *Nat. Genet.* 20:129.
- Tangye, S. G., S. Lazetic, E. Woollatt, G. R. Sutherland, L. L. Lanier, and J. H. Phillips. 1999. Cutting edge: human 2B4, an activating NK cell receptor, recruits the protein tyrosine phosphatase SHP-2 and the adaptor signaling protein SAP. *J. Immunol.* 162:6981.
- Sayos, J., M. Martin, A. Chen, M. Simarro, D. Howie, M. Morra, P. Engel, and C. Terhorst. 2001. The cell surface receptors Ly-9 and CD84 recruit the XLP gene product SAP. *Blood* 97:3867.
- Vanhecke, D. L., J. Plum, and B. Vanderckhove. 1995. Characterization of distinct stages during the differentiation of human CD69<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> thymocytes and identification of thymic emigrants. *J. Immunol.* 155:1862.

27. Massagué, A., P. Engel, S. Pérez-del-Pulgar, J. Bosch, and P. Pizcueta. 2000. Production and characterization of monoclonal antibodies against conserved epitopes of P-selectin (CD62P). *Tissue Antigens* 56:117.
28. Engel, P., Y. Nojima, D. Rothstein, L. J. Zhou, G. L. Wilson, J. H. Kehrl, and T. F. Tedder. 1993. The same epitope on CD22 of B lymphocytes mediates the adhesion of erythrocytes, T and B lymphocytes, neutrophils and monocytes. *J. Immunol.* 150:4719.
29. Wong, Y. W., A. F. Williams, S. F. Kingsmore, and M. F. Seldin. 1990. Structure, expression, and genetic linkage of the mouse BCM1 (OX45 or Blast-1) antigen: evidence for genetic duplication giving rise to the BCM1 region on mouse chromosome 1 and the CD2/LFA3 region on mouse chromosome 3. *J. Exp. Med.* 171:2115.
30. Wang, J. H., A. Smolyar, K. Tan, J. H. Liu, M. Kim, Z. J. Sun, G. Wagner, and E. L. Reinherz. 1999. Structure of a heterophilic adhesion complex between the human CD2 and CD58 (LFA-3) counterreceptors. *Cell* 97:791.
31. Sun, J., J. Williams, H. C. Yan, K. M. Amin, S. M. Albelda, and H. M. DeLisser. 1996. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) homophilic adhesion is mediated by immunoglobulin-like domains 1 and 2 and depends on the cytoplasmic domain and the level of surface expression. *J. Biol. Chem.* 271:18561.
32. Punnonen, J., B. G. Cocks, J. M. Carballido, B. Bennett, D. Peterson, G. Aversa, and J. E. de Vries. 1997. Soluble and membrane-bound forms of signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) induce proliferation and Ig synthesis by activated human B lymphocytes. *J. Exp. Med.* 185:993.
33. Biron, C. A., K. B. Nguyen, G. C. Pien, L. P. Cousens, and T. P. Salazar-Mather. 1999. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu. Rev. Immunol.* 17:189.
34. Isomaki, P., G. Aversa, B. G. Cocks, R. Luukkainen, R. Saario, P. Toivanen, J. E. de Vries, and J. Punnonen. 1997. Increased expression of signaling lymphocytic activation molecule in patients with rheumatoid arthritis and its role in the regulation of cytokine production in rheumatoid synovium. *J. Immunol.* 159:2986.
35. Ferrante, P., M. L. Fusi, M. Saresella, D. Caputo, M. Biasin, D. Trabattini, A. Salvaggio, E. Clerici, J. E. de Vries, G. Aversa, et al. 1998. Cytokine production and surface marker expression in acute and stable multiple sclerosis: altered IL-12 production and augmented signaling lymphocytic activation molecule (SLAM)-expressing lymphocytes in acute multiple sclerosis. *J. Immunol.* 160:1514.
36. Klein, G. 1994. Epstein-Barr virus strategy in normal and neoplastic B cells. *Cell* 77:791.
37. Purtilo, D. T., C. K. Cassel, J. P. Yang, and R. Harper. 1975. X-linked recessive progressive combined variable immunodeficiency (Duncan's disease). *Lancet* 1:935.
38. Hamilton, J. K., L. A. Paquin, J. L. Sullivan, H. S. Maurer, F. G. Cruz, A. J. Provisor, C. P. Steuber, E. Hawkins, D. Yawn, J. A. Cornet, et al. 1980. X-linked lymphoproliferative syndrome registry report. *J. Pediatr.* 96:669.
39. Tangye, S. G., J. H. Phillips, L. L. Lanier, and K. E. Nichols. 2000. Functional requirement for SAP in 2B4-mediated activation of human natural killer cells as revealed by the X-linked lymphoproliferative syndrome. *J. Immunol.* 165:2932.
40. Parolini, S., C. Bottino, M. Falco, R. Augugliaro, S. Giliani, R. Franceschini, H. D. Ochs, H. Wolf, J. Y. Bonnefoy, R. Biassoni, et al. 2000. X-linked lymphoproliferative disease: 2B4 molecules displaying inhibitory rather than activating function are responsible for the inability of natural killer cells to kill Epstein-Barr virus-infected cells. *J. Exp. Med.* 192:337.
41. Howie, D., J. Sayos, C. Terhorst, and M. Morra. 2000. The gene defective in X-linked lymphoproliferative disease controls T cell dependent immune surveillance against Epstein-Barr virus. *Curr. Opin. Immunol.* 12:474.
42. Morra, M., D. Howie, M. S. Grande, J. Sayos, N. Wang, C. Wu, P. Engel, and C. Terhorst. 2001. X-linked lymphoproliferative disease: a progressive immunodeficiency. *Annu. Rev. Immunol.* 19:657.



### **3.2 Article n°2**

**CD229 (Ly9) lymphocyte cell-surface receptor interacts homophilically through its N-terminal domain and relocates to the immunological synapse.**

Xavier Romero, Nuria Zapater, Maria Calvo, Susana G. Kalko, Miguel Angel de la Fuente, Victoria Tovar, Charlotte Ockeloen, Pilar Pizcueta i Pablo Engel.

The journal of Immunology (2005) In press.

## **Resum de l'article n°2**

El CD229 és un membre de la família del CD150 expressat en cèl·lules B i T. Els receptors d'aquesta família regulen la producció de citocines i la citotoxicitat dels limfòcits T i de les cèl·lules NK. La cua citoplasmàtica de CD229 s'associa amb SAP, molècula defectuosa en el síndrome limfoproliferatiu lligat al cromosoma X (XLP).

Amb l'objectiu d'identificar el lligand de CD229, es va generar una proteïna de fusió soluble que contenia els dos dominis Ig N-terminals del receptor CD229 (CD229-Ig). La proteïna de fusió CD229-Ig s'unia a les cèl·lules transfectades amb el cDNA de CD229 però no es va detectar cap interacció amb les cèl·lules que expressaven la resta dels membres de la família del CD150, demostrant així que CD229 interaccionava de manera homofílica. Tant el CD229 humà com el de ratolí interaccionen amb ells mateixos. Amb mutants en que es deleccionaven els dominis Ig es va demostrar que el domini immunoglobulina N-terminal mitjançava l'adhesió homofílica. La interacció CD229-CD229 es veia severament compromesa quan es mutaven tres aminoàcids carregats del domini Ig N-terminal: E27 i E29 en el "loop" B-C i R89 en el "loop" F-G, localitzacions predites mitjançant anàlisi computacional. De manera sorprenent, la mutació R44A augmentava la interacció homofílica. Imatges obtingudes per microscopia confocal revelaven que el CD229 es relocalitzava en les zones de contacte entre les cèl·lules B i T durant la formació de la sinapsi immunològica. Per tant, CD229 interacciona de forma homotípica i participa en la sinapsi immunològica.



# **CD229 (Ly9) lymphocyte cell-surface receptor interacts homophilically through its N-terminal domain and relocates to the immunological synapse**

*Running title:* CD229 is a homophilic cell-surface receptor

Xavier Romero<sup>\*¶</sup>, Nuria Zapater<sup>\*¶</sup>, María Calvo<sup>†</sup>, Susana G. Kalko<sup>‡</sup>, Miguel Angel de la Fuente<sup>\*</sup>, Victoria Tovar<sup>\*</sup>, Charlotte Ockeloen<sup>§</sup>, Pilar Pizcueta<sup>\*</sup> and Pablo Engel<sup>2\*</sup>

From <sup>\*</sup>the Immunology Unit, Department of Cellular Biology and Pathology, Medical School, University of Barcelona. Barcelona, Spain; <sup>†</sup>The Scientific Services, University of Barcelona. Barcelona, Spain; <sup>‡</sup>The Bioinformatics Unit, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Barcelona, Spain; <sup>§</sup>The International School of Hepatology and Tropical Medicine, Faculty of Medical Sciences, University of Groningen, Netherlands.

<sup>¶</sup> X.R. and N.Z. contributed equally to this study.

*Key words:* human, T cells, cell activation, cell-surface molecule

*Footnotes:*

<sup>1</sup> This work was supported by a grants from the Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain (SAF2003-00564) and Marató (2000-TV4410).

<sup>2</sup> Address correspondence and print requests to Pablo Engel. Unidad de Inmunología, Departamento de Biología Celular y Anatomía Patológica, Facultad de Medicina, C/ Casanova 143, Barcelona 08036, Spain; Phone: (+34) 93 403 5267 ; Fax: (+34) 93 402 1907; e-mail: pengel@ub.edu

## *Abstract*

**CD229 is a member of the CD150 family of the immunoglobulin (Ig) superfamily expressed on T and B-cells. Receptors of this family regulate cytokine production and cytotoxicity of lymphocytes and natural killer cells. The cytoplasmic tail of CD229 binds to SAP, a protein, which is defective in X-linked lymphoproliferative syndrome. In order to identify the CD229 ligand, we generated a soluble Ig fusion protein containing the two N-terminal extracellular domains of human CD229 (CD229-Ig). CD229-Ig bound to CD229-transfected cells, whereas no binding was detected on cells expressing other CD150 family receptors, showing that CD229 binds homophilically. Both human and mouse CD229 interacted with itself. Domain deletion mutants showed that the N-terminal Ig-domain mediates homophilic adhesion. CD229-CD229 binding was severely compromised when the charged amino acids E27 and E29 on the predicted B-C loop and R89 on the F-G loop of the N-terminal domain were mutated to alanine. In contrast, one mutation, R44A, enhanced the homophilic interaction. Confocal microscopy image analysis revealed re-localization of CD229 to the contact area of T and B-cells during Ag-dependent immune synapse formation. Thus, CD229 is its own ligand and participates in the immunological synapse.**

## **Introduction**

Interactions between cell-surface molecules, expressed by various hematopoietic cell types, regulate immune responses. A considerable number of these cell-surface molecules belong to the immunoglobulin superfamily (IgSF), which has evolved as a large but diverse group of genes encoding proteins involved in bimolecular recognition (1). The extracellular domains of IgSF proteins are involved in multiple specific cell-cell interactions, both homophilic and heterophilic. These interactions trigger intracellular signals that determine numerous cellular functions including activation, differentiation, proliferation, and acquisition of effector function and/or tolerance induction (2). Even though most of these cell-surface receptors lack intrinsic enzymatic activity they recruit intracellular kinases, phosphatases and adapter proteins in response to engagement by their ligands or counter-receptors (3).

CD229, previously known as Ly9, is expressed in T and B- lymphocytes, and thymocytes (4-7). It belongs to the CD150 family, a group of structurally related leukocyte cell-surface receptors of the IgSF. Members of this family of immunoreceptors are involved in the functional regulation of several immune cell types, including helper and cytotoxic T lymphocytes, natural killer cells, and macrophages (8-11). The CD150 family includes a number of cell-surface receptors CD229, CD48, CD84, CD150 (SLAM), CD244 (2B4), NTB-A (Ly108), CS1 (novel Ly9; CRACC), CD84-H1, and BLAME (BCM-like) (9). These molecules are type I transmembrane glycoproteins that contain a cytoplasmic tail, with the exception of CD48, which has a GPI anchor to the membrane. The extracellular ectodomain of this group of proteins comprises N-terminal V-set Ig domains lacking the canonical disulfide bond, and C-terminal C2-set Ig domains, which are characterized by similar patterns of conserved cysteines. Although the extracellular domain of CD2 and CD58 share some of these characteristics (12, 13), the homology between these two leukocyte receptors and

members of the CD150 family is low (less than a 15% identity) (14). Unlike other members of the CD150 family, CD229 has four rather than two extracellular Ig domains. Domains 1 and 3 are similar, as are domains 2 and 4, suggesting that CD229 arose from a progenitor with two Ig domains (5). The cytoplasmic domain of CD229, similar to several members of the CD150 family, contains two copies of the tyrosine-based motif (T-I/V-Y-x-x-V/I) (6). This unique motif is a docking site for SH2-binding phosphatases and the adapter molecules SAP and EAT-2 (15, 16). It has recently been shown that SAP is required for CD229 tyrosine phosphorylation in T lymphocytes (17). The *SH2D1A* gene, which encodes SAP, is deleted or mutated in patients with X-linked lymphoproliferative disease (XLP) (18, 19), an unusual immunodeficiency characterized by uncontrolled polyclonal expansion of both T and B cells after an Epstein-Barr virus infection, resulting in fatal mononucleosis. Some other clinical manifestations of this disease include B cell lymphoma and dysgammaglobulinemia (20). The lethal immunodeficiency observed in XLP patients points to a critical role of the CD150 family of SAP-binding cell-surface receptors in the regulation of the immune system (9). Recently, CD229 was shown to associate with the  $\mu$ -chain of the AP-2 adaptor complex, which links transmembrane molecules with clathrin coated pits (21). TCR and CD229 co-ligation enhances CD229 endocytosis, suggesting that Ag receptor signaling regulates the availability of CD229 at the plasma membrane. CD229 is the only member of the CD150 family that binds to the AP-2 complex.

Through their extracellular domain, the CD150 immunoreceptors interact with specific ligands. One common feature of this subset of molecules is that they interact with members of the same family; CD150, CD84, CS1 and NTB-A all participate in homophilic interactions (10, 22-26), whilst CD244 (2B4) is a receptor for CD4827. The counter-receptor of CD229 is currently unknown.

During antigen recognition, T cells undergo substantial membrane and cytoskeletal

rearrangements that lead to the formation of the immunological synapse (28, 29). The TCR, accessory cell-surface molecules and intracellular signaling molecules that are incorporated into and around the contact zone between T cells and antigen-presenting cells all contribute to the modulation of the functional state of the synapse. The immunological synapse appears to be essential to establish the persistent signaling necessary for full activation and is implicated in the control of the quality and extent of biological T cell responses. Recently, it has been reported that CD244 (2B4), which is a member of the CD150 family, redistributes to the central zone of the cytotoxic NK immune synapse (30). However, the behavior of CD229 and other members of the family during immunological synapse formation remains to be elucidated.

Here we show that CD229 interacts homophilically through its N-terminal V-like domain and identify the amino acid residues essential for binding. We also show that CD229 localizes to the contact site between T cells and antigen presenting B cells during antigen-dependent immune synapse formation.

## Materials and Methods

### *Cells and reagents*

COS-7 cells, the lymphoblastoid B cell line Raji and the murine myeloma cell line NS-1 were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA). The Armenian hamster kidney cell line (AHK) was obtained in our laboratory by transfecting a primary culture of kidney cells with SV40. The Jurkat-derived human cell line V $\beta$ 8<sup>+</sup> J77cl20 was provided by A. Alcover and has been described previously (31). Cell lines were cultured in complete RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum, penicillin/streptomycin, and L-glutamine (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD). The following mAbs were produced in our laboratory: anti-human CD84 (clone CD84.1.21) (23), anti-human CD229 (clones HLY9.1.84, HLY9.1.38, HLY9.1.25, HLY9.1.77) (6) and anti-human CD150 (clone SLAM 4) (32). The anti-CD244 mAb (clone 69- IgG1) was generated by fusing myeloma cell line NS<sub>1</sub> with spleen of a BALB/c mouse immunized three times with the human CD244-Ig fusion protein (described below). The mAbs anti-murine CD229 (clone Ly9ab3) and anti-murine CD84 (clone mCD84.7) were generated by fusing NS<sub>1</sub> with spleen cells obtained from Armenian hamsters that were immunized three times with AHK transiently transfected with murine full-length Ly9 cDNA or the Ig fusion protein of murine CD84 (mCD84-Ig), respectively. Hybridomas were subcloned at least three times. MAbs were purified using the Affi-Gel Protein A MAPS II kit (Bio-Rad, Hercules, CA) from concentrated supernatants obtained from the culture of hybridomas in INTEGRA CL 1000 flasks (Integra Biosciences AG, Wallisellen, Switzerland).

Anti-human CD48 mAb (clone 156.4H9) and LFA-1 (clone 68-5A5) were a gift from R. Vilella (Hospital Clínic, Barcelona, Spain) and NTB-A mAb (clone MA127) was a gift from A. Moretta (33). The following mAbs were obtained from Becton Dickinson Pharmingen (San Jose, CA):

Anti-human CD3-FITC ,CD45-FITC, CD2-PE, CD58-PE, biotin anti-mouse Ig  $\kappa$  and TNP. Biotin-conjugated anti-human IgG, streptavidin-Cy3 and anti-mouse-Cy3 were purchased from Jackson ImmunoResearch Labs (West Grove, PA) and streptavidin-PE was from Southern Biotechnology Associates (Birmingham, AL). Anti-mouse IgG-labelled with horseradish peroxidase was obtained from Sigma-Aldrich (St Louis, MO).

#### *Chimeric CD229 molecules and splice variants*

Two human/mouse CD229 cDNAs chimeric molecules were produced. Chimeric molecule hDI/II mDIII/IV was made by joining the cDNA that encodes domain I and II of human CD229 with domains III and IV of murine CD229, whereas the chimeric molecule hDI/DIII/DIV mDII was constructed using domains I, III and IV of human CD229 and domain II of murine CD229. The chimera hDI/II mDIII/IV was constructed with two fragments generated by polymerase chain reaction (PCR). The first PCR product was generated using human CD229 cDNA as template and the HLy9 wt forward oligonucleotide (Table I) and overlapping reverse oligonucleotide 5' -TCT TCT GGA GGC TC/C TGG ATC TGT ACA GAA C-3'. The second PCR product was generated using the murine (C57BL/6) CD229 cDNA as template and overlapping forward oligonucleotide 5'-GTT CTG TAC AGA TCC AG/G AGC CTC CAG AAG A- 3' and reverse oligonucleotide 5' -TTC TCC AAA TCC TCA CCC CG- 3'. Each PCR product was used for a recombinant PCR containing the primers HLy9 wt and reverse primer of murine CD229.

Chimeric molecule hDI/DIII/DIV mDII was constructed using three products generated by PCR. The first PCR product, corresponding to the first domain of human CD229 was amplified using human CD229 cDNA as template and HLy9 wt forward oligonucleotide (Table1) and

overlapping reverse oligonucleotide 5' -GGC TTC TGG AGC TTC TCA TAG ACG AAA AGG GTG- 3'. The second PCR product, corresponding to the second domain of murine CD229 was generated using murine (C57BL/6) CD229 cDNA as template and the overlapping forward oligonucleotide 5' -CAC CCT GTT CGT CTA TGA GAA GCT CCA GAA GCC- 3', and overlapping reverse oligonucleotide 5' -GTT CCT CCT CTG GAG GCT CCT GTG CAG AAT TGC CA- 3'. The third PCR product was amplified using human CD229 cDNA as template and the overlapping forward oligonucleotide 5' -CTG GCA ATT CTG CAC AGG AGC CTC CAG AGG A- 3', and the HLy9 wt reverse oligonucleotide (Table1). PCR products were used for a recombinant PCR to anneal overlapping ends. The human/mouse chimeric molecules were cloned into pcDNA3.1/V5/His-TOPO expression vector (Invitrogen) fully sequenced and transfected in COS cells. As control, murine CD229 full-length cDNA was transfected in COS cells and tested with the anti-human CD229 mAbs to rule out possible cross-reactivity of these mAbs with murine CD229.

A CD229 isoform that lacks the first Ig domain (CD229  $\Delta$ DI) was isolated from the thymus by RT-PCR and subcloned in PCIneo expression vector. The reactivity of CD229 mAbs (HLy9.1.25, HLy9.1.38, HLy.1.77 and HLy9.1.84) with COS cells transfected with the chimeric molecules and the splicing variant CD229 $\Delta$ DI cDNAs was analysed using flow cytometry.

### *Construction of the fusion proteins*

The human CD229-Ig (CD229-Ig), human CD244-Ig (CD244-Ig), murine CD84-Ig (mCD84-Ig), and murine CD229-Ig (mCD229-Ig) fusion proteins containing the CD33 leader peptide and the Fc region of human IgG<sub>1</sub> were obtained by inserting the sequences corresponding to the first and second extracellular Ig domains into the mammalian expression vector signal



pIg-Tail (R&D Systems, Minneapolis, MN). The oligonucleotides used were as follows: Human CD229 forward oligonucleotide, 5' -AGG AAG ATC TAA AGG ACT CAG CCC CAA CAG TGG T- 3'-, and reverse oligonucleotide, 5' -AGG AAG ATC TAC TTA CCT GTT CTG GAG GCT CCT GGA TCT GTA C- 3'. Human CD244 forward oligonucleotide, 5' -AGG GGG ATC CAT GCC AGG GTT CAG CTG ACC A- 3' and reverse oligonucleotide, 5' -ACC AGG ATC CAC TTA CCT GTG AAT TCC TGA TGG GCA TTC TGA C- 3'; Murine CD84 forward oligonucleotide, 5' -TCG AGG ATC CAA AAG ATG CAG ACC CGG TGG T- 3' and reverse oligonucleotide, 5' -TAA CGG ATC CAC TTA CCT GTA TG AAG CTT GGA GTG TCT G- 3'; Murine CD229 forward oligonucleotide, 5' -GTT CAG ATC TAA AGG AAA CAC CTC CAA CAG TGA T- 3' and reverse oligonucleotide, 5' -GTC AAG ATC TAC TTA CCT GTT CTG GAG GCT CCT GTG CAG AAT TGC CA- 3'. Human CD84-Ig was obtained in our laboratory (23). The constructs corresponding the Ig fusion proteins were subcloned in the expression vector pCI-neo (Promega, Madison, WI) and NS-1 stable transfectants were obtained by electroporation and selection with 1.2 mg/mL geneticin (G418) (Gibco/BRL, Gaithersburg, MD). Eight million cells were electroporated (280 V, 950  $\mu$ F) with 8  $\mu$ g of linearized DNA using the Gene Pulser II Apparatus (Bio-Rad). The transfected cells were plated in flat-bottomed 96-well tissue culture plates (Corning) by limiting dilution and clones producing high amounts of fusion protein were cultured in INTEGRA CL 1000 flasks (Integra Biosciences AG). The supernatants containing the fusion proteins were purified as described for the mAbs.

#### *Site-directed mutagenesis*

Site-directed mutagenesis of single residues was performed using a set of sense and antisense

primers containing the appropriate mutation (Table 1). Wild type CD229 cDNA was used as template. The first polymerase chain reaction (PCR) used either the sense primer 5' -AGT TCT GAA AAT AGA TCA TCA TGG- 3' plus an antisense primer containing the mismatched base, or a sense primer that contained the mismatched base plus the antisense primer 5' -AGC TGC TTT TCC TTT CAG GTG- 3', to create 2 PCR products that overlapped within the region spanned by the mutagenized sense and antisense primers. The reactions were carried out as follows: 95° C for 5 minutes, followed by 35 cycles of 95°C for 30 seconds, 56°C for 30 seconds, 72°C for 2 minutes, with a final extension period of 72°C for 6 minutes. Aliquots of 3 µl of a 1/25 dilution of each PCR product were used as templates for a recombinant PCR containing the primers of the full-length CD229. The conditions of the PCR were the same as before. PCR products were cloned into the pcDNA3.1/V5/His-TOPO expression vector (Invitrogen, Groningen, The Netherlands). After confirming mutated clones by automatic sequencing, each cDNA mutant was transfected into COS-7 cells.

### *COS transfection*

One million COS-7 cells were transiently transfected with 3 µg of cDNA corresponding to human CD229 or the CD229 mutants, CD229 chimeras, CD229 splice variant (CD229  $\Delta$ DI), CD84, CD150, CD244, CD48, CD2, CD58 and NTB-A using 100 µl of Nucleofector™ Solution V according to the manufacturer's protocol (AMAXA Biosystems, Köln, Germany). 24 hours after transfection, the cells were analyzed either by flow cytometry or by immunocytochemistry.

### *Immunocytochemistry*

Transiently transfected COS-7 cells were cultured on glass cover-slips in 24 well tissue culture plates (Corning Incorporated, NY). After 48 hours, cells were fixed with 4% paraformaldehyde at 4°C and then blocked with 3% bovine serum albumin (Sigma-Aldrich). Cells were labelled with HLY9.1.25, HLY9.1.38 and HLY9.1.77 mAbs and CD229-Ig fusion protein for 1 h at room temperature. After washing in PBS, samples were incubated with Cy3-conjugated anti-mouse IgG or biotin-conjugated anti-human IgG (Jackson Immuno Research Labs.). Samples were washed twice in PBS and mounted in Fluoromount-G (Southern Biotechnology, Birmingham, AL, USA). Fluorescence images were obtained using a confocal spectral microscope (TCS SL, Leica, Heidelberg, Germany).

### *Flow cytometry*

Flow cytometry was carried out with transfected cells, stained with anti-human mAbs, followed by biotinylated anti-mouse  $\kappa$  light chain, plus streptavidin-PE (Becton Dickinson Pharmingen). Ig fusion protein staining was performed using 2  $\mu$ g of Ig fusion protein followed by incubation with biotin-conjugated anti-human IgG (Jackson ImmunoResearch Labs) and then streptavidin-PE. The stained cells were analyzed using a FACSCalibur (Becton Dickinson, Immunocytometry Systems, San Jose, CA) equipped with Cell Quest™ software. Ten thousand cells were counted for each sample.

### *Molecular modeling of the CD229 N-terminal domain*

We used the 'alignment mode' of SWISS-MODEL, an automated modelling process based on a user-defined target-template alignment (34). We obtained a first model of 78 residues (corresponding to residues 13 to 90 of the N-terminal domain of CD229) from the alignment between our target and CD58, and a second model of 42 residues (corresponding to residues 63 to 104 of the N-terminal domain of CD229) from the alignment between our target and CD2. The final model presented here is 90 residues long and was constructed using the three-dimensional alignment CE method with the first and second models (35). Our final model shows the archetypical fold of V Ig variable domains characterised by nine  $\beta$  strands forming two antiparallel  $\beta$  sheets. The first  $\beta$  strand was not modelled.

### *Immunological synapse formation and immunofluorescence microscopy*

To distinguish B (Raji) from T (Jurkat  $V\beta 8^+$  J77cl20) lymphocytes, Raji cells were loaded with the fluorescent cell tracker chloromethyl derivative of aminocoumarin (CMAC; 10  $\mu$ M) or 5-chloromethylfluorescein diacetate (CMFDA; 3  $\mu$ M) (Molecular Probes, Eugene, OR). B cells were incubated for 20 min at 37°C with 2  $\mu$ g/ml of staphylococcal enterotoxin (SEE) (Toxin Technology, Sarasota, FL). Jurkat cells were mixed with Raji cells (proportion 1:1) and incubated for 15 min at 37°C. Cells were plated onto poly-L-lysine-coated slides (50  $\mu$ g/ml; Sigma-Aldrich), incubated for 20 min at 37°C, and fixed in 4% formaldehyde. For immunofluorescence assays, samples were blocked with PBS containing 2%BSA and Fc receptors were blocked with 15% of heat-inactivated rabbit serum (Gibco/BRL). Cells were labeled with mAbs followed by Cy3 conjugated goat anti-mouse (Jackson ImmunoResearch

Labs.). For visualization of immunological synapse formation, confocal images were acquired using a Leica TCS SL laser scanning confocal spectral microscope (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Mannheim, Germany) with Argon and HeNe lasers attached to a Leica DMIRE2 inverted microscope. All images were obtained using a 63x oil immersion objective lens (NA 1.32) equipped with phase contrast optics. Due to the small size of cells electronic zoom was necessary for higher magnification and better image resolution. The images of CMAC-labeled Raji cells were obtained using an Hg lamp HBO 50W UV filter as light source after each acquisition of fluorescence confocal and phase contrast images. Image assembly and treatment were performed using the Leica Confocal Image Processing Software.

B cell line Raji was negatively selected for CD229 expression using three sequential pannings. Briefly, polystyrene bacteriological Petri dishes (100 × 15 mm) were coated overnight at 4°C with of HLy9.1.84 mAb at 10 µg/ml in PBS. The dishes were washed twice with PBS and blocked with PBS containing 0.2% of BSA (Sigma) for 1h at RT. The dishes were washed once with PBS and then  $10 \times 10^6$  Raji cells were added and incubated for 40 min at 4°C. Non-adherent Raji cells were collected. This procedure was repeated three times. The collected cells Raji expressed almost undetectable CD229 levels (Raji CD229<sup>-</sup>) These cells were used to perform immunological synapse formation studies. Contacts of Jurkat cells with Raji CD229<sup>-</sup> cells which expressed detectable levels of CD229 in the confocal images were excluded from the analysis.

### *Statistical analysis*

The Sigma Stat statistical package (Jandel Scientific Software, San Rafael, CA) was used in the analysis of the results. All results are reported as mean  $\pm$  SEM. Statistical significance was set at  $P < 0.05$ . ANOVA and Student's "t" test with Bonferroni's correction were used.

## **Results**

### *CD229 interacts homophilically*

In order to identify the ligand of CD229, we assessed binding of a CD229-Ig fusion protein to COS-7 cells transiently transfected with CD2, CD58, or members of the CD150 family. Binding was only detected with CD229. CD2, CD58, CD84, CD150, CD48, CD244, and NTB-A transfected cells were all negative (Fig. 1). The specific binding of CD244-Ig to CD48 was used as a positive control (Fig. 1). CD229 homophilic binding was also observed in mice (Fig. 2A). Moreover, the CD229-CD229 homophilic interaction is not species-restricted since human CD229 can bind to mouse CD229 and vice versa (Fig. 2B). This is in contrast to CD84 homophilic binding, which is species-restricted, because human CD84 does not bind to murine CD84, although murine CD84 can bind to itself (Fig. 2A).

### *Domain mapping of CD229 monoclonal antibodies*

To identify the Ig like domains that are involved in the homophilic interaction of CD229, domain mapping was performed for the four mAbs previously produced by our laboratory (6). MAb binding to COS cells transfected with CD229 human/mouse chimeras indicated that HLY9.1.25, HLY9.1.38 and HLY9.1.77 were directed against Ig domain I, whereas HLY9.1.84 was reactive with Ig domain II (Table 2). Moreover, only mAb HLY9.1.84 was able to bind

with COS cells transfected with a CD229 isoform that lacks the first Ig domain (CD229  $\Delta$ DI), further demonstrating that this mAb recognizes the second Ig domain. Cross-blocking studies showed that the mAbs recognized three epitopes: HLY9.1.25 and HLY9.1.38 recognize epitope A, HLY9.1.77 epitope B and HLY9.1.84 epitope C (Table 3).

#### *The N-terminal domain of CD229 mediates homophilic interaction*

CD229-Ig binding was tested with CD229  $\Delta$ DI. This isoform was expressed on the cell-surface of transfected COS cells as shown by positive staining with mAb HLY9.1.84. Deletion of the first V domain completely abolished binding of CD229-Ig, indicating that the direct and exclusive interaction between two opposing V domains is crucial for the homophilic CD229 interaction (Fig. 3).

Furthermore, monovalent Fab fragments of mAb HLY9.1.77, which maps to the first Ig domains and reacts with epitope B were able to partially blocked (60%) the binding of CD229-Fc to wild-type CD229-transfected cells. In contrast, antibodies recognizing epitope A, located in domain I, and mAb recognizing epitope C, located within domain II, did not significantly block CD229-Ig binding to CD229-transfected COS cells (data not shown). These data demonstrate that the first Ig domain mediates homophilic binding of CD229.

#### *Identification of the key amino acid residues on the GFCC'CC'' face involved in CD229 homophilic interaction*

Surface-exposed charged amino acids have been proposed to be involved in the intermolecular interaction of the N-terminal Ig domains of CD2 and its counter-receptor CD58 (36, 37). To identify key amino acid residues of CD229 that contribute to homophilic

binding, a number of point mutations were generated by site-directed mutagenesis. Several charged amino acids that are conserved between human and murine CD229, located at the GFCC'CC'' face of the N-terminal Ig domain, were mutated to alanine. Binding of the CD229-Ig fusion protein was tested in COS cells transfected with wild-type and mutated CD229. COS cells expressing mutant CD229 molecules at levels comparable to wild-type were analyzed by flow cytometry and immunocytochemistry (Table 4, Fig. 4). To assess whether any of these mutations resulted in alterations of their tertiary structure that could affect their adhesion to a CD229 ligand, we tested their immunoreactivity with three mAbs, HLy9.1.25, HLy9.1.38 and HLy9.1.77, that recognize epitopes located within the first Ig-like domain. All of the mutants tested reacted similarly with these mAbs, suggesting no significant alteration of the general tertiary structure (Fig. 4B). Our results show that mutation of E27 and E29 on the predicted B-C loop, and R89 on the F-G loop of the N-terminal domain all cause a disruption of the binding by more than 80%, whereas the rest of the mutants had no significant effect on the binding activity of CD229 (Table 4, Fig. 4A). Surprisingly, one mutation, R44A, was found to cause a dramatic increase in binding to CD229-Ig (Table 4, Fig. 4).

#### *CD229 redistributes to the contact area of T-B cell conjugates in an Ag-dependent manner*

Here we used confocal microscopy to examine the localization of CD229 during Ag-dependent immune synapse formation. Superantigen activation of V $\beta$ 8<sup>+</sup> Jurkat cells has been described to trigger molecular polarization and segregation, forming a canonical immunological synapse (28). Jurkat T cells activated with the bacterial superantigen SEE-pulsed Raji cells formed immunological synapses similar to those described previously in mouse T cells activated with peptide antigen-bearing B cells. Both Jurkat and Raji cells



expressed comparable levels of CD229. CD229 moved to the interface of the T-B cell conjugate after Ag triggering (Fig. 5B). CD229 was re-localized in 13.2% of the T-B cell conjugates analyzed in the absence of SEE. However, after incubation with SEE the number of conjugates in which CD229 relocalized to the T-B cell contact area increased to a 38.0 %, similar to the relocalization levels of CD3 (Fig. 5 and Table 5). In contrast, CD45 was homogeneously distributed around the cell-surface (Fig. 5, Table 5). The relocalization of CD229 was observed on both the Jurkat T cell and the Raji APC (Table 6). Moreover, the relocalization of CD229 was significantly affected by the presence of CD229 on APCs, since we observed that CD229 relocalization was significantly reduced when CD229 was not present on APCs both in the presence and in the absence of SEE. In contrast, no significant differences in the relocalization of CD3 were observed (Fig. 6). To further analyze the localization of CD229 at the immunological synapse, co-localization studies were performed. We observed that the compact clusters of CD3 were embedded in large accumulations of CD229, similar to those observed with the integrin LFA-1 (Fig. 5A). Together, these data show that CD229 localizes to the immunological synapse.

## Discussion

In this study we have demonstrated that CD229 is a self-ligand, interacting through its N-terminal V-like domain, in which we have identified three residues critical for the homophilic interaction. We observed that a soluble CD229-Fc fusion protein binds to CD229-transfected cells, but not to cells transfected with the cDNA of other members of the CD150 family or the related cell-surface molecules CD2 and CD58. Our data are consistent with the observation that the only known ligands of the CD150 family of cell-surface receptors are other members of the same family. With the exception of CD48, which binds to CD244, ligand interactions within this family have been shown to be homophilic (CD84-CD84, CD150-CD150, CS1-CS1 and NTB-A-NTB-A) (9, 10, 25, 26). Here we have shown that both human and murine CD229 can bind to itself, indicating that the homophilic interaction of this molecule occurs in different species. Moreover, the CD229-CD229 homophilic interaction is not species-restricted, because human CD229 also bound to murine CD229 and *vice versa*. This is in contrast to our results with CD84 and to previous reports for other members of the CD150 family where their interaction has been shown to be species-specific (23, 27). These data indicate that residues involved in the homophilic interaction of CD229 may be preserved between these two species.

Our structure-function analysis, using domain deletion mutants, revealed that the homophilic interaction of CD229 is mediated by the membrane distal N-terminal Ig domain. If additional Ig domains were directly involved in this interaction, cells expressing a CD229 that only lacks the N-terminal domain would be expected to display a residual capacity to bind to CD229-Fc. However, soluble ligand binding was completely abolished upon deletion of the N-terminal V domain. Moreover, single amino acid point mutation of residues located in the first Ig-like domain abolished the CD229-CD229 interaction. N-terminal domains are

generally important for the interaction of cell-adhesion molecules that belong to the immunoglobulin superfamily (38).

When homology can be demonstrated with well-characterized proteins, many properties of the 3-dimensional structure may be predicted. The model building analysis of the N-terminal domain of CD229 employed here utilized the known structure of CD2 and CD58 as a guide (36). The basic structure of the V-like N-terminal domain of CD229 is a predicted tertiary fold of a stacked pair of beta-pleated sheets. There are 9 beta strands, with strands A, B, E, and D lying in one sheet and strands C, C', C'', F and G lying antiparallel in the other (Fig. 7). Site-directed mutagenesis in CD2 and CD58 has shown that charged residues located on the GFCC'CC'' face are critical for their interaction. The structural analysis of the ligand-binding domains of CD2 and CD58 confirmed that the binding is dominated by electrostatic contacts between binding surfaces exhibiting considerable electrostatic complementarity. Our results show that exposed residues on the GFCC'C'' face of the N-terminal domain also play a crucial role in homophilic interaction of CD229. Single mutations of the negatively charged residues E27 and E29 located in the predicted B-C loop, and the positively charged residue R89 on the F-G loop, abolished the CD229-CD229 interaction (Fig. 6). On the basis of mAb binding profiles, the presence of gross structural perturbation or misfolding, as a consequence of specific mutations was highly unlikely (Fig 4B). Thus, we speculate that the negatively charged residues (E27 and E29) may interact with the positively charged residue (R89) in the counter-receptor interacting interface between the N-terminal adhesion domains of CD229. However, a crystal structure of CD229 binding to itself will be needed to confirm the actual way in which these residues interact at the molecular level.

As suggested for CD2 and CD58, we hypothesize that CD229 molecules expressed on the surface of adjacent cells establish head-to-head contacts. Of interest in this context is the

observation that dynamic binding between CD2 and CD58 counter-receptors on opposing cells optimizes immune recognition through stabilization of T cell and APC cell contact (36).

Surprisingly, mutation of residue R44 located in the C'C'' loop enhanced the binding of CD229 to itself, a phenomenon which has been reported for other ligand–receptor pairs (39). This observation may aid the design of fusion proteins or small peptides that could be used to alter CD229 function in a therapeutic context.

Binding of the CD229-Ig could be only observed in transfected cells overexpressing CD229 indicating that its affinity for itself is weak. Nevertheless, CD229 binding is very specific, since it only bond to itself and not to any other member of the CD150 family. Low affinity interactions are a common feature of homophilic receptors of the Ig superfamily including CD150 (Kd of 200  $\mu$ M). These interactions are characterized by remarkably fast on/off rates that foster rapid and extensive exchanges between partners on opposing cell surfaces. This is thought to allow cells to rapidly form and break contacts, conferring plasticity at the cell-cell contact areas or enabling the rapid surveillance of target membranes (38, 40). Whereas the affinity of adhesion molecules often reflects a specific conformation of the extracellular binding domain, avidity modulation involves changes in the cellular distribution, which leads to clusters of molecules and thereby specifically increases the number of available receptors at the site of cell-cell interaction. This avidity can be further enhanced by the participation of other adhesion molecules at the contact site, such as the integrins (41). Thus, the lateral receptor mobility and accumulation of multiple interface bonds will be required for the development of appreciable adhesion.

To explore the functional relevance of CD229 homophilic binding we analyzed its localization during immunological synapse formation. Immune receptors and components of their signaling cascades are spatially organized and this spatial organization plays a central role in the initiation and regulation of signaling (42). The synapse is established and maintained to a

large extent by the interaction of glycoproteins expressed on the surface of adjacent cells. Homophilic interactions of cell-surface proteins typically result in their accumulation at sites of cell-cell contact. These molecules do not only function as adhesion molecules but also translate biochemical information. By doing so they regulate the initiation and prolongation of signaling triggered by ligand-engagement of the immune cell signaling receptors. The ability to segregate receptors provides a mechanism for the compartmentalization of signaling components within the membrane, concentrating certain components in the contact area and excluding others with negative regulatory activity. Our results show that CD229 redistributes to the contact area established between T cells and enterotoxin E (SEE)-pulsed antigen presenting B cells. The redistribution could be observed in both the T and the B cell. Moreover, the presence of CD229 on the B cell affected the relocalization of CD229 on the T cell indicating a role of CD229 homophilic interaction in its cellular distribution (Fig. 6). However, CD229 homophilic interaction was not required for CD3 relocalization to the immunological synapse. Interestingly, the accumulation of CD229 was more evident at the periphery of the contact region, surrounding the compact clusters of CD3 (Fig. 5B). The molecular segregation of CD229 may be explained by the four Ig domain structure of this cell-surface molecule. It has been observed that cell-surface molecules of the Ig superfamily that are present in the central synapse contain just two Ig domains, and that this may be important to ensure the right distance for interactions between two cells. This is also the case for the CD150 family member CD244 (2B4) (30). Consistent with this notion, the interaction of CD2 with an elongated form of CD48 significantly inhibits immune recognition (43). Recent studies in our laboratory indicate that CD229 inhibits rather than induce T cell activation and cytokine production (44). Thus, we hypothesize that CD229 is excluded from the central synapse to prevent it from delivering negative signals. More studies including dynamic redistribution analysis of CD229, will be required to elucidate its contribution to the modulation of the

functional state of the immunological synapse.

Immunological synapse occurring during cognate interactions between B and helper T cells, within the B cell follicles of secondary lymphoid organs, are required for humoral immune responses to many antigens (45). Expression of SAP by CD4<sup>+</sup> T cells is essential for T-cells to provide B-cell help, and establish long term humoral immunity (46). The fact that CD229 is a SAP-associated homophilic receptor expressed on both T and B cells and that it localizes at the immune synapse suggests that this molecule has a role in the regulation of T-B interactions. Further evidence supporting the importance of CD229 in regulating T-cell help for B-cells is the recent finding that CD229 is preferentially expressed by effector T follicular helper cells (47).

The identification of CD229 as a homophilic receptor and characterization of the binding site is an important step in advancing our understanding of how this interaction can regulate the immune response.

## **Acknowledgments**

We thank A Alcover for kindly providing us with the Jurkat V $\beta$ 8<sup>+</sup> J77c120 cell line. We are also thankful to A Moretta and R Vilella for providing monoclonal antibodies.

## References

1. Barclay, A. N. 2003. Membrane proteins with immunoglobulin-like domains--a master superfamily of interaction molecules. *Semin.Immunol.* 15:215-223.
2. Lanier, L. L. 2001. Face off--the interplay between activating and inhibitory immune receptors. *Curr.Opin.Immunol.* 13:326-331.
3. Cannons, J. L. and P. L. Schwartzberg. 2004. Fine-tuning lymphocyte regulation: what's new with tyrosine kinases and phosphatases? *Curr.Opin.Immunol.* 16:296-303.
4. Sandrin, M. S., T. P. Gumley, M. M. Henning, H. A. Vaughan, L. J. Gonez, J. A. Trapani, and I. F. McKenzie. 1992. Isolation and characterization of cDNA clones for mouse Ly-9. *J.Immunol.* 149:1636-1641.
5. Sandrin, M. S., M. M. Henning, M. F. Lo, E. Baker, G. R. Sutherland, and I. F. McKenzie. 1996. Isolation and characterization of cDNA clones for Humly9: the human homologue of mouse Ly9. *Immunogenetics* 43:13-19.
6. de la Fuente, M. A., V. Tovar, N. Villamor, N. Zapater, P. Pizcueta, E. Campo, J. Bosch, and P. Engel. 2001. Molecular characterization and expression of a novel human leukocyte cell-surface marker homologous to mouse Ly-9. *Blood* 97:3513-3520.
7. Romero, X., D. Benitez, S. March, R. Vilella, M. Miralpeix, and P. Engel. 2004. Differential expression of SAP and EAT-2-binding leukocyte cell-surface molecules CD84, CD150 (SLAM), CD229 (Ly9) and CD244 (2B4). *Tissue Antigens* 64:132-144.
8. Veillette, A. and S. Latour. 2003. The SLAM family of immune-cell receptors. *Curr.Opin.Immunol.* 15:277-285.
9. Engel, P., M. J. Eck, and C. Terhorst. 2003. The SAP and SLAM families in immune responses and



- X-linked lymphoproliferative disease. *Nat.Rev.Immunol.* 3:813-821.
10. Wang, N., A. Satoskar, W. Faubion, D. Howie, S. Okamoto, S. Feske, C. Gullo, K. Clarke, M. R. Sosa, A. H. Sharpe, and C. Terhorst. 2004. The Cell Surface Receptor SLAM Controls T Cell and Macrophage Functions. *J.Exp.Med.* 199:1255-1264.
  11. Lee, K. M., M. E. McNerney, S. E. Stepp, P. A. Mathew, J. D. Schatzle, M. Bennett, and V. Kumar. 2004. 2B4 Acts As a Non-Major Histocompatibility Complex Binding Inhibitory Receptor on Mouse Natural Killer Cells. *J.Exp.Med.* 199:1245-1254.
  12. Davis, S. J. and P. A. van der Merwe. 1996. The structure and ligand interactions of CD2: implications for T-cell function. *Immunol.Today* 17:177-187.
  13. Tangye, S. G., J. H. Phillips, and L. L. Lanier. 2000. The CD2-subset of the Ig superfamily of cell surface molecules: receptor-ligand pairs expressed by NK cells and other immune cells. *Semin.Immunol.* 12:149-157.
  14. Wang, N., M. Morra, C. Wu, C. Gullo, D. Howie, T. Coyle, P. Engel, and C. Terhorst. 2001. CD150 is a member of a family of genes that encode glycoproteins on the surface of hematopoietic cells. *Immunogenetics* 53:382-394.
  15. Sayos, J., M. Martin, A. Chen, M. Simarro, D. Howie, M. Morra, P. Engel, and C. Terhorst. 2001. Cell surface receptors Ly-9 and CD84 recruit the X-linked lymphoproliferative disease gene product SAP. *Blood* 97:3867-3874.
  16. Morra, M., J. Lu, F. Poy, M. Martin, J. Sayos, S. Calpe, C. Gullo, D. Howie, S. Rietdijk, A. Thompson, A. J. Coyle, C. Denny, M. B. Yaffe, P. Engel, M. J. Eck, and C. Terhorst. 2001. Structural basis for the interaction of the free SH2 domain EAT-2 with SLAM receptors in hematopoietic cells. *EMBO J.* 20:5840-5852.
  17. Simarro, M., A. Lanyi, D. Howie, F. Poy, J. Bruggeman, M. Choi, J. Sumegi, M. J. Eck, and C. Terhorst. 2004. SAP increases FynT kinase activity and is required for phosphorylation of SLAM and Ly9. *Int.Immunol.* 16:727-736.

18. Sayos, J., C. Wu, M. Morra, N. Wang, X. Zhang, D. Allen, S. van Schaik, L. Notarangelo, R. Geha, M. G. Roncarolo, H. Oettgen, J. E. De Vries, G. Aversa, and C. Terhorst. 1998. The X-linked lymphoproliferative-disease gene product SAP regulates signals induced through the co-receptor SLAM. *Nature* 395:462-469.
19. Coffey, A. J., R. A. Brooksbank, O. Brandau, T. Oohashi, G. R. Howell, J. M. Bye, A. P. Cahn, J. Durham, P. Heath, P. Wray, R. Pavitt, J. Wilkinson, M. Leversha, E. Huckle, C. J. Shaw-Smith, A. Dunham, S. Rhodes, V. Schuster, G. Porta, L. Yin, P. Serafini, B. Sylla, M. Zollo, B. Franco, D. R. Bentley, and . 1998. Host response to EBV infection in X-linked lymphoproliferative disease results from mutations in an SH2-domain encoding gene. *Nat.Genet.* 20:129-135.
20. Morra, M., D. Howie, M. S. Grande, J. Sayos, N. Wang, C. Wu, P. Engel, and C. Terhorst. 2001. X-linked lymphoproliferative disease: a progressive immunodeficiency. *Annu.Rev.Immunol.* 19:657-682.
21. Del Valle, J. M., P. Engel, and M. Martin. 2003. The cell surface expression of SAP-binding receptor CD229 is regulated via its interaction with clathrin-associated adaptor complex 2 (AP-2). *J.Biol.Chem.* 278:17430-17437.
22. Mavaddat, N., D. W. Mason, P. D. Atkinson, E. J. Evans, R. J. Gilbert, D. I. Stuart, J. A. Fennelly, A. N. Barclay, S. J. Davis, and M. H. Brown. 2000. Signaling lymphocytic activation molecule (CDw150) is homophilic but self-associates with very low affinity. *J.Biol.Chem.* 275:28100-28109.
23. Martin, M., X. Romero, M. A. de la Fuente, V. Tovar, N. Zapater, E. Esplugues, P. Pizcueta, J. Bosch, and P. Engel. 2001. CD84 functions as a homophilic adhesion molecule and enhances IFN-gamma secretion: adhesion is mediated by Ig-like domain 1. *J.Immunol.* 167:3668-3676.
24. Kumaresan, P. R., W. C. Lai, S. S. Chuang, M. Bennett, and P. A. Mathew. 2002. CS1, a novel member of the CD2 family, is homophilic and regulates NK cell function. *Mol.Immunol.* 39:1-8.
25. Flaig, R. M., S. Stark, and C. Watzl. 2004. Cutting Edge: NTB-A Activates NK Cells via Homophilic Interaction. *J.Immunol.* 172:6524-6527.

26. Falco, M., E. Marcenaro, E. Romeo, F. Bellora, D. Marras, F. Vely, G. Ferracci, L. Moretta, A. Moretta, and C. Bottino. 2004. Homophilic interaction of NTBA, a member of the CD2 molecular family: induction of cytotoxicity and cytokine release in human NK cells. *Eur.J.Immunol.* 34:1663-1672.
27. Brown, M. H., K. Boles, P. A. van der Merwe, V. Kumar, P. A. Mathew, and A. N. Barclay. 1998. 2B4, the natural killer and T cell immunoglobulin superfamily surface protein, is a ligand for CD48. *J.Exp.Med.* 188:2083-2090.
28. Das, V., B. Nal, A. Roumier, V. Meas-Yedid, C. Zimmer, J. C. Olivo-Marin, P. Roux, P. Ferrier, A. Dautry-Varsat, and A. Alcover. 2002. Membrane-cytoskeleton interactions during the formation of the immunological synapse and subsequent T-cell activation. *Immunol.Rev.* 189:123-135.
29. Huppa, J. B. and M. M. Davis. 2003. T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nat.Rev.Immunol.* 3:973-983.
30. Roda-Navarro, P., M. Mittelbrunn, M. Ortega, D. Howie, C. Terhorst, F. Sanchez-Madrid, and E. Fernandez-Ruiz. 2004. Dynamic redistribution of the activating 2B4/SAP complex at the cytotoxic NK cell immune synapse. *J.Immunol.* 173:3640-3646.
31. Niedergang, F., A. Hemar, C. R. Hewitt, M. J. Owen, A. Dautry-Varsat, and A. Alcover. 1995. The Staphylococcus aureus enterotoxin B superantigen induces specific T cell receptor down-regulation by increasing its internalization. *J.Biol.Chem.* 270:12839-12845.
32. Romero, X., M. Martin, N. Zapater, V. Tovar, P. Pizcueta, and P. Engel. 2001. Expression of CD150 on human leukocytes. Production and characterization of a new CD150 monoclonal antibody. *Inmunología* 20:57-66.
33. Bottino, C., M. Falco, S. Parolini, E. Marcenaro, R. Augugliaro, S. Sivori, E. Landi, R. Biassoni, L. D. Notarangelo, L. Moretta, and A. Moretta. 2001. NTB-A, a novel SH2D1A-associated surface molecule contributing to the inability of natural killer cells to kill Epstein-Barr virus-infected B cells in X-linked lymphoproliferative disease. *J.Exp.Med.* 194:235-246.

34. Schwede, T., J. Kopp, N. Guex, and M. C. Peitsch. 2003. SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res.* 31:3381-3385.
35. Shindyalov, I. N. and P. E. Bourne. 1998. Protein structure alignment by incremental combinatorial extension (CE) of the optimal path. *Protein Eng* 11:739-747.
36. Wang, J. H., A. Smolyar, K. Tan, J. H. Liu, M. Kim, Z. Y. Sun, G. Wagner, and E. L. Reinherz. 1999. Structure of a heterophilic adhesion complex between the human CD2 and CD58 (LFA-3) counterreceptors. *Cell* 97:791-803.
37. Kim, M., Z. Y. Sun, O. Byron, G. Campbell, G. Wagner, J. Wang, and E. L. Reinherz. 2001. Molecular dissection of the CD2-CD58 counter-receptor interface identifies CD2 Tyr86 and CD58 Lys34 residues as the functional "hot spot". *J.Mol.Biol.* 312:711-720.
38. van der Merwe, P. A. and S. J. Davis. 2003. Molecular interactions mediating T cell antigen recognition. *Annu.Rev.Immunol.* 21:659-684.
39. Wang, S., G. Zhu, K. Tamada, L. Chen, and J. Bajorath. 2002. Ligand binding sites of inducible costimulator and high avidity mutants with improved function. *J.Exp.Med.* 195:1033-1041.
40. Zhu, B., E. A. Davies, P. A. van der Merwe, T. Calvert, and D. E. Leckband. 2002. Direct measurements of heterotypic adhesion between the cell surface proteins CD2 and CD48. *Biochemistry* 41:12163-12170.
41. Davis, S. J., S. Ikemizu, E. J. Evans, L. Fugger, T. R. Bakker, and P. A. van der Merwe. 2003. The nature of molecular recognition by T cells. *Nat.Immunol.* 4:217-224.
42. Kupfer, A. and H. Kupfer. 2003. Imaging immune cell interactions and functions: SMACs and the Immunological Synapse. *Semin.Immunol.* 15:295-300.
43. Wild, M. K., A. Cambiaggi, M. H. Brown, E. A. Davies, H. Ohno, T. Saito, and P. A. van der Merwe. 1999. Dependence of T cell antigen recognition on the dimensions of an accessory receptor-ligand complex. *J.Exp.Med.* 190:31-41.

44. Martin, M., del Valle, J., Saborit, I., and P. Engel. 2005. Identification of Grb2 as a novel binding partner of the SAP-binding receptor CD229. *J.Immunol.* (in press)
45. Mills, D. M., and J. C. Cambier. 2003. B lymphocyte activation during cognate interactions with CD4+ T lymphocytes: molecular dynamics and immunologic consequences. *Semin Immunol.* 5:325-329.
46. Crotty, S., Kersh, E. N., Cannons, J., Schwartzberg, P. L., and R. Ahmed. 2003. SAP is required for generating long-term humoral immunity. *Nature* 42:282-287.
47. Chtanova, T., Tangye, S. G., Newton, R., Frank, N., Hodge, M. R., Rolph, M. S., and C. R. Mackay. 2004. T follicular helper cells express a distinctive transcriptional profile, reflecting their role as non-Th1/Th2 effector cells that provide help for B cells. *J.Immunol.* 173:68-78.

***Footnotes:***

<sup>1</sup> This work was supported by a grant from the Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain (SAF2003-00564) and Marató (2000-TV4410).

<sup>2</sup> Address correspondence and print requests to Pablo Engel. Unidad de Inmunología, Departamento de Biología Celular y Anatomía Patológica, Facultad de Medicina, C/ Casanova 143, Barcelona 08036, Spain; Phone: (+34) 93 403 5267 ; Fax: (+34) 93 402 19 07; e-mail: pengel@ub.edu

## Figure Legends

**FIGURE 1.** CD229 exhibits homotypic binding. COS-7 cells transfected with human CD229, CD2, CD48, NTB-A, CD58, CD244, CD84 and CD150 cDNA were labeled with CD229-Ig or CD244-Ig fusion proteins. Protein expression was detected using specific Abs (first column). Transfected cells were assayed for binding of CD229-Ig or CD244-Ig (second and third column). Immunostaining controls: isotype controls (first column) and Ctl-Ig (murine CD84-Ig; second and third column) are represented with dotted lines. The percentage of positive cells is indicated in each histogram.

**FIGURE 2.** Human and murine CD229 receptors interact homophilically. A) COS-7 cells transfected with full-length murine CD84 (upper panel) or full-length human CD84 (lower panel) were labeled with specific antibodies mCD84.7 and CD84.1.21 (First column). Human CD84-Ig (hCD84-Ig) or murine CD84-Ig (mCD84-Ig) binding was assayed (second and third columns). B) COS-7 cells transfected with full-length murine CD229 (upper panel) or the full-length human CD229 (lower panel) were labeled with specific antibodies Ly9ab3 and HLy9.1.25 (First column). Human CD229-Ig (hCD229-Ig) or murine CD229-Ig (mCD229-Ig) binding was assayed (second and third columns). Immunostaining controls: isotype controls (first column) and Ctl-Ig (CD244-Ig; second and third columns) are represented with dotted lines. The percentage of positive cells is indicated in each histogram.

**FIGURE 3.** Homophilic binding of CD229 is mediated by the first extracellular domain. COS-7 cells transiently transfected with cDNA encoding full-length CD229 (upper panel) or the thymus CD229 isoform that lacks the first Ig domain (CD229  $\Delta$ D1), which contains DII/DIII and DIV (lower panel), were stained with HLy9.1.25 or HLy9.1.84 (right column).

CD229-Ig binding (left column). Immunostaining controls: isotype controls (first column) and Ctl-Ig (murine CD84-Ig; second column) are represented with dotted lines.

**FIGURE 4.** Identification of residues involved in homophilic interaction of CD229. **A)** COS-7 cells transiently transfected with full-length CD229, E29A or R44A cDNA were stained with HLy9.1.25 mAb followed by Cy3-conjugated anti-mouse Ig (upper panel). The transfected cells were assayed with CD229-Ig followed by biotinylated antihuman Fc antibody and avidin-Cy3 (lower panel). **B)** COS-7 cells transiently transfected with full-length CD229, E27A, E29A, R89A cDNAs were stained with HLy9.1.25, HLy9.1.38, HLy9.1.77 mAbs followed by biotinylated anti  $\kappa$  and streptavidine PE. Mean fluorescence intensities are shown.

**FIGURE 5.** CD229 localizes to the immune synapse. **A)** Jurkat-Raji conjugates incubated for 10 min in the presence or absence of SEE were allowed to adhere to poly-L-lysine, fixed, and stained (red) for CD3, CD45, LFA-1 and CD229. Phase contrast images merged with green fluorescence from CMFDA-loaded Raji cells are shown. **B)** Jurkat-Raji conjugates incubated for 10 min in the presence of SEE and double stained for CD229 (red) and CD3 or CD45 (green). Phase contrast images merged with blue fluorescence from CMAC-loaded Raji cells are shown.

**FIGURE 6.** CD229 relocalization is affected by the presence of CD229 on APCs. Quantification of CD229 and CD3 relocalization to the T-B contact area of Jurkat-Raji or Jurkat-Raji CD229<sup>-</sup> conjugates in presence or absence of SEE. More than 100 contacts were analyzed in three independent experiments. Histograms bars represent the arithmetic mean  $\pm$



SD. \*P<0.05 compared with Jurkat-Raji with Jurkat-Raji CD229<sup>-</sup> conjugates no treated with SEE. \*\*P<0.05 compared with Jurkat-Raji with Jurkat-Raji CD229<sup>-</sup> conjugates treated with SEE.

**FIGURE 7.** Molecular model of the N-terminal IgV set domain of human CD229. Ribbon diagram of the N-terminal domain of CD229 showing the predicted homophilic interface. The beta-strands GFCC'C'' are labeled according to the standard convention. The face GFCC'C'' is gold and the ABED face is gray. The mutated amino acids that strongly modify the interaction are indicated on the model according to the one letter amino acid code. Substituted amino acids that abolish adhesion are labeled in white, whereas residue 44, which strongly enhances adhesion, is labeled in light blue. Negatively charged atoms are labeled in red and positively charged atoms are labeled in blue.

Table 1. CD229 primers for site-directed mutagenesis.

Mutation	Sense primer (5'...3')	Antisense primer (5'...3')
HLy9 wt	gctagcatgagtcagctgcaaatattctct	gcagcagctgcttttccttcaggtgaa
D25A	ctcagtagccacagagattg	tcaatctctgtggctactga
E27A	gtatacacagcgattgagaac	gttctcaatcgctgtgtctac
E29A	cacagagattgcgaacgtcat	atgacgttcgcaatctctgtg
K37A	gattggtcccgcaaatgctct	agagcatttcgaggaccaatc
R44A	tcgagctcccaaagaaaatg	catttctttgggagctgcga
K46A	cgccccgagaaaatgtaacc	ggtttacatttctgcgggacg
E47A	cgtcccaaagcaaatgtaacc	ggttacatttgctttgggacg
R89A	gccagataaaccaagcgaatt	aatcgcttggttatctgggc

Table 2. Mapping the interaction domain of CD229 mAbs<sup>a</sup>

	CD229 h DI/DII m DIII/DIV	CD229 h DI/DIII/DIV m DII	CD229 Δ DI	mAb interaction domain <sup>b</sup>	
	HLy9.1.25	+	+	-	DI
mAbs	HLy9.1.38	+	+	-	DI
	HLy9.1.77	+	+	-	DI
	HLy9.1.84	+	-	+	DII

<sup>a</sup> COS cells were transiently transfected with chimeric human (h) /mouse (m) constructs or the isoform lacking the first V-like Ig domain (CD229 ΔDI) described on the materials and methods. CD229 mAbs were assayed by flow cytometry: +; detection of protein expression, -; Non detection of protein expression .

<sup>b</sup> Domain which is recognized by the mAb.

Table 3. Ability of test mAbs to block the binding of labeled mAbs to CD229-300.19 cells<sup>a</sup>

Test mAbs	Labeled mAbs			
	HLy9.1.25	HLy9.1.38	HLy9.1.77	HLy9.1.84
HLy9.1.25	+++	++	-	-
HLy9.1.38	+++	+++	-	-
HLy9.1.77	-	+	+++	-
HLy9.1.84	-	-	-	+++

<sup>a</sup> Symbols represent the relative ability of test mAbs to block the binding of the indicated labeled mAbs to CD229-300.19 cells. Symbols indicate the percentage decrease in the number of fluorescence-positive cells: -, < 20% of positive cells; +, 20-50 % of positive cells; ++, 50-80 % of positive cells; +++, > 80% of positive cells

Table 4. Site directed mutagenesis dissection of the homophilic adhesion.

CD229 <sup>a</sup>	Location first Ig-like domain <sup>b</sup>	Relative CD229 expression <sup>c</sup>	% Binding <sup>d</sup>
Wild type		1.0	100
D25A	BC loop	1.7	96
E27A	BC loop	0.9	<b>21</b>
E29A	BC loop	1.5	<b>4</b>
K37A	CC' loop	1.1	73
R44A	C'C'' loop	1.47	<b>204</b>
K46A	C''	0.7	51
E47A	C''	0.99	69
R89A	FG loop	0.95	<b>0</b>

<sup>a</sup> COS cells transiently transfected with Wild type CD229 and mutants CD229 cDNAs.

<sup>b</sup> Strand assignment based upon the model of CD229 described on materials and methods.

<sup>c</sup> Expression of wild type and mutants CD229 proteins labeled with HLY91.25 mAb were measured by flow cytometry. Fluorescence intensity of wild type or mutants CD229 vs wild type CD229 are shown.

<sup>d</sup> Positive cells of wild type and mutants CD229 proteins assayed with CD229-Ig were measured by flow cytometry. % of positive cells of wild type or mutants CD229 vs wild type CD229 are shown.

Table 5. Frequency of relocation at the Raji-Jurkat IS<sup>a</sup>

Conjugates	- SEE	+ SEE
CD3	1.1 ± 1.1	47.4 ± 7.2
CD45	8 ± 2.8	9.1 ± 0.4
CD229	13.2 ± 1.0	38.0 ± 1.8

<sup>a</sup> Quantification (%) of cell conjugates in which CD3, CD45 and CD229 were relocated at the T cell-APC contact area in the presence or absence of SEE. At least 100 conjugates from three independent experiments were analyzed. Results correspond to the arithmetic mean ± SD.

Table 6. Fold induction of fluorescence intensity at the IS<sup>a</sup>

	CD229 (n = 10)	CD3 (n = 5)	CD45 (n = 5)
IS vs T cell	4.2 ± 2.0	13.1 ± 4.6	0.9 ± 0.2
IS vs APC	6.4 ± 3.0		0.9 ± 0.3

<sup>a</sup> Fluorescence intensity in the IS with respect to the rest of the T cell or APC membrane fluorescence. (n) was the number of T cell-APC contacts analyzed from two different experiments. The arithmetic mean ± SD are shown.

Fig. 1

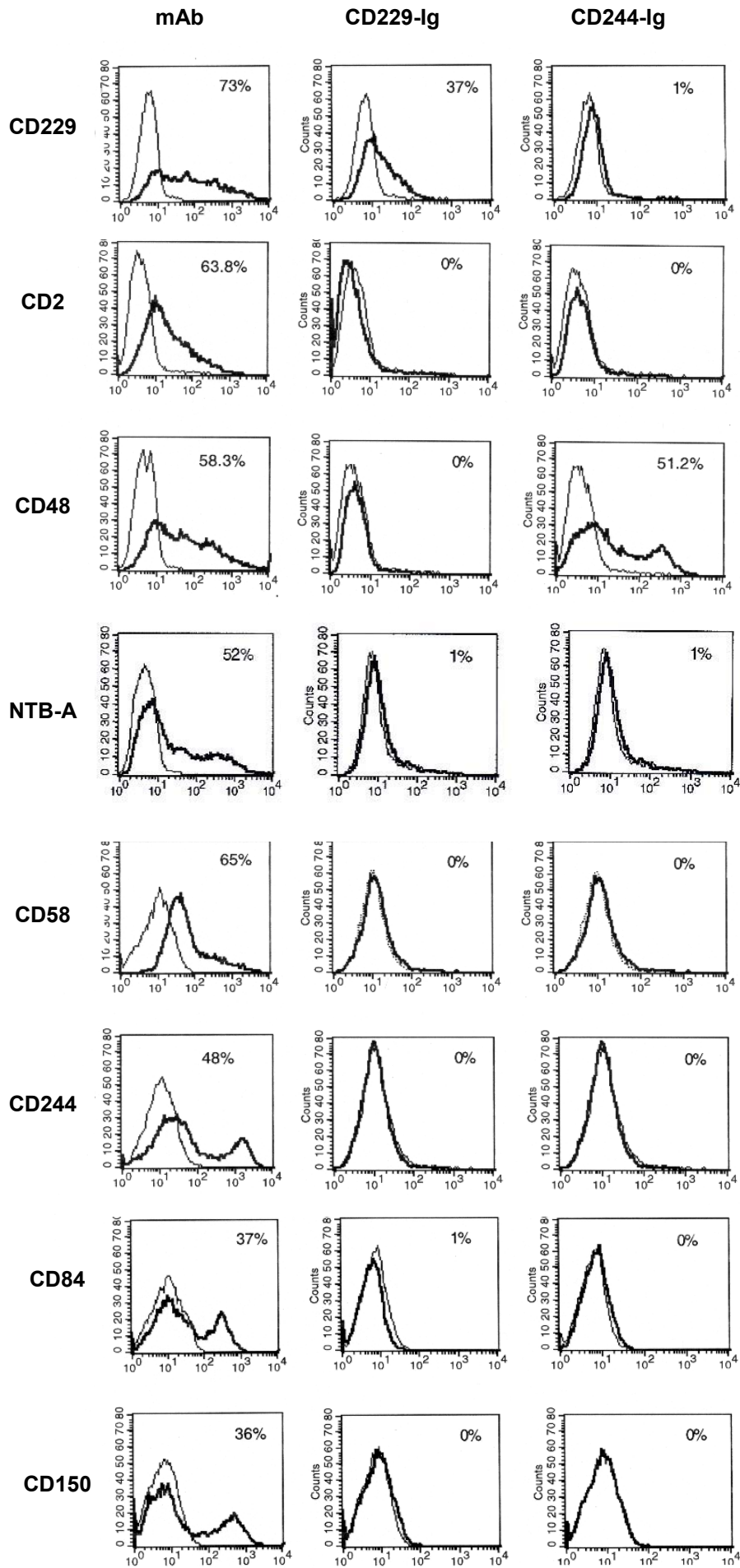


Fig. 2

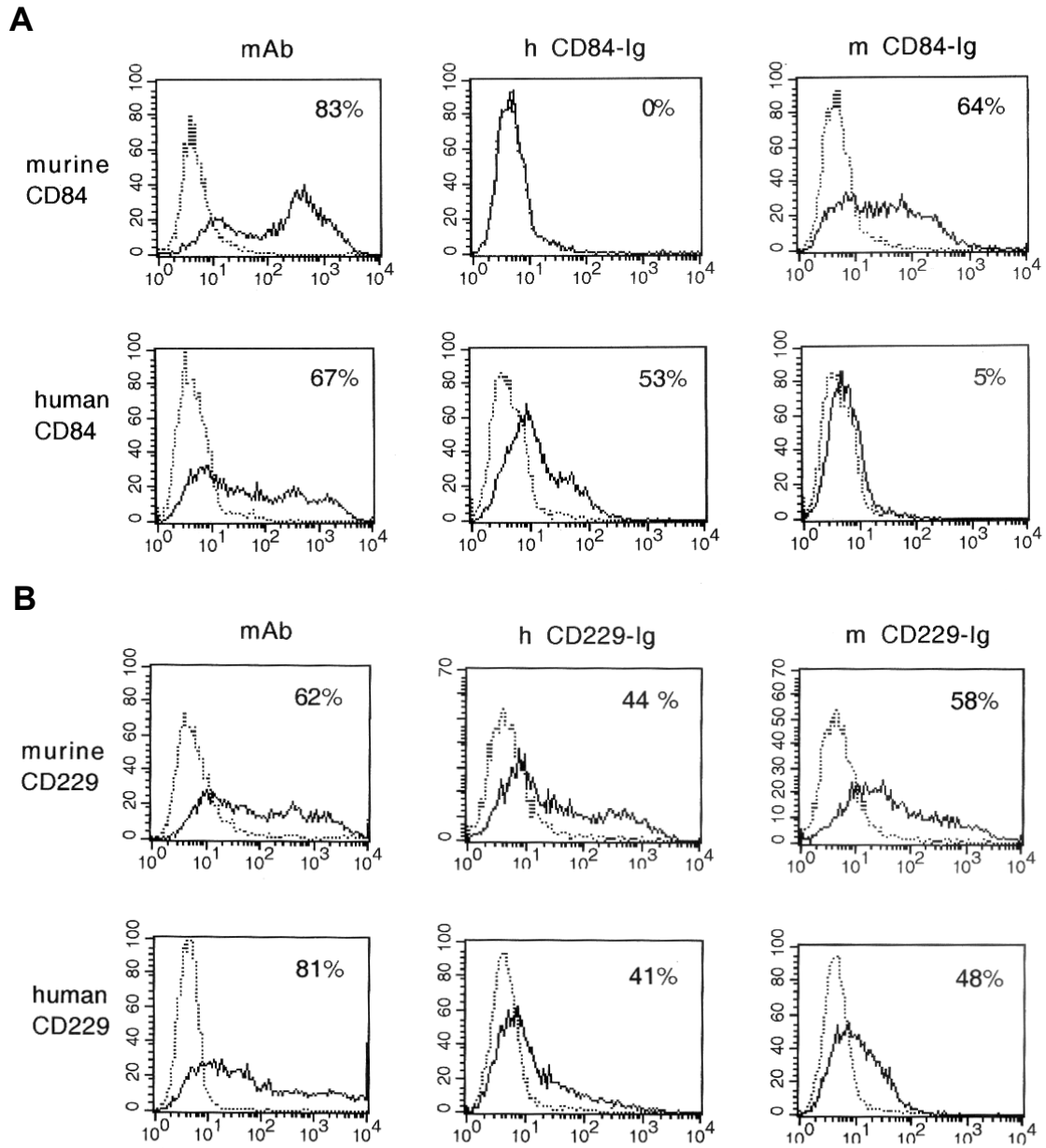




Fig. 3

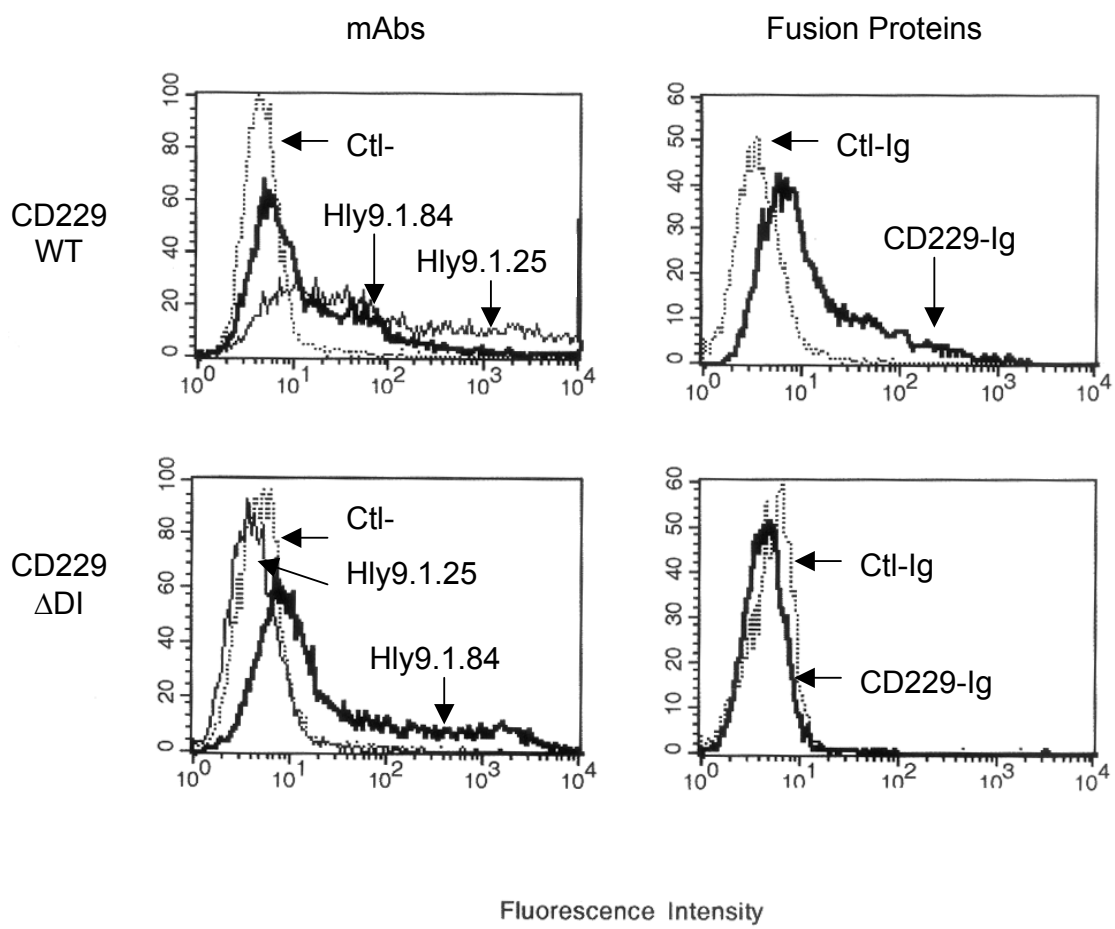
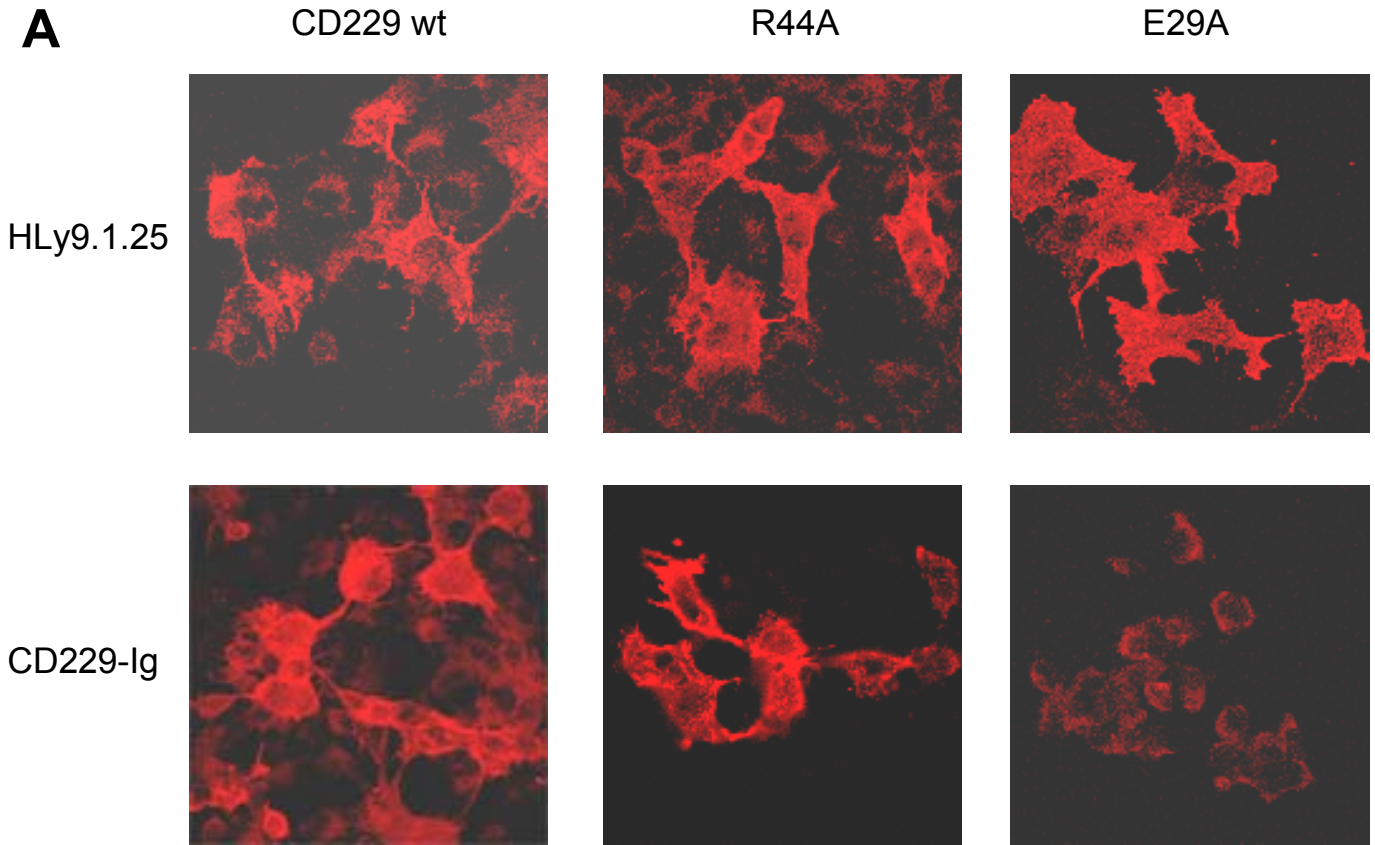


Fig 4



**B**

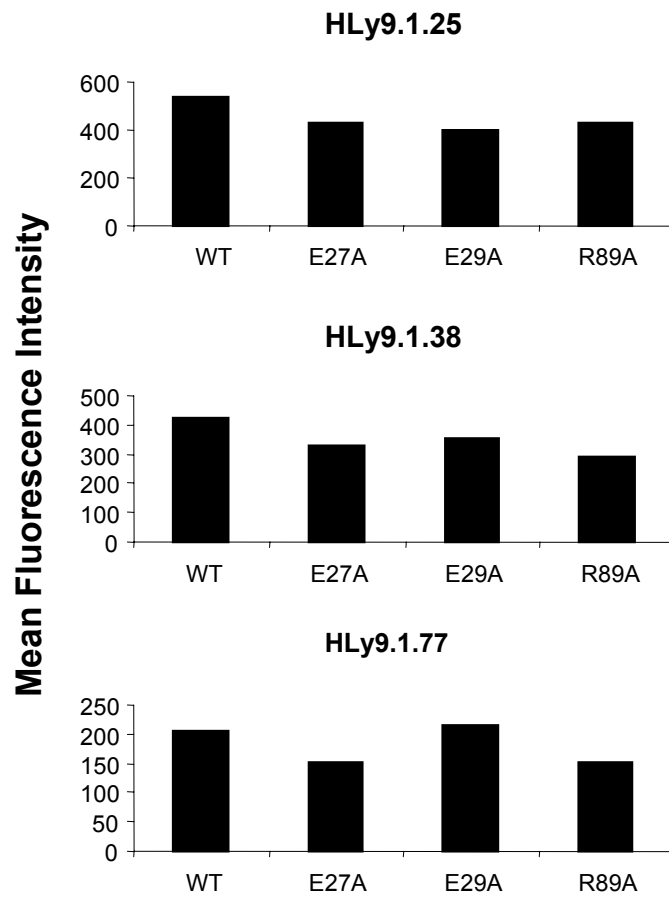


Fig 5A

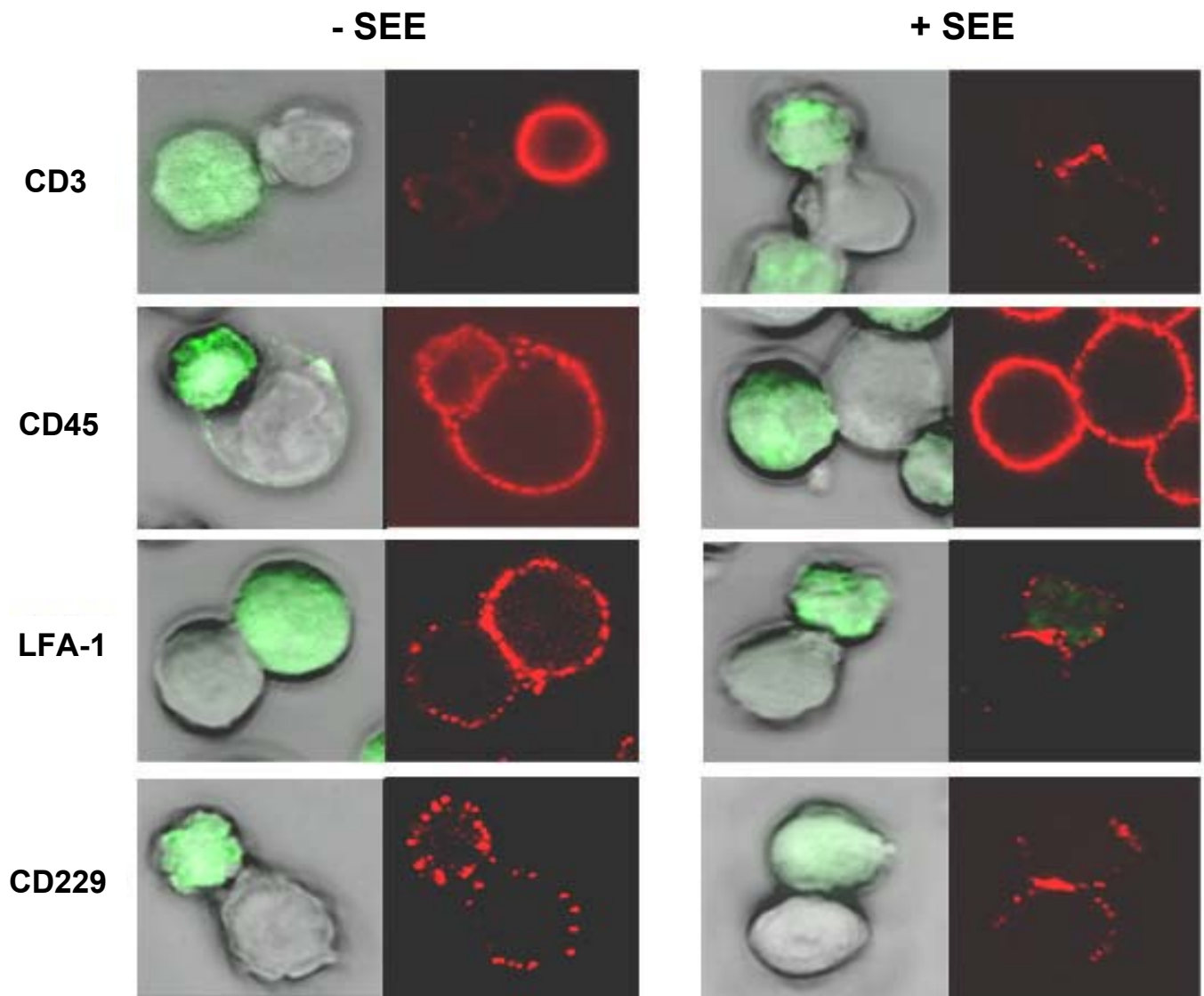


Fig 5B

**B**

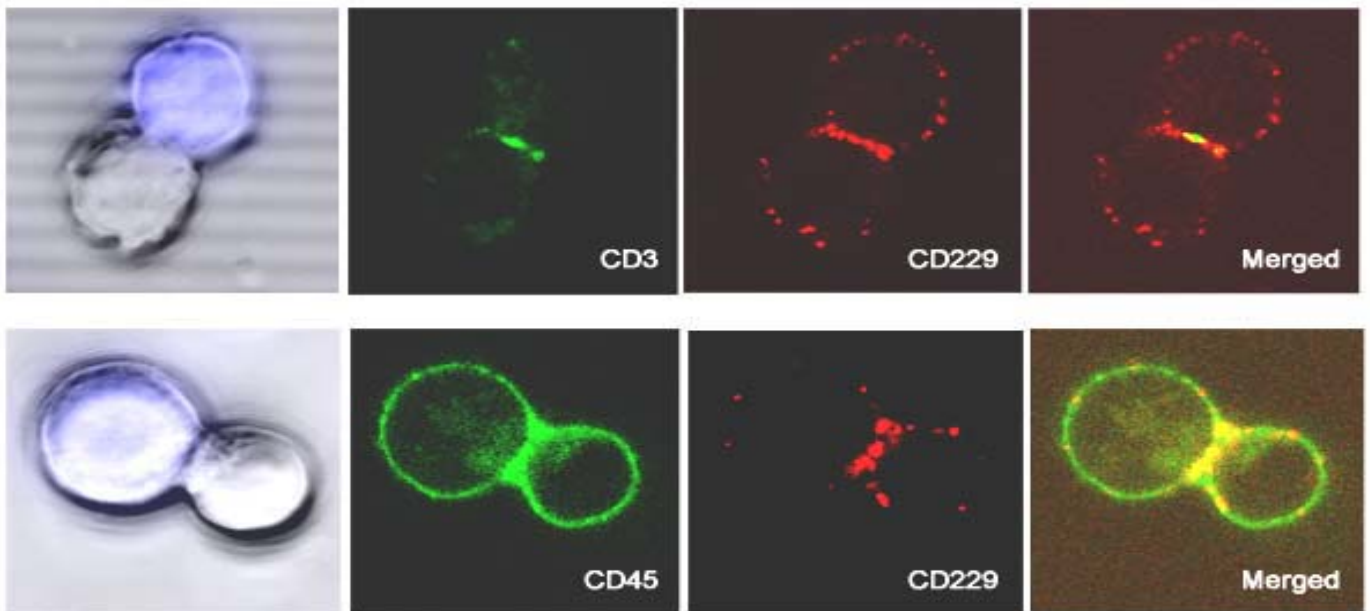


Fig 6

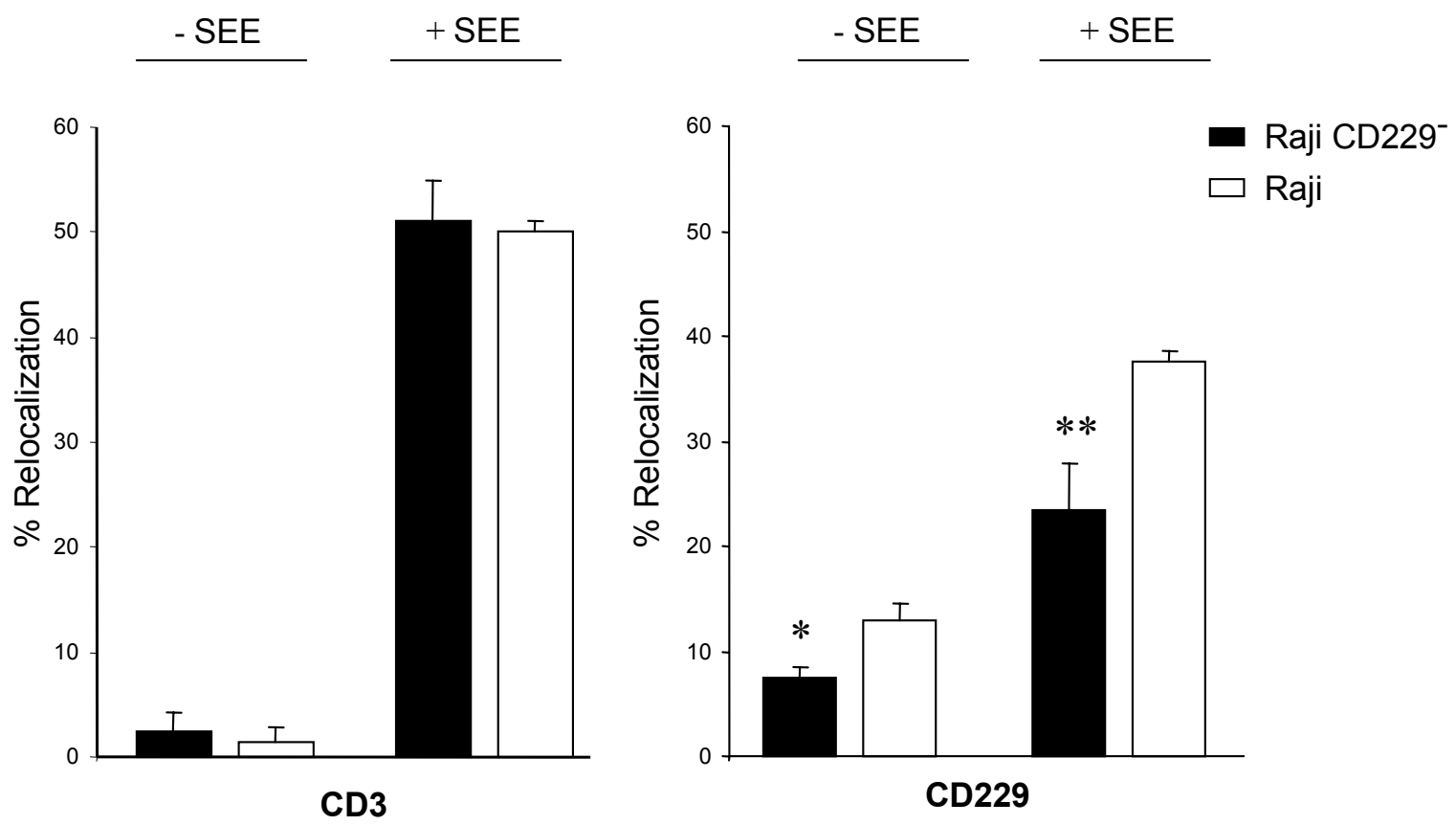
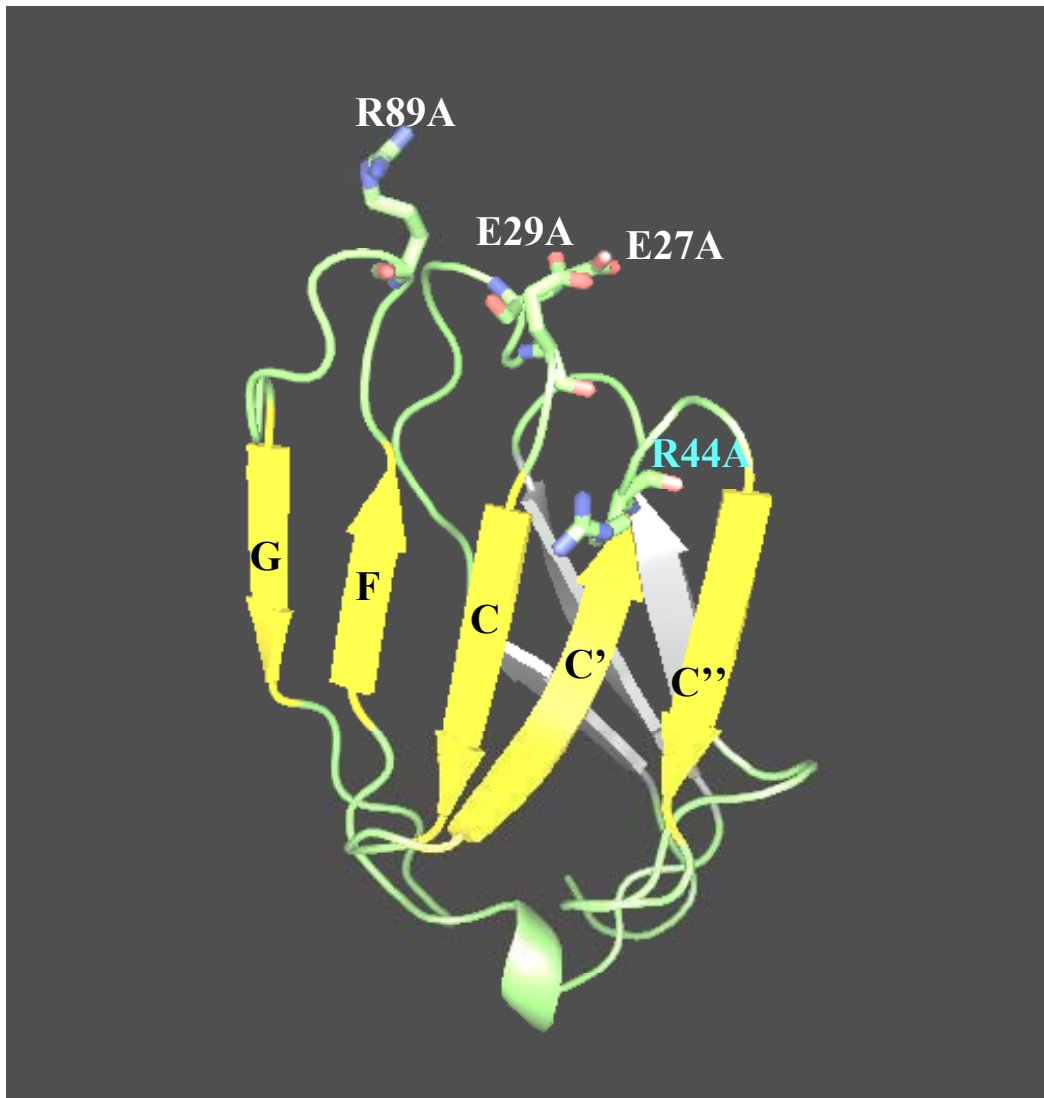


Fig 7





### **3.3 Article n°3**

**Differential expression of SAP and EAT-2 binding leukocyte cell-surface molecules CD84, CD150 (SLAM), CD229 (Ly9) and CD244 (2B4)..**

X. Romero, D. Benitez, S. March, R. Vilella, M. Miralpeix, P. Engel.

Tissue Antigen (2004): 64132-144



### Resum de l'article n°3

La família del CD150 es troba constituïda per nou proteïnes expressades en la superfície dels leucòcits implicades en l'activació dels limfòcits i que pertanyen a la superfamília de les immunoglobulines. Els receptors CD84, CD150 (SLAM), CD229 (Ly9), CD244 (2B4), NTB-A i CS1 s'associen amb els adaptadors SAP (*SLAM-associated protein*) i EAT-2. L'adaptador SAP és una proteïna intracel·lular que es troba mutada en malalts amb el síndrome d'immunodeficiència lligat al cromosoma X (XLP).

En aquest estudi s'ha analitzat l'expressió de CD84, CD150, CD229 i CD244 en diferents leucòcits i poblacions limfocitàries mitjançant citometria de fluxe. El CD84 i el CD150 estaven presents en timòcits, cèl·lules T madures i cèl·lules presentadores d'antigen. L'expressió de CD84 i CD150 era elevada en cèl·lules T memòria. L'expressió de CD150 s'incrementava molt després de l'activació. Al contrari que el CD84, el CD150 es trobava absent en monòcits en repòs i en cèl·lules dendrítiques immadures. El CD229 presentava un patró d'expressió restringit a limfòcits. El CD244 s'expressava de forma preferencial en cèl·lules NK, limfòcits CD8+ efectors, monòcits en repòs, basòfils i eosinòfils. Nosaltres hem descrit una distribució de CD84, CD150, CD229 i CD244 més àmplia que la prèviament descrita i hem demostrat que aquestes molècules s'expressen de forma diferencial en les cèl·lules hematopoietiques. L'expressió heterogènea d'aquests receptors indica que deuen tenir funcions no redundants en la regulació tant del sistema immune adaptatiu com de l'innat.

X. Romero  
D. Benítez  
S. March  
R. Vilella  
M. Miralpeix  
P. Engel

## Differential expression of SAP and EAT-2-binding leukocyte cell-surface molecules CD84, CD150 (SLAM), CD229 (Ly9) and CD244 (2B4)

### Key words:

CD150; co-stimulatory molecules; immunoglobulin superfamily; leukocyte cell-surface molecules

### Acknowledgments:

This study was supported by a grant from the Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología SAF00-0037 and Marató 2000-TV4410. X.R. is a fellow of the Programa de Formació en la Recerca i la Docència, Universitat de Barcelona. We thank Dr Butterfield (Mayo Clinic, Rochester, MN, USA) for providing us with mast cells line HMC-1.

**Abstract:** The CD150 (SLAM) family consists of nine leukocyte cell-surface proteins involved in lymphocyte activation that belong to the immunoglobulin (Ig) superfamily. Six members of this family – CD84, CD150 (SLAM), CD229 (Ly9), CD244 (2B4), NTB-A, and CS1 – associate with adapter proteins – SLAM-associated protein (SAP) and EAT-2. SAP is a short intracellular molecule that is mutated in humans with X-linked lymphoproliferative disease. Flow cytometric analysis of the expression of CD84, CD150, CD229, and CD244 cell-surface receptors on several leukocyte and lymphocyte subsets was performed. CD84 and CD150 were present on thymocytes, mature T cells and antigen-presenting cells. The expression of CD84 and CD150 was high on memory T cells. CD150 expression was strongly up-regulated after cell activation. In contrast to CD84, CD150 was absent on resting monocytes and immature dendritic cells (DCs). CD229 presented a pattern of expression restricted to lymphocytes. CD244 was preferentially expressed on natural killer cells, CD8<sup>+</sup> effector cells, resting monocytes, basophils, and eosinophils. We describe a broader distribution of CD84, CD150, CD229, and CD244 than previously reported and show that they are differentially expressed on hematopoietic cells. The heterogeneous expression of these receptors indicates that these molecules may play non-redundant functions in the regulation of both innate and adaptive immune responses.

### Authors' affiliation:

X. Romero<sup>1</sup>,  
D. Benítez<sup>2</sup>,  
S. March<sup>1</sup>,  
R. Vilella<sup>2</sup>,  
M. Miralpeix<sup>3</sup>,  
P. Engel<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Cellular Biology and Pathology, Immunology Unit, Medical School, University of Barcelona and Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Barcelona, Spain.

<sup>2</sup>Servei d'Immunologia, Hospital Clínic and Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Barcelona, Spain.

<sup>3</sup>Almirall Prodesfarma S.A., Research Center, Barcelona, Spain

### Correspondence to:

Dr Pablo Engel  
Facultad de Medicina  
Departamento de Biología  
Celular y Anatomía Patológica  
Unidad de Inmunología  
C/Casanova 143  
08036 Barcelona, Spain  
Fax: +34 345 15272  
e-mail: engel@medicina.ub.es

Immune responses are orchestrated by dynamic interactions between molecules on the membrane of various types of leukocytes. Some of these molecules modulate leukocyte responses by strengthening cell–cell interaction and inducing intracellular signals. Positive and negative signaling by these molecules determines numerous cell functions including activation, differentiation, proliferation, and acquisition of effector functions and/or tolerance induction (1).

The CD150 (SLAM) family of cell-surface receptors consists of nine members of the immunoglobulin (Ig) superfamily – CD48, CD84, CD150 (SLAM), CD229 (Ly9), CD244 (2B4), BLAME, CS1, NTB-A, and CD84-H1 (2–4). An N-terminal V-like Ig domain without disulfide bonds and a C-terminal truncated C2-like Ig domain with two putative disulfide bonds characterize this small group of cell-surface

Received 26 September 2003, revised 20 February 2004, accepted for publication 24 February 2004

Copyright © Blackwell Munksgaard 2004  
doi: 10.1111/j.1399-0039.2004.00247.x

Tissue Antigens 2004; 64: 132–144  
Printed in Denmark. All rights reserved

molecules. The exception is CD229, which is constituted by a tandem repeat of two V-C2 set domains (5). Because of the structural similarity of their extracellular domains, most of these cell-surface molecules were originally described as members of the CD2 family (6). However, their sequence homology and chromosomal localization are quite different from CD2. The genes of the CD150 family are located in close proximity in both mouse (93.3cM) and human (1q23) genomes (7). The cytoplasmic domains of CD84, CD150, CD229, CD244, NTB-A, and CS1 contain multiple copies of the tyrosine-based motif (T-I/V-Y-x-x-V/I) (4). This unique motif is a docking site for the adapter molecule SLAM-associated protein (SAP) and EAT-2. SAP and EAT-2 are single SH2-domain proteins with a short carboxyl-terminal region, which block the recruitment of signal transduction molecules; for example, the tyrosine phosphatase SHP-2 to the cytoplasmic tail of these receptors (4). However, a recent report demonstrates that SAP also functions as an adapter molecule by increasing the recruitment and activation of protein tyrosine kinase Fyn to the cytoplasmic tail of CD150 (SLAM) (8). The SAP SH2 domain binds to the SH3 domain of Fyn, which mediates its association with CD150 (9, 10). Significantly, the *SH2D1A* gene that encodes the SAP is deleted or mutated in patients with X-linked lymphoproliferative disease (XLP) (11–13). This unusual immunodeficiency is characterized by an uncontrolled polyclonal expansion of both T and B cells after Epstein–Barr virus (EBV) infection that results often in fatal mononucleosis. Some other clinical manifestations of this disease include B cell lymphoma and dys-gammaglobulinemia (14, 15). Significantly, a recent report has demonstrated that SAP expression on CD4<sup>+</sup> T cell is required to drive the production of memory B cells and long-lived plasma cells, indicating the role of SAP in the humoral response (16). The lethal immunodeficiency observed in XLP patients points to a critical role of the CD150 family of SAP-binding cell-surface receptors in the regulation of the immune system.

Another common feature of these cell-surface molecules is that they interact with members of the same family. CD244 (2B4) is a high-affinity receptor for CD48 (17). CD150 binds homophilically (18) and is the primary receptor for the measles virus (MV) (19). Recently, CD84 and CS1 have also been shown to function as self-ligands (20, 21).

CD150 and CD84 monoclonal antibodies promote human T-cell activation and induce interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) secretion (20, 22). CD244 ligation on human natural killer (NK) results in cell adhesion, increased cytotoxicity, and cytokine secretion (23, 24). CD229 function is unknown, although preliminary data implicate that this molecule is also involved in T-cell activation (Martin and Engel, unpublished observation).

Despite all the studies mentioned above, a comprehensive characterization of the expression these cell-surface molecules has not been previously performed. In this study, we analyze the expression of these cell-surface receptors on several hematopoietic cell types.

## Materials and methods

### Antibodies and reagents

The following monoclonal antibodies were produced in our laboratory—CD84 (clone CD84.1.21) (20), CD229 (clone HLy9.1.84) (25), and CD150 (clone SLAM.4) (26). These monoclonal antibodies were purified with a protein A column (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) from concentrated supernatant obtained from the culture of the hybridomas in INTEGRA CL 350 flasks (Integra Biosciences AG, Switzerland). Purified monoclonal antibodies were biotinylated using Biotinamidocaproate N-hydroxysuccinimide ester (Sigma, St Louis, MO, USA). CD11a-phycoerythrin (PE), CD80-PE, CD83-PE, CD86-PE, and C1.7-PE that recognize human CD244 were obtained from Immunotech (Marseille, France). The following monoclonal antibodies were obtained from Becton Dickinson Pharmingen (San Diego, CA, USA) – antihuman CD3-APC, CD3-FITC, CD4-FITC, CD8-PerCP, CD8-APC, CD8-CyChrome, CD19-FITC, CD19-PerCP, CD19-APC, CD45-FITC, CD45RO-FITC, CD45RA-FITC, CCR7-CyChrome, CD16-CyChrome, CD56-FITC, CD14-FITC, CD69-FITC, CD25-PE, CD25-APC, CD27-FITC, IgD-FITC, CD38-PE, HLA-DR-FITC, CD40-PE, CD11c-FITC, and mouse anti-TNP. Streptavidin-PE was purchased from Southern Biotechnology Associates (Birmingham, AL, USA). Streptavidin-CyChrome was purchased from Pharmingen. The monoclonal antibody antihuman CD3 (clone33-2A3) was from R. Vilella (Hospital Clinic, Barcelona, Spain).

### Cells and cell lines

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by Ficoll density gradient centrifugation from buffy coats obtained from healthy donors. Thymocytes were isolated as previously described (27). Briefly, thymi were obtained from children (aged 3–7 years) who underwent cardiac surgery. None of them presented a history of immunological disease. Tonsils were obtained from patients undergoing tonsillectomy for breathing disorders. Lymphocyte suspensions were prepared by teasing the tissue in RPMI 1640 medium (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA) with 10% fetal calf serum (FCS) (Gibco-BRL). The suspension was passed through silkscreen to remove any connective tissue. Finally, lymphocytes were isolated by Ficoll density gradient centrifugation from the tonsil suspension. All tissues were stored in RPMI 1640 (Gibco-BRL) medium at 4°C until processing. Typically, the tissues were processed within 1–3 h of surgical removal.

Cell lines – Jurkat, Daudi, HL-60, U937, K562, HSB2, JM-1, YT, CESS, Namalwa, RPMI 8226, and Raji – were from the American

Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). BEN cell line was obtained by the transformation of peripheral blood leukocytes with EBV. Cell lines were cultured in complete medium (RPMI 1640 supplemented with 10% FCS, antibiotics, and 10 mmol/l glutamine) (Gibco-BRL) and were split twice weekly at a ratio that allowed maintenance of cell concentration below  $10^6$  cells/ml. HMC-1 line was obtained from J.H. Butterfield (Mayo Clinic, Rochester, MN, USA). HMC-1 line was cultured in Iscove's medium (25 mM Hepes, Sodium Carbonate, with  $\beta$ -mercaptoethanol) (Gibco-BRL) supplemented with 10% FCS, antibiotics, 10 mM L-glutamine, and 1.2 mM  $\alpha$ -D-glucopyranoside from Sigma (Sigma).

Human cells and tissues were obtained in accordance with protocols approved by the Ethics Committee of the Hospital Clínic of Barcelona (Barcelona, Spain) and according to the principles of the Declaration of Helsinki.

### **In vitro cell stimulation**

PBMCs were activated under various conditions – 1 ng/ml phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Sigma), soluble anti-CD3 (clone 332A3) at 1/50,000 dilution, 1% (v/v) of phytohemagglutinin (PHA) (Murex Biotech Limited, Dartford, England), 2  $\mu$ g/ml of lipopolysaccharide (LPS) (*Escherichia coli* Serotype 011:B4) (Sigma) and 10 ng/ml of tumor necrosis factor- $\gamma$  (TNF- $\gamma$ ) (Sigma) for 72 h at concentrations of  $2 \times 10^6$  cells/ml in RPMI 10% FCS. Lymphocytes from tonsils were activated with 0.1 ng/ml phorbol 12-myristate 13-acetate (Sigma) and 1% (v/v) Prot A-Sepharose (Biorad, Hercules, CA, USA) for 72 h at concentrations of  $2 \times 10^6$  cells/ml in RPMI 10% FCS.

### **Dendritic cells**

Aliquots of  $50 \times 10^6$  PBMCs were incubated for 2 h at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> in a 25 cm<sup>2</sup> (Nunc) (Nunc, Denmark) in RPMI 1640 medium (Gibco-BRL). After a wash, the adherent monocytes were cultured in the presence of 500 U/ml of IL-4 (Sigma) and 1000 U/ml of GM-CSF (Leucomax, Novartis, Switzerland) in RPMI 1640 medium with 10% FCS (Gibco-BRL) at 37°C in humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. After 3 days of culture, the cytokines were renewed. At day 6, a cocktail of defined, maturative recombinant cytokines was added to the culture: 10 ng/ml of IL-1 (Sigma), 1000 U/ml of IL-6 (Sigma), 10 ng/ml of TNF- $\alpha$  (Sigma) and 1  $\mu$ g/ml of PGE-2 (Sigma), and cultured for 2 days. Purity of the mature and immature DC was typically greater than 95% as determined by flow cytometry using CD1a-PE, CD80-PE, CD83-PE, CD86-PE, CD14-FITC, HLA-DR-FITC, CD40-PE, and CD11c-FITC monoclonal antibodies.

### **Mast cells**

Human mast cells were differentiated *in vitro* from CD34<sup>+</sup> progenitor cells obtained from peripheral blood of granulocyte-colony stimulating factor-treated adult healthy subjects (Hospital Provincial de Barcelona, Barcelona, Spain) essentially as described in (28). Purified CD34<sup>+</sup> cells (>98%) were seeded at density of  $0.2\text{--}0.5 \times 10^6$  cells/ml and were maintained in  $\alpha$ -MEM medium (Gibco-BRL) supplemented with 15% FCS (Gibco-BRL) 2 mM L-glutamine; 100 IU/ml penicillin, streptomycin and gentamicin; 10 mM HEPES; 50  $\mu$ M 2-ME; 100 ng/ml SCF (rhSCF, Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA) and 50 ng/ml IL-6 (rhIL-6, Peprotech). Half of the cell culture medium was changed weekly, and adherent cells were discarded weekly by transfer of non-adherent cell to fresh culture flasks. Cells were cultured for at least 8 weeks. The purity of mast cells was greater than 99%, as determined using Giemsa stain, tryptase (antihuman tryptase, Chemicon Int., Temecula, CA, USA) and cell-surface Fc $\epsilon$ RI (anti-human Fc $\epsilon$ RI, Upstate Biotechnology, NY, USA) immunostaining.

### **Immunofluorescence analysis**

Leukocytes and cell lines were stained using directly labeled antibodies in conjunction with biotinylated CD84, CD150, CD229 antibodies plus streptavidin-PE. CD244 expression was performed using C1.7-directed labeled with PE. Fluorescence was analyzed using a FACSCalibur (Becton Dickinson, Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA) equipped with the CellQuest<sup>TM</sup> software. Fluorescence intensity was analyzed on a 4-decade log scale (1–10,000). A minimum of 10,000 cells were analyzed for each sample. The negative control was set at 5 mean fluorescence intensity (MFI).

### **Basophils, eosinophils and neutrophils**

The granulocyte and basophil populations were identified by side scatter and CD45 expression as described (29). Eosinophils and neutrophils were identified by their differential expression of CD16 and CD45 (29). Gated basophils, neutrophils, and eosinophils were analyzed for CD84, CD150, CD229, and CD244 expression.

## **Results**

### **Expression on thymocytes and peripheral blood T lymphocyte subsets**

CD84, CD229, and CD150 were expressed on thymocytes, although the expression pattern during T-cell maturation was different for

**Expression of CD84, CD150, CD229, CD244 on thymocytes, T cell and NK cells from peripheral blood**

	Thymus				PBMCs		
	CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> (%/MFI)	CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> (%/MFI)	CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> (%/MFI)	CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup> (%/MFI)	T cell CD4 (%/MFI)	T cell CD8 (%/MFI)	NK cells (%/MFI)
CD84	83 ± 3/90 ± 37	2 ± 15/57 ± 7	67 ± 15/46 ± 16	79 ± 19/53 ± 15	62 ± 8/30 ± 4	86 ± 4/49 ± 10	40 ± 3/23 ± 7
CD150	89 ± 12/116 ± 22	99 ± 1/410 ± 61	97 ± 2/136 ± 59	91 ± 9/197 ± 89	96 ± 2/81 ± 14	64 ± 7/60 ± 13	7 ± 3/7 ± 4
CD229	53 ± 5/38 ± 6	51 ± 1/38 ± 14	77 ± 13/83 ± 23	96 ± 1/88 ± 6	96 ± 2/48 ± 13	93 ± 3/51 ± 12	38 ± 11/12 ± 4
CD244	28 ± 1/20 ± 9	7 ± 5/7 ± 2	6 ± 1/5 ± 2	13 ± 1/15 ± 4	10 ± 5/7 ± 1	59 ± 10/38 ± 14	99 ± 1/154 ± 37

CD84, CD150, CD229, and CD244 expression on thymocytes, T cell and natural killer (NK) cells from peripheral blood. The cells were incubated with anti-CD4 fluorescein isothiocyanate (FITC), anti CD8-PerCp, anti-CD3-allophycocyanin, CD16-CyChrom, CD56-FITC, biotinylated CD84.1.21, SLAMF4, HLy9.1.84 mAbs, C1.7-phycoerythrin or isotype controls. Cells were washed and incubated with streptavidin-PE. Results represent the mean value of percentage of positive cells (% ± SD) and the mean fluorescence intensity (MFI ± SD) of four independent experiments for peripheral blood mononuclear cells and two experiments for thymus. The percentage of positive cells and the fluorescence intensity of negative controls were 5% and 5 MFI.

**Table 1**

each molecule (Table 1). CD84 molecule showed the highest expression on CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> immature thymocytes. The expression of this molecule decreased with T-cell maturation (Table 1). CD150 was also observed early during T-cell differentiation on CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> cells. In contrast to CD84, CD150 showed the highest expression levels on CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (Table 1) (Fig. 1).

The CD229 monoclonal antibody (mAb) stained half of CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> immature thymocytes, whereas virtually all-single-positive CD8 cells were positive for CD229 (Table 1). Low levels of CD244 were found on a third of double-negative thymocytes. Double-negative and CD4<sup>-</sup>single-positive were negative, whereas a small number of CD8<sup>-</sup>single-positive cells expressed CD244 (Table 1) (Fig. 2). Resting peripheral blood lymphocytes expressed CD84, CD150, and CD229. CD244 was primarily expressed on CD8 T cells, although CD4 T cells expressed very low levels. Expression of CD84 was slightly higher on CD8 T cells than on CD4 T cells, whereas the contrary was observed with CD150 (Table 1).

CD84 and CD150 expression was much higher on CD45RO<sup>-</sup> T cells (Table 2)(Fig. 3). By contrast, CD229 and CD244 expression was only slightly higher on CD45RO<sup>+</sup> than on CD45RO<sup>-</sup> T cells (Table 2). CD150 expression was higher on central memory T cells (CD3<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>) compared with effector memory T cells (CD3<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup>) (Table 2), whereas CD244 was preferentially expressed on effector memory T cells (Table 2). Because a large proportion of CD8 memory T cells are CD45RA<sup>+</sup>, we analyzed the CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> (naïve cells) and CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup> (effector cells) subsets. Our results show that CD244 is predominantly expressed on the CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> effector cells (Table 2).

CD56<sup>+</sup> and CD16<sup>+</sup> blood mononuclear cells were also analyzed for expression of CD84, CD150, CD229, and CD244 (Table 1). CD244 was expressed on virtually all NK cells. CD84 and CD229 were also observed at low levels on NK cells, whereas CD150 expression was absent.

**Expression on tonsil and peripheral blood B lymphocytes**

The expression of CD84 was higher on peripheral blood B cells than on peripheral T cells (Table 3). The levels of expression on B cells of CD150 and CD229 were similar to those observed in T cells. CD244 was absent on B cells from both peripheral blood and tonsils (Table 3). CD150 expression on B cells from tonsils was high. By contrast, CD84 expression on tonsil B cells was lower than on peripheral blood B cells. CD229 expression was similar in both types of B cells.

Expression of CD84 and CD229 as measured by CD27 monoclonal antibody was higher on memory CD27<sup>+</sup> B lymphocytes than on CD27<sup>-</sup> cells. By contrast, CD150 expression was lower on memory B lymphocytes (Table 3). B lymphocytes IgD<sup>-</sup>CD38<sup>+</sup>, corresponding to the germinal center cells, expressed lower levels of CD84, CD150, and CD229 than IgD<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> mantle zone B lymphocytes.

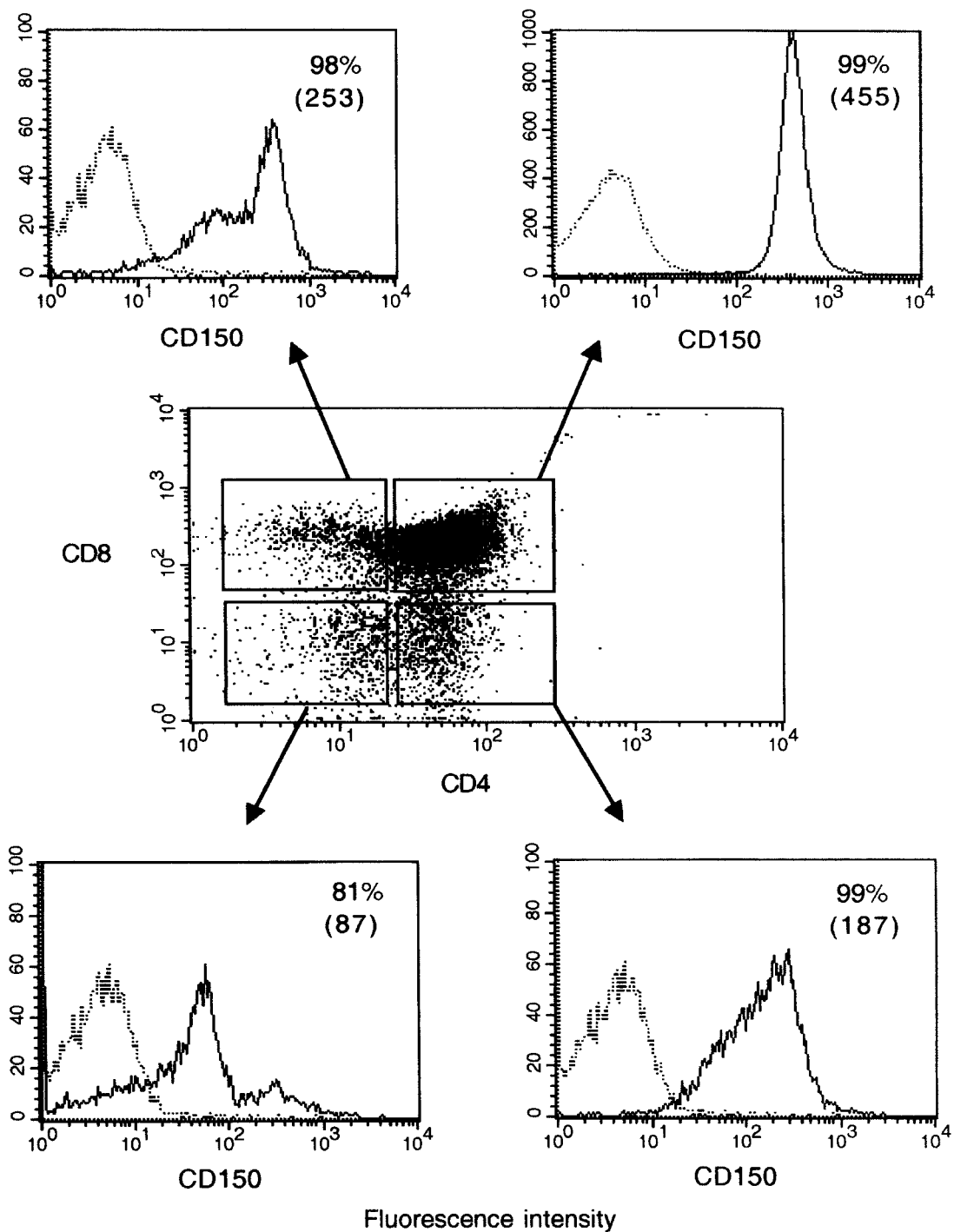
**Expression on activated B and T lymphocytes**

CD84, CD150, CD229, and CD244 expression was assessed on CD3<sup>+</sup> T lymphocytes activated with anti-CD3 monoclonal antibody and phytohemagglutinin (PHA) (Fig. 4A). CD84 expression increased with anti-CD3 activation, but not with PHA. CD150 expression was strongly up-regulated following activation with anti-CD3 or PHA. By contrast, no significant increase of CD229 and CD244 expression was observed after cell activation.

CD19<sup>+</sup> tonsil lymphocytes activated with PMA and Protein A showed an increased expression of CD84 (Fig. 4B). CD150 was also highly up-regulated after B-cell activation, whereas CD229 only slightly increased.

**Expression on resting and activated monocytes**

High levels of CD84 were observed on resting CD14<sup>+</sup> monocytes (Fig. 5). All monocytes expressed CD244, whereas CD150 and

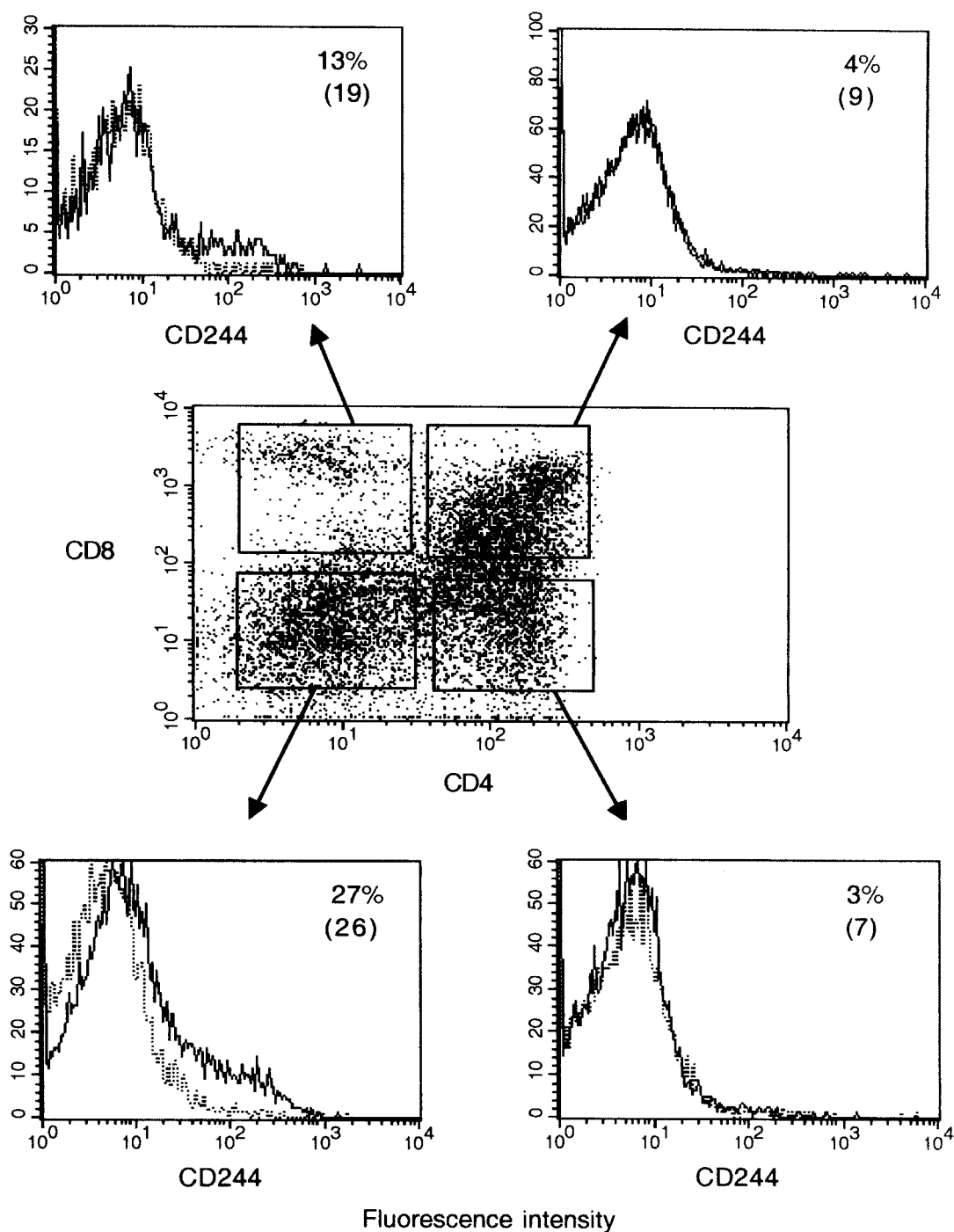


**Fig. 1. CD150 expression on thymocytes.** Isolated thymocytes were incubated with biotinylated SLAMF4 mAb, anti-CD4 fluorescein isothiocyanate (FITC), anti-CD8-PerCP, and anti-CD3-allophycocyanin (APC). They were washed and incubated with streptavidin-phycoerythrin. The thymocytes were examined using a control-Ig (dot line) and SLAMF4 (solid line). The numbers indicate percentage of positive cells and the mean fluorescence intensity (MFI).

CD229 were absent. CD84 expression decreased on LPS-activated monocytes. By contrast, LPS strongly up-regulated CD150 to a maximum at 24 h of culture. On activated monocytes the expression of CD224 decreased to background levels. CD229 was not observed.

#### Expression on dendritic cells

Immature dendritic cells (IDCs) and mature dendritic cells (MDCs) were assayed (Fig. 6). CD84 was expressed at high levels on IDCs and



**Fig. 2. CD244 expression on thymocytes.** Isolated thymocytes were incubated with C1.7-phycoerythrin monoclonal antibody, anti-CD4 fluorescein isothiocyanate, anti-CD8-cychrome, and anti-CD3-allophycocyanin (APC). The thymocytes were examined using a control-Ig (dot line) and C1.7 (solid line). The numbers indicate percentage of positive cells and the mean fluorescence intensity (MFI).

increased its expression following maturation stimuli. CD150 was expressed at very low levels on IDCs but was strongly up-regulated following maturation stimuli. CD244 and CD299 expression was not observed on IDCs or MDCs.

**Expression on leukocyte cell lines**

All tested B cell lines (Table 4) were positive for CD84 expression but the plasma cell line (RPMI8866) and the Burkitt lymphoma cell lines

**Expression of CD84, CD150, CD229 and CD244 on naïve and memory T-cell subsets from Peripheral blood mononuclear cells**

	CD3 <sup>+</sup> CD45RO <sup>low</sup> (%/MFI)	CD3 <sup>+</sup> CD45RO <sup>high</sup> (%/MFI)	CD3 <sup>+</sup> CCR7 <sup>+</sup> CD45RA <sup>-</sup> (%/MFI)	CD3 <sup>+</sup> CCR7 <sup>-</sup> CD45RA <sup>-</sup> (%/MFI)	CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CCR7 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> (%/MFI)	CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CCR7 <sup>-</sup> CD45RA <sup>+</sup> (%/MFI)
CD84	72 ± 5/16 ± 3	91 ± 1/78 ± 3	90 ± 2/75 ± 21	75 ± 12/72 ± 11	78 ± 7/25 ± 4	72 ± 4/31 ± 4
CD150	81 ± 14/34 ± 7	96 ± 3/148 ± 18	99 ± 1/426 ± 47	77 ± 10/361 ± 44	64 ± 14/47 ± 6	46 ± 6/67 ± 21
CD229	95 ± 5/39 ± 3	97 ± 4/61 ± 11	98 ± 1/97 ± 15	83 ± 11/67 ± 8	93 ± 6/83 ± 39	83 ± 9/64 ± 29
CD244	9 ± 2/7 ± 1	26 ± 5/20 ± 8	18 ± 3/10 ± 1	58 ± 9/44 ± 10	16 ± 3/13 ± 1	56 ± 8/64 ± 6

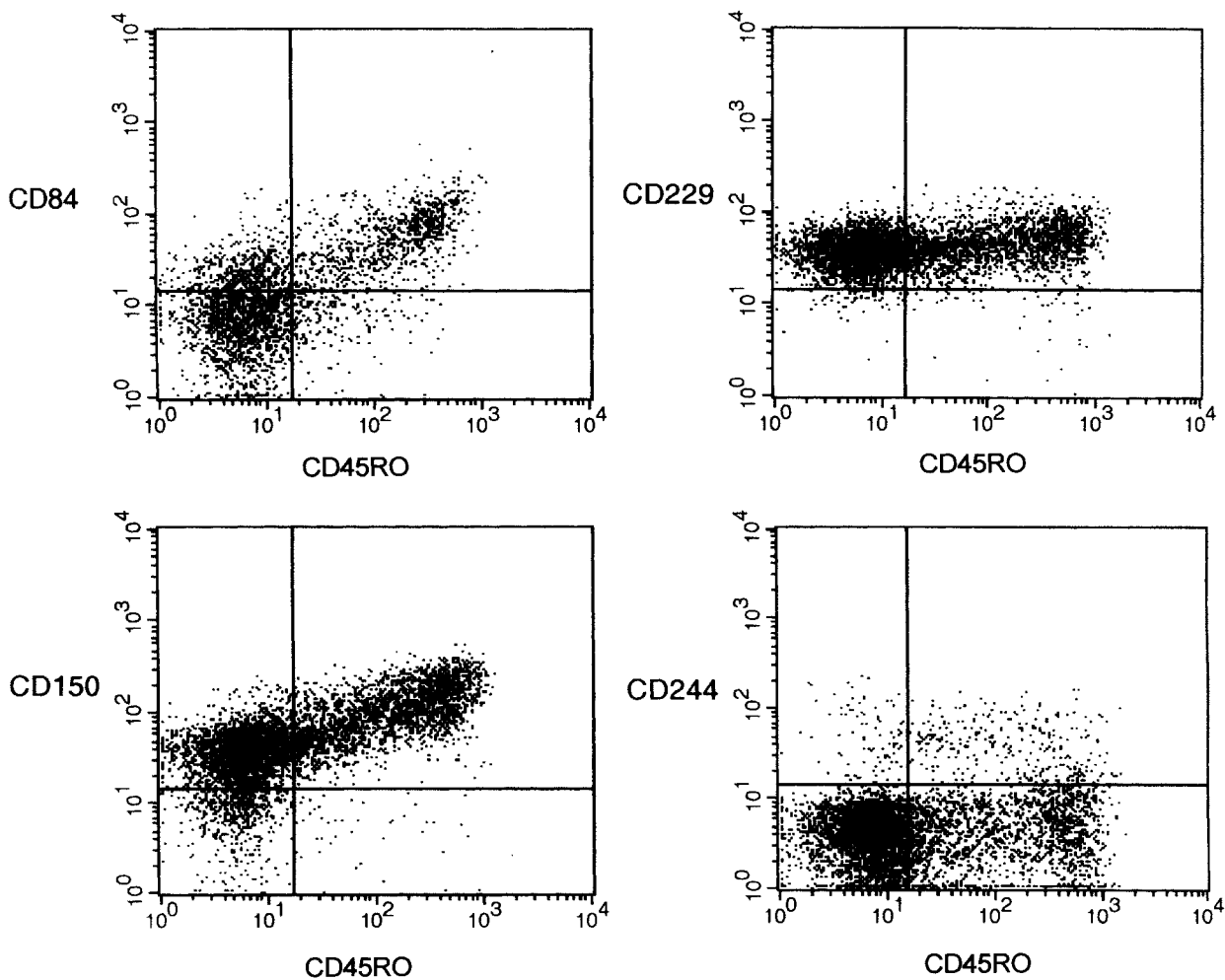
CD84, CD150, CD229, CD244 expression on T cell subsets from peripheral blood. Naïve (CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>low</sup>), memory/effector (CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>high</sup>), central memory T cells (CD3<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup>), effector memory T cell (CD3<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>), naïve CD8 T cells (CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>) and effector CD8 T cell (CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>). The cells were incubated with anti-CD3-allophycocyanin (APC), anti CD8-APC, anti-CD45RO± fluorescein isothiocyanate (FITC), anti-CD45RA + FITC, anti-CCR7 CyChrom and biotinylated CD84.1.21, SLAM.4, HLy9.1.84 mAbs, C1.7-phycoerythrin or isotype controls. Cells were washed and incubated with streptavidin-PE. Results represent the mean value of percentage of positive cells (% ± SD) and the mean fluorescence intensity (MFI ± SD) of four independent experiments for CD45RO. The percentage of positive cells and the fluorescence intensity of negative controls were 5% and 5 MFI.

**Table 2**

(Raji, Namalwa) showed the highest levels. CD150 was highly expressed on EBV-transformed B cell lines but almost absent on Burkitt lymphoma cell lines – such as Daudi or Ramos – with the exception of the Raji cell line. The highest expression of CD229 was

found on B cell lines. CD244 was negative on all B cell lines tested, with the exception of CESS, which expressed a small amount.

T cell lines derived from acute lymphoblastic leukemia (Jurkat and HSB2) were also tested. CD84 was expressed on both lines but the



**Fig. 3.** CD84, CD150, CD229 and CD244 expression on memory T cell subset. Lymphocytes from peripheral blood were incubated with CD3-APC, CD45RO-FITC, biotinylated CD84.1.21, SLAM.4, HLy9.1.84, and C1.7-PE mAbs. Cells were washed and incubated with streptavidin-phycoerythrin.

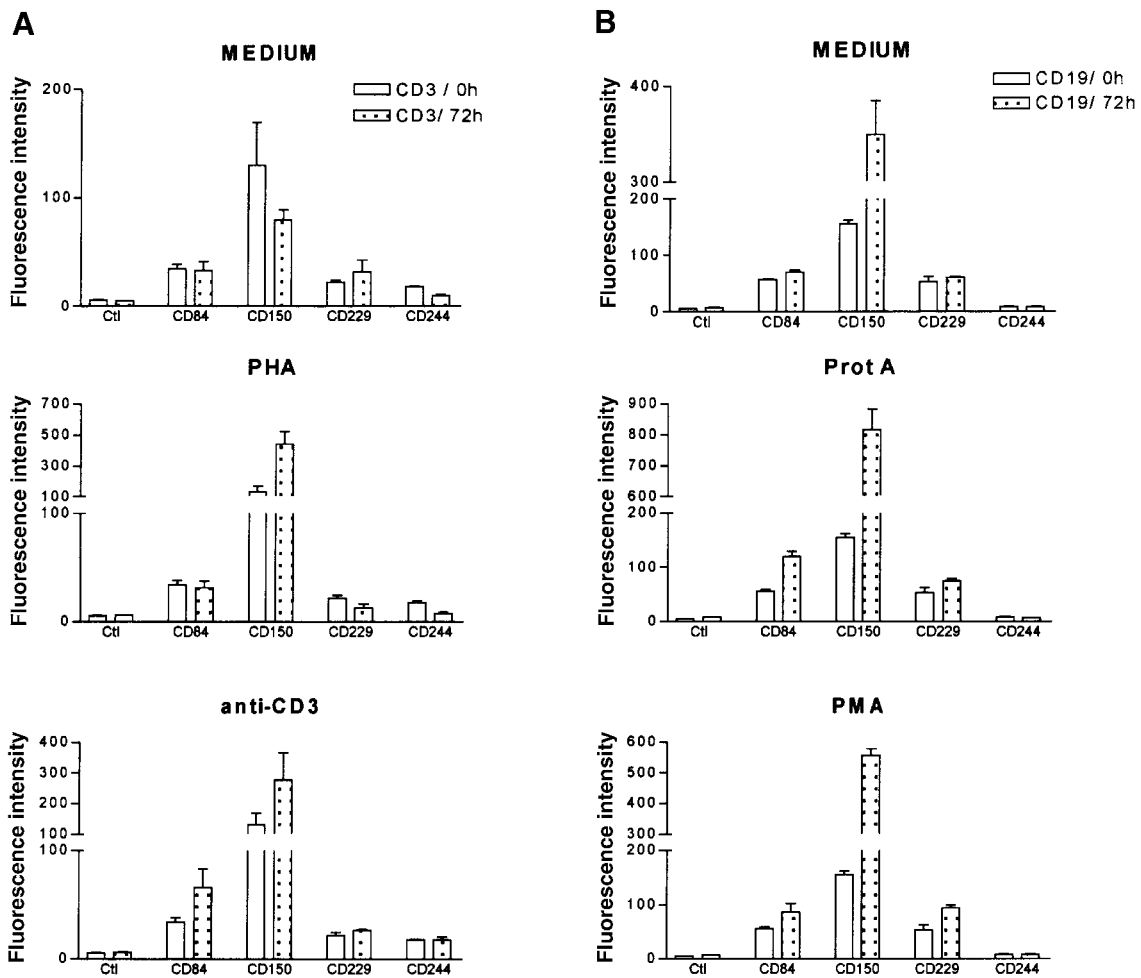


**Expression of CD84, CD150, CD229 and CD244 on B cell subsets**

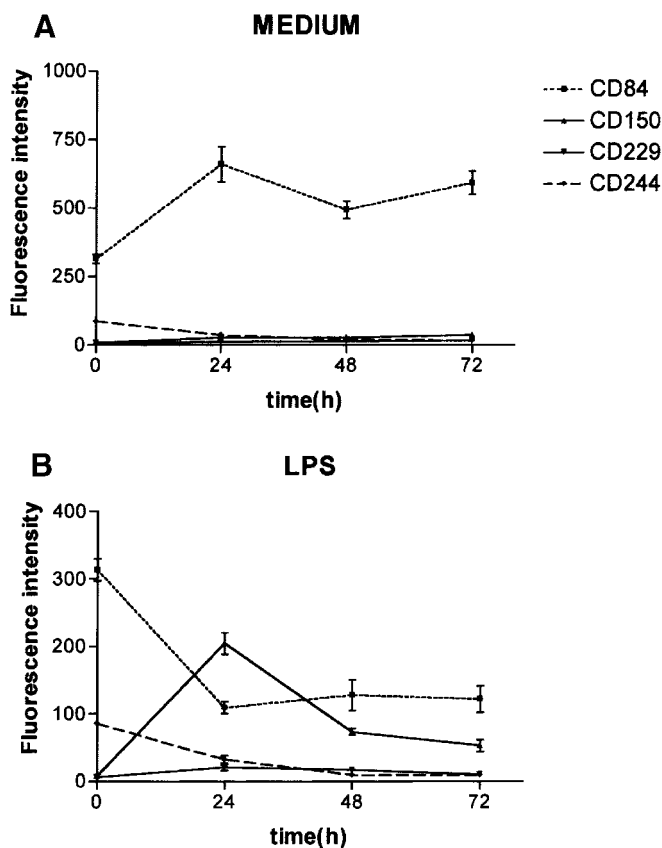
	PBMCs CD19 <sup>+</sup> (%/MFI)	Tonsils CD19 <sup>+</sup> CD27 <sup>-</sup> (%/MFI)	Tonsils CD19 <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup> (%/MFI)	Tonsils CD38 <sup>-</sup> IgD <sup>+</sup> (%/MFI)	Tonsils CD38 <sup>+</sup> IgD <sup>-</sup> (%/MFI)
CD84	85 ± 9/110 ± 22	92 ± 2/26 ± 1	84 ± 8/34 ± 4	94 ± 3/42 ± 12	92 ± 4/27 ± 2
CD150	84 ± 7/73 ± 22	99 ± 1/129 ± 11	92 ± 2/80 ± 2	97 ± 3/95 ± 18	98 ± 1/81 ± 5
CD229	76 ± 13/37 ± 4	96 ± 2/37 ± 4	95 ± 2/46 ± 4	98 ± 1/43 ± 3	94 ± 2/31 ± 2
CD244	3 ± 1/7 ± 1	5 ± 1/4 ± 1	5 ± 1/4 ± 1	6 ± 1/4 ± 1	6 ± 1/4 ± 1

CD84, CD150, CD229, CD244 staining of human B cells on tonsils and peripheral blood. The cells were incubated with CD19-fluorescein isothiocyanate (FITC), CD3-allophycocyanin (APC), CD27-phycoerythrin (PE), CD19-APC, CD38-PE and Ig-D-FITC and biotinylated CD84.1.21, SLAMF4, HLy9.1.84 mAbs, C1.7-PE or isotype controls. Cells were washed and incubated with streptavidin-PE or streptavidin-Cychrom. Results represent the mean value of percentage of positive cells (± SD) and the mean fluorescence intensity (MFI ± SD) of four independent experiments for peripheral blood cells and three for tonsils. The percentage of positive cells and the fluorescence intensity of negative controls were 5% and 5 MFI.

**Table 3**



**Fig. 4.** CD84, CD150, CD229 and CD244 expression on activated T- and B-cells. (A) Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were cultured in the presence of medium, anti-CD3 (clone 332A3) at working dilution 1:10,000 or PHA 1% (v/v) for 72 h. The cells were harvested at 0 h (empty bars) and 72 h (filled bars), washed and incubated with anti-CD3 FITC and biotinylated CD84.1.21, HLy9.1.84, SLAMF4 mAbs, C1.7-phycoerythrin (PE) or control IgG with irrelevant specificity then cells were washed and labeled with streptavidin-PE. Mean fluorescence intensity ± SD of four independent experiments is represented. (B) Cells isolated from tonsils were cultured in the presence of medium, 0.1 ng/ml of PMA or 1% (v/v) of Protein A (ProtA) for 72 h. Cells were harvested at 0 h (empty bars) and 72 h (filled bars), washed and incubated with anti-CD19 FITC and biotinylated CD84.1.21, HLy9.1.84, SLAMF4, C1.7-PE or control IgG with irrelevant specificity, and then cells were washed and labeled with streptavidin-PE. Mean fluorescence intensity ± SD of four independent experiments are shown.

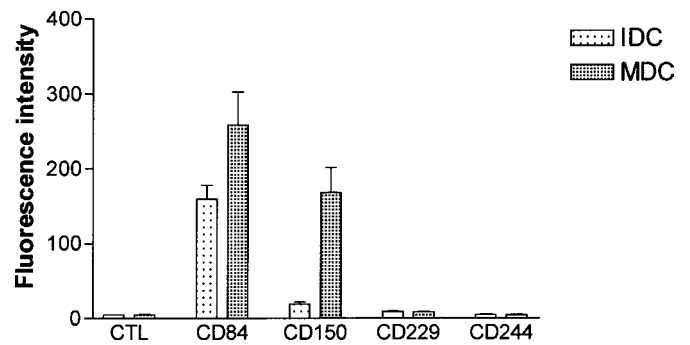


**Fig. 5. Kinetic of CD84, CD150, CD229 and CD244 expression on CD14<sup>+</sup> cells under activation conditions.** PBMCs were cultured in presence of medium only (A) or 2 µgr/ml of LPS (B) for 24, 48 and 72 h as indicated. At those times cells were harvested, washed and stained with CD14-FITC and biotinylated CD84.1.21, HLy9.1.84, SLAM.4, C1.7-phycoerythrin or control IgG with irrelevant specificity. Thereafter, cells were washed and incubated with streptavidin-PE. Analysis by two colors flow cytometry was carried out. Mean fluorescence intensity ±SD of four independent experiments are shown.

fluorescence intensity was lower than on B cell lines. The Jurkat cell line was negative for CD150 and CD244 but positive for CD229. NK cell line (YT) expressed CD244 but not CD84, CD150 or CD229. Myelomonocytic cell lines HL60 and U937 did not express CD150 or CD229 but both lines expressed CD84 and CD244. Erythromyeloid cell line K562 did not express any of the molecules studied. Mast cell line HMC-1 expressed significant amounts of CD84 and trace amounts of CD244 (Table 4).

**Expression on polymorphonuclear cells and other blood cells**

Each receptor showed a characteristic expression pattern on granulocytes. CD84 was observed on neutrophils, eosinophils, and basophils. CD150 was slightly expressed on basophils but not on



**Fig. 6. CD84, CD150, CD229, CD244 expression on immature and mature dendritic cells (DCs).** Three samples of mature and immature DCs derived from different donors were incubated with biotinylated CD84.1.21, HLy9.1.84, SLAM.4 or C1.7-phycoerythrin and isotype controls. The cells were washed and incubated with streptavidin-PE. Mean fluorescence intensity (MFI) ± SD of three independent experiments are shown.

neutrophils or eosinophils. CD229 was absent on all granulocyte populations, whereas CD244 was observed on basophils and eosinophils (Table 5). CD84, CD150, CD299, and CD244 were absent on erythrocytes (data not shown). CD84 was highly expressed on platelets but not CD150, CD229, or CD244 (data not shown).

**Expression on mast cells**

CD84 was expressed on virtually all bone-marrow-derived mast cells at levels similar to those observed on monocytes (Table 5). CD229, CD244, and CD150 expression on mast cells was weak.

**Discussion**

CD84, CD150, CD229, and CD244 are expressed on the cell surface of hematopoietic cells and associate with adaptor proteins SAP and EAT-2 (4, 30). SAP and EAT-2 associate with a specific tyrosine motif, different from ITAM and ITIM, present in the cytoplasmic tail of the CD150 family receptors (31, 32). SAP is expressed in T cells and NK cells, whereas EAT-2 is expressed in macrophages and B cells and possibly in dendritic cells (DCs) (33). We show that CD84, CD150, CD229, and CD244 are differentially expressed on several leukocytes and lymphocyte populations.

CD84 is expressed on thymocytes, T-, B-lymphocytes, platelets, DCs, and monocytes (20, 34, 35). CD84 expression was highly regulated at specific stages of differentiation and maturation of B and T cells. CD84 was up-regulated after activation of both T and B cells. The highest expression level of CD84 on lymphocytes was observed on CD45RO high-expressing memory/effector T cells. We found only a slight difference in expression between naïve (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>) and

**Expression of CD84, CD150, CD229 and CD244 on cell lines**

	Cell lines	CD84	CD150	CD229	CD244
Epstein-Barr virus-transformed	CESS	+	+++	++	+
B cell lines	BEN	+++	+++	+	-
	Raji	+++	+++	++	-
Burkitt Lymphoma	Daudi	+++	-	+++	-
B cell lines	Ramos	+++	+	+	-
	Namalwa	+++	++	+	-
	RPMI8866	-	+++	+	-
T cell lines	Jurkat	+	-	+++	-
	HSB2	+++	+++	-	+++
Natural killer cell line	YT	-	-	-	+++
	K562	-	-	-	-
Myelomonocytic	U937	++	-	-	-
Cell lines	HL60	+	-	-	+++
Mast cell line	HMC-1	+++	-	-	+

Expression of CD84, CD150, CD229 and CD244 on human cell lines. The cells were stained with biotinylated CD84.1.21, HLy9.1.84, SLAM.4 mAbs, C.1-phycoerythrin or isotype controls. This was followed by incubation with streptavidin-PE and analysis by flow cytometry. Results represent the percentage of positive cells: -, <20% positive cell population; +, 20–50% positive cell population; ++, 50–75% positive cell population; and +++, 75–100% positive cell population.

**Table 4**

memory B cells (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>). However, a recent report shows that B cells that strongly express CD84 had more somatic mutations than B cells expressing low levels of CD84, indicating its preferential expression on memory B cells (35). Moreover, CD84 was highly expressed on other antigen-presenting cells (APCs) – such as monocytes and DCs – and this expression was up-regulated by maturation stimuli. Once activated by inflammatory stimuli or infectious agents, DCs undergo maturation whose hallmarks are up-regulated expression of costimulatory (CD40, CD80, and CD86) and adhesion (CD54 and CD58) molecules, migration into lymphoid organs and subsequent acquisition of the capacity to activate quiescent, naïve, and

memory lymphocytes (36, 37). Thus, the homophilic adhesion receptor CD84 may play a critical role in the interaction between memory/effector T cells and APCs. The range of CD84-mediated interactions may be extended to other cell types with high expression levels of CD84 molecule. Recently, CD84 has been shown to be expressed on the cell surface of the majority of granulocytes (38). We found high levels of CD84 on mast cells, eosinophils, and basophils. These cells share many phenotypic features, including molecules involved in adhesion such as VLA-4 (CD49-d), ICAM-1 (CD54), ICAM-3 (CD50), SAF-2 or migration such as the chemotactic factor receptors CCR3 and C3aR (39). Signaling mediated by CD84 adhesion receptor may regulate effector function on these cells.

CD150 molecule was described as a T- and B-cell-activation marker (40, 41). CD150 is also present on thymocytes (22, 41). We show that CD150 is expressed very early during development of T cells because CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> thymocytes expressed CD150. However, the highest levels of expression were found on CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> thymocytes. Double-positive thymocytes express the highest amounts of SAP (42). More importantly, CD150 is tyrosine-phosphorylated and associated with SAP and FynT in these cells (9, 10). Expression of CD150 decreased when the T cells matured into single-positive CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> and expressed similar levels to those observed on mature T cells in peripheral blood. In contrast to some reports, in which CD150 was not observed on resting T and B cells, we observed CD150 on more than 80% of the cells (22, 40, 41). However, Punnonen et al. also observed expression of CD150 on peripheral blood B cells (43). We also confirmed the observation of high levels of CD150 on memory/effector T cells (40, 41). Here we show that the expression of CD150 was higher on central memory T cells (CD3<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>) compared to effector memory T cells (CD3<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup>). Surprisingly, CD150 expression was significantly lower on memory B cells (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>) than on naïve B cells (CD19<sup>+</sup>, CD27<sup>-</sup>). Our results are different from those recently reported by Feldhahn et al., which do not observe expression of CD150 on CD19<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> (44). The

**Expression of CD84, CD150, CD229 and CD244 on granulocytes and mast cells**

	Neutrophils (%/MFI)	Basophils (%/MFI)	Eosinophils (%/MFI)	Mast cells (%/MFI)
CD84	41 ± 5/8 ± 1	71 ± 3/72 ± 24	55 ± 28/62 ± 20	82 ± 19/94 ± 12
CD150	10 ± 5/6 ± 2	26 ± 5/17 ± 8	9 ± 6/27 ± 10	10 ± 9/11 ± 8
CD229	7 ± 1/5 ± 1	12 ± 4/6 ± 1	6 ± 3/13 ± 1	6 ± 1/7 ± 1
CD244	11 ± 2/6 ± 2	78 ± 8/97 ± 8	80 ± 17/47 ± 9	4 ± 1/6 ± 1
Ctl	4 ± 1/4 ± 1	4 ± 1/6 ± 1	6 ± 1/13 ± 3	5 ± 1/7 ± 1

CD84, CD150, CD229 and CD244 expression on polymorphonuclear cells and mast cells. Basophils, eosinophils and neutrophils were analyzed as described on methods. The human mast cells were differentiated *in vitro* from CD34<sup>+</sup>-progenitor cells from peripheral blood. The cells were incubated with biotinylated CD84.1.21, HLy9.1.84, SLAM.4 mAbs, C.1-phycoerythrin or isotype controls, followed by incubation with streptavidin-PE. The mean values of percentage of positive cells (% ± SD) and the mean fluorescence intensity (MFI ± SD) of three independent experiments are represented.

**Table 5**

expression of CD150 was much higher on activated B and T cells than that of the other markers analyzed in this study. CD150 was not restricted to T and B cells but appeared on other activated leukocytes – such as activated monocytes and mature DCs. In contrast to CD84, its expression was absent in resting monocytes or immature DCs. These data show that CD150, like CD83, is a maturation marker of DCs (45, 46). This observation reinforces the hypothesis that CD150 is important as a homophilic adhesion molecule not only in bi-directional signaling during T–B interaction but also in the interaction of T cells with other APCs. Recently, CD150 has been identified as a receptor for MV (19, 47). CD150 expression on activated monocytes (26, 48) and mature DC cells (45, 46) extends the range of cells susceptible to MV infection. These expression data may help us understand the complex immunodeficiency observed in patients infected with MV.

CD229 molecule is expressed on mature T, B cells and thymocytes. By contrast, monocytes, granulocytes, platelets, and red blood cells are uniformly negative for CD229 (25). The expression of CD229 on thymocytes increased with cell maturation because the highest level was observed on single-positive CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> thymocytes. In contrast to CD84 or CD150, there was no significant difference between memory and naïve T cells, whereas there was slight difference between memory and naïve B cells. T-cell activation with anti-CD3 or PHA did not affect CD229 expression, although PMA increased CD229 expression on B cells. Most B and T cell lines were positive for CD229. By contrast, myelomonocytic cell lines – the NK cell line YT or the mast cell line HMC-1 – did not express CD229 receptor. However, a significant number of acute myeloblastic leukemias express CD229, indicating that some cells of the myeloid lineage also express CD229 (25). Of the markers analyzed in this study, CD229 presented the most restricted expression pattern.

CD244 is expressed on all NK cells, a subset of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes, monocytes, basophils, and  $\gamma/\delta$  T cells (23, 49–53). Our results

confirm the preferential expression of CD244 on NK cells, where it plays a critical role in SAP-mediated NK cytotoxicity and IFN- $\gamma$  secretion (24, 54, 55). CD244 was also observed on CD8<sup>+</sup> T cell, whereas CD4<sup>+</sup> T cells and B cells did not show CD244 expression. It has been reported that CD224 is predominantly expressed on differentiated T cells with high levels of granzyme B, perforin expression, down-regulation of CCR7, and rapid IFN- $\gamma$  production (53). We also showed the predominant expression of CD244 on effector CD8<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup> T cells. CD8<sup>+</sup> T cells expressed CD84, CD150, CD229, and CD244 receptors. CD150 and CD244 molecules could be engaged on the surface of CD8<sup>+</sup> cells recognizing their highly up-regulated ligands – CD150 and CD48 – on EBV-infected B cells. Therefore, the malfunction of these receptors may contribute to the response of XLP patients to EBV infection. It has already been shown that CD244 is expressed on human monocytes. Significantly, CD244 was rapidly down-regulated on monocyte cell surface after activation. Eosinophils and basophils were also shown to express high levels of this protein. Although CD244 was not observed on human mast cells, a recent report has shown CD244 expression on mouse bone-marrow-derived mast cells (56).

In conclusion, our data show a wider distribution of these four molecules on the hematopoietic cells than previously described, suggesting that they regulate a broad range of biological effects. These receptors may mediate various functions depending on their cell-surface expression and the availability of cytoplasmic signaling molecules – such as SAP and EAT-2. The heterogeneous expression of these receptors indicates that they may contribute to the regulation of both innate and adaptive immune responses. The data reported here may help to design new strategies in order to unravel the functional role of these molecules in the regulation of immune responses and in immunopathological conditions – such as XLP or MV infection.

## References

1. Lanier LL. Face off – the interplay between activating and inhibitory immune receptors. *Curr Opin Immunol* 2001; **13**: 326–31.
2. Morra M, Howie D, Grande MS et al. X-linked lymphoproliferative disease: a progressive immunodeficiency. *Annu Rev Immunol* 2001; **19**: 657–82.
3. Sidorenko SP, Clark EA. The dual-function CD150 receptor subfamily: the viral attraction. *Nat Immun* 2003; **4**: 19–24.
4. Engel P, Eck MJ, Terhorst C. The SAP and SLAM families in immune responses and X-linked lymphoproliferative disease. *Nat Rev Immunol* 2003; **3**: 813–21.
5. Sandrin MS, Gumley TP, Henning MM et al. Isolation and characterization of cDNA clones for mouse Ly-9. *J Immunol* 1992; **149**: 1636–41.
6. Tangye SG, Phillips JH, Lanier LL. The CD2-subset of the Ig superfamily of cell surface molecules: receptor-ligand pairs expressed by NK cells and other immune cells. *Semin Immunol* 2000; **12**: 149–57.
7. Wang N, Morra M, Wu C et al. CD150 is a member of a family of genes that encode glycoproteins on the surface of hematopoietic cells. *Immunogenetics* 2001; **53**: 382–94.
8. Latour S, Gish G, Helgason CD, Humphries RK, Pawson T, Veillette A. Regulation of SLAM-mediated signal transduction by SAP, the X-linked lymphoproliferative gene product. *Nat Immun* 2001; **2**: 681–90.
9. Chan B, Lanyi A, Song HK et al. SAP couples Fyn to SLAM immune receptors. *Nat Cell Biol* 2003; **5**: 155–60.
10. Latour S, Roncagalli R, Chen R et al. Binding of SAP SH2 domain to FynT SH3 domain reveals a novel mechanism of receptor signalling in immune regulation. *Nat Cell Biol* 2003; **5**: 149–54.

11. Sayos J, Wu C, Morra M et al. The X-linked lymphoproliferative-disease gene product SAP regulates signals induced through the co-receptor SLAM. *Nature* 1998; **395**: 462–9.
12. Coffey AJ, Brooksbank RA, Brandau O et al. Host response to EBV infection in X-linked lymphoproliferative disease results from mutations in an SH2-domain encoding gene. *Nat Genet* 1998; **20**: 129–35.
13. Nichols KE, Harkin DP, Levitz S et al. Inactivating mutations in an SH2 domain-encoding gene in X-linked lymphoproliferative syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 13765–70.
14. Purtilo DT, Cassel CK, Yang JP, Harper R. X-linked recessive progressive combined variable immunodeficiency (Duncan's disease). *Lancet* 1975; **1**: 935–40.
15. Sumegi J, Huang D, Lanyi A et al. Correlation of mutations of the SH2D1A gene and Epstein–Barr virus infection with clinical phenotype and outcome in X-linked lymphoproliferative disease. *Blood* 2000; **96**: 3118–25.
16. Crotty S, Kersh EN, Cannons J, Schwartzberg PL, Ahmed R. SAP is required for generating long-term humoral immunity. *Nature* 2003; **421**: 282–7.
17. Brown MH, Boles K, van der Merwe PA, Kumar V, Mathew PA, Barclay AN. 2B4, the natural killer and T cell immunoglobulin superfamily surface protein, is a ligand for CD48. *J Exp Med* 1998; **188**: 2083–90.
18. Mavaddat N, Mason DW, Atkinson PD et al. Signaling lymphocytic activation molecule (CDw150) is homophilic but self-associates with very low affinity. *J Biol Chem* 2000; **275**: 28100–9.
19. Tatsuo H, Ono N, Yanagi Y. Morbilliviruses use signaling lymphocyte activation molecules (CD150) as cellular receptors. *J Virol* 2001; **75**: 5842–50.
20. Martin M, Romero X, de la Fuente MA et al. CD84 functions as a homophilic adhesion molecule and enhances IFN-gamma secretion: adhesion is mediated by Ig-like domain 1. *J Immunol* 2001; **167**: 3668–76.
21. Kumaresan PR, Lai WC, Chuang SS, Bennett M, Mathew PA. CS1, a novel member of the CD2 family, is homophilic and regulates NK cell function. *Mol Immunol* 2002; **39**: 1–8.
22. Aversa G, Chang CC, Carballido JM, Cocks BG, De Vries JE. Engagement of the signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) on activated T cells results in IL-2-independent, cyclosporin A-sensitive T cell proliferation and IFN-gamma production. *J Immunol* 1997; **158**: 4036–44.
23. Garni-Wagner BA, Purohit A, Mathew PA, Bennett M, Kumar V. A novel function-associated molecule related to non-MHC-restricted cytotoxicity mediated by activated natural killer cells and T cells. *J Immunol* 1993; **151**: 60–70.
24. Chuang SS, Kumaresan PR, Mathew PA. 2B4 (CD244)-mediated activation of cytotoxicity and IFN-gamma release in human NK cells involves distinct pathways. *J Immunol* 2001; **167**: 6210–6.
25. de la Fuente MA, Tovar V, Villamor N et al. Molecular characterization and expression of a novel human leukocyte cell-surface marker homologous to mouse Ly-9. *Blood* 2001; **97**: 3513–20.
26. Romero X, Martin M, Zapater N, Tovar V, Pizcueta P, Engel P. Expression of CD150 on human leukocytes. Production and characterization of a new CD150 monoclonal antibody. *Immunologia* 2001; **20**: 57–66.
27. Vanhecke D, Leclercq G, Plum J, Vandekerckhove B. Characterization of distinct stages during the differentiation of human CD69<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> thymocytes and identification of thymic emigrants. *J Immunol* 1995; **155**: 1862–72.
28. Saito H, Ebisawa M, Tachimoto H et al. Selective growth of human mast cells induced by Steel factor, IL-6, and prostaglandin E2 from cord blood mononuclear cells. *J Immunol* 1996; **157**: 343–50.
29. Fujimoto H, Sakata T, Hamaguchi Y et al. Flow cytometric method for enumeration and classification of reactive immature granulocyte populations. *Cytometry* 2000; **42**: 371–8.
30. Latour S, Veillette A. Molecular and immunological basis of X-linked lymphoproliferative disease. *Immunol Rev* 2003; **192**: 212–24.
31. Veillette A. The SAP family: a new class of adaptor-like molecules that regulates immune cell functions. *Sci STKE* 2002; **2002**: E8.
32. Sayos J, Martin M, Chen A et al. Cell surface receptors Ly-9 and CD84 recruit the X-linked lymphoproliferative disease gene product SAP. *Blood* 2001; **97**: 3867–74.
33. Morra M, Lu J, Poy F et al. Structural basis for the interaction of the free SH2 domain EAT-2 with SLAM receptors in hematopoietic cells. *EMBO J* 2001; **20**: 5840–52.
34. Krause SW, Rehli M, Heinz S, Ebner R, Andreesen R. Characterization of MAX.3 antigen, a glycoprotein expressed on mature macrophages, dendritic cells and blood platelets: identity with CD84. *Biochem J* 2000; **346 Part 3**: 729–36.
35. Tangye SG, van de Weerd BC, Avery DT, Hodgkin PD. CD84 is up-regulated on a major population of human memory B cells and recruits the SH2 domain containing proteins SAP and EAT-2. *Eur J Immunol* 2002; **32**: 1640–9.
36. Hart DN. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 1997; **90**: 3245–87.
37. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; **392**: 245–52.
38. Zaiss M, Hirtreiter C, Rehli M et al. CD84 expression on human hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol* 2003; **31**: 798–805.
39. Bochner BS, Schleimer RP. Mast cells, basophils, and eosinophils: distinct but overlapping pathways for recruitment. *Immunol Rev* 2001; **179**: 5–15.
40. Cocks BG, Chang CC, Carballido JM, Yssel H, De Vries JE, Aversa G. A novel receptor involved in T-cell activation. *Nature* 1995; **376**: 260–3.
41. Sidorenko SP, Clark EA. Characterization of a cell surface glycoprotein IPO-3, expressed on activated human B and T lymphocytes. *J Immunol* 1993; **151**: 4614–24.
42. Wu C, Sayos J, Wang N, Howie D, Coyle A, Terhorst C. Genomic organization and characterization of mouse SAP, the gene that is altered in X-linked lymphoproliferative disease. *Immunogenetics* 2000; **51**: 805–15.
43. Punnonen J, Cocks BG, Carballido JM et al. Soluble and membrane-bound forms of signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) induce proliferation and Ig synthesis by activated human B lymphocytes. *J Exp Med* 1997; **185**: 993–1004.
44. Feldhahn N, Schwering I, Lee S et al. Silencing of B cell receptor signals in human naive B cells. *J Exp Med* 2002; **196**: 1291–305.
45. Kruse M, Meinel E, Henning G et al. Signaling lymphocytic activation molecule is expressed on mature CD83<sup>+</sup> dendritic cells and is up-regulated by IL-1 beta. *J Immunol* 2001; **167**: 1989–95.
46. Bleharski JR, Niaz KR, Sieling PA, Cheng G, Modlin RL. Signaling lymphocytic activation molecule is expressed on CD40 ligand-activated dendritic cells and directly augments production of inflammatory cytokines. *J Immunol* 2001; **167**: 3174–81.
47. Yanagi Y, Ono N, Tatsuo H, Hashimoto K, Minagawa H. Measles virus receptor SLAM (CD150). *Virology* 2002; **299**: 155–61.
48. Minagawa H, Tanaka K, Ono N, Tatsuo H, Yanagi Y. Induction of the measles virus receptor SLAM (CD150) on monocytes. *J Gen Virol* 2001; **82**: 2913–7.

49. Valiante NM, Trinchieri G. Identification of a novel signal transduction surface molecule on human cytotoxic lymphocytes. *J Exp Med* 1993; **178**: 1397–406.
50. Mathew PA, Gani-Wagner BA et al. Cloning and characterization of the 2B4 gene encoding a molecule associated with non-MHC-restricted killing mediated by activated natural killer cells and T cells. *J Immunol* 1993; **151**: 5328–37.
51. Nakajima H, Cella M, Langen H, Friedlein A, Colonna M. Activating interactions in human NK cell recognition: the role of 2B4-CD48. *Eur J Immunol* 1999; **29**: 1676–83.
52. Moretta A, Bottino C, Vitale M et al. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 2001; **19**: 197–223.
53. Speiser DE, Colonna M, Ayyoub M et al. The activating receptor 2B4 is expressed in vivo by human CD8<sup>+</sup> effector alpha beta T cells. *J Immunol* 2001; **167**: 6165–70.
54. Tangye SG, Lazetic S, Woollatt E, Sutherland GR, Lanier LL, Phillips JH. Cutting edge: human 2B4, an activating NK cell receptor, recruits the protein tyrosine phosphatase SHP-2 and the adaptor signaling protein SAP. *J Immunol* 1999; **162**: 6981–5.
55. Tangye SG, Phillips JH, Lanier LL, Nichols KE. Functional requirement for SAP in 2B4-mediated activation of human natural killer cells as revealed by the X-linked lymphoproliferative syndrome. *J Immunol* 2000; **165**: 2932–6.
56. Kubota K. A structurally variant form of the 2B4 antigen is expressed on the cell surface of mouse mast cells. *Microbiol Immunol* 2002; **46**: 589–92.

## ***4. DISCUSSIÓ***

---





## 1. La interacció de CD84 amb el seu contrareceptor

En aquest treball de tesi es demostra per primera vegada la interacció homofílica de CD84 i la seva rellevància funcional. Els únics lligands de les proteïnes de la família de CD2/CD150 que s'han descrit fins l'actualitat són altres membres de la mateixa família (157, 44, 158, 42, 43, 48, 49, 159). S'ha proposat que els gens de la família del CD150 es van originar a partir d'un gen ancestral comú que codificava per una proteïna amb la capacitat d'interaccionar de forma homotípica, implicada en funcions d'adhesió (22, 23). Aquest gen ancestral s'hauria anat duplicant i diversificant al llarg de l'evolució, donant lloc als diferents membres de la família del CD150 i adquirint la nova capacitat d'interaccionar de forma heterotípica, com és el cas de la interacció del CD244 amb el seu lligand el CD48 (42, 43).

Nosaltres demostrem que la proteïna de fusió soluble de CD84-Ig, que conté els dos dominis Ig extracel·lulars de CD84, s'uneix a les cèl·lules transfectades amb el cDNA del CD84, però no a les cèl·lules transfectades amb els cDNAs que codifiquen per a altres membres de la família del CD2/CD150. A més a més, la interacció de CD84-Ig amb les cèl·lules transfectades és bloquejada per la presència d'anticossos monoclonals específics contra CD84. Els estudis realitzats per mapar els epítops de la molècula CD84 demostren que els fragments Fab dels anticossos que interaccionen amb epítops del primer domini, bloquegen la interacció amb la proteïna de fusió CD84-Ig, mentre que els fragments Fab de l'anticòs CD84.2.151 que reconeix el segon domini és incapaç de bloquejar aquesta interacció. Aquestes dades són totalment consistents amb els resultats obtinguts amb les proteïnes quimèriques humà/ratolí, on s'observa que només es dona la interacció homofílica de CD84 amb CD84-Ig en aquella proteïna que conserva el primer domini Ig de tipus V humà. Aquesta interacció homofílica també es dona en ratolins, com ho demostra la interacció de la proteïna de fusió CD84 murina amb el CD84 murí expressat en la superfície de les cèl·lules COS, i per tant, aquesta interacció es conserva entre les diferents espècies, tant en humà com en ratolí. Tanmateix, no s'observen interaccions creuades entre aquestes dues espècies.

Diferents estudis demostren que el domini responsable de l'adhesió entre diferents membres de la família del CD2/CD150, com ara el receptor CD2 humà interaccionant amb el CD58 humà, el CD2 murí amb el CD48 murí o el CD48 humà amb el CD244 humà, és el domini Ig de tipus V localitzat a l'extrem N-terminal de la proteïna (160). Aquestes observacions suggereixen que els receptors CD84 expressats en cèl·lules adjacents interaccionen mitjançant els dominis Ig de tipus V més exposats, establint un contacte entre molècules de CD84 de "cap contra cap". Aquestes dades estan d'acord amb les trobades pels cristalls de CD2 soluble on es detecta la formació de dímers de CD2 interaccionant de forma homotípica seguint aquest model de "cap contra cap" i que mimetitza la topologia de la interacció del CD2 amb el CD58 (161). Per altre banda, s'ha demostrat que la cua citoplasmàtica del receptor PECAM-1 (CD31), molècula que pertany a la SFIg i que també interacciona de forma homotípica, és crítica per tal de que es doni la interacció (162). Per aquesta raó hem testat la interacció de CD84-Ig amb un mutant al que li manca la cua citoplasmàtica del CD84. Els nostres resultats demostren que els dominis citoplasmàtics de CD84 no influeixen en la interacció homofílica.

La interacció de CD84 amb ell mateix té lloc en cèl·lules del sistema hematopoètic. Les plaquetes són les cèl·lules que presenten una major expressió de CD84, molt superior a la que podem trobar en els limfòcits. Hem observat la interacció de la proteïna de fusió CD84-Ig amb les plaquetes i hem estat capaços de bloquejar aquesta interacció amb fragments Fab que reconeixen el primer domini, però no amb fragments que en reconeixen el segon. Tot això demostra novament que la interacció és específica i que implica al primer domini. El fet de no observar interacció en els limfòcits pot ser degut a que la concentració de molècules de CD84-Ig lliure sigui força baixa comparada amb la concentració total de la proteïna de fusió, degut a que gran part de la proteïna soluble pot estar interaccionant de forma homotípica. Una altra explicació, no exclouent de l'anterior, és que la majoria d'interaccions homofíliques són de baixa afinitat i per tant el nivell requerit de proteïna expressat a la membrana de la cèl·lula ha de ser força elevat (47).

Per altra banda, cal pensar que la interacció d'una proteïna soluble amb una proteïna expressada en la superfície cel·lular és una aproximació del que podria estar succeint en la interacció entre molècules expressades en la superfície de cèl·lules adjacents. Així doncs, fenòmens com l'agregació de receptors, que polaritzen les interaccions a les

superfícies de contacte entre cèl·lules, augmenten l'avidesa del receptor pel seu contrareceptor. A més a més, aquestes interaccions són dinàmiques i solen estar gerarquitzades, s'estableix un ordre d'interacció que afavoreix les successives interaccions entre diferents molècules. Per altra banda, l'orientació i el moviment de les molècules en la superfície de les cèl·lules es veu restringida, afavorint-ne la interacció amb el seu contrareceptor. Uns components destacats en la restricció del moviment són els sucres, presents en gran quantitat en el domini de tipus C2 de la molècula CD84, que podrien imposar restriccions al moviment del receptor i d'aquesta manera optimitzar la interacció amb el CD84 present en la cèl·lula adjacent (19). A més a més, el CD84, en funció del tipus cel·lular, sembla presentar un patró de glicosilació diferent (103, 99). Aquest fet podria influenciar en la interacció homofíllica de CD84.

La lligació de CD84 modula l'activació de la cèl·lula T, de la mateixa manera que ho fan el CD2, el CD150 o el CD244 (111, 124, 125). Els anticossos contra CD84 incrementen la secreció de IFN- $\gamma$  dependent de la senyalització del TCR, de la mateixa manera que ocorre amb els anticossos contra CD150. Tots els anticossos contra CD84 tenen un efecte funcional semblant, és a dir que la inducció de IFN- $\gamma$  és epítot independent. A més a més, la proteïna de fusió de CD84 també incrementa els nivells de IFN- $\gamma$ . Però la producció de IL-4 no es veu incrementada ni pels anticossos contra CD84 ni per la proteïna de fusió CD84-Ig. La semblança en aspectes funcionals del receptor CD84 amb el receptor CD150, fa pensar que aquestes molècules es podrien comportar de forma semblant en limfòcits T i intervenir en la polarització Th1/Th2. Una vegada més ens trobem amb el dilema de l'activitat agonista o antagonista dels anticossos. La resposta la trobarem en models que sobreexpressin o bloquegin l'expressió de la proteïna CD84. En el cas del CD150, els limfòcits de ratolins deficientes en aquesta molècula incrementen la secreció de IFN- $\gamma$  i redueixen la de IL-4. Per tant, no podem descartar un patró semblant pel ratolí deficient en CD84, d'aquesta manera l'únic que podem afirmar és que aquesta molècula influencia la resposta Th1/Th2.

En un model d'interacció d'una cèl·lula T amb una cèl·lula presentadora d'antígens (APC), es podria donar la interacció del CD84 present en la cèl·lula T amb el CD84 expressat en la cèl·lula APC. Les cues citoplasmàtiques de CD84 es fosforilarien i s'associarien amb els adaptadors de la família de SAP. En la cèl·lula T, la cua

citoplasmàtica de CD84 seria fosforilada per LcK i interaccionaria amb l'adaptador SAP mitjançant la tirosina 262 (36, 108), mentre que en la cèl·lula APC la cua citoplasmàtica de CD84 fosforilada interaccionaria amb EAT-2 mitjançant les tirosines 262 i 298 (91, 102, 108). Aquests adaptadors podrien reclutar src cinases que iniciarien la cascada de senyalització i acabarien modulant la secreció de citocines Th1/Th2, de la mateixa manera que es dona amb el CD150 (87, 88). Les cues citoplasmàtiques de CD84 reclutarien un grup de molècules de manera singular. Aquestes interaccions intracel·lulars vindrien determinades per la distribució dels motius tirosina al llarg de la cua citoplasmàtica, per la mateixa seqüència d'AA del motiu i els AA que l'envolten. Com a conseqüència, el receptor CD84 podria donar lloc a un senyal diferent a la resta de molècules de la família del CD150. Trets particulars de la senyalització de CD84 com ara la fosforilació de la seva cua citoplasmàtica independent de SAP, el requeriment d'una activació prèvia o la presència de LcK en la cèl·lula T perquè es doni la fosforilació de CD84 (108), la interacció diferencial de SAP amb els diferents membres de la família del CD150 com ho demostra el fet que la mutació T53I en SAP permet l'associació de l'adaptador amb CD84 i CD150 però no amb CD229 o CD244 (69) corroboren aquesta hipòtesi.

La senyalització induïda pel receptor CD84 podria estar involucrada en el fenotip dels pacients amb XLP, juntament amb els restants membres de la família del CD150 que interaccionen amb SAP.

## **2. L'expressió de CD84: extensió del rang d'interacció homofílica**

El CD84 es troba expressat en limfòcits B, plaquetes, cèl·lules dendrítiques i monòcits (99, 103). Nosaltres observem que l'expressió de CD84 es troba altament regulada al llarg dels estats de diferenciació i maduració de les cèl·lules B i T i es veu incrementada després de la seva activació. S'observa un decrement de l'expressió de CD84 al llarg de la maduració dels timòcits. Els majors nivells del CD84 en limfòcits es detecten en cèl·lules CD45RO memòria/efectores. No s'observen diferències significatives en l'expressió de CD84 entre les cèl·lules memòria central i memòria efectora. Trobem lleugeres diferències en l'expressió del CD84 entre les cèl·lules B naïve CD19+CD27- i les memòria CD19+CD27+. No obstant això, un treball recent

mostra que les cèl·lules B que expressen elevats nivells de CD84 tenen més mutacions somàtiques que les cèl·lules B amb menor expressió de CD84, indicant així la seva expressió preferencial en cèl·lules B memòria (102). A més a més, el CD84 es troba altament expressat en altres cèl·lules presentadores antigèniques (APCs), tals com monòcits i cèl·lules dendrítiques, en les quals hi ha un augment de l'expressió per estímuls maduratius. Una vegada les cèl·lules dendrítiques són activades per estímuls inflamatoris o agents infecciosos, es diferencien cap a cèl·lules dendrítiques madures, incrementant l'expressió de molècules coestimuladores (CD40, CD80, CD86) i molècules d'adhesió (CD54 i CD58). Aquestes cèl·lules migren cap als òrgans limfoides i tenen la capacitat d'activar limfòcits quiescents, naïve i memòria (163, 164). Així doncs, la interacció homofílica pot jugar un paper crític en la interacció entre cèl·lules T memòria/efectores i les APC.

La interacció homofílica del CD84 es pot estendre a altres tipus cel·lulars que expressin elevats nivells de CD84. Recentment, la seva expressió ha estat descrita en la majoria dels granulòcits (104). Nosaltres trobem grans nivells de CD84 en mastòcits, eosinòfils, basòfils i una menor expressió en neutròfils. La majoria d'aquestes cèl·lules comparteixen molts fenotips comuns, incloent-hi molècules implicades en l'adhesió cel·lular com ara el VLA-4 (CD49-d), ICAM-1 (CD54), ICAM-3 (CD50), SAF-2 o migració, com ara els receptors de factors quimiotàctics CCR3 i C3aR (165). La senyalització mitjançada per CD84 podria regular funcions efectores en aquestes cèl·lules.

El fet de trobar una elevadíssima expressió de CD84 en plaquetes ens porta a preguntar-nos quina importància funcional pot tenir aquesta molècula en fenòmens com l'agregació plaquetaria. Seria força interessant estudiar el possible efecte del CD84 en fenòmens com la trombosi i si aquests es poden veure afectats per la presència de la proteïna de fusió CD84-Fc. Així doncs es podria pensar en altres vies d'agregació a part de les descrites per molècules d'adhesió com ara integrines.

Un altre tipus de cèl·lules efectores mitjanceres de la resposta cel·lular tipus Th2 són els mastòcits. Aquestes cèl·lules expressen elevats nivells de CD84, tot i això, els mastòcits són una població força heterogènia i l'expressió de CD84 podria variar en funció de la localització d'aquestes cèl·lules. La presència de motius tirosines en la cua

citoplasmàtica del CD84, que podrien ser llocs d'unió a la cinasa src Lyn expressada en mastòcits, fa pensar que sigui una molècula interessant per a proporcionar senyals a l'interior de la cèl·lula que puguin modular la secreció de grànuls (Ex. Histamina, peroxidasa), de mitjancers lipídics (Ex. leucotriens) i/o de citocines (Ex. IL-4, IL-13). Fins l'actualitat només un altre receptor de la família del CD150 ha estat descrit en aquestes cèl·lules: el CD48. Recentment, s'ha observat que mastòcits i macròfags, mitjançant el receptor CD48, poden reconèixer i unir-se àvidament a diverses lectines FimH expressades en bacteries entèriques (56). Aquesta interacció de CD48 amb FimH indueix per una banda, l'alliberament de factors proinflamatoris com el TNF- $\alpha$  i per una altra, el procés d'endocitosis de la bactèria.

El CD84, altament expressat en monòcits, decreix en ésser estimulat amb LPS, possiblement mimetitzant la resposta dels macròfags en teixit un cop es troben amb els patògens que han de fagocitar. Per tant, resulta atractiu pensar que CD84 podria estar involucrat en els processos de fagocitosis i al mateix temps de secreció de factors proinflamatoris. D'aquesta manera es podria començar a dibuixar una nova funció d'aquestes molècules en el sistema immune adquirit.

### 3. La interacció homofílica del CD229 (Ly9)

En aquest treball es demostra que el CD229 interacciona de forma homotípica mitjançant el domini Ig variable N-terminal. En aquest domini identifiquem tres residus crítics per tal que es doni aquesta interacció. Observem que la proteïna soluble CD229-Ig interacciona amb cèl·lules transfectades amb el gen del CD229, però no amb cèl·lules transfectades amb el cDNA d'altres membres de la família o molècules relacionades com el CD2 i el CD58. Els nostres resultats són consistents amb les observacions de que els únics lligands coneguts de la família són altres membres de la mateixa família. Moltes de les interaccions dintre d'aquesta família es donen de forma homotípica (CD150-CD150, CD84-CD84, CS1-CS1 i NTB-A-NTB-A) (47, 49, 159), amb l'excepció del CD48, que s'uneix amb el CD244 (42). Tant en humà com en ratolí, el CD229 interacciona amb ell mateix. A més a més, la interacció CD229-CD229 no es troba restringida entre espècies ja que CD229 humà pot unir-se al murí i *vice versa*.

Aquests resultats demostren que els residus responsables de la interacció deuen estar preservats en ambdues espècies.

Les anàlisis estructurals, fent servir mutants amb dominis Ig deleccionats, demostren que la interacció homofílica de CD229 està mitjançada pel domini N-terminal. En el cas de que altres dominis Ig estiguessin directament involucrats en aquesta interacció caldria esperar una capacitat residual d'interacció amb la proteïna de fusió CD229-Fc. No obstant això, la interacció de la proteïna soluble és completament abolida en els assaigs amb el CD229 amb el primer domini deleccionat. A més a més, les mutacions puntuals d'un únic residu localitzat en el primer domini aboleixen completament la interacció homofílica del CD229. Resultat que és consistent amb les interaccions estudiades en altres membres de la família del CD150, on els dominis N-terminal són importants perquè es doni la interacció.

Gràcies a la homologia de la seqüència del CD229 amb altres proteïnes que han estat ben caracteritzades, moltes de les propietats de la seva estructura tridimensional poden ser predites. El model construït per l'anàlisi del domini N-terminal de CD229 fa servir l'estructura coneguda del CD2 i del CD58 com a guia. Hi ha 9 làmines  $\beta$ , amb les làmines A, B, E i D en una fulla i les làmines C, C' C'' F i G en la fulla oposada. Les mutacions puntuals realitzades en l'estructura del CD2 i CD58, han demostrat que els AA carregats localitzats en la cara GFCC'C'' són crítics per tal que es doni la interacció. Les anàlisis estructurals confirmen que aquesta interacció es troba dominada per contactes electrostàtics entre les superfícies d'interacció de les dues molècules, exhibint una complementarietat electrostàtica considerable. Els nostres resultats demostren que els residus de la cara GFCC'C'' de la regió N-terminal també tenen un paper important en la interacció homofílica de CD229. Les mutacions de residus carregats E27 i E29 localitzats en el "loop" B-C i la mutació de l'AA carregat positivament R89 en el "loop" F-G, aboleixen la interacció homofílica del CD229. El fet que no s'observin modificacions en la interacció dels diferents anticossos monoclonals contra el CD229 assajats sobre les diferents molècules mutades, fa pensar que la presència de possibles alteracions estructurals sigui força improbable. Nosaltres especulem que els residus carregats negativament (E27 i E29) del receptor deuen interaccionar amb el residu carregat positivament (R89) del contra-receptor. Tot i així, caldria obtenir el cristall del CD229 interaccionant amb ell mateix per confirmar com

interaccionen realment aquests residus a nivell molecular. Com en el cas de la interacció de CD2 amb CD58, es suggereix una interacció de “cap contra cap” entre cèl·lules adjacents que expressin CD229, de la mateixa manera que es va suggerir per la interacció homofíllica del CD84. El primer domini Ig variable del CD229 presenta una gran homologia amb el tercer domini d'aquesta molècula, però observem que AAs que són essencials per tal que es doni la interacció no es mantenen conservats. Així doncs, l'AA R89 carregat positivament del primer domini correspon a un residu glutàmic carregat negativament en el tercer domini, per tant en cas d'existir accessibilitat per interaccionar amb aquest domini, la càrrega negativa d'aquest AA podria repel·lir la interacció.

De manera sorprenent, mutacions en el residu R44 localitzat en el “loop” C'C” augmenten la interacció de CD229 amb ell mateix, un fenomen que ja ha estat descrit per altres parelles lligand-receptor (166). Totes aquestes dades ens fan pensar en un model on els residus carregats formen una xarxa de ponts salins, enllaços febles, que assegurin una elevada especificitat i a més a més contribueixen a l'energia d'interacció entre lligand-receptor, ja que les possibles interaccions desfavorables entre residus carregats són neutralitzades un cop es dona la formació del complex lligand-receptor. A més a més, la baixa superfície de contacte lligand-receptor afavoreix el contacte dinàmic amb constants de dissociació-associació elevades.

La interacció de CD229-Ig s'observa únicament en cèl·lules transfectades amb una elevada expressió de CD229, indicant que la seva afinitat és molt baixa. No obstant això, la interacció de CD229 és molt específica ja que només interacciona amb ell mateix i no amb altres membres de la família del CD150. Les afinitats baixes són una característica comú entre els receptors de la SFIg que interaccionen de manera homotípica, incloent-hi el CD150 (KD de 200  $\mu$ M). Aquestes interaccions són destacables per les seves elevades constants cinètiques d'associació i disssociació que mostren el ràpid intercanvi de parelles lligand-receptor entre cèl·lules veïnes. Això permet a la cèl·lula formar i trencar ràpidament contactes, conferint plasticitat a les àrees de contacte entre cèl·lules i facilitant el ràpid rastreig de les proteïnes exposades en la membrana cel·lular adjacent en la recerca de contrareceptors. 167, 168).



#### 4. L'expressió de CD229 (Ly9)

De totes les molècules de la família del CD150, el receptor CD229 és el que mostra un patró d'expressió més restringit. Així doncs, el CD229 s'expressa en cèl·lules T i B madures, en timòcits i lleugerament en cèl·lules NK. No observem, però, expressió en altres cèl·lules del sistema hematopoietic tals com monòcits, granulòcits, plaquetes i cèl·lules vermelles. L'expressió de CD229 en timòcits s'incrementa amb la maduració, ja que els nivells més elevats els trobem en timòcits CD4 o CD8. No s'observen diferències significatives entre cèl·lules T memòria i cèl·lules naïve, de manera contrària a altres membres de la família com el CD150 i el CD84. L'activació de cèl·lules T amb anti-CD3 o PHA no afecta a l'expressió de CD229, mentre que el PMA incrementa lleugerament l'expressió en cèl·lules B. La majoria de les línies cel·lulars T i B expressen CD229, mentre que les línies mielomonocítiques, la línia YT de cèl·lules NK i la línia HMC-1 de mastòcits no expressen CD229. Tot i això, un gran nombre de leucèmies mioblàstiques agudes expressen CD229, la qual cosa indica que algunes cèl·lules d'origen mieloid poden expressar CD229 (24).

#### 5. El receptor CD229 i la sinapsi immunològica T-B

En el procés de reconeixement del MHC-pèptid, exposat en la membrana de la cèl·lula presentadora d'antigen (APC), per part del complex TCR de la cèl·lula T, es produeix un reordenament molecular a les membranes d'ambdues cèl·lules (APC i T) per formar l'anomenat complex supramolecular d'activació (SMAC) (169). Un cop es dona aquest reordenament molecular, la zona de contacte entre la cèl·lula T i la cèl·lula APC rep el nom de sinapsi immunogènica (SI). La SI madura comprèn un complex supramolecular d'activació central (cSMAC), on trobem el TCR-pèptid-MHC entre altres molècules, i un complex supramolecular d'activació perifèric (pSAMC) on es localitzen molècules com ara LFA-1 interaccionant amb ICAM-1 (169). Recentment, s'ha descrit la presència de CD150, CD244 i SAP en la sinapsi immunològica (170, 94). Per explorar la rellevància funcional de la interacció homofílica de CD229 hem analitzat la localització de CD229 en la formació de la sinapsi immunològica. La sinapsi s'estableix i és mantinguda gràcies a les interaccions de glicoproteïnes expressades en la superfície de cèl·lules adjacents. Les interaccions homofíliques de baixa afinitat

normalment s'acumulen a les superfícies de contacte entre cèl·lules. Aquests canvis en la distribució cel·lular incrementen l'avidesa i porten a la formació d'agregats, incrementant el nombre de receptors disponibles en els llocs d'interacció entre cèl·lules. Així doncs la mobilitat lateral dels receptors i l'acumulació de múltiples interaccions lligand-receptor és requerida pel desenvolupament d'una adhesió cel·lular apreciable. Tanmateix, aquestes molècules no només tenen la funció d'adhesió sinó que a més a més transmeten senyals a l'interior de la cèl·lula. L'habilitat per segregar receptors dona un mecanisme per la compartimentalització dels components amb capacitat de senyalitzar cap a l'interior de la cèl·lula, concentrant certs components en determinades zones de contacte entre cèl·lules i excloent-hi aquelles amb activitat reguladora negativa.

Els nostres resultats demostren que CD229 es redistribueix a les zones de contacte entre la cèl·lula T i la cèl·lula APC en presència d'enterotoxina (SEE). La redistribució s'observa tant en la cèl·lula T com en la cèl·lula B. A més a més, la presència de CD229 en la cèl·lula B afecta la relocalització de CD229 en la cèl·lula T, indicant el paper de la interacció homofílica de CD229 en la redistribució cel·lular. No obstant això, la interacció homofílica del CD229 no és requerida per a la relocalització del CD3 en la sinapsi immunològica. L'acumulació del CD229 és més evident en la perifèria de la zona de contacte, envoltant l'agregat de molècules de CD3. La segregació molecular de CD229 es pot explicar per la estructura de quatre dominis Ig de la molècula, mentre que la zona central conté molècules amb dos dominis Ig, i això pot ser important per mantenir la distància correcta d'interacció entre dos cèl·lules. Consistent amb aquests resultats trobem que la interacció del CD2 amb formes allargades del CD48 inhibeixen significativament el reconeixement immune (171). Recentment, el nostre grup ha descrit la interacció de CD229 amb els adaptadors AP-2 i Grb-2. Aquestes interaccions regulen la internalització de la molècula CD229 (130, Martin. JI. 05. Inpress). Tanmateix, en limfòcits de sang perifèrica, la colligació del CD3 i CD229 dona lloc a una disminució en la fosforilació de Erk i en la producció de IFN- $\gamma$  quan es compara amb l'estimulació amb anti-CD3 (Martin. JI. 05. In press). Així doncs, aquests experiments apuntarien cap a un paper inhibitor del CD229 en la resposta antigènica de la cèl·lula T.

La generació d'una resposta humoral contra la majoria d'antígens proteics requereix de la col·laboració entre la cèl·lula T CD4 i la cèl·lula B en els òrgans limfoides

secundaris. Aquesta col·laboració T-B es dona primer en les zones T i posteriorment en els folicles de cèl·lules B. Les cèl·lules circulants B naïve entren en els òrgans limfoides secundaris on migren cap a la regió folicular per posar-se en contacte amb els antígens estranys. La senyalització induïda per la interacció del receptor de cèl·lula B (BCR) amb l'antigen rescata a la cèl·lula B de la mort. La cèl·lula B internalitza i processa l'antigen proteic reconegut pel BCR, migrant cap a la interfase entre el folicle i la zona T. És en aquesta zona on la cèl·lula B presentarà l'antigen processat unit al MHCII a la cèl·lula Th CD4. Al mateix temps, la cèl·lula B augmenta l'expressió de molècules com el CD80 i CD86 per afavorir una presentació antigènica efectiva. L'activació de la cèl·lula Th CD4 per part de la cèl·lula B, incrementa l'expressió de receptors coestimuladors a la membrana de la cèl·lula T CD4 com ara el CD40L, el OX40 o el ICOS, i induïx la secreció de citoquines com IL-4, IL-10 i IL-21 que promouen la proliferació i diferenciació de la cèl·lula B a cèl·lula secretora d'anticossos. En aquest punt, la cèl·lula B es diferencia cap a cèl·lules de vida curta secretores de Ig o migra cap al folicle i forma un centre germinal. Tanmateix, la cèl·lula B segueix interaccionant amb cèl·lules dendrítiques foliculars o cèl·lules Th foliculars per donar lloc a cèl·lules plasmàtiques de vida llarga que continuament secreten Ig o cèl·lules B memòria que ràpidament produeixen anticossos amb una nova exposició a l'antigen. Aquestes interaccions B-T promouen el canvi isotípic i l'increment de mutacions somàtiques en els gens de les Ig. El CD229 també s'ha trobat altament expressat, juntament amb CD84 i l'adaptador SAP, en cèl·lules Th foliculars ( $T_{FH}$ ) (105). El fet que SAP sigui indispensable per a la correcta diferenciació a cèl·lules plasmàtiques de vida llarga i cèl·lules memòria, fa pensar que molècules de membrana que s'associïn a SAP i que es trobin altament expressades en cèl·lules B i T, com ara el CD84 i el CD229, siguin excel·lents candidates per intervenir en aquesta senyalització T-B. El CD84 i CD229, mitjançant interaccions homofíliques, podrien conduir cap la correcta activació de la cèl·lula B.

Recentment, s'ha començat a identificar els mecanismes pels quals SAP podria regular els senyals d'ajut de la cèl·lula T CD4 a la cèl·lula B. En cèl·lules T CD4 de pacients de XLP s'ha observat una secreció reduïda de IL-10, citocina que és un potent factor de creixement i diferenciació de cèl·lules B. A més a més, un cop estimulades aquestes cèl·lules no s'observa un increment de l'expressió del receptor ICOS, un potent inductor de la secreció de IL-10 (Cindy S Ma, JCI, 05). Per tant, podríem especular una

via de senyalització iniciada per la interacció dels receptors de la família del CD150 en la sinapsi immunològica (T-B). La fosforilació dels motius tirosina de la cua citoplasmàtica dels receptors de la família CD150 i la interacció amb la família d'adaptadors de SAP. Com a resultat es dona un increment de l'expressió de ICOS en la cèl·lula T que interacciona amb el seu lligand, el ICOSL, en la cèl·lula B. Aquesta última interacció induïx la secreció de IL-10 per part de la cèl·lula T (citocina que induïx la diferenciació i proliferació de la cèl·lula B). Tanmateix, no podem descartar que l'expressió d'altres molècules implicades en l'ajut T-B estiguin alterades en els pacients de XLP.

## **6. L'expressió de CD150 (SLAM )**

CD150 va ésser descrit com un marcador d'activació per cèl·lules B i cèl·lules T (111, 21). El CD150 també es troba present en timòcits (123, 21). Nosaltres mostrem que l'expressió de CD150 es dona en estadis primerencs de desenvolupament de la cèl·lula T, ja que en timòcits CD4-CD8- es detecta CD150. Però els nivells més elevats de CD150 en timòcits es van trobar en CD4+CD8+, on s'expressa una major quantitat de SAP. A més a més, el CD150 fosforilat s'associa amb SAP i Fyn en aquestes cèl·lules (88, 87). L'expressió de CD150 decreix quan hi ha la maduració cap a CD4+ o CD8+, expressant nivells semblants als trobats en els limfòcits de sang perifèrica. Al contrari d'alguns articles, en els quals CD150 no es troba en cèl·lules T i B no activades de sang perifèrica, nosaltres observem que més del 80% de cèl·lules expressen CD150 (123, 111, 21). Tot i que, Punnonem i et al. també observen expressió de CD150 en cèl·lules B de sang perifèrica (26). Nosaltres també confirmem l'elevada expressió de CD150 en cèl·lules T memòria (111, 21). Observem que l'expressió de CD150 en cèl·lules T memòria central és superior que en cèl·lules memòria efectora. Per contra, es va trobar que els nivells de CD150 eren inferiors en cèl·lules B memòria que en les B naïve. Els nostres resultats són diferents als descrits per Feldman et al, els quals no observen expressió de CD150 en cèl·lules CD19+CD27-. L'expressió de CD150 s'incrementa de forma exagerada durant l'activació dels limfòcits. A més a més, observem que l'expressió de CD150 no es restringeix exclusivament a cèl·lules B i T, sinó que a més a més es troba en monòcits activats i en cèl·lules dendrítiques madures.

Però al contrari que CD84, l'expressió de CD150 estava absent en monòcits sense activar o en cèl·lules dendrítiques immadures. Aquests resultats demostren que CD150, com el CD83, és un marcador de maduració de cèl·lules dendrítiques (119, 118). Aquests resultats reforcen la hipòtesi de que CD150 a més de la interacció homofilica de cèl·lules T amb cèl·lules B, també és important per a la interacció amb altres APCs. El CD150, ha estat identificat com a receptor del virus del xarampió, l'expressió de CD150 en monòcits i DC explica la susceptibilitat d'aquestes cèl·lules davant la infecció del virus del xarampió.

## 7. L'expressió de CD244 (2B4)

Els nostres resultats confirmen la presència de CD244 en totes les cèl·lules NK, en una subpoblació de limfòcits CD8<sup>+</sup>, en els monòcits i en la majoria dels basòfils. Per altra banda, en els limfòcits T CD4<sup>+</sup> i en cèl·lules B no observem expressió de CD244, tampoc detectem alteracions significatives dels nivells d'expressió de CD244 en limfòcits T activats amb PHA o anti-CD3. Tanmateix, en aquest treball es descriu per primera vegada l'expressió de CD244 en eosinòfils i en estadis primerencs de la maduració dels timòcits. Tot plegat, indica un patró particular d'expressió pel CD244 i assenyala un rang de funcions més ampli que el prèviament descrit.

Així doncs, el receptor CD244 sembla estar associat amb les cèl·lules efectores del sistema immune, la majoria de les quals tenen la capacitat d'induir una resposta immune per degranulació. Els limfòcits CD8<sup>+</sup> amb major capacitat citotòxica, expressen uns majors nivells de CD244. Així ho demostren els nostres estudis, on la subpoblació CD8<sup>+</sup> memòria efectora (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>) expressen uns nivells alts de CD244, fet que es correlaciona amb la major presència de granzime B, perforina i una ràpida producció d'IFN- $\gamma$  en resposta a estímuls com PMA (136). En les cèl·lules naïve CD8 pràcticament no detectem la presència de CD244. De manera semblant, en cèl·lules NK, els anticossos contra CD244 indueixen la citotoxicitat, la producció de IFN- $\gamma$  i la degranulació (143, 135, 132). Aquesta resposta és no dependent de MHC, com és el cas d'altres famílies de receptors de cèl·lules NK com ara NKR-P1 (156). El CD244 sembla actuar com a co-receptor en cèl·lules NK, modulant la seva

funció activadora o inhibidora en funció de dos factors: la colligació amb altres receptors, com ara NCRs o KIRs, i la presència o absència de SAP (145, 145, 84, 139).

Recentment, els nostres resultats sobre l'expressió de CD244 en eosinòfils han estat confirmats pel grup de Levi-Schaffer, on es descriu el paper de CD244 en l'alliberament de peroxidasa, la secreció de IFN- $\gamma$  i de IL-4, i la citotoxicitat. Però, malgrat que SAP es troba present en aquestes cèl·lules, no s'ha demostrat que els efectes mitjançats pel CD244 siguin SAP dependents (75). Tot i que no s'ha descrit el paper de CD244 en basòfils, probablement aquesta molècula actui induint la degranulació i afavorint la secreció de citocines. Una altra subpoblació cel·lular amb una important resposta efectora mitjançada per la degranulació són els mastòcits. Curiosament, en aquestes cèl·lules no s'ha detectat CD244, però un article recent ha demostrat la presència de CD244 en mastòcits derivats de moll d'os de ratolí (Kubota K, *Microbial immunol*, 02). Tanmateix, el CD84 es troba altament expressat en mastòcits i podria intervenir en el procés de degranulació.

Les cèl·lules T $\gamma\delta$  efectores expressen CD244 i la lligació de CD244 dona lloc a la producció de citocines com IFN- $\gamma$  i IL-2, i inducció de proliferació (149). I per últim, trobem la presència de CD244 en monòcits sense que ningú hagi estat capaç d'associar-li una funció.

S'ha descrit el possible paper inhibidor del CD244 en els primers estadis de maduració de les cèl·lules NK, quan apareixen els NCRs (NKp46 i NKp30), però encara no són presents els receptors inhibidors (KIRs) que han d'interaccionar amb l'HLA de classe I. D'aquesta manera, el CD244 en aquests estadis primerencs de maduració, on SAP no és present, podria assumir el paper dels receptors inhibidors (145).

Els nostres resultats mostren una distribució de CD84, CD150, CD244 i CD229 en el sistema hematopoiètic més àmplia que la prèviament descrita, suggerint la regulació d'un ampli ventall d'efectes biològics. Aquests receptors deuen de mitjançar diverses funcions dependent de la seva expressió i de la interacció amb molècules citoplasmàtiques com SAP i EAT-2. L'expressió heterogènea d'aquests receptors indiquen que deuen contribuir tant a la regulació de la resposta immune innata, com a la resposta adaptativa.

## ***5. CONCLUSIONS***





El conjunt de resultats exposats en aquesta Tesi permet concloure que els receptors leucocitaris CD84 i CD229 interaccionen homofilicament i aquesta interacció té una rellevància funcional en l'activació limfocitària.

La caracterització de les interaccions de CD84 i CD229 demostra que els dominis N-terminals són els responsables d'aquesta interacció. A més a més, en el cas del receptor CD229, les mutacions dels residus carregats E27 i E29 localitzats en el "loop" B-C i la mutació de l'aminoàcid carregat positivament R89 en el "loop" F-G del domini Ig N-terminal aboleixen la interacció homofílica.

El receptor CD84 es troba àmpliament distribuït en les poblacions leucocitàries. S'expressa en plaquetes, cèl·lules dendrítiques, monòcits, mastòcits, granulòcits, cèl·lules B i T. Aquests estudis assenyalen un ampli rang d'interaccions homofíliques pel CD84.

El receptor CD229 mostra un patró d'expressió força restringit en cèl·lules B i T. A més a més, el receptor CD229 es localitza en la sinapsi immunològica T-B. Fet que està d'acord amb la capacitat d'aquesta molècula per modular l'activació limfocitària.

Els nostres resultats mostren una distribució de CD84, CD150, CD244 i CD229 en el sistema hematopoiètic més àmplia que la prèviament descrita, suggerint la regulació d'un ampli ventall d'efectes biològics tant en el sistema immune innat com en l'adquirit.



## ***6. BIBLIOGRAFIA***



1. Lanier, L. L. 2001. Face off--the interplay between activating and inhibitory immune receptors. *Curr.Opin.Immunol.* 13:326-331.
2. Scharenberg, A. M. and J. P. Kinet. 1996. The emerging field of receptor-mediated inhibitory signaling: SHP or SHIP? *Cell* 87:961-964.
3. Veillette, A., S. Latour, and D. Davidson. 2002. Negative regulation of immunoreceptor signaling. *Annual Review of Immunology* 20:669-707.
4. Engel, P., M. J. Eck, and C. Terhorst. 2003. The SAP and SLAM families in immune responses and X-linked lymphoproliferative disease. *Nat.Rev.Immunol.* 3:813-821.
5. Barclay, A. N. 1999. Ig-like domains: Evolution from simple interaction molecules to sophisticated antigen recognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:14672-14674.
6. Halaby, D. M. and J. P. E. Mornon. 1998. The immunoglobulin superfamily: An insight on its tissular, species, and functional diversity. *Journal of Molecular Evolution* 46:389-400.
7. Halaby, D. M., A. Poupon, and J. P. Mornon. 1999. The immunoglobulin fold family: sequence analysis and 3D structure comparisons. *Protein Engineering* 12:563-571.
8. Blumbach, B., B. Diehl-Seifert, J. Seack, R. Steffen, I. M. Muller, and W. E. G. Muller. 1999. Cloning and expression of new receptors belonging to the immunoglobulin superfamily from the marine sponge *Geodia cydonium*. *Immunogenetics* 49:751-763.
9. Barclay, A. N. 2003. Membrane proteins with immunoglobulin-like domains--a master superfamily of interaction molecules. *Semin.Immunol.* 15:215-223.
10. Litman, G. W., N. A. Hawke, and J. A. Yoder. 2001. Novel immune-type receptor genes. *Immunological Reviews* 181:250-259.
11. Edelman, G. M. 1973. Antibody Structure and Molecular Immunology. *Science* 180:830-840.
12. Smith, D. K. and H. Xue. 1997. Sequence profiles of immunoglobulin and immunoglobulin-like domains. *Journal of Molecular Biology* 274:530-545.
13. Williams, A. F. and A. N. Barclay. 1988. The Immunoglobulin Superfamily - Domains for Cell-Surface Recognition. *Annual Review of Immunology* 6:381-405.
14. Harpaz, Y. and C. Chothia. 1994. Many of the Immunoglobulin Superfamily Domains in Cell-Adhesion Molecules and Surface-Receptors Belong to A New Structural Set Which Is Close to That Containing Variable Domains. *Journal of Molecular Biology* 238:528-539.

15. Bork, P., L. Holm, and C. Sander. 1994. The Immunoglobulin Fold - Structural Classification, Sequence Patterns and Common Core. *Journal of Molecular Biology* 242:309-320.
16. Wang, J. H., R. B. Pepinsky, T. Stehle, J. H. Liu, M. Karpusas, B. Browning, and L. Osborn. 1995. The Crystal-Structure of An N-Terminal 2-Domain Fragment of Vascular Cell-Adhesion Molecule-1 (Vcam-1) - A Cyclic Peptide-Based on the Domain-1 C-D Loop Can Inhibit Vcam-1-Alpha-4 Integrin Interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:5714-5718.
17. Wang, J. H. and T. A. Springer. 1998. Structural specializations of immunoglobulin superfamily members for adhesion to integrins and viruses. *Immunological Reviews* 163:197-215.
18. Davis, S. J., S. Ikemizu, E. J. Evans, L. Fugger, T. R. Bakker, and P. A. van der Merwe. 2003. The nature of molecular recognition by T cells. *Nat.Immunol.* 4:217-224.
19. Rudd, P. M., T. Elliott, P. Cresswell, I. A. Wilson, and R. A. Dwek. 2001. Glycosylation and the immune system. *Science* 291:2370-2376.
20. Davis, S. J., S. Ikemizu, M. K. Wild, and P. A. van der Merwe. 1998. CD2 and the nature of protein interactions mediating cell-cell recognition. *Immunological Reviews* 163:217-236.
21. Sidorenko, S. P. and E. A. Clark. 1993. Characterization of a cell surface glycoprotein IPO-3, expressed on activated human B and T lymphocytes. *J.Immunol.* 151:4614-4624.
22. Wong, Y. W., A. F. Williams, S. F. Kingsmore, and M. F. Seldin. 1990. Structure, expression, and genetic linkage of the mouse BCM1 (OX45 or Blast-1) antigen. Evidence for genetic duplication giving rise to the BCM1 region on mouse chromosome 1 and the CD2/LFA3 region on mouse chromosome 3. *J.Exp.Med.* 171:2115-2130.
23. Kingsmore, S. F., C. A. Souryal, M. L. Watson, D. D. Patel, and M. F. Seldin. 1995. Physical and genetic linkage of the genes encoding Ly-9 and CD48 on mouse and human chromosomes 1. *Immunogenetics* 42:59-62.
24. de la Fuente, M. A., V. Tovar, N. Villamor, N. Zapater, P. Pizcueta, E. Campo, J. Bosch, and P. Engel. 2001. Molecular characterization and expression of a novel human leukocyte cell-surface marker homologous to mouse Ly-9. *Blood* 97:3513-3520.
25. Stepp, S. E., J. D. Schatzle, M. Bennett, V. Kumar, and P. A. Mathew. 1999. Gene structure of the murine NK cell receptor 2B4: presence of two alternatively spliced isoforms with distinct cytoplasmic domains. *Eur.J.Immunol.* 29:2392-2399.
26. Punnonen, J., B. G. Cocks, J. M. Carballido, B. Bennett, D. Peterson, G. Aversa, and J. E. De Vries. 1997. Soluble and membrane-bound forms of

- signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) induce proliferation and Ig synthesis by activated human B lymphocytes. *J.Exp.Med.* 185:993-1004.
27. Kumaresan, P. R., S. E. Stepp, M. Bennett, V. Kumar, and P. A. Mathew. 2000. Molecular cloning of transmembrane and soluble forms of a novel rat natural killer cell receptor related to 2B4. *Immunogenetics* 51:306-313.
  28. Tovar, V., M. A. de la Fuente, P. Pizcueta, J. Bosch, and P. Engel. 2000. Gene structure of the mouse leukocyte cell surface molecule Ly9. *Immunogenetics* 51:788-793.
  29. Kingsbury, G. A., L. A. Feeney, Y. Nong, S. A. Calandra, C. J. Murphy, J. M. Corcoran, Y. Wang, M. R. Prabhu Das, S. J. Busfield, C. C. Fraser, and J. L. Villevall. 2001. Cloning, expression, and function of BLAME, a novel member of the CD2 family. *J.Immunol.* 166:5675-5680.
  30. Zhang, W., T. Wan, N. Li, Z. Yuan, L. He, X. Zhu, M. Yu, and X. Cao. 2001. Genetic approach to insight into the immunobiology of human dendritic cells and identification of CD84-H1, a novel CD84 homologue. *Clin.Cancer Res.* 7:822s-829s.
  31. Yokoyama, S., D. Staunton, R. Fisher, M. Amiot, J. J. Fortin, and D. A. Thorleylawson. 1991. Expression of the Blast-1 Activation/Adhesion Molecule and Its Identification As Cd48. *Journal of Immunology* 146:2192-2200.
  32. Nichols, K. E., C. S. Ma, J. L. Cannons, P. L. Schwartzberg, and S. G. Tangye. 2005. Molecular and cellular pathogenesis of X-linked lymphoproliferative disease. *Immunological Reviews* 203:180-199.
  33. Veillette, A. and S. Latour. 2003. The SLAM family of immune-cell receptors. *Curr.Opin.Immunol.* 15:277-285.
  34. Sayos, J., C. Wu, M. Morra, N. Wang, X. Zhang, D. Allen, S. van Schaik, L. Notarangelo, R. Geha, M. G. Roncarolo, H. Oettgen, J. E. De Vries, G. Aversa, and C. Terhorst. 1998. The X-linked lymphoproliferative-disease gene product SAP regulates signals induced through the co-receptor SLAM. *Nature* 395:462-469.
  35. Tangye, S. G., S. Lazetic, E. Woollatt, G. R. Sutherland, L. L. Lanier, and J. H. Phillips. 1999. Cutting edge: human 2B4, an activating NK cell receptor, recruits the protein tyrosine phosphatase SHP-2 and the adaptor signaling protein SAP. *J.Immunol.* 162:6981-6985.
  36. Sayos, J., M. Martin, A. Chen, M. Simarro, D. Howie, M. Morra, P. Engel, and C. Terhorst. 2001. Cell surface receptors Ly-9 and CD84 recruit the X-linked lymphoproliferative disease gene product SAP. *Blood* 97:3867-3874.
  37. Bottino, C., M. Falco, S. Parolini, E. Marcenaro, R. Augugliaro, S. Sivori, E. Landi, R. Biassoni, L. D. Notarangelo, L. Moretta, and A. Moretta. 2001. NTB-A, a novel SH2D1A-associated surface molecule contributing to the

- inability of natural killer cells to kill Epstein-Barr virus-infected B cells in X-linked lymphoproliferative disease. *J.Exp.Med.* 194:235-246.
38. Fraser, C. C., D. Howie, M. Morra, Y. Qiu, C. Murphy, Q. Shen, J. C. Gutierrez-Ramos, A. Coyle, G. A. Kingsbury, and C. Terhorst. 2002. Identification and characterization of SF2000 and SF2001, two new members of the immune receptor SLAM/CD2 family. *Immunogenetics* 53:843-850.
  39. Tovar, V., J. del Valle, N. Zapater, M. Martin, X. Romero, P. Pizcueta, J. Bosch, C. Terhorst, and P. Engel. 2002. Mouse novel Ly9: a new member of the expanding CD150 (SLAM) family of leukocyte cell-surface receptors. *Immunogenetics* 54:394-402.
  40. Veillette, A. 2002. The SAP family: a new class of adaptor-like molecules that regulates immune cell functions. *Sci.STKE.* 2002:E8.
  41. Chen, R. Y., F. Relouzat, R. Roncagalli, A. Aoukaty, R. S. Tan, S. Latour, and A. Veillette. 2004. Molecular dissection of 2134 signaling: Implications for signal transduction by SLAM-related receptors. *Molecular and Cellular Biology* 24:5144-5156.
  42. Brown, M. H., K. Boles, P. A. van der Merwe, V. Kumar, P. A. Mathew, and A. N. Barclay. 1998. 2B4, the natural killer and T cell immunoglobulin superfamily surface protein, is a ligand for CD48. *J.Exp.Med.* 188:2083-2090.
  43. Latchman, Y., P. F. McKay, and H. Reiser. 1998. Identification of the 2B4 molecule as a counter-receptor for CD48. *J.Immunol.* 161:5809-5812.
  44. Kato, K., M. Koyanagi, H. Okada, T. Takanashi, Y. W. Wong, A. F. Williams, K. Okumura, and H. Yagita. 1992. CD48 is a counter-receptor for mouse CD2 and is involved in T cell activation. *J.Exp.Med.* 176:1241-1249.
  45. Azuma, M., D. Ito, H. Yagita, K. Okumura, J. H. Phillips, L. L. Lanier, and C. Somoza. 1993. B70 Antigen Is A 2Nd Ligand for Ctl4 and Cd28. *Nature* 366:76-79.
  46. Freeman, G. J., J. G. Gribben, V. A. Boussiotis, J. W. Ng, V. A. Restivo, L. A. Lombard, G. S. Gray, and L. M. Nadler. 1993. Cloning of B7-2 - A Ctl4 Counter-Receptor That Costimulates Human T-Cell Proliferation. *Science* 262:909-911.
  47. Mavaddat, N., D. W. Mason, P. D. Atkinson, E. J. Evans, R. J. Gilbert, D. I. Stuart, J. A. Fennelly, A. N. Barclay, S. J. Davis, and M. H. Brown. 2000. Signaling lymphocytic activation molecule (CDw150) is homophilic but self-associates with very low affinity. *J.Biol.Chem.* 275:28100-28109.
  48. Kumaresan, P. R., W. C. Lai, S. S. Chuang, M. Bennett, and P. A. Mathew. 2002. CS1, a novel member of the CD2 family, is homophilic and regulates NK cell function. *Mol.Immunol.* 39:1-8.
  49. Flaig, R. M., S. Stark, and C. Watzl. 2004. Cutting Edge: NTB-A Activates NK Cells via Homophilic Interaction. *J.Immunol.* 172:6524-6527.



50. Valdez, P. A., H. Wang, D. Seshasayee, C. M. van Lookeren, A. Gurney, W. P. Lee, and I. S. Grewal. 2004. NTB-A, a new activating receptor in T cells that regulates autoimmune disease. *J.Biol.Chem.* 279:18662-18669.
51. Tatsuo, H., N. Ono, K. Tanaka, and Y. Yanagi. 2000. SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature* 406:893-897.
52. Tatsuo, H. and Y. Yanagi. 2002. The morbillivirus receptor SLAM (CD150). *Microbiol.Immunol.* 46:135-142.
53. Masse, N., M. Ainouze, B. Neel, T. F. Wild, R. Buckland, and J. P. M. Langedijk. 2004. Measles virus (MV) hemagglutinin: Evidence that attachment sites for MV receptors SLAM and CD46 overlap on the globular head. *Journal of Virology* 78:9051-9063.
54. Masse, N., T. Barrett, C. P. Muller, T. F. Wild, and R. Buckland. 2002. Identification of a second major site for CD46 binding in the hemagglutinin protein from a laboratory strain of measles virus (MV): potential consequences for wild-type MV infection. *J.Virol.* 76:13034-13038.
55. Hahm, B., N. Arbour, and M. B. A. Oldstone. 2004. Measles virus interacts with human SLAM receptor on dendritic cells to cause immuno suppression. *Virology* 323:292-302.
56. Malaviya, R., Z. M. Gao, K. Thankavel, P. A. van der Merwe, and S. N. Abraham. 1999. The mast cell tumor necrosis factor alpha response to FimH-expressing Escherichia coli is mediated by the glycosylphosphatidylinositol-anchored molecule CD48. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:8110-8115.
57. Purtilo, D. T., C. K. Cassel, J. P. Yang, and R. Harper. 1975. X-linked recessive progressive combined variable immunodeficiency (Duncan's disease). *Lancet* 1:935-940.
58. Seemayer, T. A., T. G. Gross, R. M. Egeler, S. J. Pirruccello, J. R. Davis, C. M. Kelly, M. Okano, A. Lanyi, and J. Sumegi. 1995. X-linked lymphoproliferative disease: twenty-five years after the discovery. *Pediatr.Res.* 38:471-478.
59. Morra, M., D. Howie, M. S. Grande, J. Sayos, N. Wang, C. Wu, P. Engel, and C. Terhorst. 2001. X-linked lymphoproliferative disease: a progressive immunodeficiency. *Annu.Rev.Immunol.* 19:657-682.
60. Purtilo, D. T. and H. L. Grierson. 1991. Methods of Detection of New Families with X-Linked Lymphoproliferative Disease. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 51:143-153.
61. Sumegi, J., D. Huang, A. Lanyi, J. D. Davis, T. A. Seemayer, A. Maeda, G. Klein, M. Seri, H. Wakiguchi, D. T. Purtilo, and T. G. Gross. 2000. Correlation of mutations of the SH2D1A gene and epstein-barr virus infection with clinical phenotype and outcome in X-linked lymphoproliferative disease. *Blood* 96:3118-3125.

62. Parolini, O., B. Kagerbauer, I. Simonitsch-Klupp, P. Ambros, U. Jaeger, G. Mann, O. A. Haas, M. Morra, H. Gadner, C. Terhorst, W. Knapp, and W. Holter. 2002. Analysis of SH2D1A mutations in patients with severe Epstein-Barr virus infections, Burkitt's lymphoma, and Hodgkin's lymphoma. *Ann.Hematol.* 81:441-447.
63. Markin, R. S., J. Linder, K. Zuerlein, E. Mroczek, H. L. Grierson, B. Brichacek, and D. T. Purtilo. 1987. Hepatitis in fatal infectious mononucleosis. *Gastroenterology* 93:1210-1217.
64. Purtilo, D. T., H. L. Grierson, H. Ochs, and J. Skare. 1989. Detection of X-linked lymphoproliferative disease using molecular and immunovirologic markers. *Am.J.Med.* 87:421-424.
65. Grierson, H. and D. T. Purtilo. 1987. Epstein-Barr virus infections in males with the X-linked lymphoproliferative syndrome. *Ann.Intern.Med.* 106:538-545.
66. Howie, D., J. Sayos, C. Terhorst, and M. Morra. 2000. The gene defective in X-linked lymphoproliferative disease controls T cell dependent immune surveillance against Epstein-Barr virus. *Curr.Opin.Immunol.* 12:474-478.
67. Coffey, A. J., R. A. Brooksbank, O. Brandau, T. Oohashi, G. R. Howell, J. M. Bye, A. P. Cahn, J. Durham, P. Heath, P. Wray, R. Pavitt, J. Wilkinson, M. Leversha, E. Huckle, C. J. Shaw-Smith, A. Dunham, S. Rhodes, V. Schuster, G. Porta, L. Yin, P. Serafini, B. Sylla, M. Zollo, B. Franco, D. R. Bentley, and . 1998. Host response to EBV infection in X-linked lymphoproliferative disease results from mutations in an SH2-domain encoding gene. *Nat.Genet.* 20:129-135.
68. Nichols, K. E., D. P. Harkin, S. Levitz, M. Krainer, K. A. Kolquist, C. Genovese, A. Bernard, M. Ferguson, L. Zuo, E. Snyder, A. J. Buckler, C. Wise, J. Ashley, M. Lovett, M. B. Valentine, A. T. Look, W. Gerald, D. E. Housman, and D. A. Haber. 1998. Inactivating mutations in an SH2 domain-encoding gene in X-linked lymphoproliferative syndrome. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95:13765-13770.
69. Morra, M., M. Simarro-Grande, M. Martin, A. S. Chen, A. Lanyi, O. Silander, S. Calpe, J. Davis, T. Pawson, M. J. Eck, J. Sumegi, P. Engel, S. C. Li, and C. Terhorst. 2001. Characterization of SH2D1A missense mutations identified in X-linked lymphoproliferative disease patients. *J.Biol.Chem.* 276:36809-36816.
70. Sumegi, J., T. A. Seemayer, D. Huang, J. R. Davis, M. Morra, T. G. Gross, L. Yin, G. Romco, E. Klein, C. Terhorst, and A. Lanyi. 2002. A spectrum of mutations in SH2D1A that causes X-linked lymphoproliferative disease and other Epstein-Barr virus-associated illnesses. *Leuk.Lymphoma* 43:1189-1201.
71. Poy, F., M. B. Yaffe, J. Sayos, K. Saxena, M. Morra, J. Sumegi, L. C. Cantley, C. Terhorst, and M. J. Eck. 1999. Crystal structures of the XLP protein SAP reveal a class of SH2 domains with extended, phosphotyrosine-independent sequence recognition. *Mol.Cell* 4:555-561.

72. Shinozaki, K., H. Kanegane, H. Matsukura, R. Sumazaki, M. Tsuchida, M. Makita, Y. Kimoto, R. Kanai, K. Tsumura, T. Kondoh, H. Moriuchi, and T. Miyawaki. 2002. Activation-dependent T cell expression of the X-linked lymphoproliferative disease gene product SLAM-associated protein and its assessment for patient detection. *Int.Immunol.* 14:1215-1223.
73. Nagy, N., K. Mattsson, A. Maeda, A. Liu, L. Szekely, and E. Klein. 2002. The X-linked lymphoproliferative disease gene product SAP is expressed in activated T and NK cells. *Immunol.Lett.* 82:141-147.
74. Nichols, K. E., J. Hom, A. Ganguly, C. S. Ma, S. G. Tangye, J. L. Cannons, P. L. Schwartzberg, G. A. Koretzky, and P. L. Stein. 2004. Regulation of NKT cell development by SAP, the adaptor mutated in X-linked lymphoproliferative disease. *Blood* 104:94A.
75. Munitz, A., I. Bachelet, S. Fraenkel, G. Katz, O. Mandelboim, H. U. Simon, L. Moretta, M. Colonna, and F. Levi-Schaffer. 2005. 2B4 (CD244) is expressed and functional on human eosinophils. *Journal of Immunology* 174:110-118.
76. Wu, C., J. Sayos, N. Wang, D. Howie, A. Coyle, and C. Terhorst. 2000. Genomic organization and characterization of mouse SAP, the gene that is altered in X-linked lymphoproliferative disease. *Immunogenetics* 51:805-815.
77. Sayos, J., K. B. Nguyen, C. Wu, S. E. Stepp, D. Howie, J. D. Schatzle, V. Kumar, C. A. Biron, and C. Terhorst. 2000. Potential pathways for regulation of NK and T cell responses: differential X-linked lymphoproliferative syndrome gene product SAP interactions with SLAM and 2B4. *Int.Immunol.* 12:1749-1757.
78. Nagy, N., M. Takahara, J. Nishikawa, J. C. Bourdon, L. L. Kis, G. Klein, and E. Klein. 2004. Wild-type p53 activates SAP expression in lymphoid cells. *Oncogene* 23:8563-8570.
79. Okamoto, S., H. B. Ji, D. Howie, K. Clarke, C. Gullo, S. Manning, A. J. Coyle, and C. Terhorst. 2004. Expression of the SH2D1A gene is regulated by a combination of transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *European Journal of Immunology* 34:3176-3186.
80. Kis, L. L., N. Nagy, G. Klein, and E. Klein. 2003. Expression of SH2D1A in five classical Hodgkin's disease-derived cell lines. *Int.J.Cancer* 104:658-661.
81. Feldhahn, N., I. Schwering, S. Lee, M. Wartenberg, F. Klein, H. Wang, G. Zhou, S. M. Wang, J. D. Rowley, J. Hescheler, M. Kronke, K. Rajewsky, R. Kuppers, and M. Muschen. 2002. Silencing of B cell receptor signals in human naive B cells. *J.Exp.Med.* 196:1291-1305.
82. Mikhalap, S. V., L. M. Shlapatska, O. V. Yurchenko, M. Y. Yurchenko, G. G. Berdova, K. E. Nichols, E. A. Clark, and S. P. Sidorenko. 2004. The adaptor protein SH2D1A regulates signaling through CD150 (SLAM) in B cells. *Blood* 104:4063-4070.

83. Howie, D., M. Simarro, J. Sayos, M. Guirado, J. Sancho, and C. Terhorst. 2002. Molecular dissection of the signaling and costimulatory functions of CD150 (SLAM): CD150/SAP binding and CD150-mediated costimulation. *Blood* 99:957-965.
84. Sivori, S., M. Falco, E. Marcenaro, S. Parolini, R. Biassoni, C. Bottino, L. Moretta, and A. Moretta. 2002. Early expression of triggering receptors and regulatory role of 2B4 in human natural killer cell precursors undergoing in vitro differentiation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99:4526-4531.
85. Simarro, M., A. Lanyi, D. Howie, F. Poy, J. Bruggeman, M. Choi, J. Sumegi, M. J. Eck, and C. Terhorst. 2004. SAP increases FynT kinase activity and is required for phosphorylation of SLAM and Ly9. *Int.Immunol.* 16:727-736.
86. Latour, S., G. Gish, C. D. Helgason, R. K. Humphries, T. Pawson, and A. Veillette. 2001. Regulation of SLAM-mediated signal transduction by SAP, the X-linked lymphoproliferative gene product. *Nat.Immunol.* 2:681-690.
87. Latour, S., R. Roncagalli, R. Chen, M. Bakinowski, X. Shi, P. L. Schwartzberg, D. Davidson, and A. Veillette. 2003. Binding of SAP SH2 domain to FynT SH3 domain reveals a novel mechanism of receptor signalling in immune regulation. *Nat.Cell Biol.* 5:149-154.
88. Chan, B., A. Lanyi, H. K. Song, J. Griesbach, M. Simarro-Grande, F. Poy, D. Howie, J. Sumegi, C. Terhorst, and M. J. Eck. 2003. SAP couples Fyn to SLAM immune receptors. *Nat.Cell Biol.* 5:155-160.
89. Davidson, D., X. C. Shi, S. H. Zhang, H. Wang, M. Nemer, N. Ono, S. J. Ohno, Y. Yanagi, and A. Veillette. 2004. Genetic evidence linking SAP, the X-linked lymphoproliferative gene product, to Src-related kinase FynT in T(H)2 cytokine regulation. *Immunity* 21:707-717.
90. Sylla, B. S., K. Murphy, E. Cahir-McFarland, W. S. Lane, G. Mosialos, and E. Kieff. 2000. The X-linked lymphoproliferative syndrome gene product SH2D1A associates with p62(dok) (Dok1) and activates NF-kappa B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:7470-7475.
91. Morra, M., J. Lu, F. Poy, M. Martin, J. Sayos, S. Calpe, C. Gullo, D. Howie, S. Rietdijk, A. Thompson, A. J. Coyle, C. Denny, M. B. Yaffe, P. Engel, M. J. Eck, and C. Terhorst. 2001. Structural basis for the interaction of the free SH2 domain EAT-2 with SLAM receptors in hematopoietic cells. *EMBO J.* 20:5840-5852.
92. Wu, C., K. B. Nguyen, G. C. Pien, N. Wang, C. Gullo, D. Howie, M. R. Sosa, M. J. Edwards, P. Borrow, A. R. Satoskar, A. H. Sharpe, C. A. Biron, and C. Terhorst. 2001. SAP controls T cell responses to virus and terminal differentiation of TH2 cells. *Nat.Immunol.* 2:410-414.
93. Czar, M. J., E. N. Kersh, L. A. Mijares, G. Lanier, J. Lewis, G. Yap, A. Chen, A. Sher, C. S. Duckett, R. Ahmed, and P. L. Schwartzberg. 2001. Altered lymphocyte responses and cytokine production in mice deficient in the X-

- linked lymphoproliferative disease gene SH2D1A/DSHP/SAP. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98:7449-7454.
94. Cannons, J. L., L. J. Yu, B. Hill, L. A. Mijares, D. Dombroski, K. E. Nichols, A. Antonellis, G. A. Koretzky, K. Gardner, and P. L. Schwartzberg. 2004. SAP regulates T(H)2 differentiation and PKC-theta-mediated activation of NF-kappa B1. *Immunity* 21:693-706.
  95. Crotty, S., E. N. Kersh, J. Cannons, P. L. Schwartzberg, and R. Ahmed. 2003. SAP is required for generating long-term humoral immunity. *Nature* 421:282-287.
  96. Hron, J. D., L. Caplan, A. J. Gerth, P. L. Schwartzberg, and S. L. Peng. 2004. SH2131A regulates T-dependent humoral autoimmunity. *Journal of Experimental Medicine* 200:261-266.
  97. Pasquier, B., L. Yin, M. C. Fondaneche, F. Relouzat, C. Bloch-Queyrat, N. Lambert, A. Fischer, G. Saint-Basile, and S. Latour. 2005. Defective NKT cell development in mice and humans lacking the adapter SAP, the X-linked lymphoproliferative syndrome gene product. *Journal of Experimental Medicine* 201:695-701.
  98. Chung, B., A. Aoukaty, J. Dutz, C. Terhorst, and R. S. Tan. 2005. Cutting edge: Signaling lymphocytic activation molecule-associated protein controls NKT cell functions. *Journal of Immunology* 174:3153-3157.
  99. de la Fuente, M. A., P. Pizcueta, M. Nadal, J. Bosch, and P. Engel. 1997. CD84 leukocyte antigen is a new member of the Ig superfamily. *Blood* 90:2398-2405.
  100. Wang, N., M. Morra, C. Wu, C. Gullo, D. Howie, T. Coyle, P. Engel, and C. Terhorst. 2001. CD150 is a member of a family of genes that encode glycoproteins on the surface of hematopoietic cells. *Immunogenetics* 53:382-394.
  101. Palou, E., F. Piroto, J. Sole, J. H. Freed, B. Peral, C. Vilardell, R. Vilella, J. Vives, and A. Gaya. 2000. Genomic characterization of CD84 reveals the existence of five isoforms differing in their cytoplasmic domains. *Tissue Antigens* 55:118-127.
  102. Tangye, S. G., B. C. van de Weerd, D. T. Avery, and P. D. Hodgkin. 2002. CD84 is up-regulated on a major population of human memory B cells and recruits the SH2 domain containing proteins SAP and EAT-2. *Eur.J.Immunol.* 32:1640-1649.
  103. Krause, S. W., M. Rehli, S. Heinz, R. Ebner, and R. Andreesen. 2000. Characterization of MAX.3 antigen, a glycoprotein expressed on mature macrophages, dendritic cells and blood platelets: identity with CD84. *Biochem.J.* 346 Pt 3:729-736.

104. Zaiss, M., C. Hirtreiter, M. Rehli, A. Rehm, L. A. Kunz-Schughart, R. Andreesen, and B. Hennemann. 2003. CD84 expression on human hematopoietic progenitor cells. *Exp.Hematol.* 31:798-805.
105. Chtanova, T., S. G. Tangye, R. Newton, N. Frank, M. R. Hodge, M. S. Rolph, and C. R. Mackay. 2004. T follicular helper cells express a distinctive transcriptional profile, reflecting their role as non-Th1/Th2 effector cells that provide help for B cells. *Journal of Immunology* 173:68-78.
106. Baker, C. A. and L. Manuelidis. 2003. Unique inflammatory RNA profiles of microglia in Creutzfeldt-Jakob disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:675-679.
107. Gimino, V. J., J. D. Lande, T. R. Berryman, R. A. King, and M. I. Hertz. 2003. Gene expression profiling of bronchoalveolar lavage cells in acute lung rejection. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 168:1237-1242.
108. Tangye, S. G., K. E. Nichols, N. J. Hare, and B. C. M. van de Weerd. 2003. Functional requirements for interactions between CD84 and Src homology 2 domain-containing proteins and their contribution to human T cell activation. *Journal of Immunology* 171:2485-2495.
109. de la Fuente, M. A., V. Tovar, P. Pizcueta, M. Nadal, J. Bosch, and P. Engel. 1999. Molecular cloning, characterization, and chromosomal localization of the mouse homologue of CD84, a member of the CD2 family of cell surface molecules. *Immunogenetics* 49:249-255.
110. Pinchouk, V. G., S. P. Sidorenko, D. F. Gluzman, E. P. Vetrova, A. G. Berdova, and L. N. Schlapatskaya. 1988. Monoclonal-Antibodies Ipo-3 and Ipo-10 Against Human B-Cell Differentiation Antigens. *Anticancer Research* 8:1377-1380.
111. Cocks, B. G., C. C. Chang, J. M. Carballido, H. Yssel, J. E. De Vries, and G. Aversa. 1995. A novel receptor involved in T-cell activation. *Nature* 376:260-263.
112. Hamalainen, H., S. Meissner, and R. Lahesmaa. 2000. Signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) is differentially expressed in human Th1 and Th2 cells. *Journal of Immunological Methods* 242:9-19.
113. Ferrante, P., M. L. Fusi, M. Saresella, D. Caputo, M. Biasin, D. Trabattoni, A. Salvaggio, E. Clerici, J. E. De Vries, G. Aversa, C. L. Cazzullo, and M. Clerici. 1998. Cytokine production and surface marker expression in acute and stable multiple sclerosis: Altered IL-12 production and augmented signaling lymphocytic activation molecule (SLAM)-expressing lymphocytes in acute multiple sclerosis. *Journal of Immunology* 160:1514-1521.
114. Garcia, V. E., M. F. Quiroga, M. T. Ochoa, L. Ochoa, V. Pasquinelli, L. Fainboim, L. M. Olivares, R. Valdez, D. O. Sordelli, G. Aversa, R. L. Modlin, and P. A. Sieling. 2001. Signaling lymphocytic activation molecule expression

- and regulation in human intracellular infection correlate with Th1 cytokine patterns. *J.Immunol.* 167:5719-5724.
115. Isomaki, P., G. Aversa, B. G. Cocks, R. Luukkainen, R. Saario, P. Toivanen, J. E. De Vries, and J. Punnonen. 1997. Increased expression of signaling lymphocytic activation molecule in patients with rheumatoid arthritis and its role in the regulation of cytokine production in rheumatoid synovium. *J.Immunol.* 159:2986-2993.
  116. Browning, M. B., J. E. Woodliff, M. C. Konkol, N. T. Pati, S. Ghosh, R. L. Truitt, and B. D. Johnson. 2004. The T cell activation marker CD150 can be used to identify alloantigen-activated CD4(+)25(+) regulatory T cells. *Cell Immunol.* 227:129-139.
  117. Farina, C., D. Theil, B. Semlinger, R. Hohlfeld, and E. Meinl. 2004. Distinct responses of monocytes to Toll-like receptor ligands and inflammatory cytokines. *International Immunology* 16:799-809.
  118. Bleharski, J. R., K. R. Niazi, P. A. Sieling, G. Cheng, and R. L. Modlin. 2001. Signaling lymphocytic activation molecule is expressed on CD40 ligand-activated dendritic cells and directly augments production of inflammatory cytokines. *J.Immunol.* 167:3174-3181.
  119. Kruse, M., E. Meinl, G. Henning, C. Kuhnt, S. Berchtold, T. Berger, G. Schuler, and A. Steinkasserer. 2001. Signaling lymphocytic activation molecule is expressed on mature CD83+ dendritic cells and is up-regulated by IL-1 beta. *J.Immunol.* 167:1989-1995.
  120. Erlenhofer, C., W. P. Duprex, B. K. Rima, M. Ter, V, and J. Schneider-Schaulies. 2002. Analysis of receptor (CD46, CD150) usage by measles virus. *J.Gen.Virol.* 83:1431-1436.
  121. Mikhalap, S. V., L. M. Shlapatska, A. G. Berdova, C. L. Law, E. A. Clark, and S. P. Sidorenko. 1999. CDw150 associates with Src-homology 2-containing inositol phosphatase and modulates CD95-mediated apoptosis. *Journal of Immunology* 162:5719-5727.
  122. Shlapatska, L. M., S. V. Mikhalap, A. G. Berdova, O. M. Zelensky, T. J. Yun, K. E. Nichols, E. A. Clark, and S. P. Sidorenko. 2001. CD150 association with either the SH2-containing inositol phosphatase or the SH2-containing protein tyrosine phosphatase is regulated by the adaptor protein SH2D1A. *J.Immunol.* 166:5480-5487.
  123. Aversa, G., C. C. Chang, J. M. Carballido, B. G. Cocks, and J. E. De Vries. 1997. Engagement of the signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) on activated T cells results in IL-2-independent, cyclosporin A-sensitive T cell proliferation and IFN-gamma production. *J.Immunol.* 158:4036-4044.
  124. Carballido, J. M., G. Aversa, K. Kaltoft, B. G. Cocks, J. Punnonen, H. Yssel, K. Thestrup-Pedersen, and J. E. De Vries. 1997. Reversal of human allergic T helper 2 responses by engagement of signaling lymphocytic activation molecule. *J.Immunol.* 159:4316-4321.

125. Castro, A. G., T. M. Hauser, B. G. Cocks, J. Abrams, S. Zurawski, T. Churakova, F. Zonin, D. Robinson, S. G. Tangye, G. Aversa, K. E. Nichols, J. E. De Vries, L. L. Lanier, and A. O'Garra. 1999. Molecular and functional characterization of mouse signaling lymphocytic activation molecule (SLAM): differential expression and responsiveness in Th1 and Th2 cells. *J.Immunol.* 163:5860-5870.
126. Henning, G., M. S. Kraft, T. Derfuss, R. Pirzer, G. Saint-Basile, G. Aversa, B. Fleckenstein, and E. Meinel. 2001. Signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) regulates T cellular cytotoxicity. *Eur.J.Immunol.* 31:2741-2750.
127. Wang, N., A. Satoskar, W. Faubion, D. Howie, S. Okamoto, S. Feske, C. Gullo, K. Clarke, M. R. Sosa, A. H. Sharpe, and C. Terhorst. 2004. The Cell Surface Receptor SLAM Controls T Cell and Macrophage Functions. *J.Exp.Med.* 199:1255-1264.
128. Tivol, E. A., F. Borriello, A. N. Schweitzer, W. P. Lynch, J. A. Bluestone, and A. H. Sharpe. 1995. Loss of Ctl4-4 Leads to Massive Lymphoproliferation and Fatal Multiorgan Tissue Destruction, Revealing A Critical Negative Regulatory Role of Ctl4-4. *Immunity* 3:541-547.
129. Sandrin, M. S., M. M. Henning, M. F. Lo, E. Baker, G. R. Sutherland, and I. F. McKenzie. 1996. Isolation and characterization of cDNA clones for Humly9: the human homologue of mouse Ly9. *Immunogenetics* 43:13-19.
130. Del Valle, J. M., P. Engel, and M. Martin. 2003. The cell surface expression of SAP-binding receptor CD229 is regulated via its interaction with clathrin-associated adaptor complex 2 (AP-2). *J.Biol.Chem.* 278:17430-17437.
131. Mathieson, B. J., S. O. Sharrow, K. Bottomly, and B. J. Fowlkes. 1980. Ly 9, an alloantigenic marker of lymphocyte differentiation. *J.Immunol.* 125:2127-2136.
132. Kubin, M. Z., D. L. Parshley, W. Din, J. Y. Waugh, T. Davis-Smith, C. A. Smith, B. M. Macduff, R. J. Armitage, W. Chin, L. Cassiano, L. Borges, M. Petersen, G. Trinchieri, and R. G. Goodwin. 1999. Molecular cloning and biological characterization of NK cell activation-inducing ligand, a counterstructure for CD48. *Eur.J.Immunol.* 29:3466-3477.
133. Chuang, S. S., H. T. Pham, P. R. Kumaresan, and P. A. Mathew. 2001. A prominent role for activator protein-1 in the transcription of the human 2B4 (CD244) gene in NK cells. *J.Immunol.* 166:6188-6195.
134. Chuang, S. S., J. K. Lee, and P. A. Mathew. 2003. Protein kinase C is involved in 2B4 (CD244)-mediated cytotoxicity and AP-1 activation in natural killer cells. *Immunology* 109:432-439.
135. Nakajima, H., M. Cella, H. Langen, A. Friedlein, and M. Colonna. 1999. Activating interactions in human NK cell recognition: the role of 2B4-CD48. *Eur.J.Immunol.* 29:1676-1683.



136. Speiser, D. E., M. Colonna, M. Ayyoub, M. Cella, M. J. Pittet, P. Batard, D. Valmori, P. Guillaume, D. Lienard, J. C. Cerottini, and P. Romero. 2001. The activatory receptor 2B4 is expressed in vivo by human CD8<sup>+</sup> effector alpha beta T cells. *J.Immunol.* 167:6165-6170.
137. Thorleylawson, D. A., R. T. Schooley, A. K. Bhan, and L. M. Nadler. 1982. Epstein-Barr Virus Superinduces A New Human B-Cell Differentiation Antigen (B-Last-1) Expressed on Transformed Lymphoblasts. *Cell* 30:415-425.
138. Nakajima, H. and M. Colonna. 2000. 2B4: an NK cell activating receptor with unique specificity and signal transduction mechanism. *Hum.Immunol.* 61:39-43.
139. Parolini, S., C. Bottino, M. Falco, R. Augugliaro, S. Giliani, R. Franceschini, H. D. Ochs, H. Wolf, J. Y. Bonnefoy, R. Biassoni, L. Moretta, L. D. Notarangelo, and A. Moretta. 2000. X-linked lymphoproliferative disease. 2B4 molecules displaying inhibitory rather than activating function are responsible for the inability of natural killer cells to kill Epstein-Barr virus-infected cells. *J.Exp.Med.* 192:337-346.
140. Colucci, F., E. Rosmaraki, S. Bregenholt, S. I. Samson, V. Di Bartolo, M. Turner, L. Vanes, V. Tybulewicz, and J. P. Di Santo. 2001. Functional dichotomy in natural killer cell signaling: Vav1-dependent and -independent mechanisms. *Journal of Experimental Medicine* 193:1413-1424.
141. Klem, J., P. C. Verrett, V. Kumar, and J. D. Schatzle. 2002. 2B4 is constitutively associated with linker for the activation of T cells in glycolipid-enriched microdomains: properties required for 2B4 lytic function. *J.Immunol.* 169:55-62.
142. Bottino, C., R. Augugliaro, R. Castriconi, M. Nanni, R. Biassoni, L. Moretta, and A. Moretta. 2000. Analysis of the molecular mechanism involved in 2B4-mediated NK cell activation: evidence that human 2B4 is physically and functionally associated with the linker for activation of T cells. *Eur.J.Immunol.* 30:3718-3722.
143. Valiante, N. M. and G. Trinchieri. 1993. Identification of a novel signal transduction surface molecule on human cytotoxic lymphocytes. *J.Exp.Med.* 178:1397-1406.
144. Garni-Wagner, B. A., A. Purohit, P. A. Mathew, M. Bennett, and V. Kumar. 1993. A novel function-associated molecule related to non-MHC-restricted cytotoxicity mediated by activated natural killer cells and T cells. *J.Immunol.* 151:60-70.
145. Sivori, S., S. Parolini, M. Falco, E. Marcenaro, R. Biassoni, C. Bottino, L. Moretta, and A. Moretta. 2000. 2B4 functions as a co-receptor in human NK cell activation. *Eur.J.Immunol.* 30:787-793.

146. Watzl, C., C. C. Stebbins, and E. O. Long. 2000. NK cell inhibitory receptors prevent tyrosine phosphorylation of the activation receptor 2B4 (CD244). *J.Immunol.* 165:3545-3548.
147. Watzl, C. and E. O. Long. 2003. Natural killer cell inhibitory receptors block actin cytoskeleton-dependent recruitment of 2B4 (CD244) to lipid rafts. *J.Exp.Med.* 197:77-85.
148. Nakajima, H., M. Cella, A. Bouchon, H. L. Grierson, J. Lewis, C. S. Duckett, J. I. Cohen, and M. Colonna. 2000. Patients with X-linked lymphoproliferative disease have a defect in 2B4 receptor-mediated NK cell cytotoxicity. *Eur.J.Immunol.* 30:3309-3318.
149. Schuhmachers, G., K. Ariizumi, P. A. Mathew, M. Bennett, V. Kumar, and A. Takashima. 1995. 2B4, A New Member of the Immunoglobulin Gene Superfamily, Is Expressed on Murine Dendritic Epidermal T-Cells and Plays A Functional-Role in Their Killing of Skin Tumors. *Journal of Investigative Dermatology* 105:592-596.
150. Schatzle, J. D., S. Sheu, S. E. Stepp, P. A. Mathew, M. Bennett, and V. Kumar. 1999. Characterization of inhibitory and stimulatory forms of the murine natural killer cell receptor 2B4. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96:3870-3875.
151. Lee, K. M., S. Bhawan, T. Majima, H. Wei, M. I. Nishimura, H. Yagita, and V. Kumar. 2003. Cutting Edge: The NK Cell Receptor 2B4 Augments Antigen-Specific T Cell Cytotoxicity Through CD48 Ligation on Neighboring T Cells. *J.Immunol.* 170:4881-4885.
152. Kambayashi, T., E. Assarsson, B. J. Chambers, and H. G. Ljunggren. 2001. Cutting edge: Regulation of CD8(+) T cell proliferation by 2B4/CD48 interactions. *Journal of Immunology* 167:6706-6710.
153. Lee, K. M., M. E. McNerney, S. E. Stepp, P. A. Mathew, J. D. Schatzle, M. Bennett, and V. Kumar. 2004. 2B4 Acts As a Non-Major Histocompatibility Complex Binding Inhibitory Receptor on Mouse Natural Killer Cells. *J.Exp.Med.* 199:1245-1254.
154. Mooney, J. M., J. Klem, C. Wulfig, L. A. Mijares, P. L. Schwartzberg, M. Bennett, and J. D. Schatzle. 2004. The murine NK receptor 2B4 (CD244) exhibits inhibitory function independent of signaling lymphocytic activation molecule-associated protein expression. *Journal of Immunology* 173:3953-3961.
155. Esplugues, E., D. Sancho, J. Vega-Ramos, A. Martinez, U. Syrbe, A. Hamann, P. Engel, F. Sanchez-Madrid, and P. Lauzurica. 2003. Enhanced Antitumor Immunity in Mice Deficient in CD69. *J.Exp.Med.* 197:1093-1106.
156. Iizuka, K., O. V. Naidenko, B. F. M. Plougastel, D. H. Fremont, and W. M. Yokoyama. 2003. Genetically linked C-type lectin-related ligands for the NKR1P family of natural killer cell receptors. *Nature Immunology* 4:801-807.

157. Selvaraj, P., M. L. Plunkett, M. Dustin, M. E. Sanders, S. Shaw, and T. A. Springer. 1987. The Lymphocyte-T Glycoprotein Cd2 Binds the Cell-Surface Ligand Lfa-3. *Nature* 326:400-403.
158. Arulanandam, A. R. N., J. M. Withka, D. F. Wyss, G. Wagner, A. Kister, P. Pallai, M. A. Recny, and E. L. Reinherz. 1993. The Cd58 (Lfa-3) Binding-Site Is A Localized and Highly-Charged Surface-Area on the Agfcc'C" Face of the Human Cd2 Adhesion Domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90:11613-11617.
159. Falco, M., E. Marcenaro, E. Romeo, F. Bellora, D. Marras, F. Vely, G. Ferracci, L. Moretta, A. Moretta, and C. Bottino. 2004. Homophilic interaction of NTBA, a member of the CD2 molecular family: induction of cytotoxicity and cytokine release in human NK cells. *Eur.J.Immunol.* 34:1663-1672.
160. Tangye, S. G., J. H. Phillips, and L. L. Lanier. 2000. The CD2-subset of the Ig superfamily of cell surface molecules: receptor-ligand pairs expressed by NK cells and other immune cells. *Semin.Immunol.* 12:149-157.
161. Wang, J. H., A. Smolyar, K. Tan, J. H. Liu, M. Kim, Z. Y. Sun, G. Wagner, and E. L. Reinherz. 1999. Structure of a heterophilic adhesion complex between the human CD2 and CD58 (LFA-3) counterreceptors. *Cell* 97:791-803.
162. Sun, J., J. Williams, H. C. Yan, K. M. Amin, S. M. Albelda, and H. M. DeLisser. 1996. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) hemophilic adhesion is mediated by immunoglobulin-like domains 1 and 2 and depends on the cytoplasmic domain and the level of surface expression. *J.Biol.Chem.* 271:18561-18570.
163. Hart, D. N. 1997. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 90:3245-3287.
164. Banchereau, J. and R. M. Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245-252.
165. Bochner, B. S. and R. P. Schleimer. 2001. Mast cells, basophils, and eosinophils: distinct but overlapping pathways for recruitment. *Immunol.Rev.* 179:5-15.
166. Wang, S., G. Zhu, K. Tamada, L. Chen, and J. Bajorath. 2002. Ligand binding sites of inducible costimulator and high avidity mutants with improved function. *J.Exp.Med.* 195:1033-1041.
167. van der Merwe, P. A. and S. J. Davis. 2003. Molecular interactions mediating T cell antigen recognition. *Annu.Rev.Immunol.* 21:659-684.
168. Zhu, B., E. A. Davies, P. A. van der Merwe, T. Calvert, and D. E. Leckband. 2002. Direct measurements of heterotypic adhesion between the cell surface proteins CD2 and CD48. *Biochemistry* 41:12163-12170.

169. Monks, C. R. F., B. A. Freiberg, H. Kupfer, N. Sciaky, and A. Kupfer. 1998. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* 395:82-86.
170. Roda-Navarro, P., M. Mittelbrunn, M. Ortega, D. Howie, C. Terhorst, F. Sanchez-Madrid, and E. Fernandez-Ruiz. 2004. Dynamic redistribution of the activating 2B4/SAP complex at the cytotoxic NK cell immune synapse. *J.Immunol.* 173:3640-3646.
171. Wild, M. K., A. Cambiaggi, M. H. Brown, E. A. Davies, H. Ohno, T. Saito, and P. A. van der Merwe. 1999. Dependence of T cell antigen recognition on the dimensions of an accessory receptor-ligand complex. *J.Exp.Med.* 190:31-41.