



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Facultat de Medicina

Departament de Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica

Unitat d'Immunoreceptors

Paper de la Molècula Adaptadora 3BP2 en la Senyalització dels Receptors Leucocitaris de la Família del CD150

Tesi doctoral presentada per

Ifigènia Saborit Villarroya

Per optar al grau de

Doctora en Bioquímica

Directora de la tesi: **Dra. Margarita Martín Andorrà**

Barcelona, Juny del 2006

ÍNDEX

- Abreviatures

I. INTRODUCCIÓ	1
1. Activació del Sistema Immunològic	2
2. Molècules Adaptadores Implicades en la Senyalització a Leucòcits	5
2.1 Molècules Adaptadores Positives	6
2.1.1 LAT	
2.1.2 Grb-2/Grap/Gads	7
2.1.3 SLP-76	8
2.1.4 Contribució Dels Adaptadors Positius En L'Activació dels Leucòcits	9
2.2 Molècules Adaptadores Negatives	12
2.2.1 PAG/Cbp	
2.2.2 Dok	
2.2.3 Cbl	13
2.2.4 Contribució Dels Adaptadors Negatius En La Inhibició dels Leucòcits	14
2.3 Noves Molècules Adaptadores: La Família de SAP i EAT-2	17
2.3.1 SAP	
2.3.1.1 Síndrome Limfoproliferativa Associada al Cromosoma X (XLP)	18
2.3.1.2. Model de Funció de SAP	20
2.3.1.3 Ratolins Deficients en SAP	22
2.3.2 EAT-2	24
2.3.2.1 Ratolins Deficients en EAT-2	
3. La Família dels Co-Receptors CD150	25
3.1 CD150	28
3.1.1 CD150 en humans	
3.1.1.1 Funció del CD150	29
3.1.2 CD150 en murins	
3.1.2.1 Ratolins Deficients en CD150	30
3.1.2.2 Model de Funció del CD150	31

3.2 CD244	33
3.2.1 CD244 en humans	
3.2.1.1 Funció del CD244	
3.2.2 CD244 en murins	35
3.2.2.1 Ratolins Deficients en CD244	36
3.2.2.2 Model de Funció del CD244	37
3.3 CD229	39
3.3.1 CD229 en humans	
3.3.1.1 Model de Funció del CD229	
3.3.2 CD229 en murins	41
3.3.2.1 Ratolins deficients en CD229	
3.4 CD84	42
3.4.1 CD84 en humans	
3.4.1.1 Funció del CD84	
3.5 NTB-A	43
3.5.1 NTB-A en humans	
3.5.1.1 Funció del NTB-A	
3.5.2 Ly108 en murins	44
3.5.2.1 Ratolins deficients en Ly108	
3.6 CD319	
3.6.1 CD319 en humans	
3.6.1.1 Funció del CD319	45
3.7 CD48	46
3.8 BLAME	47
3.9 CD84-H1	
3.10 Taula resum de distribució cel·lular, lligand extracel·lular i funció dels membres de la família del CD150	48
II. OBJECTIUS I PLANTEJAMENT DEL PROBLEMA	49
III. MATERIALS I MÈTODES	53
1. Cèl·lules i Reactius	54
1.1 Línies cel·lulars	
1.2 Anticossos i Reactius	

2. Sistema del Triple Híbrid	56
2.1 Transformació d'una llibreria de cDNA en llevats	59
2.2 Cribatge d'una llibreria	62
2.2.1 Assaig Qualitatiu d'Activitat β -galactosidasa	
2.2.2 Assaig Semiquantitatiu d'Activitat β -galactosidasa	63
2.3 Obtenció del DNA genòmic de llevat	64
2.4 Transformació de bacteris E. coli HB101 per electroporació	65
2.5 Seqüenciació del DNA	67
3. Construcció de Plàsmids	68
4. Aïllament del RNA cel·lular	71
5. Sistemes de Transfecció	72
5.1 Transfectants transitoris	
5.1.1 DEAE-Dextrà	
5.1.2 Electroporació	73
5.2 Transfectants Estables	74
6. Producció d'anticòs monoclonal contra el 3BP2 humà	75
6.1 Immunitzacions	
6.2 Fusió	76
6.3 Cribatge dels clons per ELISA	77
7. Producció de Cultius Primaris	78
7.1 Producció de cèl·lules NK	
7.2 Producció de limfòcits CD8 ⁺	80
8. Anàlisi de Proteïnes	81
8.1 Immunoprecipitació	
8.1.1 Tractament de les mostres, previ a la immunoprecipitació	
8.2 Assaigs d'activitat d'ERK, p38 i Akt	83
8.3 Electroforesi de proteïnes (SDS-PAGE)	84
8.5 Western-Blot	
9. Immunocitoquímica	85
10. Citometria de Flux	87
10.1 Anàlisi de l'expressió de proteïnes	
10.2 Incorporació de Phalloïdina	88
10.3 Expressió del CD69	89
11. Citotoxicitat Redirigida Dependent d'Anticòs (ADCC)	

12. Assaig de Producció d'IFN γ	91
IV. RESULTATS	93
1. Identificació del 3BP2 com a lligand intracel·lular del receptor CD244	94
1.1 3BP2	95
1.2 L'associació del 3BP2 amb el CD244 és dependent de fosforilació	98
1.3 Producció de transfectants estables pel 3BP2	
2. Característiques de la Interacció del CD244 amb el 3BP2	100
2.1 El CD244 recluta el 3BP2 en cèl·lules humanes NK, YT	
2.2 El 3BP2 i la família d'adaptadors SAP no competeixen pel mateix motiu a la cua citosòlica del CD244	102
2.2.1 SAP	
2.2.2 EAT-2	103
2.3 Producció d'un anticòs monoclonal contra el 3BP2	105
2.4 Interacció entre el CD244 i 3BP2 en NK primàries	107
2.5 Distribució subcel·lular del CD244 i 3BP2	108
2.5.1 El CD244 i el 3BP2 col·localitzen en cèl·lules COS	
2.5.2 El CD244 i el 3BP2 col·localitzen en cèl·lules YT	
2.6 La interacció entre el 3BP2 i el CD244 no es manté en models murins	109
3. Dissecció de les vies d'activació desencadenades pel CD244 i 3BP2	110
3.1 La lligació del CD244 indueix la fosforilació del 3BP2	111
3.2 El 3BP2 recluta Vav després de l'activació del CD244	112
3.3 El CD244 activa les vies d'ERK i p38	113
3.3.1 El 3BP2 incrementa en temps i magnitud l'activació d'ERK	
3.3.2 El 3BP2 no modifica la via de la p38	115
3.4 El CD244 promou la producció d'IFN γ	
3.4.1 La sobreexpressió del 3BP2 no afecta la producció d'IFN γ	116
3.5 Durant la senyalització via CD244, el 3BP2 incrementa la citotoxicitat cel·lular sense modificar la producció de l'IFN γ	117
3.5.1 La sobreexpressió del 3BP2 incrementa la citotoxicitat via CD244	
3.5.2 El 3BP2 no afecta la producció d'IFN γ	119
3.6 El CD244 no interacciona directament amb la PI3K	121
3.6.1 La sobreexpressió del 3BP2 resulta en una major fosforilació	

del CD244 i evita parcialment, la inhibició de la PI3K	122
3.6.2 El 3BP2 augmenta la fosforilació d'Akt	123
3.7 El CD244 interacciona directament amb Csk	124
4. Funció del CD244 i 3BP2 en els limfòcits CD8 ⁺	125
4.1 Perfil d'expressió del CD244 en els limfòcits CD8 ⁺	126
4.2 El CD244 estimula la reorganització del citoesquelet en els limfòcits CD8 ⁺	127
4.2.1 El 3BP2 incrementa la polimerització d'actina, en canvi, el mutant puntual del 3BP2 per Vav la disminueix	128
4.2.2 El domini SH2 del 3BP2 bloqueja la polimerització d'actina via CD244 en els limfòcits CD8 ⁺	129
5. El CD229 interacciona directament amb el 3BP2	130
5.1 La tirosina 606 en el CD229 és la responsable de reclutar el 3BP2	131
5.2 Interacció entre el CD229 i el 3BP2	132
5.2.1 Distribució subcel·lular del CD229 i 3BP2	133
5.3 La sobreexpressió del 3BP2 potencia la inhibició via CD229 en la cèl·lula T	135
5.4 El CD229 interacciona directament amb Csk	137
6. El 3BP2 és fosforilat preferentment per Fyn	138
6.1 El 3BP2 interacciona amb Fyn	
6.1.1 Distribució subcel·lular del 3BP2 i Fyn	140
7. Interacció dels membres de la família del CD150 amb SHP-1 i Csk	
V. DISCUSSIÓ	143
VI. CONCLUSIONS	163
VII. BIBLIOGRAFIA	165
VIII. ANNEX	181

ABREVIATURES

3-AT: 3-Aminotriazol

Ab: Anticòs

ADAP: *Adhesion-and Degranulation-promoting Adaptor Protein* (proteïna adaptadora promotora de l'adhesió i desgranulació)

Asn (N): Asparragina

Asp (D): Aspàrtic

BCR: *B Cell Receptor* (receptor per l'antigen de la cèl·lula B)

Cbl: *casitas B-lineage lymphoma*

Cbp: *Csk binding protein* (proteïna d'unió a Csk)

CSK: *C-terminal SRC kinase* (cinasa de l'extrem carboxi-terminal de Src)

Cys (C): Cisteïna

DAG: Diacilglicerol

DNA: àcid desoxirribonucleic

Dok: *Downstream of tyrosine kinase* (per sota de cinases de tirosines)

EAT-2: *EWS-Fli 1-associated transcript 2* (trànscrip 2 associat a EWS-Fli 1)

ECFP: *Enhanced Cyan Fluorescent Protein* (proteïna cian fluorescent amplificada)

EGFP: *Enhanced Green Fluorescent Protein* (proteïna verda fluorescent amplificada)

ERK: *Extracellular-signal-regulated kinase* (cinasa regulada per senyals extracel·lulars)

EYFP: *Enhanced Yellow Fluorescent Protein* (proteïna groga fluorescent amplificada)

EBV: Epstein-Barr Virus

FCS: *Fetal calf serum* (sèrum fetal de vedella)

Gads: *Grb-2-related adaptor downstream of Shc* (adaptador relacionat a Grb-2 per sota Shc)

GEM: *Glycolipid-enriched microdomains* (microdominis enriquits en glicolípids)

Gln (Q): Glutamina

Glu (E): Glutàmic

GPI: Glicosilfosatidilinositol

Grap: *Grb-2-related adaptor protein* (proteïna adaptadora relacionada amb Grb-2)

Grb-2: *Growth factor receptor-bound protein 2* (proteïna 2 unida al receptor de creixement)

His (H): Histidina

HPK: *Hemopoietic Protein Kinase* (proteïna cinasa hematopètica)

Ig: Immunoglobulina

IFN γ : Interferó γ

IL: Interleucina

Ile (I): Isoleucina

Ip: Immunoprecipitació

IP3: Inositol 1,4,5-trifosfat

ITAM: *Immunoreceptor Tyrosin-based Activation Motif* (motiu tirosina d'activació de l'immunoreceptor)

ITIM: *Immunoreceptor Tyrosin-based Inhibitory Motif* (motiu tirosina d'inhibició de l'immunoreceptor)

ITSM: *Immunoreceptor Tyrosin-based Switch Motif* (motiu tirosina canviat de l'immunoreceptor)

LAB: *Linker for activated B cell* (connector per l'activació de cèl·lula B)

LAK: *Lymphokine Activated NK cell* (cèl·lula NK activada per limfocines)

LAT: *Linker for activated T cell* (connector per l'activació de la cèl·lula T)

LCMV: *Lymphocytic choriomeningitis virus*

Leu (L) : Leucina

mAb: Anticòs monoclonal

MAPK: *Mitogen activated protein kinases* (proteïnes cinases activades per mitògens)

Met (M): Metionina

NK: *Natural Killer* (cèl·lula citocida natural)

PAG: *Phosphoprotein Associated with Glycolipid-enriched microdomains* (fosfoproteïna associada amb microdominis enriquits en gliolípids)

PBLs: *Peripheral blood lymphocytes* (limfòcits de sang perifèrica)

PCR: *Polimerase Chain Reaction* (reacció en cadena de la polimerasa)

PH: *Plektrín Homology* (homologia a plextrina)

Phe (F): Fenilalanina

PI3K: *Phosphoinositide 3-kinase* (fofoinositol 3 cinasa)

PIP2: Fosfatidilinositol-4,5-bifosfat

PKA: *Protein kinase A* (proteïna cinasa A)

PKC: *Protein kinase C* (proteïna cinasa B)

PLC γ : *Phospholipase C γ* (fosfolipasa C gamma)

PTB: *Phosphotyrosine binding* (unió a fosfotirosina)

PTK: *Protein tyrosine kinase* (proteïna cinasa de tirosines)

Ras-GAP: *RasGTPase-activation protein* (proteïna d'activació de RasGTPase)

RNA: àcid ribonucleic

SAP: *SLAM Associated Protein* (proteïna associada a SLAM)

Ser (S): Serina

SH2: *Src-homology 2* (domini 2 d'homologia a les cinases Src)

SH3: *Src-homology 3* (domini 3 d'homologia a les cinases Src)

SHIP: *SH2-domain-containing 5' inositol phosphatase* (fosfatasa d'inositols 5' amb domini SH2)

SHP: *SH2-domain-containing protein tyrosine kinase* (proteïna cinasa de tirosines amb domini SH2)

SLAM: *Signalling lymphocyte activation molecule* (molècula d'activació de la senyalització del limfòcits)

SLP-76: *SH2-domain-containing leukocyte protein of 65 kilodalton* (proteïna leucocítica de 65 KDa amb domini SH2)

Sos: *Son of sevenless*

TCR: *T Cell Receptor* (receptor per l'antigen de la cèl·lula T)

Th1 o Th2: cèl·lula T col·laboradora 1 o 2

Thr (T): Treonina

TKB: *Tyrosine kinase-binding*

Trp (W): Triptòfan

Tyr (Y): Tirosina

Val (V): Valina

WB: Western-Blot

WCL: *Whole cell lysates* (lisats totals)

XLP: *X-linked lymphoproliferation* (limfoproliferació lligada al cromosoma X)

I. INTRODUCCIÓ

INTRODUCCIÓ

El sistema immunològic és el mecanisme de defensa dels organismes en front qualsevol agressió. La resposta immune ha de ser precisa, específica, coordinada i controlada. Per tal d'assolir aquest objectiu, es disposa d'una maquinària cel·lular finament regulada. Al llarg d'una resposta immune, receptors a la superfície de les cèl·lules del sistema immunològic s'encarreguen de reconèixer senyals externes. Aquests receptors de membrana són capaços d'enviar senyals a l'interior de la cèl·lula a través del que es coneix com a vies de senyalització. Es transdueix una senyal de manera ordenada i regulada des de l'exterior de la cèl·lula fins al nucli usant la maquinària proteica intracel·lular tal com cinases, fosfatases, fosfolipases, factors bescanviadors, proteïnes moduladores o adaptadors. D'aquesta manera la cèl·lula podrà donar una resposta precisa, davant un estímul concret. Però també cal un mecanisme de control de duració i intensitat de la resposta per tal d'evitar activacions massa prolongades que també serien danyines. La correcta regulació de la resposta és crítica per prevenir immunodeficiències i malalties autoimmunes.

1. Activació del Sistema Immunològic

Una resposta immunològica requereix de la participació ordenada i controlada de la immunitat innata (cèl·lules NK, dendrítiques, macròfags, mastòcits i altres cèl·lules d'origen mieloide) i adquirida (limfòcits T tant citotòxics -CD8⁺- com d'ajuda -CD4⁺- i limfòcits B). Encara que totes les cèl·lules del sistema immunològic reconeixen i s'activen davant estímuls diferents, la maquinària de senyalització intracel·lular destinada a donar una resposta, està altament conservada. L'habilitat del sistema immune de reconèixer els estímuls i activar la resposta cel·lular, està principalment mediada per receptors especialitzats anomenats Immunoreceptors Activadors. Aquest terme engloba diferents receptors de membrana: el receptor per l'antigen de la cèl·lula T i B (TCR i BCR respectivament) (Veillette, 2004b). També fa referència a alguns receptors per la fracció constant de les Immunoglobulines (FcR) tal com els FcγR I (macròfags i cèl·lules mieloides), FcγRIIA (monòcits i cèl·lules mieloides), FcγRIII (cèl·lules NK, mieloides i mastòcits) i FcεRI (mastòcits, basòfils i monòcits) (Veillette, et al., 2002). També la cèl·lula NK disposa de receptors activadors: receptors naturals de

la citotoxicitat (NCR), els dímers CD94/NKG2C, CD94/NKG2E i variants activadores dels receptors semblants a les Ig en cèl·lules NK (KIR) (Chiesa, et al.,2005; Lanier,2005). Els immunoreceptors tot i no tenir activitat cinasa intrínseca, són ràpidament fosforilats en tirosines després de l'activació. Els motius tirosina fosforilats reben el nom d'ITAMs (immunoreceptor amb motius d'activació basats en tirosines) i segueixen el consens: YxxL/Ix(6-8)YxxL/I (Y és Tirosina, L és Leucina, I és Isoleucina i x qualsevol aminoàcid). Els immunoreceptors manquen d'una cua citosòlica amb aquests motius ITAMs, però presenten interaccions electrostàtiques amb molècules que sí que en tenen. Són proteïnes transmembranes com per exemple: CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ i TCR ζ pel TCR, o Ig α i Ig β pel BCR, o DAP-12 per receptors activadors de la cèl·lula NK, o el Fc ϵ RI α pel receptor Fc de la IgE en mastòcits, o el Fc ϵ RI γ pel receptor Fc de la IgG (CD16) en cèl·lules NK, etc (Humphrey, et al.,2005; Lanier,2001; Veillette, et al.,2002). Els ITAMs després de la seva fosforilació, són els responsables del reclutament de tres famílies de cinases: família Src, família Syk/Zap-70 i família Itk/Btk (Koretzky and Myung,2001; Veillette, et al.,2002).

Les cèl·lules del sistema immune també expressen co-receptors que modulen la senyal derivada dels immunoreceptors tal com CD4, CD8, CD28 en limfòcits T i CD40 en limfòcit B (Veillette,2004b). Per tal d'aconseguir una resposta eficient per part del limfòcits T s'ha descrit que cal imprescindiblement, d'una col·laboració entre el complex TCR i els co-receptors. Es basa en el model de dues senyals; una primera per part del TCR i una segona per part del co-receptors, com el CD28. Però els limfòcits T derivats de ratolins deficients en el CD28, mostren una correcta activació. Per tant, sembla que les senyals derivades del CD28 poden veure's compensades per altres molècules receptores. Aquesta compensació és visible en el ratolí genodeficient per CD28 i CD2, que està més incapacitat per activar correctament el limfòcit T que no pas ratolins deficients per només una de les molècules. Aquestes dades suggereixen un grau de redundància entre les molècules co-estimuladores o co-receptors. Tot i així, la co-estimulació és necessària per evitar l'anèrgia o manca de resposta, en front d'un únic primer estímul per part del TCR (Bromley, et al.,2001).

Finalment, també hi ha receptors inhibidors (Immunoreceptors Inhibidors) capaços de prevenir una activació no desitjada, aturar o finalitzar una resposta; es tracta dels

receptors inhibidors tal com CTLA-4 en els limfòcits T, KIRs en les cèl·lules NK i FcγRIIB en els limfòcits B. Aquests receptors inhibidors funcionen generalment reclutant les proteïnes citosòliques fosfatases de tirosines (SHP-1, SHP-2 i PEP) o les fosfatases de lípids (SHIP-1, SHIP-2) en els seus motius ITIMs prèvia fosforilació per part de les cinases de la família Src. Els motius ITIMs (immunoreceptor amb motius d'inhibició basats en tirosines) es troben a les regions citosòliques dels receptors inhibidors i segueixen la seqüència consens: I/V/L/SxYxxL/V (I és Isoleucina, V és Valina, L és Leucina, S és Serina, Y és Tirosina i x qualsevol aminoàcid) (Veillette, et al.,2002).

Les cinases de la família Src (c-Src, Fyn, Lck, Lyn, etc.) són les responsables de la primera fosforilació en els ITAMs tot just el receptor reconeix el seu lligand (Samelson,2002). Aquesta família de cinases té punts de miristilació o palmitilació que les mantenen integrades a dominis més insolubles de la membrana (rafts). La membrana plasmàtica no és homogènia, sinó que és un mosaic fluid constituït per diferents microdominis que varien en la composició i concentració de lípids i proteïnes. Petites àrees enriquides en glicoesfingolípid, colesterol i proteïnes, reben el nom de rafts o GEMs (microdominis enriquits en glicoesfingolípid) i són regions altament insolubles amb detergents no-iònics a 4°C. Proteïnes ancorades a la membrana per GPI (Glicosilfosatidilinositol) i transmembrana hi són freqüents. Aquestes proteïnes transmembrana presenten una regió amino-terminal extracel·lular de pocs aminoàcids, una regió transmembrana amb un motiu de palmitilació CxxC (C és Cisteïna i x qualsevol aminoàcid) i un domini citoplasmàtic. Les modificacions lipídiques post-traduccionals són necessàries per enviar-les a aquests microdominis. Els rafts són essencials en l'activació cel·lular, ja que els immunoreceptors, exclosos en situació basal d'aquests dominis, hi són translocats ràpidament tot just reconèixer el seu lligand. En aquests microdominis de la membrana, és on els immunoreceptors entren en contacte amb les cinases de la família Src (Horejsi,2004; Lindquist, et al.,2003).

Les cinases de la família Src s'activen per autofosforilació d'una tirosina, però la seva activitat està finament regulada per fosforilació. Per una part, la fosforilació, per part de la cinasa Csk, en una tirosina en l'extrem carboxi-terminal, les manté inhibides. En canvi, la fosfatasa CD45 les activa tot alliberant-les de la fosforilació inhibidòria (Veillette, et al.,2002). La fosforilació dels ITAMs, per part de les cinases Src, permet el

reclutament de la família de cinases Syk/Zap-70 via els seus dominis SH2 (dominis que uneixen específicament tirosines fosforilades dins un motiu) (Koretzky and Myung,2001). L'activitat d'aquestes cinases també està regulada per fosforilació en tirosines; Zap-70 es fosforila per Src, mentre que Syk s'autofosforila. Finalment, la família de cinases Itk/Btk també s'activa per Src i intervenen en l'activació cel·lular (Samelson,2002). Aquestes tres famílies de cinases actives són les responsables de la fosforilació i activació d'un divers ventall de molècules amb dominis catalítics i/o modulars que permeten la formació de signalosomes: LAT, SLP-76, Vav, PI3K, PLC γ . Aquestes proteïnes intervenen en la correcta activació del limfòcit: moviments de calci, reorganització del citoesquelet, activació de les tres vies de les MAP cinases (o MAPK) (ERK, p38, JNK), activació de factors de transcripció, secreció de citocines, activació de la maquinària lítica en cèl·lules citotòxiques (Koretzky and Myung,2001; Samelson,2002).

2. Molècules Adaptadores Implicades en la Senyalització a Leucòcits

Les proteïnes que intervenen en la transducció de senyals des del receptor a l'interior de la cèl·lula es poden dividir en dos tipus: enzims i molècules adaptadores. Les molècules adaptadores o moduladores juguen un paper important en la resposta immune. Es tracta de proteïnes sense activitat catalítica intrínseca, ni funció receptora ni capacitat d'unió al DNA, però posseeixen motius i dominis capaços de mediar la interacció simultània entre diverses proteïnes i/o estructures lipídiques. Poden induir canvis conformationals a les seves parelles d'unió i modificar la seva activitat. Poden jugar un paper positiu o negatiu en funció del complex senyalitzador que creen i poden estabilitzar o desestabilitzar l'expressió d'una proteïna. D'aquesta manera permeten la formació d'un complex multiproteic (tot incloent i excloent molècules en un moment i localització subcel·lular determinats) i són capaces d'integrar senyals des de la membrana de la cèl·lula receptora d'un estímul cap a molècules efectores citoplasmàtiques, que finalment donaran lloc a una resposta cel·lular: moviments de calci, activació de les MAPK, reorganització del citoesquelet, transcripció de gens, etc.

Hi ha adaptadors específic de teixit hematopoètic, mentre que d'altres tenen una distribució ubiqua. Deficiències o manca d'aquestes proteïnes són també responsables de malalties i immunodeficiències. La generació de ratolins genodeficients per aquestes molècules ha posat de manifest la seva importància en l'activació i diferenciació del sistema immunològic (Koretzky and Myung, 2001).

Les molècules adaptadores es cataloguen clàssicament, en dos tipus; aquelles que juguen un paper positiu en l'activació del limfòcit i aquelles que estan involucrades en la inhibició. També es poden classificar en funció de la localització cel·lular; o bé integrats a la membrana plasmàtica en regions insolubles (coneguts com a TRAPs) o bé citosòlics (anomenats CAPs) (Lindquist, et al., 2003). D'altra banda, també hi ha molècules adaptadores específiques per receptors concrets, com és el cas de la família d'adaptadors SAP i EAT-2 específics d'una família de receptors anomenada CD150 (Engel, et al., 2003).

2.1 Molècules Adaptadores Positives

2.1.1 LAT

Proteïna de tipus III (sense pèptid leader) integral de membrana de 36 KDa. S'expressa en limfòcits T, cèl·lules NK, mastòcits, plaquetes (Facchetti, et al., 1999) i cèl·lules pre-B (Oya, et al., 2003). En cèl·lules B, NK i mieloides s'expressa un homòleg anomenat LAB o NTAL (Horejsi, 2004). Estructuralment consta d'un petit domini extracel·lular, un domini transmembrana, un motiu CxxC susceptible a la palmitilació i una llarga cua citoplasmàtica amb nou residus tirosines. Durant l'activació del TCR, l'immunoreceptor es transloca a rafts, on es fosforila i s'aproxima a LAT. En aquest moment, les tirosines de LAT són ràpidament fosforilades per les cinases de la família Syk/Zap-70 (Lindquist, et al., 2003; Zhang, et al., 1998). D'aquesta manera es creen molts motius d'unió directes per dominis SH2 d'altres proteïnes tant adaptadores (família Grb2, Shb) com amb activitat catalítica (PLC γ , PI3K, Vav, Itk).

Molts treballs s'han centrat en conèixer quin és el paper de cada tirosina; s'ha vist que un mateix motiu interacciona amb més d'una molècula i que una mateixa proteïna pot

tenir més d'un punt d'unió. Línies cel·lulars T amb mutants puntuals pels tres motius per Grb2 (tirosina 171, 191 i 226) mostren una incapacitat d'activar la PLC γ , tot i que la tirosina que interacciona directament amb aquest enzim és la 132. En canvi, mutants simples dels motius per Grb-2 no presenten problemes per interaccionar amb aquest adaptador. Aquests fets indiquen que hi ha tant una col·laboració com una redundància en el sistema per assegurar una correcta senyalització (Lindquist, et al.,2003; Samelson,2002). LAT, al reclutar tal diversitat de proteïnes està relacionat amb la integració d'esdeveniments pròxims al TCR i amb diverses cascades de senyalització; moviments de calci, activació de les vies de les vies MAPK, factors de transcripció, reorganització del citoesquelet i producció de citocines (Samelson,2002).

Ratolins deficients en LAT indiquen que és crucial pel correcte desenvolupament i activació dels limfòcits T; són ratolins amb un timus molt petit i sense limfòcits T madurs (Finco, et al.,1998; Koretzky and Myung,2001). Interessantment, però, s'ha vist que ratolins *Knock-ins* portadors d'un LAT amb les quatre tirosines a l'extrem carboxi mutades, presenten un desordre limfoproliferatiu amb molta producció de citocines Th2, per tant LAT també controla mecanismes terminadors de resposta activadora (Malissen, et al.,2005). Les cèl·lules NK derivades dels ratolins deficients en LAT, tenen un desenvolupament i funció correctes (Chiesa, et al.,2005; Zhang, et al.,1999). La sobreexpressió de LAT en cèl·lules NK humanes, comporta un augment de la citotoxicitat natural i redirigida (Chiesa, et al.,2005; Jevremovic, et al.,1999).

2.1.2 Grb-2/Grap/Gads

Família d'adaptadors citosòlics formats per un domini SH2 central, flanquejat per dos dominis SH3; tot i que Gads té un domini ric en prolines entre l'SH2 i l'SH3 carboxi-terminal. Els dominis SH3 uneixen regions riques en prolines amb un motius consens mínim de PxxP (P és Prolina i x qualsevol aminoàcid) (Koretzky and Myung,2001). Només Gads és específic de teixit hematopoètic. Tots tres s'associen a LAT fosforilat a través del domini SH2, però els dominis SH3 els permeten reclutar diferents proteïnes i així participar diferencialment en l'activació del limfòcit (Samelson,2002)

Grb-2 i Grap a través del domini SH3 interaccionen amb Sos que és el bescanviador activador de Ras; proteïna petita G que participa en l'activació d'ERK (Dong, et al.,2002; Samelson,2002). Els limfòcits T de ratolins heterozigots per Grb-2 (el diploidisme és letal) tenen atenuada la selecció negativa i una reducció en les vies de JNK i p38, però ERK resta intacte. En canvi, l'activació del TCR en ratolins deficitaris en Grap comporta un bloqueig de la via d'ERK, però una proliferació i una producció de IL-2 incrementada en resposta al TCR (Janssen and Zhang,2003; Koretzky and Myung,2001). Aquests efectes en les vies de les MAPK deuen ser deguts a l'interacció d'activació diferents o a la participació d'altres proteïnes unides als seus dominis SH3; com per exemple Shc, que associada al domini SH3 de Grb2, podria col·laborar reclutant més Sos i evitar defectes en l'activació d'ERK (Janssen and Zhang,2003).

Gads és l'únic membre capaç d'interaccionar amb l'adaptador SLP-76 i acostar-lo a LAT. La manca de Gads comporta deficiències en la proliferació i desenvolupament dels timòcits T (Koretzky and Myung,2001).

2.1.3 SLP-76

Família d'adaptadors citoplasmàtics específics de teixit hematopoètic formada per tres membres: SLP-76, BLNK i CLNK. SLP-76 és d'expressió preferent en cèl·lules T i NK (Veillette,2004b). Està compost per tres dominis estructurals; a l'extrem amino-terminal té diversos motius tirosines, a la regió central té un domini ric en prolines i a l'extrem carboxi-terminal conté un domini SH2. L'activació via TCR comporta la formació d'un complex LAT-Gads-SLP-76; d'aquesta manera l'adaptador s'aproxima a la membrana on ràpidament serà fosforilat en tirosines per Zap70 i es crearan motius d'unió pels dominis SH2 de Vav, Nck i Itk. La regió central rica en prolines uneix constitutivament i d'una manera específica a Gads i PLCγ1. El domini SH2 recluta les proteïnes fosforilades en tirosines; LAT, ADAP i HPK (Samelson,2002; Veillette,2004b). ADAP és un adaptador implicat en l'adhesió i activació de les integrines (Togni, et al.,2004), HPK és una cinasa de serines i treonines implicada en l'activació de JNK (Janssen and Zhang,2003).

En cèl·lules Jurkat deficients en SLP-76, l'activació via TCR no va acompanyada de moviments de calci, ni d'una activació d'ERK ni del promotor de la IL2 (NFAT). El fenotip dels ratolins deficients en SLP-76 és molt semblant al de LAT pel què fa l'activació i desenvolupament del limfòcit T (Koretzky and Myung,2001). Les cèl·lules NK derivades d'aquests ratolins es desenvolupen i funcionen correctament (Peterson, et al.,1999).

2.1.4 Contribució Dels Adaptadors Positius En L'Activació dels Leucòcits

En l'activació de la cèl·lula T CD4⁺ per reconeixement de l'antigen en les molècules d'histocompatibilitat de classe II, es generen diversos complexes amb LAT interaccionat amb diferents proteïnes adaptadores o amb activitat enzimàtica. Després de l'activació del TCR, LAT és fosforilat per la família Syk/Zap-70 i crea així, motius d'interacció amb per dominis SH2 de proteïnes i formar signalosomes. Es forma el complex LAT amb Grb2-Sos relacionat amb l'activació de les vies d'ERK (Roose, et al.,2005). També apareix el signalosoma format per LAT unit a Gads i a PLC γ que alhora interaccionen amb SLP-76 associat a Vav. Aquest complex intervé en l'activació de les vies d'ERK, moviments de calci, activació de factors de transcripció i de la reorganització del citoesquelet (Samelson,2002).

Vav funciona tant com a molècula adaptadora (amb tirosines fosforilables responsables de la seva activació) com a bescanviador de nucleòtids de guanina per les GTPases Rac/Rho/Cdc42 i s'activa per fosforilació en tirosines per part de la cinasa Lck. Vav a través de l'activitat bescanviadora de nucleòtids activa Rac, Rho i Cdc42, proteïnes rellevants en la reorganització del citoesquelet (Hornstein, et al.,2004; Tybulewicz,2005). Rac alhora activa la PI3K; cinasa de lípids formada per una subunitat catalítica (p110) i una d'unió (p85) (Deane and Fruman,2004). Els metabòlits que genera permeten que molècules amb dominis PH (motius de reconeixement de fosfolípids específics (Koretzky and Myung,2001) s'aproximin a la membrana, on s'activen. Alguns dels substrats de la PI3K són, les cinases de la família Tec, PCK i Akt (Deane and Fruman,2004). Però també cal esmentar que Vav és regulable per

fosfolípids derivats de l'activitat PI3K i per tant l'activitat de Vav queda supeditada a la cinasa (Jiang, et al.,2000; Tybulewicz,2005; Welch, et al.,2003).

L'activació de la família de cinases Itk està directament relacionada amb la fosforilació en tirosines i activació de la PLC γ ; enzim que hidrolitza el PIP₂ (Fosfatidilinositol-4,5-bifosfat) en DAG (Diacilglicerol) i IP₃ (Inositol 1,4,5-trifosfat) (Fruman,2004). El DAG activa directament a Ras-GRP, activador immediat de Ras i per tant d'ERK. El DAG també activa la PKC, cinasa de serines i treonines que participa en l'activació d'ERK (per fosforilació de Ras-GRP) i de factors de transcripció de moltes citocines (NF κ B, AP-1) (Fruman,2004; Roose, et al.,2005). Per altra banda l'IP₃, és el responsable de la sortida del calci del reticle. El calci col·labora en l'activació de la PKC, la Calmodulina i factors de transcripció (NFAT) (Caloca, et al.,2003; Tybulewicz,2005). L'activitat d'ERK desencadena també l'activació de factors de transcripció (Dong, et al.,2002). L'activació dels factors de transcripció permet l'activació de la transcripció gènica per l'activació, producció de citocines, proliferació, etc. En la figura 1 s'esquematitzen les cascades de senyalització derivades de l'activació del TCR.

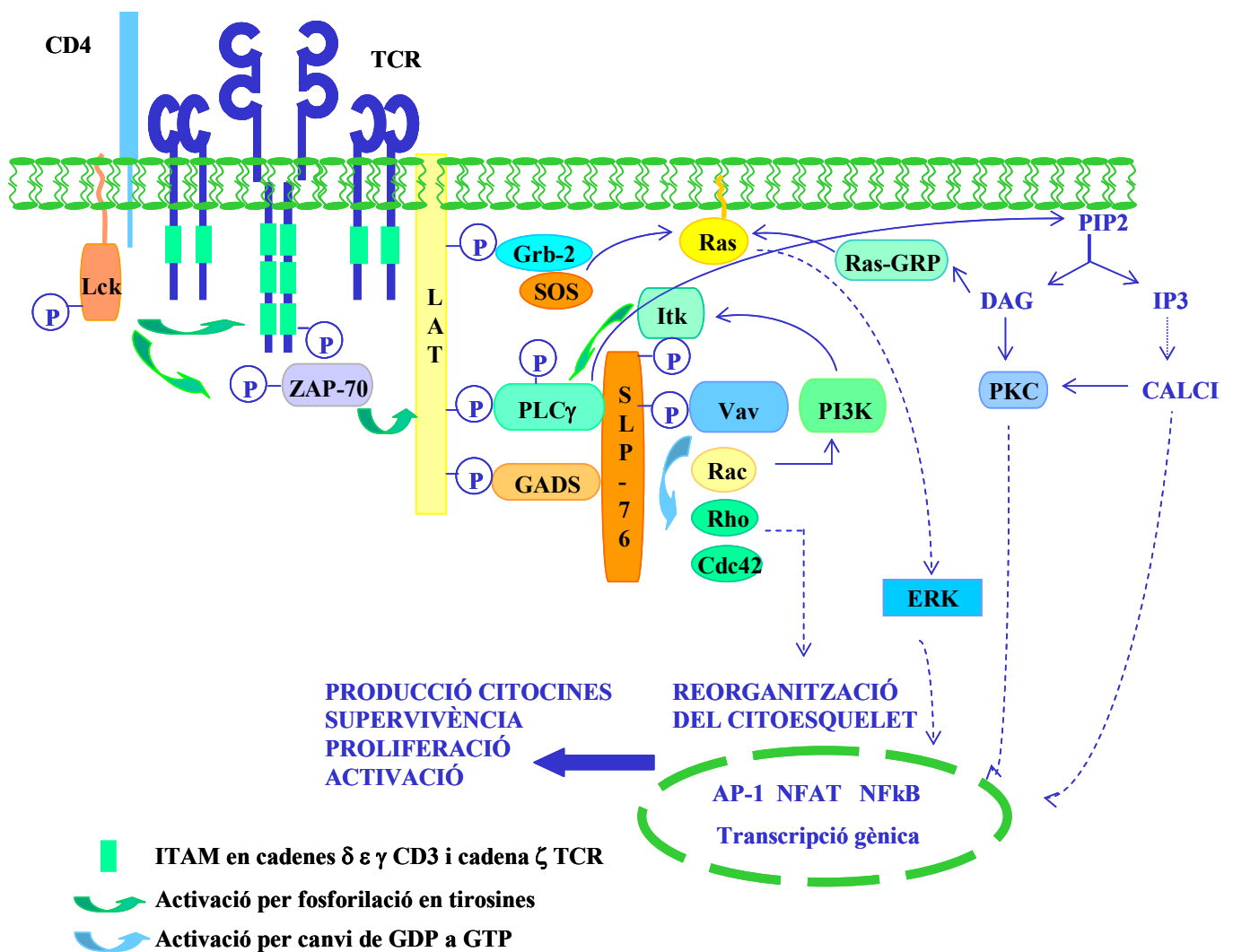


Figura 1. Regulació positiva de l'activació del limfòcit. Model d'activació del limfòcit T regulada per les molècules adaptadores. Seguir text de contribució dels adaptadors positius en l'activació. Basat en els models de (Deane and Fruman,2004; Fruman,2004; Koretzky and Myung,2001; Roose, et al.,2005; Samelson,2002).

2.2 Molècules Adaptadores Negatives

2.2.1 PAG/Cbp

Proteïna transmembrana de tipus III, de 85 KDa i d'expressió ubiqua. Està formada per una llarga cua citoplasmàtica amb motius tirosines, serines i treonines fosforilables i dos dominis rics en prolines. Està localitzada principalment en rafts, on de forma constitutiva està fosforilada per Src i unida principalment, a Csk pel seu domini SH2 i també amb Fyn pel seu SH3 (Koretzky and Myung,2001; Lindquist, et al.,2003; Veillette, et al.,2002). Csk és una cinasa de tirosines, citosòlica, de 50 KDa d'expressió ubiqua, amb homologia estructural a les cinases de la família Src: des de l'extrem amino-terminal al carboxi-terminal presenta un domini SH3, SH2 i un domini amb activitat catalítica. En situació basal, Csk està unit a PAG aproximant-se a la membrana on té els seu substrats: les cinases de la família Src. Csk augmenta la seva activitat per canvis al·lostèrics al interaccionar amb PAG i per fosforilació en una serina per la PKA. Csk fosforila una tirosina a l'extrem carboxi-terminal de les cinases de la família Src; la fosforilació en aquest residu comporta un replegament intramolecular amb el propi domini SH2 i per tant, la inactivació de Src. Csk està constitutivament unit a la fosfatasa PEP, responsable d'inhibir Src i Zap70 tot desfosforilant la tirosina activadora d'aquestes cinases (Veillette, et al.,2002). Ràpidament després de l'activació de l'immunoreceptor, PAG es desfosforila transitòriament, possiblement per l'activitat de la fosfatasa CD45 i allibera Csk, d'aquesta manera les cinases Src poden activar-se, també per acció de CD45 que desfosforila la tirosina que les mantenia inhibides (Horejsi,2004; Veillette, et al.,2002). En ratolins, la manca de Csk comporta una hiperactivitat de Src i mort al novè o desè dia de desenvolupament embrionari (Lindquist, et al.,2003; Veillette, et al.,2002). PAG també està afavorint una major rigidesa dels rafts a través d'interaccionar amb EBP50, proteïna relacionada amb la formació de la sinapsi immunològica; així evita que hi hagi mobilitat en els rafts i hi hagi sinapsis innecessàries (Lindquist, et al.,2003).

2.2.2 Dok

Família de cinc membres de 62 KDa, tot i que només Dok-1, Dok-2 i Dok-3 són

específics de teixit hematopoètic. Dok-1 es troba acumulat en la majoria de cèl·lules hematopoètiques, Dok-2 és present en cèl·lules T, mastòcits i macròfags, però no en limfòcits B. Dok-3 s'expressa en cèl·lules B, mastòcits i macròfags, però no en limfòcits T. Aquestes molècules estan formades per un domini PH a l'extrem amino, un domini central d'unió a fosfotirosines (PTB que uneix proteïnes fosforilades en tirosines dins el context Asp-Pro-X-pY on X és qualsevol aminoàcid) i un carboxi-terminal amb tirosines fosforilables (Veillette, et al.,2002).

Dok es transloca a membrana mitjançant el seu domini PH en resposta a la producció de PtdIns(3,4,5)P₃ per activitat de la PI3K. Aquesta translocació permet que Dok es fosforili en les tirosines i es creïn motius d'unió per proteïnes amb dominis SH2; SHIP-1, Ras-GAP, Nck, Csk (Janssen and Zhang,2003; Veillette,2004b). SHIP-1 és una fosfatasa de lípids que degrada els lípids que interaccionen amb dominis PH d'Akt, Itk (Veillette, et al.,2002). Ras-GAP és l'activador de la GTPasa encarregada d'inactivar Ras i per tant, es tracta d'un potent inhibidor d'ERK. Dok està també segrestant Nck, un adaptador involucrat en l'activació de Rac i en la polimerització d'actina (Yamasaki and Saito,2004). Juntament amb el fet que enllaça Csk, Dok està governant i és imprescindible per una correcta inhibició de l'activació de les cèl·lules dels sistema immunològic (Veillette,2004b).

Estudis de sobreexpressió i ratolins deficients en qualsevol d'aquests tres Dok, indiquen que és un adaptador imprescindible per la proliferació i inhibició de l'activació cel·lular on s'expressa (Janssen and Zhang,2003; Veillette,2004b).

2.2.3 Cbl

Família de 3 membres: c-Cbl, Cbl-b, Cbl-3, només els dos primers són específics de sistema immune. Estàn constituïts des de l'extrem amino al carboxi-terminal per dominis: PTK (domini d'interacció amb proteïnes fosforilades en tirosines que divergeix del típic domini SH2 i PTB), dit RING, múltiples regions riques en prolines, tirosines fosforilables i una seqüència semblant a la cremallera de leucines (Koretzky and Myung,2001). Interaccionen amb molècules involucrades en la senyalització: família Src i Syk (a través del domini PTK de Cbl), PI3K, Vav, PLCγ, Grb2 (a través de

dominis rics en prolines i de tirosines fosforilades en Cbl durant l'activació de l'immunoreceptor) (Veillette, et al.,2002). Actuen com a lligases d'ubiquitina a través del seu dit RING, tot acostant aquestes proteïnes enllaçades amb l'enzim de conjugació d'ubiquitina E2. Per tant estan activant un segrest proteic i/o degradació depenent de proteosoma; d'aquesta manera interfereixen en la senyal positiva derivada de l'immunoreceptor (Koretzky and Myung,2001).

En ratolins deficients en c-Cbl s'observa hiperproliferació de limfòcits T, augment de la selecció positiva, increment de l'expressió del TCR en superfície i hiperfosforilació de Src, Syk i LAT. c-Cbl associat a Zap-70 és capaç d'induir l'ubiquitinació i degradació del TCR (Veillette, et al.,2002).

Els limfòcits T de ratolins deficient en Cbl-b tenen un desenvolupament normal i nivells correctes de TCR a la membrana. En canvi, desenvolupen malalties autoimmunes espontànies amb infiltració de limfòcits T hiperactivats i un augment de producció de la IL-2 només via TCR (amb independència de la necessària co-estimulació del CD28). Aquest fenotip va acompanyat d'una hiperactivitat i fosforilació de Vav-1, sense augments de la seva expressió (Veillette, et al.,2002)

2.2.4 Contribució Dels Adaptadors Negatius En La Inhibició dels Leucòcits

En limfòcits T no estimulats, PAG associat a rafts, està constitutivament fosforilat per les cinases Src i interacciona amb Csk, portant la cinasa a les proximitats de la família Src que es mantindran inhibides per fosforilació de Csk. Tot seguit, després de l'estimulació del TCR, aquest es transloca a rafts, PAG es desfosforila (possiblement per CD45), allibera Csk i es deixa d'inhibir les cinases de la família Src. Csk interacciona constitutivament amb la fosfatasa PEP, inhibidora de les cinases Src i Zap-70. Per tant, el fet que el complex Csk-PEP s'allunyi dels rafts, ja que deixa d'estar unit a PAG, permet que les cinases de la família Src s'activin i no s'inhibeixin les senyals mediades pel TCR.

L'estabilitat i vida mitja proteica ve regulada a través de la família Cbl. El dit RING de Cbl s'associa amb l'enzim de conjugació d'ubiquitina i l'extrem amino-terminal amb domini TKB interacciona amb proteïnes fosforilades en tirosines com el TCR i Zap-70. D'aquesta manera Cbl, fa de pont per activar la degradació de proteïnes activadores per part del proteosoma. Per altra banda, en resposta a l'activació del TCR i següent producció d' PtdIns(3,4,5)P₃ per part de la PI3K, Dok s'integra a la membrana a través del seu domini PH. Un cop localitzat a la membrana serà fosforilat per les cinases Src i portarà a terme el seu paper inhibitori: acostar a Csk, SHIP-1, Ras-GAP per tal de que inhibeixin, respectivament, les cinases Src, proteïnes amb dominis PH i la via d'ERK (Janssen and Zhang,2003; Koretzky and Myung,2001; Veillette,2004b) .

Per altra banda, l'activació dels receptors inhibidors de la cèl·lula, resulta en la fosforilació dels seus motius ITIM per part de les cinases Src. Els ITIM actuen reclutant SHP-1, fosfatasa que desfosforila els motius ITAM, SLP-76, Vav, PI3K i les cinases de la família Src, Syk. També poden reclutar SHIP-1 (Veillette, et al.,2002). En la figura 2 s'esquematitza el paper de les molècules adaptadores en la inhibició.

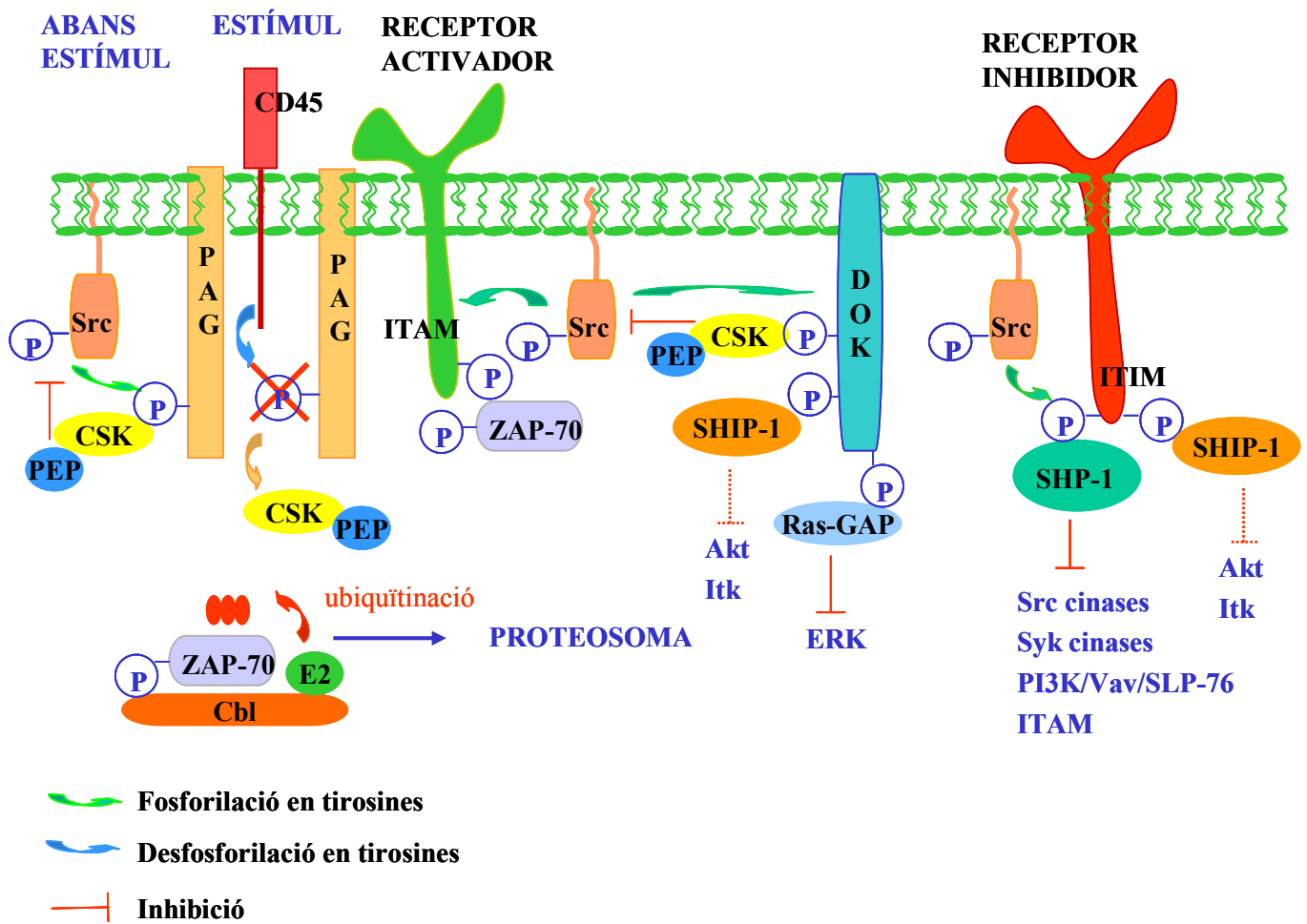


Figura 2. Regulació negativa de l'activació del limfòcit. Model d'inhibició del limfòcit T regulat per les molècules adaptadores. Seguir text contribució dels adaptadors negatius en la inhibició basat en els models (Koretzky and Myung,2001; Veillette,2004b; Veillette, et al.,2002).

2.3 Noves Molècules Adaptadores: La Família de SAP i EAT-2

Aquesta família d'adaptadors defineix una nova classe de proteïnes adaptadores ja que estan compostes casi exclusivament per domini un SH2 (Latour and Veillette, 2004). A través d'aquest domini SH2 interaccionen directament amb motius tirosina a la regió citosòlica dels co-receptors membres de la família del CD150 (secció 3) (Engel, et al., 2003). En la figura 3 es mostren els dominis SH2 alineats de la família d'adaptadors SAP i EAT-2 (Chan, et al., 2003).

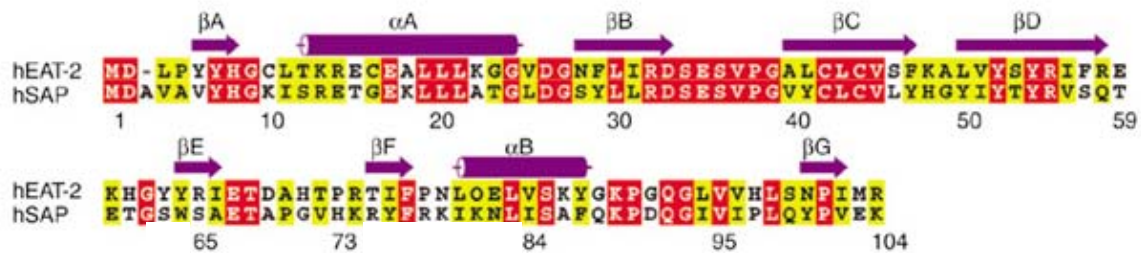


Figura 3. Seqüència aminoacídica dels dominis SH2 de SAP i EAT-2 humans. Alineament de les seqüències aminoacídiques dels dominis SH2 de les molècules adaptadores SAP i EAT-2 humanes. En vermell s'indiquen els residus idèntics i en groc es presenten blocs de semblança. En púrpura es mostren els elements de l'estructura secundària del domini SH2 (Chan, et al., 2003)

2.3.1 SAP

SAP (*SLAM-associated protein*) és el producte del gen sh2d1a o dshp, localitzat en la regió cromosòmica Xq25 en humans, identificat per primera vegada el 1998 com a gen responsable de la malaltia limfoproliferativa associada al cromosoma X (XLP) (Coffey, et al., 1998; Nichols, et al., 1998; Sayos, et al., 1998). SAP està format per 4 exons i tres introns que ocupen unes 25 Kb; el gen codifica per una proteïna citoplasmàtica de només 128 aminoàcids (un pes de 15 Kd), formada per un únic domini SH2 i una petita cua a l'extrem carboxi-terminal de 24 aminoàcids. En la posició 78 del domini SH2 presenta una arginina que es capaç d'interaccionar directament amb el domini SH3 de Fyn (Chan, et al., 2003; Latour, et al., 2003) (figura 3). Tot i que no s'ha descrit cap

funció per la seva petita cua, sembla que està relacionada amb la seva estabilitat (Latour and Veillette, 2004).

SAP interacciona directament amb motius tirosina en la regió intracel·lular dels co-receptors de la família del CD150 (Engel, et al., 2003; Morra, et al., 2001a). També s'ha detectat que SAP interacciona amb Dok-1 en un motiu semblant al del CD150; aquesta interacció és depenent del domini PH i de la tirosina 449 fosforilada de Dok-1 (Sylla, et al., 2000). Es desconeix, però, la rellevància de la interacció entre SAP i Dok1 (Morra, et al., 2001a).

SAP es troba bàsicament expressat en cèl·lules NK madures i activades, NKT, limfòcits T del timus i de la perifèria, en alguns limfomes B, eosinòfils i en plaquetes (Nichols, et al., 2005a). Pel què fa la seva expressió en limfòcit B hi ha certa controvèrsia. Certs estudis indiquen que s'expressa en alguns limfòcits B memòria i del centre germinal (Morra, et al., 2005), en canvi altres treballs indiquen que SAP no hi és present (Nichols, et al., 2005a). Al llarg d'una activació, l'expressió de SAP està molt regulada. En humans, en front una infecció pel virus d'EBV o durant una activació cel·lular in vitro, l'expressió de SAP augmenta en les NK i els limfòcits T (Eissmann, et al., 2005; Nichols, et al., 2005a). En murins s'ha observat el fenomen invers pels limfòcits T activats amb anti-CD3, tot i que durant una infecció vírica l'expressió de SAP augmenta en les NK (Sayos, et al., 2000; Wu, et al., 2000).

2.3.1.1 Síndrome Limfoproliferativa Associada al Cromosoma X (XLP)

Característiques clíniques: Mutacions en el gen humà sh2d1a són responsables del 50 al 60% dels casos de la síndrome limfoproliferativa associada al cromosoma X (XLP), també anomenada malaltia de Duncan o de Purtilo; es tracta d'una malaltia poc freqüent (d'1 a 3 casos per cada milió) que afecta només als mascles humans (Engel, et al., 2003; Morra, et al., 2001a). Es tracta d'una immunodeficiència primària que va ser primerament caracteritzada per l'extrema susceptibilitat al virus de l'Epstein-Barr (EBV) (Morra, et al., 2001a). Les mutacions detectades en el gen poden disminuir la vida mitjana de la proteïna (i per tant, causen una pèrdua de l'expressió) o poden provocar-li una pèrdua de la funció (incapacitant-lo per unir-se al receptor) (Morra, et al., 2001b), tot i que també és comú la deleció del gen (Sayos, et al., 1998).

La infecció per l'EBV i la proliferació dels limfòcits B que això comporta, està perfectament controlada en les persones no afectades per aquesta immunodeficiència. La síndrome d'XLP es caracteritza per una incapacitat dels limfòcits T, B i cèl·lules NK per activar una resposta correcta en front de l'EBV; hi ha un desequilibri entre una exagerada resposta Th1 o cel·lular i un dèficit de resposta Th2 o humoral (Latour and Veillette, 2004). Hi ha tres característiques clíniques comunes en els pacients amb la síndrome d'XLP; mononucleosi infecciosa fulminant, desordres limfoproliferatius (tal com limfomes T i B malignes) i disgammaglobulinèmia (Engel, et al., 2003). Tot i que el contacte amb l'EBV accelera aquesta clínica, un pacient pot desenvolupar qualsevol d'aquests malalties independentment del contacte amb l'EBV i quasi tots moren entre els 10 i 40 anys (Engel, et al., 2003). La principal causa de mort en aquests malalts amb mononucleosi, és la necrosi hepàtica i destrucció del moll de l'os degut a una exagerada resposta i proliferació cel·lular (Wu, et al., 2001).

Mecanismes cel·lulars: La majoria de pacients afectats per la síndrome d'XLP tenen nivells baixos IgG, però alts d'IgM i sovint presenten infeccions cròniques o recurrents, possiblement degut a una incapacitat de generar una resposta humoral a llarg termini degut a disfuncions en les cèl·lules CD4⁺ (Crotty, et al., 2003; Ma, et al., 2005). En concordança, en aquests pacients s'observa una menor població de CD4⁺ i una disminució de l'expressió del receptor ICOS, potent inductor de la IL-10; citocina que es relaciona amb l'activació de la proliferació i diferenciació del limfòcit B humà (Ma, et al., 2005). S'observa que, encara que, principalment les cèl·lules NK i els limfòcits T expressin SAP, són sobretot els limfòcits B els que no poden respondre correctament a la infecció de l'EBV, segurament, degut a que no estan correctament activats pels limfòcits T (Crotty, et al., 2003). Tant si SAP és o no present en cèl·lules B, la manca d'aquesta proteïna les afecta negativament; aquests pacients no generen limfòcits B memòria, ni canvi d'isotip de les immunoglobulines, motiu pel qual hi ha infeccions recurrents i nivells variables d'immunoglobulines (disgammaglobulinèmia) (Ma, et al., 2005; Morra, et al., 2005).

SAP és imprescindible per l'ontogènia de les cèl·lules NKT, ja que les persones amb la síndrome d'XLP no tenen aquest tipus cel·lular (Nichols, et al., 2005b; Pasquier, et al., 2005). Les cèl·lules NKT representen una població de limfòcits amb característiques tant de limfòcit T com d'NK. Expressen un TCR invariant que reconeix una molècula

semblant a MHC de classe I anomenada CD1d, que presenta antígens glicolípidics. Per altra banda també expressa marcadors de cèl·lula NK; NK1.1 i receptors activadors i inhibidors d'NK. Sembla que estan relacionades en l'inici i regulació de la resposta immunològica tot actuant de pont entre la immunitat innata i adquirida. Produeixen IFN γ , IL-10, IL-4 i TGF- β (Borowski and Bendelac,2005; Chung, et al.,2005; Nichols, et al.,2005b; Pasquier, et al.,2005)

D'altra banda, tampoc hi ha una bona activitat lítica de les cèl·lules NK ni limfòcits CD8⁺ en experiments in vitro (Benoit, et al.,2000; Dupre, et al.,2005; Nichols, et al.,2005a; Sharifi, et al.,2004). Per tant no tota la clínica radica en defectes per part dels limfòcits CD4⁺, sinó que defectes en diferents tipus cel·lulars dels sistema immunològic són la causa del desordre limfoproliferatiu general i la incapacitat de desenvolupar una bona resposta immunològica encara que mai entrin en contacte amb el virus de l'EBV. Per exemple la manca d'NKT i les disfuncions de les cèl·lules citotòxiques podrien ser una explicació per entendre el per què de tants tumors i infeccions en aquests pacients (Nichols, et al.,2005b).

Per altra banda, la poca resposta Th2 s'associa a una incorrecte resposta de la cèl·lula B (hipogammaglobulinèmia i fins i tot agammaglobulinèmia). També hi ha una exagerada proliferació dels limfòcits B (no hi ha un control negatiu per part de les cèl·lules T pel què fa la supervivència). Encara queda per dilucidar si els defectes en la cèl·lula B venen originats també per problemes intrínsecs. Actualment la teràpia usada és el tractament amb l'administració d'immunoglobulines (Engel, et al.,2003).

2.3.1.2 Model de Funció de SAP

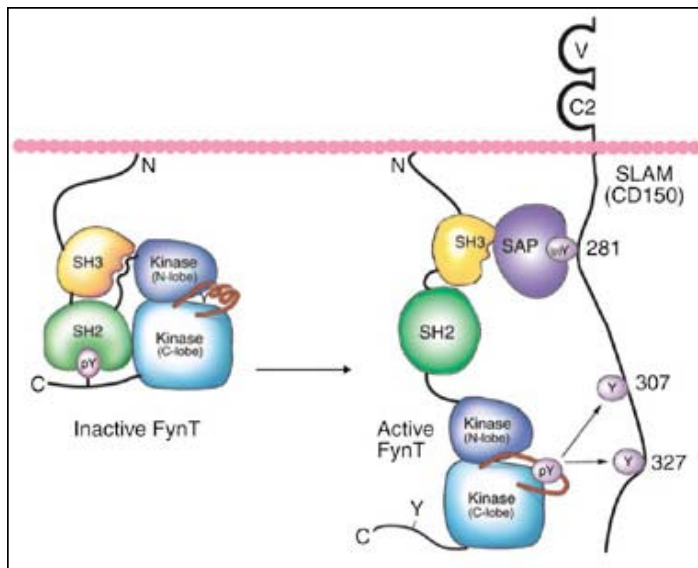
S'han proposat dos models de funció per comprendre les senyals derivades de l'activació del receptor de la família del CD150 i la seva associació amb SAP en limfòcits (Nichols, et al.,2001).

- Model Bloquejador: SAP podria estar actuant com un inhibidor natural; bloqueja la fosforilació del receptor i evita que d'altres molècules amb dominis SH2 (tal com els de la fosfatasa SHP-2) es poguessin unir al receptor de la família del CD150. D'aquesta manera, tot desplaçant SHP-2, SAP permet desenvolupar una senyal positiva via el

receptor. En cèl·lules deficientes en SAP, SHP-2 pot lliurement unir-se al receptor de la família CD150 i desfosforilar-lo, tot bloquejant la senyal (Sayos, et al.,1998);(Morra, et al.,2001c).

- Model Directe: Es proposa que SAP actua com un adaptador i d'una manera activa acosta la cinasa Fyn al receptor de la família CD150. Fyn, fosforila la cua citoplasmàtica del receptor i es permet el reclutament de molècules efectores: SHIP-1, Dok-1 i Dok-2, Shc, Ras-GAP per CD150 o Vav, SHIP-1 i c-Cbl per CD224. Sembla ser que en aquest cas, SHP-2 no hi participaria (Latour, et al.,2001);(Latour, et al.,2003);(Chen, et al.,2004). En la figura 4 es presenta el mecanisme pel qual SAP actua tot acostant Fyn al CD150 (Chan, et al.,2003)

A



B

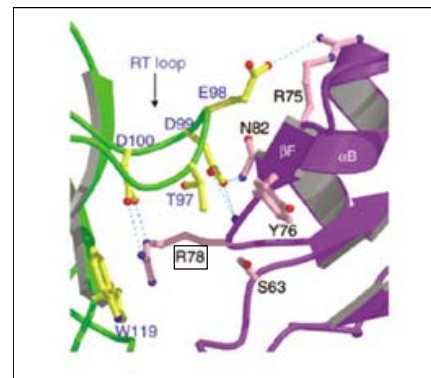


Figura 4. Model de reclutament i d'activació de Fyn per SAP via CD150. **A** Fyn es troba ancorat a la membrana cel·lular a través del seu amino-terminal meristilat. L'activació del CD150 per reconeixement del seu lligand, acostarà el SAP enllaçat a les proximitats de Fyn en la sinapsi immunològica. La interacció entre el domini SH3 de Fyn i SAP, establitzarà la conformació oberta i activa de Fyn per tal de que interaccioni amb el CD150 i li fosforili els residus tirosina 307 i 327. **B** Representació dels motius claus en la interacció entre l'aspàrtic 100 del domini SH3 de Fyn i l'arginina 78 del domini SH2 de SAP. Les línies blaves puntejades són els ponts d'hidrogen responsables de mantenir la interacció (Chan, et al.,2003).

També s'ha proposat que ambdós models podrien ser vàlids; la família del CD150 tindria una funció dual. Depenent de l'expressió de SAP, SHP-2 i SHIP-1 i afinitat d'aquestes molècules pel receptor, en un tipus cel·lular o moment determinat dictaria que s'afavorís el model bloquejador o el directe (Li, et al.,2003).

2.3.1.3 Ratolins Deficients en SAP

En murins, el gen *sh2d1a* es localitza a la banda A5.1 del cromosoma X que codifica per la proteïna de 126 aminoàcids. L'aparició i l'estudi de ratolins genodeficients per SAP estan sent molt valuosos per comprendre el paper d'aquesta proteïna al llarg de la resposta immunològica. En aquests ratolins, s'han fet estudis amb models infecciosos vírics, però mai usant el virus de l'EBV, ja que els ratolins no són infectables per aquest virus, per tant s'han usat models d'infecció amb altres virus i paràsits. En certs estudis, la infecció amb el virus LCMV (*Lymphocytic Choriomeningitis virus*) o el paràsit *Toxoplasma gondii*, dels ratolins genodeficients per SAP o el tractament amb anti-CD3/CD28 in vitro, comporta un augment en la secreció de citocines Th1 (IFN γ) per part dels limfòcits CD4⁺ (Crotty, et al.,2003; Czar, et al.,2001; Wu, et al.,2001). D'altres treballs no veuen diferències pel què fa la producció d'IFN γ en estimulacions in vitro amb combinacions amb anti-CD3/CD28 (Cannons, et al.,2004; Davidson, et al.,2004) o anti-CD3/CD150 (Howie, et al.,2002). Tot i així, sempre s'observa una marcada disminució de la resposta Th2 (IL-4, IL-10 i IL-13) per part de les cèl·lules CD4⁺ (Cannons, et al.,2004; Czar, et al.,2001; Davidson, et al.,2004; Wu, et al.,2001).

Aquests ratolins presenten defectes en l'activitat del limfòcit B a curt termini i sobretot a l'hora de desenvolupar una memòria a llarg termini tal i com s'observa en els defectes en la resposta en front de la infecció per LCMV (Crotty, et al.,2003; Wu, et al.,2001). En front aquesta infecció, també s'observen nivells baixos d'immunoglobulines i defectes en la formació de centres germinals (Crotty, et al.,2003; Morra, et al.,2005). La manca de limfòcits B memòria però, no es deu a una manca de limfòcits CD8⁺ i CD4⁺ memòria, ja que aquesta població és manté i fins pot augmentar, si no que es deu a una incorrecte polarització dels CD4⁺ cap a Th2 (Crotty, et al.,2003; Czar, et al.,2001; Davidson, et al.,2004; Wu, et al.,2001).

Els ratolins deficients en SAP, són més susceptibles que els salvatges a un model d'Encefalomyelitis Experimental Autoimmune; malaltia mediada per resposta Th1 (Hron, et al.,2004). En canvi, en front mecanismes patològics que cursen amb resposta Th2, queden més protegits; són més resistents a la *Leishmania major* (Wu, et al.,2001) i queden protegits en un model experimental de Lupus (malaltia humoral autoimmune) (Hron, et al.,2004).

SAP té un paper regulador de la funció cel·lular T CD4⁺ i és essencial per desenvolupar la resposta humoral (Engel, et al.,2003; Veillette,2006).

Per altra banda, la citotoxicitat mediada per les cèl·lules NK és deficient en estudis in vitro, de citotoxicitat espontània i in vivo, d'eliminació de tumors (Bloch-Queyrat, et al.,2005). També la producció d'IFN γ es veu atenuada en les cèl·lules NK després de l'estimulacions in vivo del receptor activador NK1.1 (Nichols, et al.,2005b). En canvi, l'activitat de les CD8⁺ està potenciada; SAP sembla que en aquestes cèl·lules està jugant un paper inhibitori (fenomen invers al què té en humans) (Chen, et al.,2005).

Una altra característica a destacar en aquests ratolins, és la manca de cèl·lules NKT; SAP és imprescindible per l'ontogènia de les NKT, tal i com s'observa en els humans (Borowski and Bendelac,2005; Chung, et al.,2005; Nichols, et al.,2005b; Pasquier, et al.,2005).

Diversos estudis mostren que és la senyalització desencadenada pel complex SAP-Fyn qui governa la correcta activació limfocitària. Ratolins deficients en Fyn adquireixen un fenotip molt semblant al de SAP; s'observen grans defectes en la resposta Th2 i alguns en la Th1. Més específicament, els ratolins transgens que expressen SAP amb l'arginina 78 mutada reproduïen el fenotip de SAP^{-/-} pel què fa a la incapacitat de muntar una equilibrada resposta immune (Bloch-Queyrat, et al.,2005; Cannons, et al.,2004; Davidson, et al.,2004; Nichols, et al.,2005b).

Encara que el model murí deficient en SAP fenocopia molts aspectes de la malaltia humana, hi ha paràmetres discordants; en humans, l'expressió de SAP augmenta durant l'activació en limfòcits T i l'activitat de les cèl·lules CD8⁺ és deficient (Ma, et al.,2005);(Nichols, et al.,2005a; Veillette,2006). En canvi, en murins, l'activació del

TCR va acompanyada d'una disminució en l'expressió de SAP en el limfòcit T (Wu, et al.,2000) i l'activitat citotòxica de les cèl·lules CD8⁺ augmenta si SAP no és present (Chen, et al.,2005).

2.3.2 EAT-2

El gen que codifica per EAT-2 (*EWS-Fli1-associated transcript 2*) es localitza al braç llarg del cromosoma 1 (1q23), pròxim al loci ocupat per la família CD150 (Engel, et al.,2003). També es tracta d'una proteïna de baix pes molecular, de 132 aminoàcids, formada bàsicament per un domini SH2 i una petita cua en l'extrem carboxi-terminal. L'organització exó-intró és molt semblant a la de SAP; es creu que deriven d'un gen ancestral comú (Morra, et al.,2001c). Presenta una homologia amb SAP del 47% en el domini SH2, però les cues d'ambdues molècules són totalment diferents. En el domini SH2 no presenta l'arginina 78 responsable de reclutar Fyn, però la seva cua té unes tirosines no presents en SAP, susceptibles a ser fosforilades (Chan, et al.,2003; Latour, et al.,2003; Morra, et al.,2001c) (figura 3). EAT-2 també interacciona directament amb els membres de la família del CD150 en les motius tirosina en les cues citosòliques d'aquests co-receptors (Morra, et al.,2001c). EAT-2 es troba aberrantment expressat en fibroblasts transformat per l'oncogen *EWS-Fli1* responsable del sarcoma d'Ewing (EWS) en humans (Thompson, et al.,1996). En humans EAT-2 s'expressa en NK i en limfòcits T activats (Tangye, et al.,2003; Tassi and Colonna,2005)

2.3.2.1 Ratolins Deficients en EAT-2

En murins hi ha dos gens en el locus 1H2 (també pròxim al locus de la família CD150) que codifiquen per dues proteïnes: EAT-2a (EAT-2 o Sh2d1b) i EAT-2b (ERT o Sh2d1c) també de 132 aminoàcids (Engel, et al.,2003). Presenten una homologia del 85% entre els seus dominis SH2 i del 73% entre les seves cues amb tirosines (Veillette,2006). Respecte l'homologia amb SAP, només hi ha certa identitat entre els seus dominis SH2 (sobretot amb respecte EAT-2A), però les cues no presenten cap semblança (Veillette,2006). EAT-2A s'expressa en NK, macròfags, cèl·lules dendrítiques, plaquetes i s'ha detectat transcrits en limfòcits B. En canvi, EAT-2b és restrictiu d'NK (Calpe, et al.,2006; Roncagalli, et al.,2005; Veillette,2006). Els EATs murins poden interaccionar directament amb les cinases de la família Src a través del

seu domini cinasa (Calpe, et al.,2006).

Estudis desenvolupats en ratolins deficients o que sobreexpressen un dels dos membres d'EAT-2 (no existeix el doble *knock out*), han demostrat que es tracta d'una molècula que reprimeix l'activitat NK tant citotòxica com productora d'IFN γ . Aquesta inhibició és dependent de la fosforilació en les tirosines de la cua carboxi-terminal d'EAT-2 (Roncagalli, et al.,2005).

3. La Família dels Co-Receptors CD150

La família del CD150 ha estat clàssicament englobada dins la família del CD2, tot i que per sé constitueix una família (Engel, et al.,2003). Originàriament la família del CD2 està formada per receptors expressats en la superfície dels leucòcits. Es tracta de glicoproteïnes de tipus I (extrem amino-terminal extracel·lular) pertanyents de la subfamília de les immunoglobulines (Ig) amb homologia en els seus dominis extracel·lulars. Actualment es coneixen onze membres que integren aquesta família: CD2 (LAF-2), CD48 (BLAST2), CD58 (LFA-3), CD84, CD150 (SLAM o IPO-3), CD229 (Ly9) CD244 (2B4), NTB-A (SF2000 o Ly108 en murí), CD319 (CRACC o CS1 o 19A o Novel Ly9), BLAME i CD84-H1 (SF2001 o CD2F-10); tots ells juguen algun paper en la funció cel·lular (Engel, et al.,2003; Nichols, et al.,2005a).

Els onze membres es localitzen en dues regions del cromosoma humà 1; CD2 i CD58 al braç curt (1p13), mentre que la resta es concentren al braç llarg (1q23). Aquesta proximitat gènica i homologia entre els membres de la família dona suport a la hipòtesi que tots ells deriven de duplicacions gèniques al llarg de l'evolució (Boles, et al.,2001). L'estructura exònica en tots els membres és molt semblant; un exó pel pèptid leader, domini extracel·lular i transmembrana, però diferents exons codifiquen pel domini citoplasmàtic. Cada gen pot donar lloc a més d'un transcrit degut a *splicings* alternatius; tots els membres poden aparèixer amb diferents isoformes de membrana, solubles o citosòliques (Boles, et al.,2001).

Pel què fa la seva homologia estructural, cada membre està compost com a mínim per un domini distal semblant al variable (V) de les Ig sense ponts disulfur i un domini proximal a la membrana semblant al constant 2 (C2) de les Ig amb cisteïnes conservades

que formen ponts disulfur. A més tots els membres de la família estan altament N-glicosilats. Les diferències estructurals radiquen en el domini transmembrana i citoplasmàtic. El CD58 s'expressa tant ancorat a la membrana per un glicosilfosfatidil inositol (GPI) com amb un petit domini transmembrana. El CD2 és l'únic que presenta un domini ric en prolines imprescindibles per la correcta adhesió i activació del limfòcit T. El CD48 s'expressa ancorat a la membrana per un GPI. La resta de membres presenten un domini extracel·lular, una regió transmembrana i una cua citoplasmàtica variable (Boles, et al.,2001; Engel, et al.,2003). En la figura 5 es mostra l'estructura esquemàtica de la família del CD2.

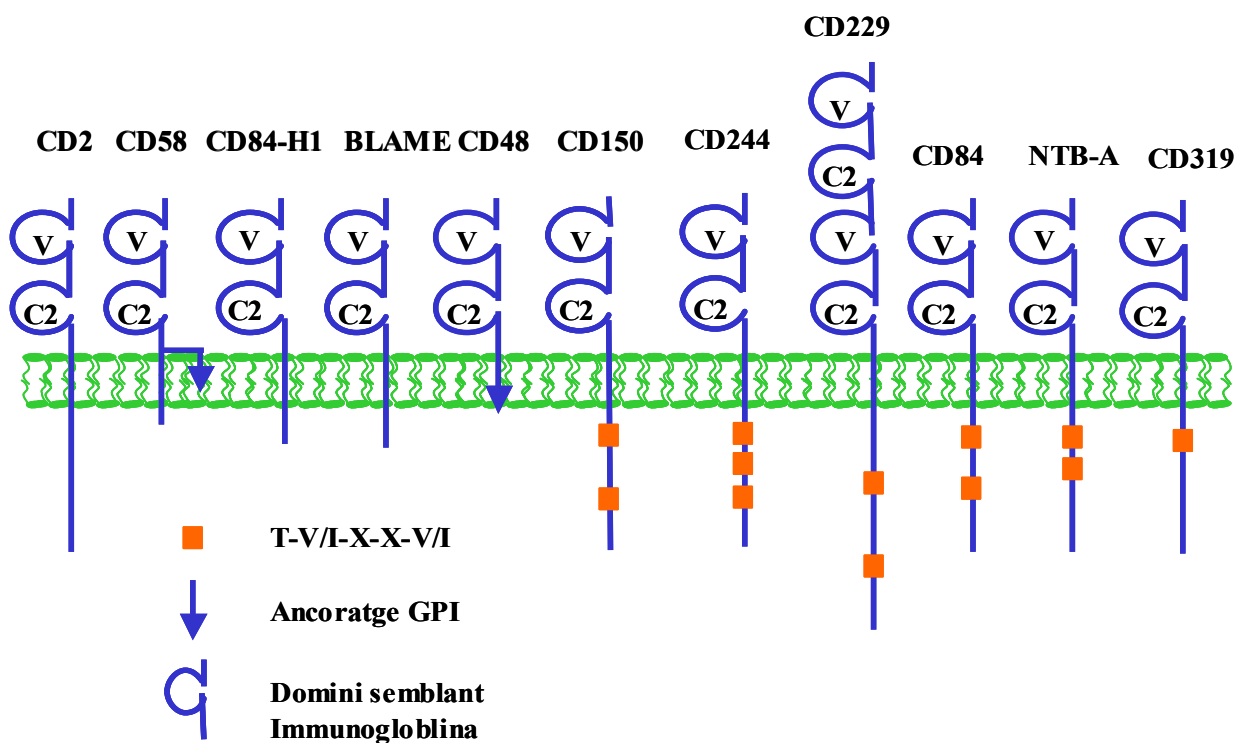


Figura 5. Representació esquemàtica dels membres de la família del CD2 i CD150. Els membres de la família del CD150: CD150, CD244, CD229, CD48, NTB-A i CD319, contenen en el seu domini citoplasmàtic motius del tipus T-V/I-X-X-V/I (T és Treonina, V es Valina, I és Isoleucina, Y és Tirosina i X qualsevol aminoàcid) responsables de la unió amb la família d'adaptadors SAP i EAT-2. Les fletxes en el CD58 i CD48 indiquen ancoratge a membrana mitjançant GPI.

Els membres de la família del CD2 són lligands tant homotípics com heterotípics mitjançant el domini V; permetent així, el contacte cèl·lula-cèl·lula. En humans, el CD2

interacciona amb el CD48 amb baixa afinitat i amb el CD58. En canvi, en murins el CD2 només s'uneix amb el CD48. En qualsevol cas, el CD48 té molta més afinitat pel CD244 (Boles, et al.,2001; Brown, et al.,1998). Per altra banda, CD150, CD84, NTB-A, CD229 i CD319 interaccionen homotípicament a través dels seus dominis V extracel·lulars (Aversa, et al.,1997; Falco, et al.,2004; Kumaresan, et al.,2002; Martin, et al.,2001; Romero, et al.,2005).

La família del CD150 està composta per 9 membres: CD48, CD84, CD150, CD229, CD244, CD319, NTB-A, CD84-H1 i BLAME. Tots ells es localitzen a la mateixa regió cromosòmica 1q23 (figura 6) en humans i 1H2 en murins. Per altra banda CD84, CD150, CD229, CD244, CD319, NTB-A presenten a les seves cues citosòliques com a mínim una tirosina englobada dins el motiu consens **TV/IYxxV/I** (Treonina-Valina/Isoleucina- Tirosina- 2 aminoàcids qualsevol- Valina/Isoleucina) responsable del reclutament de la família d'adaptadors SAP: SAP i EAT-2, tal i com es presenta en la figura 5. Aquest motiu és una variant del motiu TxYxxV/I anomenat ITSM, responsable del reclutament de molècules amb dominis SH2. Els membres de família CD150: CD48, BLAME i CD84-H1, no s'uneixen a SAP ni presenten motius citosòlics aparents de transducció de senyals (Engel, et al.,2003). La resta dels sis membres de la família CD150 interaccionen amb el domini SH2 de SAP i EAT-2. Només el membre SLAM o CD150 pot reclutar SAP independentment del seu estat de fosforilació (Sayos, et al.,2000; Sayos, et al.,1998), no obstant, per interaccionar amb EAT-2 requereix d'una prèvia fosforilació (Morra, et al.,2001c).

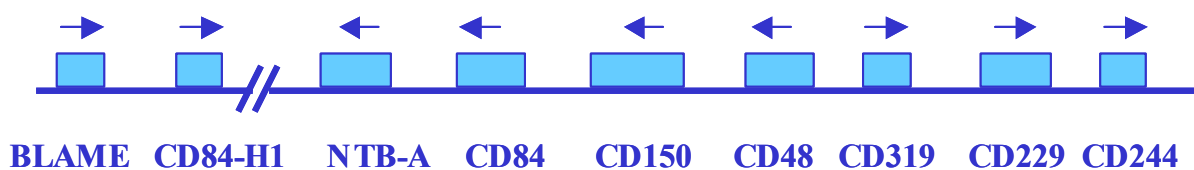


Figura 6. Organització genòmica dels membres de la família del CD150. Els membres de la família del CD150 es localitzen al cromosoma humà 1q23. S'agrupen en un segment genòmic de 359 Kb, conegut com el locus de SLAM. Les fletxes indiquen la direcció de la transcripció.

3.1 CD150

3.1.1 CD150 en humans

Glicoproteïna de membrana de tipus I altament N-glicosilada d'un pes entre 70 i 95 KDa (Cocks, et al.,1995). Està composta per una regió extracel·lular de 202 aminoàcids amb 8 punts d'N-glicosilació, un domini transmembrana de 22 aminoàcids i una regió intracel·lular de 77 aminoàcids (Punnonen, et al.,1997; Sayos, et al.,1998; Sidorenko and Clark,1993). S'expressa en timòcits, limfòcits T memòria CD45RO^{high}, limfòcits B, dendrítiques, macròfags i plaquetes. La seva expressió augmenta ràpidament durant l'activació amb el receptor per l'antigen i durant infeccions virals en limfòcits T, B i cèl·lules presentadores d'antigen (Morra, et al.,2001a; Nanda, et al.,2005; Romero, et al.,2004). Apareixen quatre isoformes derivades per *splicing alternatiu*; una soluble, dues de transmembrana (que varien en la longitud del domini citoplasmàtic) i una citosòlica (Boles, et al.,2001; Punnonen, et al.,1997). Es tracta d'un receptor que estableix interaccions homotípiques amb si mateix tot permetent el contacte cèl·lula-cèl·lula (Mavaddat, et al.,2000).

També s'ha vist que el CD150, juntament amb el CD46, és el receptor i porta d'entrada del virus del xarampió. La infecció amb aquest virus va acompanyada d'una forta immunodepressió que afecta la funció de les cèl·lules T, B i dendrítiques (Howie, et al.,2002; Sidorenko and Clark,2003; Tatsuo, et al.,2000).

El CD150 presenta a la seva cua citoplasmàtica tres motius tirosina: Y281, Y307 i Y327. Concretament, les tirosines Y281 i Y327 uneixen SAP i EAT-2 (Sayos, et al.,1998) (Morra, et al.,2001c). És l'únic membre de la família que s'associa a SAP independentment del seu estat de fosforilació en la primera tirosina (Y281) i en la Y327 només en condicions de fosforilació (Sayos, et al.,1998). La cristal·lització de la interacció entre SAP i CD150 ha mostrat que interaccions addicionals entre el domini SH2 de SAP i els tres aminoàcids a l'amino terminal de la tirosina Y281 (sobretot la treonina en la posició -2 respecte la tirosina) de CD150 estableixen la interacció, raó per la qual hi ha interacció entre el domini SH2 de SAP i la tirosina 281 no fosforilada del CD150 (Poy, et al.,1999). Durant l'activació del CD150, l'arginina 78 de SAP

interacciona amb el domini SH3 de Fyn i acosta aquesta cinasa a la cua citosòlica del receptor permetent la fosforilació de les tirosines 307 i 327 (Chan, et al.,2003) (figura 4).

3.1.1.1 Funció del CD150

El tractament del CD150 amb anticossos o la seva isoforma soluble, en limfòcits T activats amb anti-CD3, estimula la proliferació, secreció d'IFN γ i redirigeix la resposta cap a Th1, independentment del CD28 (Aversa, et al.,1997; Cocks, et al.,1995). En limfòcits B activats amb anticossos contra el CD40, el tractament amb la isoforma soluble del CD150, estimula la proliferació i secreció d'immunoglobulines (Punnonen, et al.,1997). En aquest mateix tipus cel·lular, s'ha observat que anticossos contra el CD150 potencien l'apoptosi mediada pel CD95 (Mikhalap, et al.,1999). En limfomes B, on SAP s'expressa, l'activació amb anticossos del CD150 comporta una activació de les vies d'ERK i Akt (Mikhalap, et al.,2004; Sidorenko and Clark,2003). Anticossos contra CD150 augmenten la citotoxicitat i producció d'IFN γ dels limfòcits CD8⁺ activats amb anti-CD3 (Henning, et al.,2001). En cèl·lules dendrítiques madures, anticossos contra el CD150 augmenten la producció de la IL-12 i IL-8, sense modificar la IL-10 (Bleharski, et al.,2001). Però, més recentment s'ha descrit que la interacció SLAM-SLAM, regula negativament la producció de la IL-12, en les cèl·lules dendrítiques (Rethi, et al.,2005). En aquest mateix treball, s'indica que les cèl·lules dendrítiques que estan afectades negativament per la interacció SLAM-SLAM, no són capaces de diferenciar cèl·lules T naïf cap a cèl·lules T productores de l'IFN γ .

3.1.2 CD150 en murins

En murins, el CD150 s'expressa en timòcits, limfòcits T i B, cèl·lules dendrítiques, macròfags i plaquetes. Tal i com s'observa en humans, la seva expressió augmenta durant l'activació, apareixent també en cèl·lules NK (Castro, et al.,1999; Nanda, et al.,2005; Sayos, et al.,2000).

Recentment s'ha descobert que l'estudi de l'expressió del CD150, CD244 i CD48 al llarg de la diferenciació cel·lular murina és molt útil per distingir poblacions amb major o menor potencial desenvolupador de llinatge hematopoètic. Les cèl·lules mare

hematopoètiques (HSC) són aquelles que tenen altíssima capacitat regenerativa i poden donar lloc a qualsevol cèl·lula hematopoètica. Aquestes cèl·lules poden ser altament seleccionades i purificades, tenint en compte l'expressió dels marcadors: CD150⁺ CD244⁻ CD48⁻. Per altra banda cèl·lules que són CD150⁻ CD244⁺ CD48⁻ identifiquen les cèl·lules progenitores hematopoètiques multipotents (MPP). Les MPP estan més diferenciades que les HSC i són menys capaces de regenerar. Finalment, el fenotip cel·lular CD150⁻ CD244⁺ CD48⁺ correspon a progenitors més restringits que només donen lloc a cèl·lules B i progenitors formadors de colònies. La simple combinació d'aquests tres membres de la família del CD150 permet separar molt bé les diferents poblacions i aconseguir regeneracions molt superior al què fins ara s'obtenia (usant una combinació complicada de molts marcadors de diferents famílies). Els marcadors de la família del CD150 es conserva entre diferents soques murines i tant en ratolins joves com adults (Kiel, et al.,2005; Yilmaz, et al.,2006).

El tractament amb anticossos contra CD150 de limfòcits CD4⁺ murins activats amb anti-CD3, provoca un augment en la proliferació, producció d'IFN γ , activació d'Akt. S'està afavorint la resposta Th1, sense afectar la Th2 (Castro, et al.,1999; Howie, et al.,2002). Per tant, es considerarà que el CD150 tenia un paper positiu sobre la funció de la cèl·lula T murina.

Dos estudis van descartar que CD150 actués com a co-receptor activador. Un primer treball en què la sola estimulació amb anti-CD3 d'una línia T, que sobreexpressa CD150 i SAP, inhibeix la producció d'IFN γ sense modificar la IL2 (Latour, et al.,2001). Finalment, la caracterització de ratolins geno-deficients per CD150 on s'observa que aquest receptor actua inhibint la producció d'IFN γ i activant la resposta Th2 (Wang, et al.,2004). Per tal d'explicar aquesta controvèrsia, es considera que els anticossos contra CD150 estan actuant d'una manera antagonista i per tant, s'observen fenòmens inversos pel què fa la resposta Th1/Th2 en limfòcits T CD4⁺ (Engel, et al.,2003; Veillette,2004a).

3.1.2.1 Ratolins Deficients en CD150

En aquest model murí s'observa un correcte número de les poblacions limfocitàries (Wang, et al.,2004). En aquests ratolins es detecta una forta disminució de IL-4 i IL-13 i

una tènue o inapreciable augment de la producció d'IFN γ en l'activació via CD3 dels limfòcits CD4⁺ (la inducció d'IFN γ en els CD8⁺ via TCR és alta); s'afavoreix la resposta Th2 vers la Th1 (Cannons, et al.,2004; Davidson, et al.,2004; Wang, et al.,2004). Tot i que aquest fenomen de polarització a Th2 és menys marcat que en el fenotip del ratolí SAP^{-/-}. També s'observen defectes en l'activitat dels macròfags activats amb LPS (activa el *Toll Like Receptor-4*); disminució de l'òxid nítric, IL-12 i TNF α , augment d'IL6 i incapacitat d'eliminar la infecció per *Leishmania major* (Wang, et al.,2004). Aquest fet és independent de SAP ja que en aquests tipus cel·lulars no s'hi expressa (Wang, et al.,2004). Finalment, ratolins deficientes en CD150 mostren problemes en l'agregació plaquetària. Curiosament, durant l'agregació el CD150 es fosforila encara que SAP no hi sigui (Nanda, et al.,2005), a diferència del que s'esdevé en limfòcits, on la presència de SAP és crucial per la fosforilació del CD150. (Latour, et al.,2003; Simarro, et al.,2004).

3.1.2.2 Model de Funció del CD150

Es proposa que, en l'activació del TCR de les cèl·lules CD4⁺ en murins, hi ha un augment de l'expressió de CD150 i que d'una manera activa SAP participa en la senyal derivada d'aquest, tot reclutant Fyn: cascada CD150-SAP-Fyn (Davidson, et al.,2004; Latour, et al.,2003). L'arginina 78 de SAP interacciona amb el domini SH3 de Fyn i aproxima aquesta cinasa a CD150 tot permetent la fosforilació de les tirosines 288, 315 i 335 del domini intracel·lular del CD150 murí (Latour, et al.,2001; Latour, et al.,2003). La primera tirosina és imprescindible per SAP, les altres dues estan més relacionades amb el reclutament i activació de mediadors com SHIP-1, Dok-1 i Dok-2, Shc, Ras-GAP (Chen, et al.,2005; Davidson, et al.,2004; Latour, et al.,2001; Latour, et al.,2003). Per altra banda també s'activa la PKC θ i els factors de transcripció NF κ B i Gat-3, relacionats amb citocines de tipus Th2 (IL-4 i IL-13). En canvi, tot i que hi ha certs estudis que detecten una disminució de l'IFN γ , no hi ha variacions en el factor de transcripció T-bet, responsable d'activar el gen d'aquesta citocina (Cannons, et al.,2004; Davidson, et al.,2004). Tampoc varien els nivells de la IL-2 ni del seu factor de transcripció c-Rel (Cannons, et al.,2004; Latour, et al.,2001). Encara que s'han de relacionar els camins de senyalització desencadenats, es coneix que sense la fosforilació del receptor per part de Fyn aquesta cascada no s'activa, tot i que SAP estigui unit al

CD150 independentment de la fosforilació del receptor (Davidson, et al.,2004). En la figura 7 s'esquematitzen les senyals conegudes derivades de la co-estimulació del CD3 i CD150 en limfòcits T CD4⁺, que desemboquen en la producció de IL-4 i IL-12, en la tènue inhibició de l'IFN γ , sense modificar la IL2.

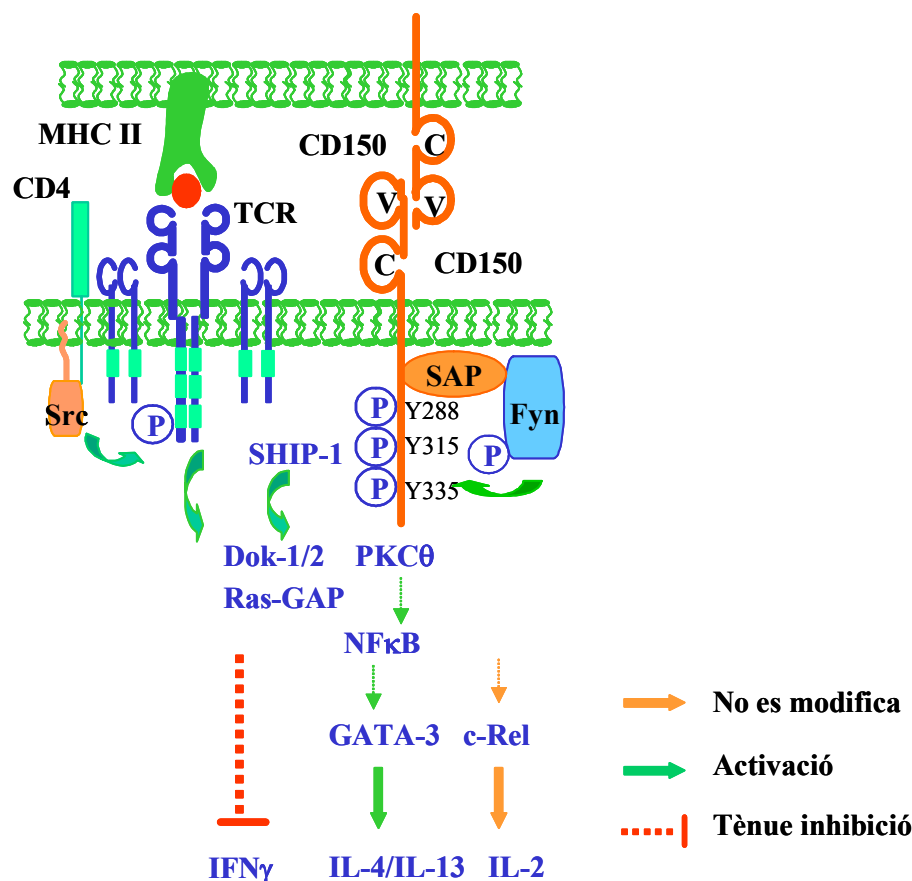


Figura 7. Regulació de la resposta Th2 mediada pel CD150. La lligació de CD150 comporta el reclutament de SAP, Fyn i la fosforilació de les tirosines 288, 315 i 335 de CD150. Això permet l'activació de mediadors més distals que col·laboren junt amb les senyals derivades del TCR per activar la resposta Th2 (IL-4 i IL-13), inhibir tènueament la producció d'IFN γ sense modificar la IL-2. Model basat en (Nichols, et al.,2005a; Veillette,2004a; Veillette,2006).

Degut a que en limfòcits T humans també s'ha treballat amb anticossos i s'han observat increments en la producció de l'IFN γ , podria ser que tal i com passa en l'espècie murina, els anticossos estiguessin actuant d'una manera antagonista i s'emascarés l'efecte del CD150 (Bhat, et al.,2005), tal i com s'ha observat per les cèl·lules dendrítiques humanes (Rethi, et al.,2005).

3.2 CD244

3.2.1 CD244 en humans

Es tracta d'una proteïna de tipus I amb vuit punts de N-glicosilació amb un pes de 66-80 KDa (Tangye, et al.,1999). Està composta d'un domini extracel·lular, transmembrana i citosòlic de 201, 24 i 120 aminoàcids, respectivament (Tangye, et al.,1999). S'expressa en cèl·lules NK immadures i madures, limfòcits T $\gamma\delta$, mastòcits, eosinòfils, basòfils i monòcits. També s'expressa en una petita fracció de limfòcits T CD8⁺ citotòxics, però la seva expressió augmenta molt durant l'activació, adquirint un fenotip memòria/efector. En monòcits activats amb LPS, s'observa una davallada del CD244 a membrana (Nichols, et al.,2005a; Romero, et al.,2004). En humans apareixen dues isoformes; h2B4-A i h2B4-B, amb una prolina de més al domini extracel·lular, però amb la cua citoplasmàtica idèntica (Boles, et al.,2001). El seu lligand natural és el CD48 (Brown, et al.,1998; Latchman, et al.,1998).

3.2.1.1 Funció del CD244

En humans, el tractament del CD244 amb anticossos o amb el seu lligand natural provoquen un augment en la citotoxicitat i en la producció d'IFN γ en cèl·lules NK. El CD244 actua tant com a co-receptor com a receptor activador primari de la citotoxicitat independent de MHC de classe I de la cèl·lula NK (Boles, et al.,1999; Chuang, et al.,2000; Kubin, et al.,1999; Nakajima, et al.,1999; Sivori, et al.,2000).

Aquest paper activador del CD244 es dona amb total dependència de la capacitat que té per reclutar SAP. La importància d'aquesta interacció i senyalització desencadenada, es reflecteix en els malalts amb la síndrome d'XLP. En cèl·lules NK derivades d'aquests pacients, hi ha una incapacitat molt marcada de muntar una correcte citotoxicitat i alliberació d'IFN γ durant l'activació del CD244 (Benoit, et al.,2000; Nakajima, et al.,2000; Tangye, et al.,2000a). Més concretament, en aquests casos s'ha proposat que el CD244 juga un paper inhibidor (Parolini, et al.,2000). També s'ha vist que el receptor CD244 juga un paper inhibidor de la citotoxicitat durant la maduració de les NK

humanes, fenomen que sembla estar relacionat amb la manca d'expressió de SAP (Sivori, et al.,2002).

L'activació del CD244 implica un reclutament del receptor a rafts on la seva cua citoplasmàtica serà fosforilada, fenòmens imprescindible per la seva correcta activitat. La co-ligació del CD244 i receptors inhibidors, evita que el CD244 vagi a rafts, que es fosforili i s'activi la cèl·lula NK per lisar (Watzl and Long,2003; Watzl, et al.,2000).

El CD244 humà presenta quatre motius tirosines TxYxxV/I en la cua citoplasmàtica susceptibles a la fosforilació; tres dels quals entren en consens amb el motiu d'interacció per SAP (TV/IYxxV/I). Només en condicions de fosforilació, mediada per Fyn o Lck, hi ha una interacció directa entre el receptor CD244 i SAP (Nakajima, et al.,2000; Sayos, et al.,2000; Tangye, et al.,1999). El CD244 i SAP col·localitzen durant la sinapsi formada entre la cèl·lula citotòxica NK i la cèl·lula diana (Roda-Navarro, et al.,2004).

Durant l'estimulació del CD244, SAP activament acosta la cinasa Fyn per fosforilar el domini citosòlic del receptor (Chen, et al.,2004). Durant aquesta activació els motius tirosina del domini intracel·lular del CD244 col·laboren per assegurar una forta interacció amb SAP (Chen, et al.,2004; Eissmann, et al.,2005). Per altra banda hi ha articles que descriuen una interacció, en rafts, del CD244 amb LAT a través dels seus dominis transmembrana (Bottino, et al.,2000; Chuang, et al.,2001). Tot i que d'altres treballs descriuen que aquesta interacció no es dona (Chen, et al.,2004; Tassi and Colonna,2005). També s'ha detectat que la cua citosòlica del CD224 interacciona amb la subunitat reguladora de la PI3K (p85), fenomen crucial per reclutar SAP i activar la citotoxicitat (Aoukaty and Tan,2002).

La lligació del CD244 comporta la fosforilació i activació d'un seguit de molècules efectores positives: Vav-1, PLC γ , Akt, GSK3, PKC, Rac, Ras i la via de les MAPK (Raf, MEK, ERK i p38) (Aoukaty and Tan,2005; Chen, et al.,2004; Chuang, et al.,2003; Tassi and Colonna,2005; Watzl, et al.,2000). Les senyals que es desencadenen asseguruen una activació de la cèl·lula NK: desgranulació, citotoxicitat i producció d'IFN γ .

Per altra banda, molts treballs han vist que l'activació del CD244 va acompanyada de la coprecipitació amb les fosfatases SHP-1, SHP-2 (Eissmann, et al.,2005; Parolini, et al.,2000; Tangye, et al.,1999; Watzl, et al.,2000). Usant pèptids s'ha detectat interacció del CD244 fosforilat amb SHP-1, SHP-2, SHIP i Csk en el tercer motiu ITSM (Eissmann, et al.,2005). La interacció amb aquestes quatre molècules es relacionen amb inhibició de l'activitat lítica (Eissmann, et al.,2005). Però hi ha treballs que no detecten coprecipitació del CD244 amb les fosfatases SHP-1 i SHP-2 (Chen, et al.,2004; Nakajima and Colonna,2000). De qualsevol manera, l'activació del CD244 comporta la fosforilació de c-Cbl i SHIP, molècules que deuen estar relacionades amb la inhibició de l'activació o regulació negativa de la senyal mediada pel CD244 (Chen, et al.,2004).

La combinació de lligands intracel·lulars dicta el paper inhibidor o activador del CD244, tot i que la cascada SAP-Fyn és imprescindible per la fosforilació del receptor i l'activació d'una senyal positiva (Chen, et al.,2004; Eissmann, et al.,2005; Veillette,2006).

En les cèl·lules T CD8⁺ amb fenotip memòria/efector, el CD244 actua com a co-receptor activador en la citotoxicitat i producció d'IFN γ (Speiser, et al.,2001). Aquesta acció és també depenent de SAP, tal i com es mostra en línies CD8⁺ derivades de pacients amb XLP on hi ha una clara deficiència en la lisi i producció d'IFN γ . En cèl·lules CD8⁺ deficients en SAP hi ha una incapacitat de polaritzar el CD244 i la perforina en l'àrea de contacte entre la cèl·lula CD8⁺ i la cèl·lula diana (Dupre, et al.,2005; Sharifi, et al.,2004).

3.2.2 CD244 en murins

El CD244 s'expressa en les cèl·lules NK, limfòcits T $\gamma\delta$, CD8⁺ amb fenotip memòria/efector, monòcits i basòfils (Assarsson, et al.,2005). Els primers estudis portats a terme en ratolins, indicaven que el CD244 activava la lisi independent d'MHC de classe I (Garni-Wagner, et al.,1993; Schuhmachers, et al.,1995). Més tard, però, es van clonar les dues isoformes que apareixen (només en murins) derivades de l'*splicing* alternatiu i que varien en les cues citoplasmàtiques; m2B4-L (isoforma llarga amb la cua semblant a la humana) i m2B4-S (isoforma curta amb només el primer motiu

tirosina per SAP) (Boles, et al.,1999; Stepp, et al.,1999). La transfecció en cèl·lules NK de rata d'una o altra isoforma murina i l'activació amb anticossos contra el CD244, indicava que m2B4S actuava estimulants la citotoxicitat, mentre que la m2B4L la inhibia (Schatzle, et al.,1999). L'aparició de ratolins genodeficients pel receptor CD244 ha acabat d'ajudar a entendre aquest fenomen.

3.2.2.1 Ratolins Deficients en CD244

Els ratolins genodeficients pel CD244 són fenotípicament normals i amb les poblacions limfocitàries semblants als ratolins salvatges (Vaidya, et al.,2005). Les cèl·lules NK derivades d'aquests ratolins, mostren un augment de la citotoxicitat en front a tumors CD48⁺ tant in vivo com in vitro i una major producció d'IFN γ . En canvi, les cèl·lules NK derivades dels ratolins salvatges mostren una menor activitat. Per tant, el CD244 actuaria com a molècula inhibidora de l'activitat NK. Aquest fenomen inhibitori és conseqüència de l'acció de la isoforma llarga del CD244 i es dona tant en les NK madures com immadures (Lee, et al.,2004b). La inhibició és independent de l'expressió de SAP; les NK immadures no n'expressen però les madures sí, tot i així, en ambdós casos el CD244 està bloquejant la citotoxicitat. En canvi, l'expressió d'EAT-2 es manté constant al llarg de la maduració de la cèl·lula NK (Lee, et al.,2004b; Mooney, et al.,2004; Vaidya, et al.,2005).

Encara que el CD244 juga un paper inhibidor en front de tumors CD48⁺, la interacció entre el CD244 i CD48 expressat en les mateixes NK co-estimula, junt amb la IL-2, la pròpia proliferació i generació de cèl·lules efectores, anomenades LAKs (Assarsson, et al.,2005; Assarsson, et al.,2004). El bloqueig de tal interacció evita la proliferació i generació de LAKs. D'aquesta manera, les LAKs derivades de ratolins deficients pel CD244 no són tan eficients com les salvatges en la lisi de tumors CD48⁺ (Lee, et al.,2005). Però en front de tumors CD48⁺, les LAKs dels ratolins genodeficients per CD244, lisen millor. Per tant l'efecte inhibidor del CD244 és dominant respecte l'efecte co-estimulador entre cèl·lules NK (Lee, et al.,2005).

3.2.2.2 Model de Funció del CD244

El paper del CD244 en murins, és d'inhibició de la citotoxicitat en la cèl·lula NK en front de tumors CD48⁺. En canvi, la interacció entre el CD244 i el CD48 estimula la proliferació de la pròpia cèl·lula NK. Per tant, les senyals derivades de la interacció de CD244 amb el CD48 són suficients per desencadenar proliferació, però, en canvi, estan inhibint l'activitat citotòxica i aquest fenomen preval sobre la co-estimulació (Colonna,2005; Lee, et al.,2005; McNerney, et al.,2005; Mooney, et al.,2004).

En murins, el 2B4-L interacciona tant amb EAT-2/ERT com amb SAP només en condicions de fosforilació (Chen, et al.,2004; Roncagalli, et al.,2005). L'estimulació del CD244 en la cèl·lula NK provoca la fosforilació de les tirosines 267, 326, 345, 370 en la regió intracel·lular del CD244, que col·laboren en el reclutament eficient de SAP, tot i que la 326 no està englobada dins un motiu consens per SAP (Chen, et al.,2004). Fyn col·labora activament en les senyals positives mediades pel CD244 (Bloch-Queyrat, et al.,2005). En canvi, la sobreexpressió d'EAT-2 va associada a una pobre fosforilació del CD244 durant la seva activació i a una inhibició de l'activitat NK. Aquesta inhibició és dependent de les dues tirosines d'EAT-2, mitjançant les quals podria acostar mediadors. EAT-2 també inhibeix la citotoxicitat mediada per receptors activadors (CD16, Ly49D) que s'activen per Src cinases. En canvi, la fosforilació i l'activitat positiva del CD244 és dependent de la cascada SAP-Fyn (Bloch-Queyrat, et al.,2005). Hi ha evidències de que LAT està relacionat amb l'activitat positiva, ja que el ratolí genodeficient per LAT no activa bé la citotoxicitat mediada pel CD244 (Klem, et al.,2002). Però hi ha treballs que no detecten una interacció LAT-CD244 (Chen, et al.,2004).

Per tant un equilibri entre l'expressió de SAP (que és baixa) i EAT-2/ERT i la unió d'aquests dos amb el receptor, deuen estar dirigint la senyalització via CD244 (Bloch-Queyrat, et al.,2005; Colonna,2005; McNerney, et al.,2005). En la figura 8 es planteja el model proposat per (Veillette,2006), pel qual l'activació del CD244 pot enviar senyals positives o negatives pel què fa l'activitat de la cèl·lula NK.

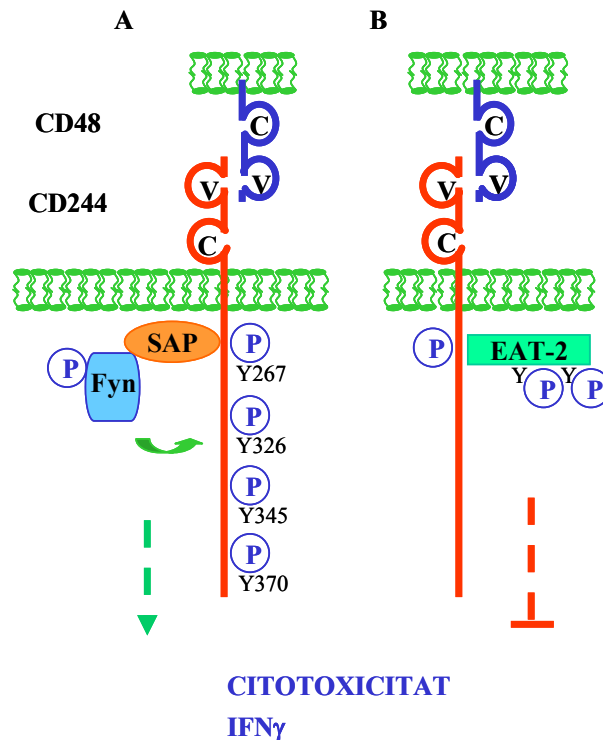


Figura 8. Possible model de la funció activadora i inhibidora del CD244 en cèl·lules NK.

(A) En presència de SAP una senyal positiva és iniciada per Fyn, resultant en l'activació de la citotoxicitat i producció d'IFN γ . (B) En presència d'EAT-2, una senyal provoca la fosforilació de les dues tirosines en l'extrem carboxi-terminal d'EAT-2 i que el CD244 es fosforili menys. En aquest cas s'inhibeix la funció de la cèl·lula NK. Basat en el model de (Veillette,2006) .

En els limfòcits T CD8⁺ efectors murins, la lligació del CD244 amb anticossos implica un increment de la citotoxicitat no restringida per MHC de classe I (Garni-Wagner, et al.,1993). També, hi ha evidències que les dues isoformes del CD244 col·laboren amb el CD3 per activar la citotoxicitat en front de tumors sensibles a la lisi, independentment de l'expressió del CD48 en aquests (Lee, et al.,2003). Per tant el CD244 actua com a co-receptor en la citotoxicitat depenent i independent d'MHC de classe I. Per altra banda, la interacció cèl·lula-cèl·lula entre CD8⁺-CD8⁺ i CD8⁺-NK mitjançada pel CD244 amb el CD48 és important per estimular la proliferació i generació de cèl·lules CD8⁺ efectores. El bloqueig d'aquesta interacció amb anticossos evita la proliferació i activitat lítica dels limfòcits CD8⁺ (Assarsson, et al.,2004; Kambayashi, et al.,2001; Lee, et al.,2003).

3.3 CD229

3.3.1 CD229 en humans

Glicoproteïna de tipus I de membrana amb set possibles motius de N-glicosilació. Està constituïda per uns 608 aminoàcids, 179 dels quals formen la seva cua citoplasmàtica. Té un pes d'uns 120 KDa, tot i que presenta una isoforma de 100 KDa derivada d'*splicing alternatiu* amb un domini extracel·lular de menys (de la Fuente, et al.,2001). És l'únic membre de la família del CD150 que presenta quatre dominis immunoglobulina a la seva regió extracel·lular. La semblança entre els dominis 1 i 3 V i els dominis 2 i 4 C2 suggereix que deriven d'una duplicació d'un progenitor amb només dos domini extracel·lulars. Es troba en la membrana de limfòcits T, B i timòcits. La seva expressió augmenta durant la maduració dels timòcits; la màxima expressió és en CD4⁺ i CD8⁺ simples positius. Però no augmenta durant l'activació del limfòcit T, per tant no hi ha diferències entre les cèl·lules naïf (o verge) i les memòria. En canvi, sí que augmenta durant l'activació de les cèl·lules B (de la Fuente, et al.,2001; Romero, et al.,2004). El CD229 estableix interaccions homotípiques a través dels àcids glutàmics 27 i 29 i l'arginina 89, presents en el primer domini V a l'extrem amino-terminal, entre dues molècules de CD229 en dues cèl·lules adjacents. S'ha vist que es relocalitza en l'àrea de contacte entre el limfòcit T i B en la formació de la sinapsi immunològica (Romero, et al.,2005).

3.3.1.1 Model de Funció del CD229

La seva cua citoplasmàtica presenta dos únics motius consens per interaccionar amb SAP i EAT-2 només en condicions de fosforilació en les tirosines 558 i 581 (Morra, et al.,2001c; Sayos, et al.,2001). La interacció entre SAP i CD229 és important per la fosforilació del receptor (Simarro, et al.,2004). A part d'interaccionar amb la família d'adaptadors SAP, la cua citosòlica del CD229 presenta motius per reclutar altres molècules. És l'únic membre de la família que interacciona directament amb la cadena $\mu 2$ del complex AP-2; molècula que connecta el receptor amb vesícules de clatrina i està relacionat amb l'endocitosi i transport de proteïnes des de la membrana a compartiments de l'endosoma i lisosoma. Aquesta interacció es dona en un motiu diferent al de SAP (tirosina 470) i en condicions de no fosforilació. S'observa que

anticossos i fragments $F(ab')_2$ contra el CD229 promouen, respectivament, l'endocitosi ràpida d'aquest receptor tant en limfòcits T com B (els receptors Fc, abundants en aquest tipus cel·lular, inhibeixen la internalització). Aquesta internalització segueix principalment la degradació lisosomal, més que el reciclatge cap a la membrana, sobretot en cèl·lula B. La internalització del CD229 és regulable pels receptors d'antigen T i B; la col·ligació del CD229 amb aquests últims, potencia l'endocitosi del receptor CD229 (Del Valle, et al.,2003).

Per altra banda, CD229 està relacionat amb l'atenuació de la senyal positiva mediada pel TCR. En limfòcits T, la col·ligació del CD3 amb el CD229 està modulant negativament l'activació d'ERK, NFAT i la producció d'IFN γ . Finalment, és l'únic membre de la família capaç d'interaccionar amb el domini SH2 de Grb-2 en la tirosina 606 (també fora del motiu per SAP). Aquesta interacció és depenent de fosforilació; mediada tant per Fyn com Lck. També s'observa en cèl·lules T, que l'estimulació amb CD3 o anti-CD299 permet que el receptor es fosforili ràpidament i s'associï a Grb-2. La interacció amb Grb-2 és crítica per permetre la correcta endocitosi del receptor, ja que el mutant d'interacció per 606 no és capaç d'endocitar el receptor tot i que continua interaccionat amb $\mu 2$. En canvi, aquest mutant, té encara un efecte negatiu en la producció d'IFN γ (Martin, et al.,2005).

En el següent model es mostra l'associació de SAP, Grb-2 i AP-2 amb la cua citosòlica del CD229 i les conseqüències funcionals de la col·ligació del receptor juntament amb el TCR, amb Grb-2 com a pont de connexió entre la senyalització del TCR i del CD229. El TCR permet que el CD229 es fosforili, recluti Grb-2 i s'incrementi l'endocitosi del receptor CD229. El CD229 atenua la senyalització positiva mediada pel TCR sobre la fosforilació d'ERK i l'activació d'NFAT (figura 9).

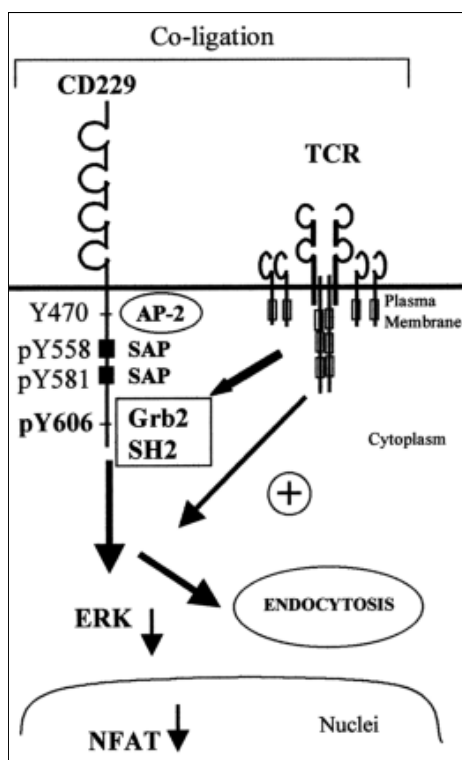


Figura 9. Model de senyalització del CD229 en la que Grb2 connecta el TCR i la senyal del CD229. La col·ligació del TCR i del CD229 atenua la senyalització del TCR i el TCR controla l'estat de fosforilació del CD229, unió de Grb-2 i internalització del CD229. La Tirosina Y470 està involucrada en el reclutament d'AP-2, les Y558 i Y581 uneixen SAP i la Y606 interacciona amb Grb2 (Martin, et al.,2005).

3.3.2 CD229 en murins

El CD229 murí també presenta els quatre dominis immunoglobulina i té una elevada homologia a la seqüència humana. El perfil d'expressió és semblant al dels humans; timòcits, limfòcits T i B madurs (de la Fuente, et al.,1999; Tovar, et al.,2000), tot i que en aquesta espècie també s'expressa en macròfags, granulòcits i cèl·lules dendrítiques (Graham, et al.,2006).

3.3.2.1 Ratolins deficients en CD229

Recentment s'ha caracteritzat el fenotip dels ratolins genodeficients pel CD229. A diferència del ratolins deficients en SLAM o SAP, els limfòcits T CD229^{-/-} en front a

una estimulació amb anti-CD3, mostren defectes en la proliferació i producció de IL-2. Sembla ser que el CD229 tindria un paper activador en aquestes condicions. Pel què fa la resposta Th1/Th2, s'observa una tènue disminució en la producció d'IL-4 i IgE, però nivells comparables a un *wild type* pel què fa l'IFN γ , en front una estimulació CD3-CD28. Finalment, a diferència del SAP^{-/-}, els ratolins deficientes en CD229 responen perfectament a una infecció pel virus LCMV (Graham, et al.,2006).

3.4 CD84

3.4.1 CD84 en humans

Glicoproteïna de tipus I de membrana d'un pes d'entre 64 i 82 KDa degut a la presència de 4 motius de N-glicosilació. Està constituïda per una seqüència de 307 aminoàcids, 189 dels quals formen la regió intracel·lular (de la Fuente, et al.,1997). S'expressa majoritàriament en limfòcits B, monòcits i abundantment en plaquetes, tot i que també es troba en timòcits, limfòcits T, cèl·lules dendrítiques, eosinòfils, basòfils, mastòcits. La seva expressió augmenta durant activació cel·lular; l'expressió més elevada es troba en plaquetes i en els limfòcits T memòria/efectors CD45RO⁺ (Martin, et al.,2001; Romero, et al.,2004). També es tracta d'un receptor amb interacció homotípica a través del seu domini V amino-terminal, fenomen que es dona amb independència del seu domini citosòlic (Martin, et al.,2001).

3.4.1.1 Funció del CD84

Tant en limfòcits T com B activats, el CD84 és fosforila i interacciona amb SAP i EAT-2 (Sayos, et al.,2001; Tangye, et al.,2002; Tangye, et al.,2003). La cua citoplasmàtica del CD84 presenta dos motius per la família SAP; mapats en les tirosines 262 i 298 fosforilables per Lck. Després de la fosforilació, la primera tirosina és essencial per reclutar SAP, mentre que ambdues poden enllaçar EAT-2 (Tangye, et al.,2003).

L'activació del CD84 amb anticòs o proteïna de fusió en limfòcits T activats amb dosis subòptimes de CD3, provoca un augment en la secreció d'IFN γ (Martin, et al.,2001). També s'ha vist que, junt amb el CD3 està estimulants la proliferació, fenomen que es

dóna amb independència de SAP. En limfòcits T derivats de pacients amb XLP, s'observa que el CD84 també es fosforila usant anticòs contra CD84. A més en aquests pacients, l'activació amb CD84 i CD3 no afecta a la proliferació. Per tant hi ha vies de senyalització activades pel CD84 independents de SAP (Tangye, et al.,2003).

En limfòcits B, el CD84 defineix dues poblacions; la CD84 amb alta expressió (CD84^{hi}) representa una població memòria amb elevada capacitat de proliferació i més mutacions somàtiques, comparat amb la CD48 de baixa expressió (CD84^{lo}) (Tangye, et al.,2002). Finalment, també s'ha descrit que el CD84 està involucrat en l'agregació plaquetària (Nanda, et al.,2005).

Encara no s'ha caracteritzat el fenotip dels ratolins deficients per CD84 i els estudis fins ara portats a terme s'han centrat en el CD84 humà.

3.5 NTB-A

3.5.1 NTB-A en humans

El NTB-A (*NK-T-B antigen*) és una glicoproteïna de membrana tipus I d'uns 60 KDa de pes amb set punts de N-glicosilació (Bottino, et al.,2001). Està formada per 331 aminoàcids, amb una cua citosòlica de 83 aminoàcids (Fraser, et al.,2002). Estableix interaccions homotípiques (Falco, et al.,2004; Flaig, et al.,2004). S'expressa en les cèl·lules NK, timòcits, limfòcits T $\gamma\delta$, CD4⁺ i CD8⁺ i B (Bottino, et al.,2001).

3.5.1.1 Funció del NTB-A

La seva cua citoplasmàtica presenta dos motius per interaccionar directament amb SAP i EAT-2 només en condicions de fosforilació, en les tirosines Y284 i Y308 (Fraser, et al.,2002).

Quan aquest receptor estableix interaccions homotípiques o és tractat amb anticossos específics, s'activa i funciona com a co-receptor activador de la citotoxicitat i producció d'IFN γ en cèl·lules NK (Bottino, et al.,2001; Falco, et al.,2004; Flaig, et al.,2004; Stark

and Watzl,2006). Aquesta activitat positiva és totalment depenent de la capacitat que té per reclutar SAP durant la seva activació. Cèl·lules NK derivades de pacients amb la síndrome d'XLP, activades via NTB-A, són incapaces de lisar cèl·lules dianes, de fet, estan mediant senyals inhibidores tal i com s'observa pel CD244 (Bottino, et al.,2001; Falco, et al.,2004).

Estudis desenvolupats en limfòcits T humans activats, han demostrat que anticossos contra el NTB-A co-estimulen la proliferació, producció d'IFN γ i s'afavoreix el fenotip Th1 (Valdez, et al.,2004).

3.5.2 Ly108 en murins

Ly108 és el nom a l'homòleg murí del NTB-A humà (Fraser, et al.,2002) (Peck and Ruley,2000). També presenta en la seva cua citosòlica els dos motius per la família SAP (Fraser, et al.,2002). En murins, a part d'expressar-se en cèl·lula T, B també es troba en macròfags, cèl·lules dendrítiques i granulòcits (Howie, et al.,2005).

3.5.2.1 Ratolins deficients en Ly108

Els limfòcits T CD4⁺ derivats dels ratolins deficients per Ly108 tenen defectes en la resposta Th2 tal i com demostra la baixa producció de IL-4. En canvi, no hi ha defectes en la producció de l'IFN γ . Per tant són ratolins que queden protegits en front d'infeccions que requereixen d'una resposta Th2 per formar lesió. En front d'infeccions bacterianes, els neutròfils d'aquests ratolins, responen produint altes dosis d'IL-6, IL-12 i TNF α . Tot i que fagociten correctament, no són capaços de desenvolupar una resposta bacteriocida eficient, ja que produeixen poques espècies reactives d'oxigen. Són, per tant, més susceptibles a aquestes infeccions (Howie, et al.,2005).

3.6 CD319

3.6.1 CD319 en humans

Glicoproteïna de membrana tipus I d'uns 66 KDa i amb set punts de N-glicosilació. Està formada per 335 aminoàcids. S'expressa sobretot en limfòcits CD8⁺ i cèl·lules NK, però

també es troba en limfòcits CD4⁺, limfòcits B activats i cèl·lules dendrítiques madures (Bouchon, et al.,2001). En humans, apareixen dues isoformes derivades del *splicing* alternatiu que varien en la longitud de la seva regió citosòlica: una isoforma curta i una llarga (Boles, et al.,2001; Lee, et al.,2004a). La isoforma llarga del CD319 presenta un motiu consens per SAP i s'ha demostrat que interacciona directament amb l'adaptador en condicions de fosforilació (Tovar, et al.,2002). Altres treballs només han vist interacció amb EAT-2 (Tassi and Colonna,2005). També es tracta d'un receptor amb interaccions homotípiques (Kumaresan, et al.,2002).

3.6.1.1 Funció del CD319

Els treballs fins ara portats a terme demostren que l'activació del CD319 amb anticòs o proteïna de fusió (que mimetitza el lligand), activen la citotoxicitat de la cèl·lula NK humana (Bouchon, et al.,2001; Kumaresan, et al.,2002; Lee, et al.,2004a; Stark and Watzl,2006; Tassi and Colonna,2005).

CD319 activa la citotoxicitat mediada per la cèl·lula NK amb un mecanisme independent de SAP, ja que cèl·lules NK derivades de pacients amb la síndrome d'XLP, responen com les sanes a l'estímul amb anticossos contra el CD319. En canvi, la citotoxicitat mediada via CD319 és dependent d'ERK (Bouchon, et al.,2001).

EAT-2 permet que el CD319 es fosforili tot acostant-li, probablement, una cinasa de la família Src, tal i com es demostra usant inhibidors de les Src cinases. L'activació del receptor implica un augment de la citotoxicitat i l'activació de diferents molècules efectores: Vav, PLC γ , Akt, SHIP-1 i c-Cbl. Per tal de que hi hagi una bona lisi cel·lular via CD319 cal la participació de les cinases Src i de la PLC γ (Tassi and Colonna,2005).

En l'espècie murina també apareixen les dues isoformes del CD319 (Tovar, et al.,2002). En aquesta espècie el CD319 no presenten motius d'interacció per SAP o EAT-2, i tampoc es detecta interacció entre el receptor i els adaptadors (Roncagalli, et al.,2005; Tovar, et al.,2002). Encara no s'ha descrit el fenotip dels ratolins deficientes en CD319.

3.7 CD48

Glicoproteïna ancorada a la membrana per un glicosilfosfatidilinositol (GPI) amb un pes de 40 a 45 KDa. Tant en humans com en murins, el CD48 s'expressa àmpliament en el sistema immune; cèl·lules T, B, NK, dendrítiques, monòcits i granulòcits (Brown, et al.,1998; Kubin, et al.,1999; Latchman, et al.,1998). La seva expressió augmenta en estadis infecciosos i per estimulació amb IFN α , IFN β i IFN γ (Boles, et al.,2001). La infecció amb el EBV indueix l'expressió del CD48 en limfòcits B (Fisher and Thorley-Lawson,1991). Tant en humans com en murins, el CD48 presenta certa capacitat d'unir el CD2, però el lligand pel què té més afinitat, és el CD244. També s'ha demostrat que és el lligand de FimH; lectina expressada en certes enterobactèries (Engel, et al.,2003)

Tant en humans com en murins, el CD48 es localitza en rafts on s'associa amb la proteïna G i amb la família de les Src cinases (Garnett, et al.,1993; Stefanova, et al.,1991). El tractament amb anticossos contra el CD48 ha mostrat que Lck es fosforila (Assarsson, et al.,2004). A més, al reconèixer el seu lligand, actua com a co-receptor en la proliferació i activació de cèl·lules B, T CD4⁺ i CD8⁺, NK i dendrítiques (Assarsson, et al.,2005; Assarsson, et al.,2004; Boles and Mathew,2001; Gao, et al.,2005; Kambayashi, et al.,2001; Kubin, et al.,1999; Messmer, et al.,2006). L'activació conjunta del TCR i CD48 permet una major entrada del TCR a rafts, l'activació de la reorganització del citoesquelet i fosforilació de la cadena ζ del TCR (Moran and Miceli,1998). Per tant, el CD48 sembla ser capaç d'enviar senyals citoplasmàtiques (Assarsson, et al.,2005).

En pacients amb malalties limfoproliferatives, artritis o infecció per EBV, es detecten nivells elevats de la forma soluble del CD48 en plasma (Smith, et al.,1997). La viabilitat de cel·lules tumorals disminueix amb el tractament de les cèl·lules efectores amb anticossos contra el CD48, per tant s'ha suggerit que el tractament amb anticossos contra el CD48 pot ser una eina terapèutica pel tractament de leucèmies i limfomes (Sun, et al.,2000).

Els ratolins genodeficients pel CD48 mostren clars defectes per muntar una correcta resposta immunològica, ja que els limfòcits T CD4⁺ derivats d'aquests ratolins tenen

reduïda la proliferació i la producció de la IL-2 durant l'activació amb CD3 o al·loantigens (Valiante and Trinchieri,1993) (Gonzalez-Cabrero, et al.,1999). Les cèl·lules LAK derivades d'aquests ratolins també mostren una citotoxicitat disminuïda en de front de tumors sensibles a la lisi (Lee, et al.,2005).

3.8 BLAME

Glicoproteïna de membrana del tipus I pertanyent a la família del CD150. Està formada per 280 aminoàcids amb una cua citosòlica de 31 aminoàcids sense motius aparents per la família d'adaptadors SAP. S'expressa, tant en humans com en murins, en cèl·lules presentadores d'antigen professionals: macròfags i cèl·lules dendrítiques després de l'activació. Tot i que encara no es coneix el seu lligand, es creu que és present en les cèl·lules B. Experiments portats a terme en ratolins han demostrat que BLAME estimula la proliferació d'un llinatge específic de cèl·lula B: B1a (Kingsbury, et al.,2001)

3.9 CD84-H1

Proteïna de membrana de la família del CD150 formada per 289 aminoàcids. S'expressa principalment en cèl·lules del sistema immunològic: macròfags, cèl·lules dendrítiques, limfòcits T i B. El seu lligand natural és encara desconegut. Presenta una cua citoplasmàtica de 30 aminoàcids, sense motius per interaccionar amb la família d'adaptadors SAP. Per tant es creu que està relacionat amb l'adhesió cel·lular o en l'activació o inhibició d'altres receptors pels quals ell és el lligand (Fennelly, et al.,2001; Fraser, et al.,2002; Zhang, et al.,2001).

3.10 Taula resum de distribució cel·lular, lligand extracel·lular i funció dels membres de la família del CD150.

En aquesta taula es resumeix l'expressió, lligand extracel·lular i funció principal dels membres de la família del CD150.

Receptor	Expressió	Lligand	Funció
CD150	Cèl.lula T, B, Macròfags, Dendrítiques i Plaquetes	CD150	Regulació de la producció d'IFN γ i proliferació induïda pel TCR Regulació de la producció d'Ig i proliferació en la cèl.lula B Regulació de la producció de citocines en cèl.lules dendrítiques
CD244	Cèl.lula NK, CD8 ⁺ , $\gamma\delta$, Basòfils, Eosinòfils i Mastòcits	CD48	Regulació de l'activitat citotòxica i productora d'IFN γ en cèl.lules NK i CD8 ⁺
CD229	Cèl.lula T i B	CD229	Regulació de la producció d'IFN γ induïda pel TCR
CD84	Cèl.lula T, B, Dendrítica, Monòcits, Plaquetes, Bsòfils, Mastòcits, Eosinòfils	CD84	Regulació de la producció d'IFN γ induïda pel TCR
NTB-A	Cèl.lula T, B i NK	NTB-A	Regulació de la citotoxicitat i producció d'IFN γ en cèl.lula NK
CD319	Cèl.lula T, B, NK i Dendrítiques	CD319	Regulació de la citotoxicitat en cèl.lula NK
CD48	Cèl.lula T, B, NK, Dendrítiques, Monòcits i Granulòcits	CD48	Regulació de l'activació en les cèl.lules on s'expressa
BLAME	Macròfags i Cèl.lules Dendrítiques	Desconegut	Desconegut
CD84-H1	Cèl.lula T, B, Dendrítiques, Macròfags	Desconegut	Desconegut

II. OBJECTIUS I PLANTEJAMENT DEL PROBLEMA

OBJECTIUS I PLANTEJAMENT DEL PROBLEMA

La família del CD150 està formada per receptors de membrana de cèl·lules leucocitàries. Al llarg d'una resposta immunològica, aquestes molècules actuen com a co-receptors, intervenint en la regulació de la producció de citocines i en la citotoxicitat cel·lular. La importància d'aquesta subfamília de receptor radica en el fet que sis dels seus membres (CD84, CD150, CD229, CD244, CD319, NTB-A), presenten a la seva cua citoplasmàtica com a mínim, un motiu per reclutar una família de dues petites molècules adaptadores. Aquests adaptadors reben el nom de SAP i EAT-2 i estan formats exclusivament per un domini SH2 i una cua de pocs aminoàcids (Morra, et al.,2001c; Sayos, et al.,1998)

Mutacions en el gen que codifica per SAP (o sh2d1a) són responsables d'una greu patologia anomenada síndrome limfoproliferativa associada al cromosoma X (XLP) o malaltia de Duncan. Es tracta d'una immunodeficiència primària que afecta només als homes (sexe masculí). Es caracteritza per una extrema vulnerabilitat en front d'infeccions per part del virus de l'Epstein Barr (EBV). Fins ara, s'han detectat tres fenotips associat a aquesta malaltia: mononucleosi infecciosa fulminant, limfomes de tipus B i disgammaglobulinèmia. Un pacient pot desenvolupar més d'un d'aquests fenotips, sobretot després del contacte amb l'EBV. La majoria de pacients moren abans dels 40 anys i el 70%, moren abans dels 10 anys (Engel, et al.,2003; Morra, et al.,2001a).

El treball d'aquesta tesi s'ha centrat en conèixer nous lligand intracel·lulars, vies de senyalització i funció, fins ara no descrits, dels receptors CD224 i CD229. El CD244 és un receptor d'expressió preferent en cèl·lules citotòxiques, a les quals, els potencia l'activitat lítica (Nakajima, et al.,1999; Speiser, et al.,2001). En canvi, el paper del CD229 està més relacionat amb una atenuació de l'activació del limfòcit T (Martin, et al.,2005)

Objectius Generals

- Caracteritzar nous lligands intracel·lulars del receptor CD244
- Disseccionar els mecanismes bioquímics, de senyalització i estudis funcionals dels membres de la família del CD150, centrant l'atenció en el CD244.

Objectius Específics

- Mitjançant la tècnica del triple híbrid en llevats, identificar noves proteïnes que interaccionen amb el CD244
- Comparar la interacció de les noves proteïnes amb els altres membres de la família del CD150
- Produir anticossos monoclonals contra noves proteïnes identificades
- Aplicar tècniques de bioquímica i immunocitoquímica per tal mostrar aquestes associacions en cèl·lules de mamífer
- Mapar les interaccions
- Generar transfectants estables per l'estudi de la senyalització i funció d'aquestes noves interaccions.

III. MATERIALS I MÈTODES

MATERIALS I MÈTODES

1. Cèl·lules i Reactius

1.1 Línies cel·lulars

S'han utilitzat les següents línies cel·lular establertes:

- YT: línia de NK humanes. Cultivades en medi RPMI 1640 complementat amb el 10% de FCS, 100 U/ml de penicil·lina, 100 µg/ml d'estreptomicina i 2mM d'L-glutamina amb 1 mM d'HEPES (Invitogen Life Technologies).
- P815: mastocitoma murí. Cultivades en medi RPMI 1640 suplementat amb el 10% de FCS, 100 U/ml de penicil·lina, 100 µg/ml d'estreptomicina i 2mM d'L-glutamina.
- COS-7 (COS): fibroblasts de ximpanzé. Cultivades en medi DMEM complementat amb el 10% de FCS (sèrum fetal boví), 100 U/ml de penicil·lina, 100 µg/ml d'estreptomicina i 2mM d'L-glutamina.
- Jurkat i Daudi (línia de limfòcits T i B respectivament): Cultivades en medi RPMI 1640 complementat amb el 10% de FCS, 100 U/ml de penicil·lina, 100 µg/ml d'estreptomicina i 2mM d'L-glutamina.

També s'ha treballat amb cultius primaris de cèl·lules NK i limfòcits CD8⁺ obtinguts, com més endavant en la secció 7 s'explicarà, a partir de limfòcits de sang perifèrica (PBL).

1.2 Anticossos i Reactius

- L'anticòs monoclonal contra el CD229 humà (clon 1.25 IgG1) va ser generat al nostre laboratori prèviament (de la Fuente, et al.,2001)
- L'anticòs monoclonal contra el CD244 humà (clon 69 IgG1) es va generar al nostre laboratori immunitzant dues vegades amb la proteïna de fusió CD244-Ig. Aquesta proteïna de fusió es va obtenir tot insertant els dos dominis extracel·lulars del CD244 en el vector d'expressió de mamífers pIg-Tail (R&D systems). Els oligonucleòtids pel

CD244 van ser: 5'-AGGG GGA TTC ATG CCA GGG TTC AGC TGA CCA-3' i 5'- A CCA GGA TCC ACT TAC CTG TGA ATT CCT GAT GGG CAT TCT GAC-3'

- Anticòs monoclonal anti-CD244 humà (clon 1.7 IgG1) de BD Pharmingen
- Anticòs monoclonals anti-CD84 humà (clon 2.15) (Martin, et al.,2001) i anti-P Selectina humana (KO 2.3) (Massaguer, et al.,2000) també generats al nostre laboratori es van usar com a controls isotípics ja que són IgG1. La P Selectina s'utilitza com a control isotípic en els casos en el què el CD84 s'expressa: cèl·lules NK, CD8⁺ i Jurkat (Romero, et al.,2004) (Tangye, et al.,2003)
- Anticòs monoclonal anti-CD69 humà biotinilat de la Dra. P. Lauzurica (Departament de Fisiologia Animal, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona)
- Anticòs contra CD3, CD19, CD56 humans conjugats directament amb FITC i anti-CD8 humà conjugat a Cy-Chrome de BD Pharmingen
- Els anticòs biotinilats són amb biotinamida-caproate N-hydroxysuccinimide éster de Sigma-Aldrich
- Biotina, anticòs anti-mouse IgG peroxidasa, F(ab')₂ sheep-anti-mouse, Phalloidina-TRIC, Wortmanina de Sigma-Aldrich
- Streptavidina-Cy3 (o Avidina Cy3, Cyanina 3) i l'anticòs anti-rabbit peroxidasa de Dako
- Streptavidina-Cy-Chrome i Streptavidin-PE (ficoeritrina) de BD Pharmingen
- Anticòs anti-mouse Cy3 de Jackson ImmunoResearch Laboratories
- Anticòs monoclonal anti-GFP i l'Avidina-Peroxidasa de Roche Diagnostics
- Anticòs monoclonal anti-Vav-1 humà de Santa Cruz
- Anticòs anti-ERK humà total monoclonal de Zymed Laboratoris, Anti-ERK fosforilat humà de Cell Signaling Technologies, Anti-p38 fosforilada humana de Cell Signaling Technologies, Anti-Akt fosforilat humà de Santa Cruz
- Anticòs Rabbit-anti-human CD244 va ser obtingut del Dr. E. Long (National Institute of Allergy and Infectious Disease, Rockville, MD)
- Anticòs monoclonal anti-CD3 humà (T3b) va ser obtingut del Dr. M. López-Botet (Universitat Pompeu Fabra de Barcelona)
- El complement, Anticòs monoclonals anti-CD4 i anti-CD19 humans van ser obtinguts del Servei d'Immunologia de l'Hospital Clínic de Barcelona
- Kit d'electroporació AMAXA per línies i cultius primaris de IZASA
- Anticòs anti-mouse biotinilat Ig κ cadena lleugera, anti-human IFNγ (clone NIB42) mAb, anti-human biotinilat IFNγ (clone 4SB3), and IFNγ *standard* de BD Pharmingen

- Avidina-Peroxidasa de Roche Diagnostics
- Proteïna A Sepharosa CL-4B d'Amersham
- Anticòs monoclonal contra tirosines fosforilades conjugat a Peroxidasa de Zymed
- Supersignal Chemiluminiscense substrate de Pierce
- IL-2 de BD Pharmingen

2. Sistema del Triple Híbrid

Es tracta d'un sistema que permet detectar interaccions directes proteïques in vivo en llevats, mitjançant la proteïna reguladora Gal 4. Aquesta proteïna està formada per dues subunitats; una d'unió al DNA (BD) i una d'activació (AD) de la transcripció. En el sistema del doble híbrid, un vector codifica per la proteïna (X) en pauta de lectura amb el BD del Gal 4 i un altre vector transcriu una altra proteïna (Y) fusionada amb l'AD del Gal 4. Si ambdues proteïnes X i Y estan interaccionant les subunitats del Gal 4 quedaran prou pròximes com per activar la transcripció dels gens reporters. El BD reconeix seqüències consens UAS a 5' (seqüències activadores pròximes) i l'AD activa la RNA polimerasa III per tal que transcriu els gens reporters. Aquest sistema es pot utilitzar per cribar una llibreria, per detectar interaccions directes entre proteïnes no conegudes amb una proteïna coneguda. També és útil per testar possibles interaccions directes entre dues proteïnes conegudes. El sistema del triple híbrid, permet la incorporació d'un tercer element, en el nostre cas el plàsmid que conté el BD permet el clonatge d'una cinasa, així es podran determinar interaccions dependents de fosforilació (figura 1).

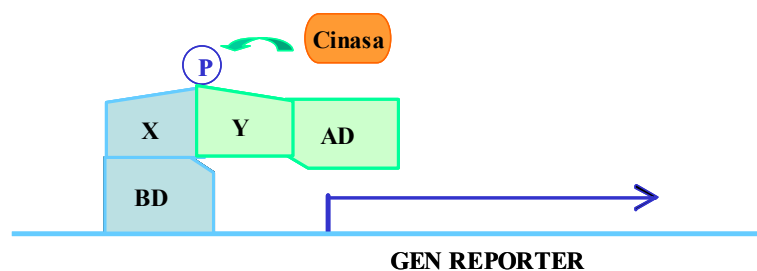


Figura 1. Diagrama esquemàtic del sistema del triple híbrid. El clonatge de la cinasa permet detectar interaccions dependents de fosforilació entre la proteïna X i Y que en el sistema del doble híbrid no es detectarien, ja que en aquest cas no hi hauria l'activitat cinasa. Quan ambdues proteïnes interaccionen els dominis BD i AD estan prou pròxims com per activar el gen reporter.

El plàsmid pBridge té dos punts de clonatge; en un primer MCS (lloc múltiple de clonatge) hi ha la cua citoplasmàtica d'un dels membres de la família del CD150 fusionat amb el BD, en l'altre MCS hi ha la cinasa Fyn. Fyn és una cinasa que fosforila bé tots els membres de la família del CD150 (Morra, et al.,2001c) (Del Valle, et al.,2003).

El vector pBridge permet créixer en un medi deficient en l'aminoàcid triptòfan. El promotor de la cinasa és reprimible per metionina, per tant en un medi deficitari en aquest aminoàcid el gen de la cinasa es transcriurà. L'activitat completa de la cinasa Fyn és tòxica pel llevat, ja que hi hauria una hiperfosforilació; la mutació de les tirosines reguladores 420 i 531 a fenilalanines permet una atenuació de l'activitat cinasa. Per altra banda la mutació de l'arginina 176 per una glutamina en el domini SH2 de Fyn, evitarà que la cinasa s'uneixi a les tirosines que acaba de fosforilar; això evitaria detectar interaccions amb les altres proteïnes (Sayos, et al.,2001) (figura 2). També es pot treballar una el vector pBridge amb Fyn catalíticament inactiu, si es tracta el vector pBridge amb BglII, es relliga i es purifica.

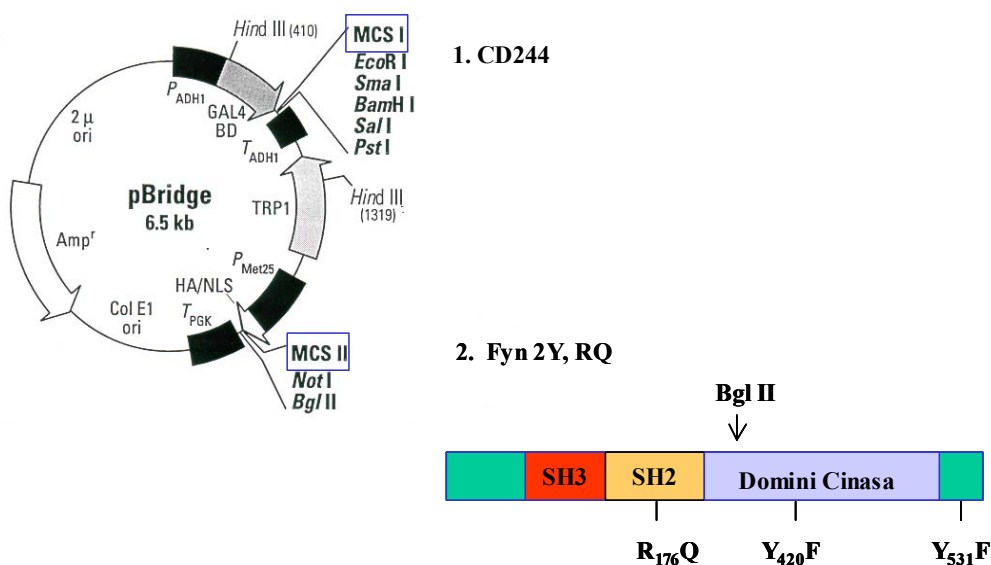


Figura 2. Característiques del vector pBridge. Aquest vector presenta dos punts de clonatge múltiple MCS I amb el domini citosòlic del CD244 i el MCS II amb Fyn. També es mostra l'estructura de Fyn modificada corresponentment.

L'altre plàsmid, pACT2, té un únic punt de clonatge on hi ha insertat fragments de la llibreria o proteïnes ja conegudes fusionades amb l'AD del Gal 4. Aquest plàsmid també permet créixer en un medi deficient per la leucina.

La soca de llevat usada és la CG1945 (*Sacharomices cerevisiae*), que pot créixer en un medi lliure de metionina i així activar la cinasa Fyn. Permet dos sistemes de cribatge mitjançant els dos gens reporters que té. El gen HISS que transcriu per la histidina és activable pel Gal 4, tot i que té certa activitat basal constitutiva que es pot bloquejar amb el 3-AT. Per altra banda, el gen LacZ, que només és activable pel Gal 4, codifica per l'enzim β -galactosidasa que reacciona amb el substrat X-gal o ONPG donant lloc a un producte colorat (blau o groc respectivament)

La construcció CD244-BD en pBridge es va transformar en el la soca de llevat CG1945 i es va seleccionar en una placa de -Trp/-Met. Els llevats que van créixer es van cotransformar amb la llibreria de cDNA de cèl·lules B (de Clontech). Si el domini intracel·lular del CD244 interacciona amb alguna proteïna X de la llibreria en presència de Fyn, s'activaran els dos gens reporters de β -galactosidasa i d'histidina (HISS). Aquesta interacció es selecciona en primera instància, per la capacitat que té de créixer el clon en un medi -Trp/-Leu/-His/-Met en presència de 3-AT. Seguidament es fa una selecció enzimàtica on es determina l'activitat de la β -galactosidasa.

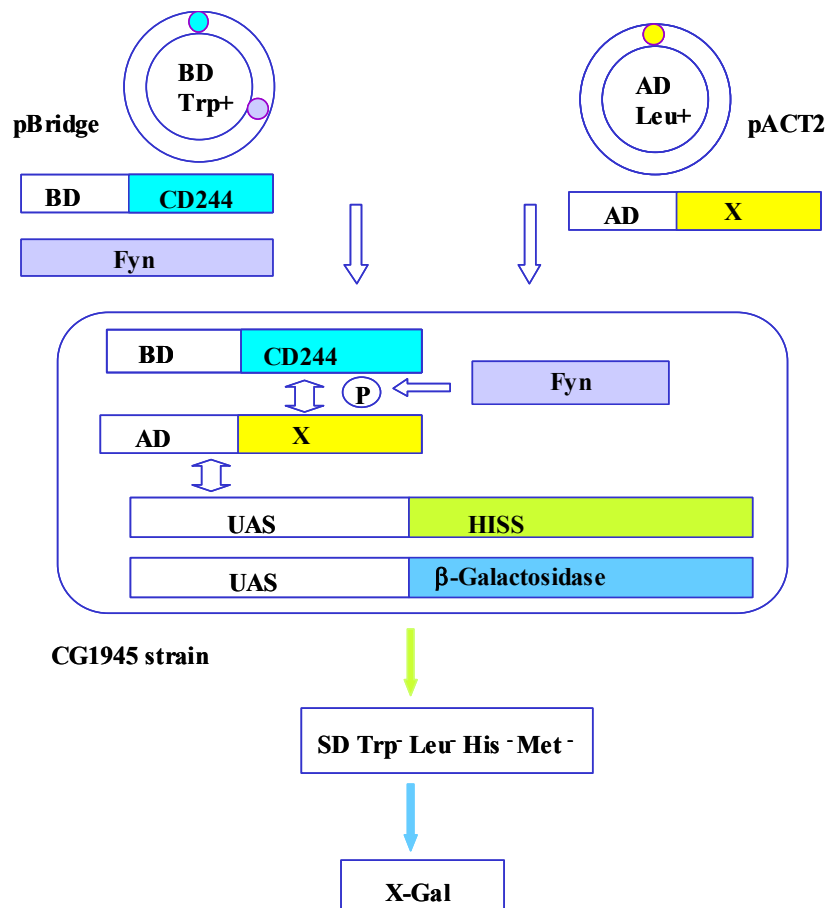


Figura 3. Representació esquemàtica del sistema del triple híbrid en llevats. La cua citosòlica del CD244 en presència de Fyn actiu (clonats en pBridge) interacciona directament amb la proteïna X de la llibreria (clonada en pACT2). Aquesta interacció permet l'activació dels dos gens reporters HISS (selecció nutricional) i β-galactosidasa (selecció enzimàtica)

2.1 Transformació d'una llibreria de cDNA en llevats

Material

- Soca de llevats CG1945 amb els gens HISS i β-galactosidasa
- Medi YPD: per 1 L: afegir a 950 ml d'aigua Mili-Q, 20 gr peptona, 10 gr extracte llevat, 20 gr agar (si sòlid). 121°C 15 minuts a l'autoclau. Quan la temperatura sigui d'un 55°C, s'afegeixen els 50 ml de la Glucosa al 40% (dissolta en aigua Mili-Q i filtrada)
- Medis SD -Trp, -Trp/-Met, -Trp/-Met/-Leu/-His: per 1 L: afegir a 950 ml d'aigua Mili-Q, 6,7 gr de Font de Nitrogen, 20 gr d'agar (si sòlid), 0,6 gr Drop out (medi amb

aminoàcids, però li manca la Met, Trp, His, Leu), afegir els aminoàcids que calgui. 121°C 15 minuts a l'autoclau. Quan la temperatura sigui d'un 55°C, s'afegeixen els 50 ml de la Glucosa al 40% (dissolta en aigua Mili-Q i filtrada)

- 3-AT a 3mM en les plaques de 150 mm de diàmetre -Trp/-Met/-Leu/-His
- 50% PEG 3350
- 1 L Aigua Mili-Q i autoclavada
- Tampó TE 10X: 0,1 M Tris-Base; 10 mM EDTA a pH 7,5. Autoclavar
- LiAc 10X: 1 M Acetat de Liti a pH 7,5 amb acètic glacial. Autoclavar
- 100% DMSO
- DNA carrier (10mg/ml)

Protocol

1. El llevat CG1945 es descongela tot plaquejant-lo en medi YPD. Es deixa a 30°C durant 2-3 dies
2. Picar unes 3 colònies (d'1-3 mm diàmetre) de llevat CG1945 en 1 ml medi YPD i fer vòrtex per disgregar bé
3. Créixer-les en 50 ml de YPD 16-18 h a 30°C a 250 rpm fins a una densitat òptica (OD₆₀₀) superior a 1,5
4. Fer una dilució 1/4-1/5, per deixar la població de llevat a OD_{600 nm} = 0,2-0,3 en 300 ml
5. Es creix fins a OD_{600nm} = 0,4-0,6 durant 2-3 h en les mateixes condicions que l'apartat 2
6. Es recull el cultiu i es centrifuga a 1200 rpm 5 minuts a temperatura ambient
7. El pèl·let es resuspèn amb 50 ml aigua Mili-Q i autoclavada
8. Centrifugació com pas 6
9. El pèl·let es resuspèn amb 1,5 ml TE/LiAc 1X (1 ml TE 10 X, 1 ml LiAc 10X, 8 ml aigua). Aquest pas és per fer les cèl·lules competents i es pot deixar fins 1 hora
10. Agafar 100 µl de llevats del pas 8 i afegir-los en un eppendorf amb (i barrejar-ho bé):
 - 1 µg DNA pBrigde
 - 100 µg DNA carrier
11. Afegir 600 µl de la solució PEG/LiAc (8 ml PEG 50%, 1 ml TE 10 X, 1 ml LiAc 10X)

12. Agitar-ho a 200 rpm a 30°C durant 30 minuts
13. Afegir-hi 70 µl de DMSO i barrejar per immersió
14. Col·locar les mostres 15 minuts a 42°C i anar barrejant
15. Col·locar les mostres 1-2 minuts en gel
16. Centrifugar 5 segons a 1200 rpm a temperatura ambient
17. Resuspendre els pèl·lets amb 100 µl de TE 1X
18. Plaquejar-ho en una placa de 10 cm amb –Trp/-Met i deixar-ho a 30°C uns 2-3 dies fins que les colònies són d'uns 2 mm

Les colònies que creixen es transformen amb la llibreria de cDNA de limfòcits B humans (1 mg). El protocol és el mateix, però els volums de creixement són superiors. 150 ml de cultiu líquid de –Trp/-Met (pas 1), després es posa en 1 L (pas 4), el rentat és amb 500 ml d'aigua (pas 7), solució de TE/LiAc 1 X és de 10 ml (pas 9), es barreja 1 mg de la llibreria amb 20 mg DNA carrier amb la solució PEG/LiAc 1 X de 60 ml (pas 10). Tot segueix igual fins que s'afegeixen, en aquest cas, 7 ml de DMSO. Passos 13-14 iguals, es centrifuga 5 minuts a 1200 rpm a temperatura ambient. El pèl·let es resuspèn amb 10 ml TE 1 X. Es plaquegen 200 µl per placa de 15 cm de –Trp/-Met/-Leu/-His + 3-AT 3 mM. La concentració de 3-AT primer es titula, mirant a partir de quina concentració deixen, els llevats parentals transformats amb vectors buits, de créixer en un medi deficient en His.

Per calcular l'eficiència de transformació es fan tres dilucions de 1/10, 1/100 i 1/1000 (a partir del volum total en què s'ha resuspès la transformació) i se'n plaquegen 100 µl en un medi -Trp/-Met/-Leu. Així es pot conèixer l'eficiència de transformació; quantes vegades s'ha analitzat la llibreria.

Les plaques es mantenen a 30°C i cap el dia 3-4 ja comencen a créixer colònies. Es deixen créixer fins a 2-3 mm de diàmetre i ja s'analitzen per assaig enzimàtic d'activitat β-galactosidasa, ja que el primer cribatge ha estat el nutricional.

També es poden cotransformar els llevats amb els vector pBridge i pACT2 alhora, per determinar interaccions entre proteïnes (clonades en aquests vectors) ja descrites. En

aquest cas els llevats es cotransformen alhora amb 1 µg de cada vector i 100 µg del DNA carrier. La cotrasformació es plaqueja en plaques –Trp/-Met/-Leu.

2.2 Cribatge d'una llibreria

Les colònies que creixen en el medi de selecció (primer cribatge) passen a un segon cribatge: s'analitza l'activitat β-galactosidasa. Es van utilitzar dos tipus d'assaigs per determinar l'activitat β-galactosidasa. Un assaig qualitatiu que indica si existeix o no activitat i l'altre, es un assaig semiquantitatiu, que mesura el nivell de l'activitat enzimàtica i pot donar una idea del grau d'interacció. És semiquantitatiu perquè depèn de la densitat de creixement del llevat i eficiència de transformació, en aquest cas les poblacions que s'analitzen han d'estar en fase exponencial de creixement per poder-les comparar.

2.2.1 Assaig Qualitatiu d'Activitat β-galactosidasa

Material

- Paper Whatman
- Tampó-Z: per 500 ml: Na₂HPO₄·7H₂O 8,05 gr; NaH₂PO₄·H₂O 2,75 gr; KCl 0,375 gr; MgSO₄·7H₂O 0,123 gr. Ajustar a pH 7,0 i autoclavar
- Solució X-gal: 100 ml Tampó-Z, 0,27 ml β-mercaptoetanol; 1,67 ml X-gal (Sigma) de 20 mg/ml l'stock
- Nitrogen líquid

Protocol

1. Cal fer una rèplica de la colònia que està creixent en el medi –Trp/-Met/-Leu/-His + 3-AT 3 mM, en aquest mateix medi. Aquesta es tant per analitzar com per congelar en YPD amb 25% DMSO
2. Posar dins una placa de 15 cm de diàmetre dues circumferències de Paper Whatman
3. Humitejar un trocet de Paper Whatman sobre la colònia replaquejada
4. Aquest trocet de paper haurà agafat llevats que s'hauran de matar fent tres cicles d'1 minut en nitrogen líquid i d'1 minut a temperatura ambient. Cal que el llevat mori per tal de que la solució X-gal entri a la cèl·lula i reaccioni amb l'enzim β-galactosidasa

5. Es col·loca el trocet de paper amb el llevat mort dins la placa i s'afegeixen suaument 5 ml de la solució X-gal
6. Aquesta reacció es deixa desenvolupar fins que apareix una coloració blava en les colònies positives i les negatives no viren. Triga unes 3 hores (o menys) i màxim 16 hores.

2.2.2 Assaig Semiquantitatiu d'Activitat β -galactosidasa

Les colònies que han donat positiu per primer assaig es reanalitzen amb un assaig d'activitat semiquantitatiu. Aquest mètode és més sensible i permet semiquantificar el grau d'interacció. Aquest assaig també s'utilitza per determinar interaccions directes entre proteïnes conegudes.

Material

- ONPG (O-Nitophenyl β -galactopyranoside) 4 mg/ml en Tampó-Z (pH 7), que en aquest cas és el substrat de la reacció
- Medis de creixement -Trp/-Met/-Leu
- Tampó-Z
- Nitrogen líquid

Protocol

1. En 2 ml medi -Trp/-Met/-Leu picar 3-4 colònies, vòrtex bé per evitar agregats i precipitats del llevat
2. 6-18 hores 30°C 200-250 rpm
3. $OD_{600\text{ nm}} \geq 1,5$ (al mirar la OD vòrtex bé, per evitar agregats)
4. Agafar 1 ml del cultiu pas 2 i posar-lo amb 4 ml medi selectiu (o una dilució equivalent per tenir una $OD_{600\text{ nm}}$ d'uns 0,3)
5. 2-3 hores 200-250 rpm 30°C
6. $OD_{600\text{ nm}}$ 0,5-0,8 (anotar cada OD)
7. Agafar 1,5 ml del cultiu
8. 30 segons a 14000 rpm
9. Eliminar el sobrenedant i resuspendre el pèl·let cel·lular amb 1.5 ml Z-Buffer
10. 30 segons a 14000 rpm

11. Eliminar el sobrenedant i resuspendre el pèl·let en 300 µl de Z-Buffer (el factor de dilució és $1,5/0,3 = 5$ vegades)
12. Transferir 100 µl d'aquesta suspensió cel·lular
13. Lisi; 3 x (1 minut a Nitrogen líquid + 1 minut bany 37°C)
14. Preparar un blank amb 100 µl de Z-Buffer
15. Afegir 0,7 ml de Z-Buffer + β- Mercaptoetanol (100ml de Z-Buffer + 0.27ml β-Mercaptoetanol) a tots els tubs
16. Afegir i barrejar 160 µl ONPG en Z-Buffer (4mg/ml ONPG en Z-Buffer)
17. Incubar a temperatura ambient o 30°C
18. A les 3 hores fer lectura: Afegir en un eppendorf net 200 µl de la solució llevat + 80 µl Na₂CO₃ 1M (inhibidor de la reacció)
19. Centrifugar 10 minuts a 14000 rpm
20. Transferir el sobrenedant a placa de ELISA
21. Lectura a 405_{nm} o 420_{nm}
22. Fer lectura també a les 16-18 hores (passos 18-21)

L'activitat β-galactosidasa es calcula aplicant la fórmula:

$$\text{β-Galactosidasa units} = \frac{1000 \times \text{OD}_{405}}{t \times V \times \text{OD}_{600}} \quad t = \text{temps (minuts) d'incubació amb ONPG}$$

$$V = 0,1 \text{ ml (volum mostra) } \times 5 \text{ (factor dilució)}$$

$$\text{OD}_{405} = \text{OD mostra X} - \text{OD blank}$$

2.3 Obtenció del DNA genòmic de llevat

Els clons que han estat positius cal saber per quina proteïna estan codificant. S'ha d'obtenir el DNA del llevat i aleshores transformar bacteris competents en un medi de selecció per només seleccionar el plàsmid pACT2 i separar-lo de la resta de DNA genòmic del llevat

Material

- Glass-beads (Sigma)
- Isoamil-fenol-cloroform (25:24:1)
- Acetat d'Amoni 10 M

- Etanol absolut
- Solució de suspensió: Tris-Base 10 mM pH 8; EDTA 1 mM; Lyticase 4,5 unitats/ μ l (Sigma)
- Solució de lisi: 2% Tritó; 1% SDS; 100 mM NaCl; 10 mM Tris-Base a pH 8 i 1 mM EDTA

Protocol

1. Inocular colònies de 2-4 mm en 1 ml TE 1X i vòrtex
2. Centrifugar 14000 rpm 1 minut
3. Eliminem el sobrenedant i el pèl·let el resuspenem en 30 μ l de la solució de suspensió
4. Incubar 30 minuts a 37°C
5. Afegir 170 μ l de la solució de lisi i barrejar bé
6. Transferir la barreja en un nou eppendorf amb 200 μ l de glass-beads
7. Afegir 200 μ l de Isoamil-fenol-cloroform
8. Barrejar vigorosament en un vòrtex durant 5 minuts a temperatura ambient
9. Centrifugar 14000 rpm 1 minut
10. Transferir la fase més alta en un nou eppendorf; en aquesta fase és on hi ha el DNA
11. A continuació es passa a precipitar el DNA amb 8 μ l d'Acetat d'Amoni 10 M i 500 μ l d'etanol absolut
12. Precipitar 1 hora a -80°C
13. Centrifugar 14000 rpm 10 minuts
14. Descartar molt bé el sobrenedant i assecar el pèl·let que resuspendrem en 20 μ l d'aigua estèril

2.4 Transformació de bacteris *E. coli* HB101 per electroporació

La soca *E. coli* HB101, es una soca de bacteri amb la capacitat de créixer en un medi deficient en Leu. S'electroporen amb el DNA genòmic del llevat prèviament obtingut i es seleccionen en un medi deficient en leucina i amb Ampicil·lina (resistència que aporta el vector pACT2). Amb aquest mètode es podrà amplificar el DNA plasmídic.

Material

- Soca HB101
- Líquid LB: peptona 10 gr/L; extracte llevat 5 gr/L; NaCl 10 gr/L (si es fan plaques 20 gr/L d'agar). L'Ampicil·lina s'afegeix quan el medi està a 55°C per tenir-la a una concentració final de 50 µg/ml
- Cubetes d'electroporació per bacteris
- HEPES 1mM
- Aigua autoclavada
- Plaques de medi mínim M9: 1L: a 750 ml d'aigua destil·lada afegir 2 ml d'1 M MgSO₄; 0,1 ml d' 1 M CaCl₂ i 200 ml de la solució 5xM9 (500 ml de 5xM9: 32 gr Na₂HPO₄ · 7H₂O; 7,5 gr KH₂PO₄; 1,25 gr NaCl, 2,5 gr NH₄Cl autoclavat). Afegir també 20 gr d'agar; 0,62 gr Drop out sense Leucina. Autoclavar i quan està a 55°C afegir 20 ml Glucosa al 20%; 1 ml Thiamina 1 M; 4 ml d'L-Prolina 10 mg/ml; 1 ml Ampicil·lina 50 mg/ml

Protocol

- Primer es fan els bacteris competents
 1. Inocular en 5 ml de LB 1 colònia de bacteri HB101 creixent en placa de LB
 2. Incubar 16-18 hores a 250 rpm a 37°C
 3. Afegir 1 L del medi LB als 5 ml i créixer (com pas 2) fins OD_{600 nm} de 0,5-0,7 (triga unes 3 hores)
 4. Posar les cèl·lules 10-15 minuts a 4°C
 5. Centrifugar a 4200 rpm a 4°C 20 minuts
 6. Resuspendre el pèl·let en 10 ml aigua estèril freda
 7. Afegir 1 litre d'HEPES 1 mM (4°C), barrejar bé i centrifugar a 4200 rpm a 4°C 20 minuts
 8. Resuspendre el pèl·let en 1 L aigua estèril freda
 9. Centrifugar a 4200 rpm a 4°C 20 minuts
 10. Resuspendre el pèl·let amb un volum que el dobli (2ml aproximat) d'aigua estèril
- Les cèl·lules ja es poden electroporar
 11. Afegir a un eppendorf estèril 100 µl de bacteris amb 10 µl del DNA del llevat prèviament obtingut
 12. Barrejar bé i deixar 10 minut en gel

13. Transferir a una cubeta d'electroporació per bacteris i electroporar: 200 Ω ; 2,48 KV; 25 μ F
14. Transferir el producte a 1 tub amb 1 ml de LB i incubar a 250 rpm, a 37°C 1 hora
15. Centrifugar 5 segons a 14000 rpm
16. Plaquejar en les plaques M9 i incubar a 37°C 48-72 hores
17. Les colònies que creixen s'inoculen en LB + Ampicil·lina i s'incuben 16-18 hores a 250 rpm a 37°C

Seguidament es pot obtenir el DNA plasmídic del bacteri utilitzant el Kit de mini-prep Qiagen ja que la soca HB101 té molta activitat Endonucleasa A. El DNA s'ha de seqüenciar usant un oligonucleòtid 5' corresponent al AD del pACT2 i ja es podrà conèixer el cDNA de la proteïna/es que interacciona/en directament amb la cua citosòlica del CD244. S'utilitza el Mètode de Sanger que es basa en nucleòtids diferentment fluorocromats que s'afegeixen a partir del l'oligonucleòtid d'interès del fragment a seqüenciar. S'utilitza el Kit Big Dye Terminator 3.1.

2.5 Seqüenciació del DNA

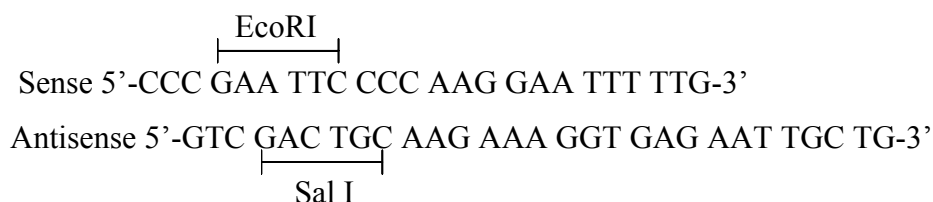
Protocol

1. Afegir 3 μ l de DNA (200-500 ng), 3 μ l del primer d'interès per seqüenciar i 4 μ l de Kit Big Dye Terminator 3.1 en un tub de 500 μ l. Afegir un parell de gotes d'oli mineral a la superfície per evitar evaporacions als 10 μ l de producte final de seqüenciació
2. Posar el Termociclador en el programa (durant 25 cicles i acabar a 4°C)
 - 96°C 30 segons
 - 50°C 15 segons
 - 60°C 4 minuts
3. Recollir els 10 μ l de la seqüenciació
4. Afegir 20 μ l d'aigua estèril i 70 μ l d'etanol absolut
5. Deixar precipitant durant 15 minuts a temperatura ambient
6. Centrifugar 20 minuts a 14000 rpm
7. Eliminar el sobrenedant i rentar amb 200 μ l d'etanol al 70% com en el pas 6
8. Deixar assecar el pèl·let i portar-lo, sec, al servei de seqüenciació

3. Construcció de Plàsmids

S'han produït diferents construccions i mutants puntals per tal de poder desenvolupar i abordar els experiments oportuns que en la secció de resultats es presenten. A continuació es mostren les construccions amb els oligonucleòtids i plàsmids generats. Quan s'ha treballat amb vectors fluorescents (pN3-EGFP, pN1-ECFP o pN1-EYFP de Clontech Laboratories), l'insert d'interès s'ha col·locat en pauta de lectura amb la proteïna fluorescent, quedant aquesta, a l'extrem carboxi-terminal de la proteïna clonada.

- **Domini intracel·lular del CD244:** Com a motlle s'utilitza el CD244 clonat en pCI-Neo. Es clona en pBridge amb Eco RI (Sense) i Sal I (Antisense)



- **Mutant puntual Y337F del domini intracel·lular del CD244:** Com a motlle s'utilitza el CD244 clonat en pCI-Neo. Per generar el mutant puntual s'utilitzen els oligonucleòtids, on s'ha canviat el codó de la tirosina (tat sense) per un de fenilalanina (ttt sense). S'indica subratllat, en les seqüències, el canvi de triplet de nucleòtids.



Aquesta construcció es fa tant en pBridge (nomé el domini intracel·lular del CD244_{Y337F}) i en el vector Topo pCDNA 3.1/V5-His de Life Technologie (CD244_{Y337F} *full length*). Per clonar el mutant en el pBridge s'utilitza la mateixa estratègia i oligonucleòtids que pel domini intracel·lular del CD244 salvatge. Pel clonatge en Topo pCDNA 3.1/V5-His s'usen els següents oligonucleòtids sense dianes.



Per construir mutants puntuals primer es fan dues PCR per separat:

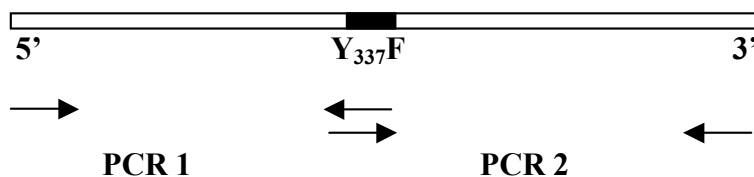


Figura 4. Disseny de mutants puntuals. Esquema de la producció del mutant puntual Tirosina 337 canviada a fenilalanina.

Els productes s'aïllen a partir del gel d'agarosa i s'ajunten per fer una nova PCR usant els oligonucleòtids de la molècula completa o del dominis intracel·lular.

- **3BP2 full length:** El cDNA del 3BP2 es va obtenir del cDNA de cèl·lules Jurkat (secció 4), usant els següents oligonucleòtids (més externs)

Sense 5'-TCG GGG AGG CGG GCG TGG ATC-3'

Antisense 5'-ATG TCC GTC TGT GTG GCC TGG GGT CA-3'

Es fa una segona PCR amb oligonucleòtids més interns i amb els què es va clonar en el vector Topo pCDNA 3.1/V5-His (amb EcoRI i amb l'ATG de la primera Met (ATG) en el Sense i no té STOP en l'antisense per entrar en pauta amb l'His)

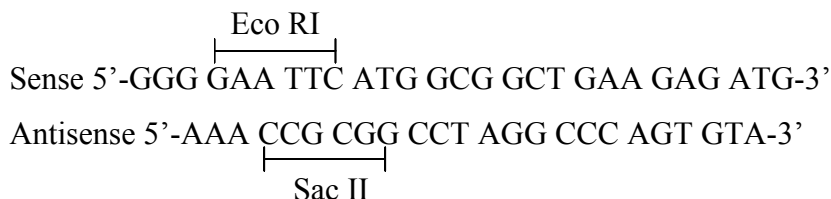
$$\begin{array}{c} \text{Eco RI} \\ | \quad | \\ \text{Sense 5'- GGG GAA TTC } \underline{\text{ATG}} \text{ GCG GCT GAA GAG ATG-3'} \end{array}$$

Antisense 5'-CCT AGG CCC AGT GTA GCC GTA G-3'

A partir d'aquí es subclona en el vector d'expressió pN3-EGFP amb les dianes Eco RI (Sense) i Bam HI (Antisense; no té el codó STOP per entrar en pauta amb l'EGFP, que és a l'extrem carboxi del 3BP2).

$$\begin{array}{c} \text{Eco RI} \\ | \quad | \\ \text{Sense 5'-GGG GAA TTC ATG GCG GCT GAA GAG ATG-3'} \\ \text{Antisense 5'-CGC GGA TCC CCT AGG CCC AGT GTA-3'} \\ \quad \quad \quad | \quad | \\ \quad \quad \quad \text{Bam HI} \end{array}$$

També es clona amb el vector pN1-EYFP amb les dianes Eco RI (Sense) i Sac II (Antisense)



- **Domini SH2 del 3BP2 (clon 41a):** Com a motlle s'usa el 3BP2 *full length* en pN3-EGFP i es treballa amb els oligonucleòtids que engloben la seqüència corresponent al clon 41a trobat en el cribatge de la llibreria. En el sense ha calgut afegir una Met (ATG) i l'Eco RI i en l'antisense, Bam HI.

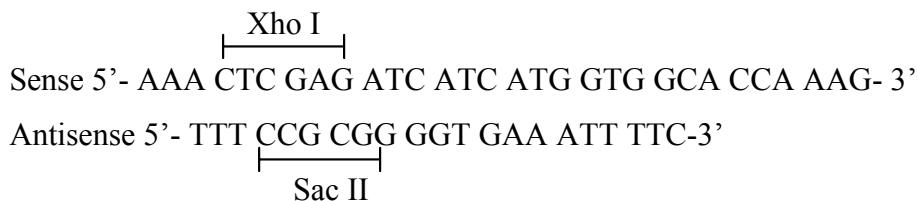


- **3BP2 Y183F:** El motlle i els oligonucleòtids externs són els del 3BP2 *full length* en pN3-EGFP. Per generar la mutació de tirosina (tac en sense) a fenilalanina (ttc en el sense) s'usen els següents oligonucleòtids en els què s'indica subratllat, el canvi de triplet de nucleòtids.



L'estratègia és la mateixa que pel mutant Y337F del CD244.

- **CD229:** En el vector pN1-ECFP es clona el CD299 *full length* parental i el CD299 *full length* mutant Y606F amb les dianes Xho I i Sac II. El motlle són els CD299 parental en pCI-Neo i CD229Y606F en Topo 3.1/V5-His (Martin, et al.,2005).



Amb els oligonucleòtids es fa la PCR pertinent. Les condicions de temperatura anellament varien entre 50-65°C en funció del menor o major contingut en G-C i A-T dels oligonucleòtids. També varien els temps d'elongació en funció de la longitud de la

seqüència a amplificar; normalment es deixa 1 minut per cada 1000 pb. El motlle per cada PCR està especificat en cada construcció.

Amb la PCR ja feta, es passa a aïllar la banda del gel d'agarosa, es digereix amb els enzims pertinents, es fa la lligació entre insert i vector i finalment, es transformen bacteris competents. Es creix en plaques amb resistència a Ampicil·lina o Kanamicina (en el cas dels vectors fluorescents: EGFP, ECFP i EYFP) i de les colònies que creixen, se'ls obté el plàsmid i s'analitzen amb anàlisi de restricció i/o PCR per tal de comprovar la presència i orientació correctes de l'insert. Cal finalment fer la seqüenciació per confirmar que la mutació puntal s'hagi donat (en el cas dels mutants puntuals) i per veure que la construcció final, sigui correcte.

4. Aïllament del RNA cel·lular

Per tal d'aïllar el RNA cel·lular cal sempre treballar amb material lliure de RNAses.

Protocol

1. Recollir entre $1-4 \times 10^6$ cèl·lules en un tub
2. Centrifugar 4 minuts 1600rpm 6°C
3. Descartar el sobrenedant i posar els tubs bocaterrosa per assecar bé
4. Resuspendre el pèl·let en sec i afegir 1ml Triazol (que homogenitza i manté la integritat del RNA)
5. Resuspendre bé i passar-ho a un eppendorf net
6. Incubar 5 minuts a temperatura ambient
7. Afegir 0,2 ml Cloroform (treu proteïnes associades al RNA, separa el contingut en una fase orgànica i una aquosa o es troba el RNA)
8. Moure 15 segons a mà
9. Incubar 3 minuts a temperatura ambient
10. Centrifugar 15 minuts a 12000 g a 4°C
11. Transferir la fase aquosa a un eppendorf net
12. Afegir 0,5 ml Isopropanol (recuperació RNA per tal de precipitar-lo)
13. Incubar 10 minuts a temperatura ambient
14. Centrifugar 10 minuts 12000g 4°C

15. Descartar el sobrenedant
16. Rentar el pèl·let amb 1 ml d'etanol al 75%
17. Pipetejar suaument
18. Centrifugar a 7500g 5 minuts 4°C
19. Assecar el pèl·let sota campana uns 10 minuts
20. Resuspendre en 50 µl aigua estèril nova
21. Mesurar l'OD_{260 nm} i mirar la relació OD_{260/280 nm}, que és correcta al voltant de 2
22. Còrrer un gel d'agarosa per veure les 3 bandes (5S/ 16S/ 28S) per descartar degradació

Ja es pot fer la RT-PCR amb el RNA prèviament aïllat i tractat de la manera següent:
7,2 µl aigua estèril + 1 µl RNA, incubar-ho 15 minuts a 65°C seguit de 5 minuts en gel.

5. Sistemes de Transfecció

Amb els plàsmids que s'han generat s'han fet tant transfeccions transitòries com estables.

5.1 Transfectants transitoris

Es tracta d'aconseguir que les cèl·lules incorporin el vector d'interès i a les 24-72 hores, depenent de la metodologia de transfecció, ja es pot fer l'assaig bioquímic.

5.1.1 DEAE-Dextrà

Mètode usat per fer les transfeccions de cèl·lules COS. Depenent de l'experiment s'utilitzen plaques de 10 cm de diàmetre (immunoprecipitació) o de 6 pous (creixent sobre el cobreobjectes per després fer immunocitoquímica)

Materials

- DEAE-Dextrà en PBS 10 mg/ml
- Chloroquine (20,6 mg/ml en PBS) 40 mM
- DMSO 10% en DMEM incomplet (sense FCS ni Gln ni antibiòtics)

- Per placa 10 cm: 10 µg DNA en 2 ml PBS + 100 µl DEAE Dextrà
- Per placa 6 pous (1/5 de tots els volums): 1 µg DNA en 400 ml PBS + 20 µl DEAE-Dextrà

Protocol

24 hores abans de la transfecció es sembren les cèl·lules COS amb un creixement exponencial, per tal de tenir del 70 al 90% de confluència en el moment de la transfecció.

1. Rentat les cèl·lules amb PBS dues vegades
2. Afegir la barreja de transfecció (DNA + DEAE-Dextrà)
3. Incubar 30 minuts a 37°C i cada 10 minuts agitar
4. Afegir 5 ml de la chloroquine (10µl/5ml PBS)
5. Incubar 2h 30 minuts a 37°C, 5% CO₂
6. Eliminar el medi
7. Afegir 5 ml del DMEM -10%DMSO
8. Incubar 2 minuts i mig a 37°C
9. Eliminar el medi, rentar amb PBS una vegada i afegir medi DMEM complet
10. Mantenir les cèl·lules a l'incubador 48-72 hores abans experiment.

5.1.2 Electroporació

Quan s'ha treballat amb cultius primaris o amb Jurkat s'han fet transfeccions transitòries amb el Kit Nucleofector d'AMAXA d'electroporació per cultius primaris o per línies. És molt important atemperar els medis de cultiu i Nucleofector per minimitzar la mortalitat cel·lular.

Protocol

1. Es centrifuguen (1400 rpm, 4 minuts a temperatura ambient) les cèl·lules Jurkat en exponencial o el cultiu primari acabat de produir
2. Es fa un rentat amb medi RPMI sense FCS
3. Barrejar 5 µg DNA d'interès, 5x10⁶ milions de cèl·lules i 60 µl del Nucleofector
4. Electroporació amb el programa T-14

5. Es recullen les cèl·lules, es cultiven a 1×10^6 cel·lules/ml i es mantenen fins l'experiment (màxim a les 24 hores)

5.2 Transfectants Estables

S'han generat línies YT transfectades establement. Per tal d'aconseguir que integrin el DNA plasmídic al seu DNA genòmic de manera estable, s'ha usant l'electroporador Bio-Rad. El plàsmid EGFP amb el qual s'electropora té el gen de resistència per la Geneticina (G418). S'han fet dos línies estables de YT: 3BP2-YT (el 3BP2 *full length*-EGFP) i SH2-YT (domini SH2 del 3BP2-EGFP, corresponent a la seqüència del clon 41a)

Protocol

1. 15×10^6 cèl·lules (primer fer un rentat en RPMI sense FCS, 1400 rpm, 4 minuts 4°C) creixent en exponencial es barregen amb $2 \mu\text{g DNA}/10^6$ cèl·lules
2. Es manté en gel uns 10 minuts
3. Electroporació: $950 \mu\text{F}$, 260 mV, 100Ω , capacítància màxima
4. Es manté en gel uns 10 minuts
5. Es resuspèn amb 20 ml de medi RPMI, 10 ml dels quals s'usen per plaquejar-ne 100 μl en una placa de 96 pous i la resta de 10 ml es dilueix a la meitat per fer una dilució $\frac{1}{2}$ i plaquejar-ne 100 μl en una altra placa. Així, es fan 4 plaques de diferent densitat cel·lular
6. 24 hores després s'afegeixen 100 $\mu\text{l/pou}$ de la G418, per les YT transfectades cal una concentració final de 2 mg/ml.

Cap a les 2 setmanes ja comencen a créixer clons. L'anàlisi es fa per citometria simplement excitant amb el canal de fluorescència FL-1 i mirant l'emissió de l'EGFP (secció 10). També s'analitza per Western-Blot (secció 8), per determinar si les cèl·lules han integrat el vector amb la molècula d'interès en pauta amb l'EGFP, ja que el pes total de la molècula augmenta amb 30 KDa, corresponent a l'EGFP. S'ha treballat amb poblacions policlonals enriquides en funció del grau d'expressió de la proteïna en pauta amb l'EGFP mitjançant citometria de *sorting* (secció 10 de citometria).

6. Producció d'anticòs monoclonal contra el 3BP2 humà

El 1975, Köhler i Milstein van optimitzar el protocol de producció d'anticòs monoclonals. Es basa en la fusió d'una línia immortal (mieloma) i una cèl·lula B secretora de l'anticòs (esplenòcit) d'interès; la cèl·lula que s'origina s'anomena híbridoma. S'escull un mieloma deficient en els enzims HGPRT (Hipoxantina-Guanosina Fosforribosiltransferasa) i TK (Timidina-Cinasa) de la via salvatge de síntesi d'àcids nucleic i per tant no podrà usar l'Hipoxantina o la Timidina (respectivament) com a substrat. L'Aminopterina és un anàleg de l'àcid fòlic que bloqueja la via de novo de síntesi d'àcids nucleics. Per tant l'híbridoma és incapaç de créixer en un medi amb Hipoxantina, Aminopterina i Timidina (HAT). En canvi, al fusionar-se amb l'esplenòcit recuperarà la via salvatge de síntesi de nucleòtids i per tant, podrà créixer usant la Timidina i la Hipoxantina. L'esplenòcit al fusionar-se amb el mieloma, s'immortalitzarà. Per tant, l'híbridoma és una cèl·lula immortalitzada capaç de produir l'anticòs d'interès. Quan ja es té un híbridoma estable es treballa amb medi HT, que a diferència del HAT, no té l'Aminopterina però sí l'Hipoxantina i la Timidina.

Material

- Medi HAT: RPMI amb 20% FCS; 150 U/ml de penicil·lina; 150 µg/ml d'estreptomicina i 2mM d'L-glutamina + 1 vial HAT
- Medi HT: RPMI amb 20% FCS; 150 U/ml de penicil·lina; 150 µg/ml d'estreptomicina i 2mM d'L-glutamina + 1 vial HT
- 1 vial de Polietilenglicol al 50% (PEG) de Sigma
- Adjuvant complet i incomplet de Freund
- Mieloma (cèl·lula maligna no secretora d'immunoglobulines) pre-B; NS-1
- Ratolins Balb/c

6.1 Immunitzacions

Es va escollir una seqüència amb baixa homologia entre el 3BP2 humà i murí i es va produir el pèptid corresponent a: H-KHGLPDVGLAAEDSKRDPLC-NH₂ amb el qual es va procedir a fer una sèrie de 3 immunitzacions en ratolins Balb/c:

- Primera Immunització: Injecció intraperitoneal de 0,5 ml d'una barreja d'1 ml de pèptid conjugat amb KLH (Keyhole Limpet Hemacyanin) + 1 ml d'adjuvant complet de Freund. En la barreja pèptid-KLH, la puresa del pèptid és del 70%. L'emulsió amb l'adjuvant complet es fa amb 250 mg/ml de pèptid-KLH, per tant realment s'està injectant de l'ordre de 43 mg de pèptid pur per ratolí.
- Segona Immunització: Quinze dies després de la primera es fa la segona immunització igual que la primera, però amb l'adjuvant incomplet de Freund. Tres dies després de la segona immunització es titula el sèrum mitjançant la tècnica de l'ELISA com s'indica en la secció 6.3, tot i que en aquest cas, la placa s'hibrida amb el pèptid del 3BP2-KLH. El ratolí amb el millor títol (positiu fins a una dilució 1: 50.000 del sèrum) s'usa per la última immunització.
- Tercera Immunització: Quinze dies després de la segona, s'injecten al ratolí escollit 100 µl de 3BP2-KLH a 250 mg/ml intravenosa i 200 µl de 3BP2-KLH a 250 mg/ml intraperitoneal. Als altres dos ratolins se'ls fa una repetició de la segona immunització.

6.2 Fusió

1. Tres dies després de la última immunització s'agafa la melsa del ratolí i se li treu la coberta tot disgregant-la (en un medi RPMI lliure de FCS) per tal de recollir els esplenòcits.
2. Es recullen les cèl·lules NS-1 del cultiu en fase exponencial i es fan un parell de rentats a de 5 minuts a 700 g i temperatura ambient per eliminar el FCS, ja que podria dificultar la fusió. Es deixa el pèl·let sec
3. Es procedeix a la fusió dels esplenòcits i el mieloma pre-B murí usant el PEG al 50% com a agent de fusió, a una relació de 3 o 4 esplenòcits (120 milions) per cada cèl·lula NS-1 (40 milions). Es divideixen les cèl·lules barrejades en dos tubs i es comença la fusió en un bany a 37°C de la següent manera;
 - Afegim 1 ml del PEG tot agitant durant 1 minut
 - Afegim 1 ml de RPMI sense FCS agitant durant 1 minut
 - Afegim 2 ml de RPMI sense FCS agitant durant 1 minut
 - Afegim 5 ml de RPMI sense FCS agitant durant 1 minut

- Afegim 10 ml de RPMI sense FCS agitant durant 1 minut
 - Afegim 20 ml de RPMI sense FCS sense agitació
4. Finalment es centrifuga 8 minuts a 400 g a temperatura ambient
 5. Els pèl·lets es resuspenen en un total de 160 ml de medi HAT i s'afegeixen 100 µl en cada pouet de les 16 plaques de 96 pouets amb les cèl·lules *feeders*. Les cèl·lules *feeders* són bàsicament monòcits que s'obtenen d'un rentat del peritoneu d'un ratolí. Es preparen el dia d'abans i es plaquegen també a 100 µl per pouet
 6. Es manté el cultiu durant 10 dies a 37°C, 5% CO₂

6.3 Cribatge dels clons per ELISA

Passat aquests dies ja es pot començar a testar la producció d'anticòs en aquells pous on es veu el creixement dels híbridomes. Es recull sobrenedant del pou on hi ha un clon creixent i es determina si hi ha anticòs que reconegui el pèptid 3BP2. El primer cribatge es va fer mitjançant la tècnica de l'ELISA.

Protocol

1. S'hibrida la placa d'ELISA de 96 pous amb 100 µl per pou d'una solució de 3 µg del pèptid 3BP2 pur/ml PBS tota la nit a 4°C
2. 2 rentats amb 200 µl PBS per pou
3. Bloqueig de la placa amb 200 µl de PBS-BSA 2% 2 hores a 37°C
4. 2 rentats amb 200 µl PBS-Tween 0,05%
5. Agafem 20 µl del sobrenedant a testar amb 80 µl de PBS-BSA 2% i ho afegim a un pou de la placa d'ELISA durant 1 hora a temperatura ambient
6. 4 rentats amb 200 µl PBS-Tween 0,05% per pou
7. Afegir 100 µl per pou de 1/2000 de l'anticòs contra Immunoglobulines G murines marcat amb Peroxidasa durant 1h a temperatura ambient
8. 2 rentats amb 200 µl PBS-Tween 0,05% per pou
9. 2 rentats amb 200 µl PBS per pou
10. Revelat amb 100 µl per pou de la solució d'OPD, substrat de la Peroxidasa
11. Llegir a OD_{450 nm}

Els sobrenedants que han donat positiu s'analitzen per citometria de flux utilitzant 20 µl del sobrenedant sobre cèl·lules Jurkat fixades i permeablitzades (secció 10 de citometria).

També es transfecten cèl·lules COS amb el 3BP2-EGFP i es mira si el sobrenedant detecta els lisats totals i és capaç d'immunoprecipitar (secció 8 d'anàlisi de proteïnes).

Els sobrenedants que hagin donat positiu caldrà expandir-los en placa de 24 pous per passar al següent pas; clonatge (o dilucions a l'infinit) i congelació (FCS amb el 20% de DMSO). El clonatge és el procés pel qual s'obté un hibridoma monoclonal productor de l'anticòs. Es fan dilucions seriades de 10, 5, 2 i 1 cèl·lules/pou en plaques de 96 pous. Quan apareix un únic clon cada 4 pous (buits) i tots són positius, ja es considera d'hibridoma monoclonal, segons la distribució de Poisson. Freqüentment, a cada pou del cultiu creix més d'un clon i per tal cal fer dos o tres passos de clonatge per tal d'aconseguir la monoclonalitat desitjada. Els hibridomes, primer es cultiven en medi HAT, quan ja creixen bé en placa de 24 pous, es creixen en medi HT. Finalment es creixen amb medi RPMI amb els antibiòtics i la glutamina. Sempre, amb el 20% de FCS. L'hibridoma que es va escollir, es va expandir per produir sobrenedant a partir del qual es va purificar l'anticòs, per afinitat amb columnes de proteïna A Sepharosa.

7. Producció de Cultius Primaris

7.1 Producció de cèl·lules NK

Les cèl·lules NK constitueixen menys del 10% dels limfòcits de sang perifèrica (PBL's), per tant, per tal de treballar amb una població enriquida d'NK, cal seleccionar-les i després fer-les proliferar amb la IL-2. Els limfòcits de sang perifèrica s'obtenen fent un gradient de Ficoll a partir de les bosses dels donants de plaquetes (*Buffy Coat*). En aquest gradient, l'anell està bàsicament constituït per limfòcits, però també hi ha monòcits que s'eliminen per adhesió entre 3 i 16 hores. Es fa un cultiu mixt entre cèl·lules Daudi pre-tractades amb Mitomicina C i els limfòcits. La Mitomicina C és una droga derivada de *Streptomyces caespitosus* amb la capacitat d'inhibir la síntesi de DNA i el cicle cel·lular. El tractament de la línia de cel·lules B, Daudi, amb aquesta

droga, evita que proliferi, però actuen com a *feeders* per l'estimulació de les cèl·lules NK. Passats 6 dies, els limfòcits T s'eliminen amb anti-CD3 més complement, els limfòcits B sobreviuen pocs dies en cultiu, per tant ja no n'hi hauran. Després del tractament amb anti-CD3 i complement, s'addiciona IL-2, citocina que permet, la proliferació de les cèl·lules NK (Cooper, et al.,2001). Per tant, al final, s'aconsegueix un 90% de cèl·lules CD56 positives (marcador de cèl·lula NK), negatives pel CD3 (marcador de cèl·lula T) i pel CD19 (marcador de cèl·lula B)

Protocol

1. Producció del Cultiu Mixt: $1.5-2 \times 10^6$ cel·lules PBL's/ml + 0.5×10^6 cel·lules Daudi/ml pre-tractades amb Mitomicina C.

PBL'S

- 15 ml Ficoll + 40 ml de dilució 1/5 de Buffy Coat en PBS
- 2000 rpm 20-25 minuts temperatura ambient
- Recollir l'anell
- Centrifugar 1600 rpm 5 minuts a temperatura ambient rentat amb PBS
- Centrifugar 1600 rpm 5 minuts a temperatura ambient rentat amb RPMI incomplet (sense FCS)
- Deixem 4 hores a l'incubador (5% CO₂, 37°C) $1.5-2 \times 10^6$ cel·lules/ml en RPMI complet (amb FCS) per tal de que s'adhereixin els monòcits
- Recollim les cèl·lules i les plaquegem a $1.5-2 \times 10^6$ cel·lules/ml en plaques de pous de 24 on hi ha les Daudi pre-tractades amb la Mitomicina C

Cèl·lules Daudi

- Tractem les Daudi amb Mitomicina C (stock a 0.5 mg/ml en PBS filtrat a -80°C i protegit de la llum). Per exemple: 26×10^6 cèl·lules Daudi en 2 ml RPMI complet + 200 µl Mitomocina C (50 µg/ml). Ho posem a l'incubador en un t bde 50 ml 4-5 hores, agitant de tant en tant.
- Passat aquest temps fem de 5 a 6 rentats (1600 rpm, 5 minuts a temperatura ambient) amb RPMI incomplet i anem canviant de tub per eliminar la Mitomicina.
- Plaquegem a 0.5×10^6 cel·lules Daudi/ml en placa de pous 24

- Mantenim el cultiu mixte 5-6 dies a l'incubador

2. Obtenció de les Cèl·lules NK: Passat aquest període de temps tenim aproximadament 50 % limfòcits T - 50 % NK; cal que fem una depleció dels limfòcits T

- Recollir les cèl·lules del cultiu mixt i les centrifuguem a 1600 rpm 5 minuts a temperatura ambient
- Resuspenem en RPMI incomplet i les centrifuguem a 1600 rpm 5 minuts a temperatura ambient
- Les cèl·lules resuspeses en 1ml RPMI incomplet/ 10^7 cèl·lules, les tractem amb anti-CD3 ($10 \mu\text{g}/90 \times 10^6$ cèl·lules) 30 minuts a 4°C en agitació.
- Afegir RPMI incomplet (fins omplir el tub) i centrifugar a 1500 rpm 5 minuts a 4°C
- Eliminar el sobrenedant i tractar amb una dilució 1/4-1/5 de complement (sèrum de conill)/ RPMI incomplet a 2×10^7 cèl·lules/ml
- Incubar 1 hora 37°C 5% CO_2 i anar movent cada 15 minuts
- Recollir el volum, diluir-lo a la meitat amb RPMI incomplet i fer un gradient amb Ficoll, centrifugar a 2000 rpm 20 minuts a temperatura ambient
- Recollir l'anell
- 2 Rentats a 1500 rpm 5 minuts a temperatura ambient en RPMI incomplet
- Posar a cultivar a 10^6 cèl·lules/ml RPMI complet amb IL-2 500-700 U/ml
- Al cap de 18 hores es fa un marcatge per citometria (secció 10) usant els anticossos anti-CD3, anti-CD19, anti-CD56-FITC (1/200)

El cultiu es fa créixer a 10^6 cèl·lules/ ml i es manté amb IL-2 a l'incubador

7.2 Producció de limfòcits CD8⁺

Els limfòcits CD8⁺ representen del 20 al 35% dels limfòcits de sang perifèrica (PBL's). Per tant, cal un enriquiment i una purificació d'aquesta població per posteriors assaigs.

Protocol

1. 15 ml Ficoll + 40 ml de dilució 1/5 de Buffy Coat en PBS
2. Centrifugar 2000 rpm 20-25 minuts temperatura ambient
3. Recollir l'anell

4. Centrifugar 1600 rpm 5 minuts a temperatura ambient rentat amb PBS
5. Centrifugar 1600 rpm 5 minuts a temperatura ambient rentat amb RPMI incomplet (sense FCS)
6. Deixem 16 hores a l'incubador (5% CO₂, 37°C) $1,5-2 \times 10^6$ cèl·lules/ml en RPMI complet (amb FCS) per tal de que s'adhereixin els monòcits.
7. Tractament amb anti-CD4 i anti-CD19 (10 µg de cada anticòs/90 x 10⁶ cèl·lules) a 1ml RPMI incomplet/ 10⁷ cèl·lules durant 30 minuts a 4°C en agitació
8. Afegir RPMI incomplet i centrifugar a 1500 rpm 5 minuts a 4°C
9. Eliminem el sobrenedant i tractem amb una dilució 1/4-1/5 de complement/ RPMI incomplet a 2×10^7 cèl·lules/ml
10. Incubar 1 hora 37°C 5%CO₂ i anar movent cada 15 minuts
11. Recollir el volum, diluir-lo a la meitat amb RPMI incomplet i fer un gradient amb Ficoll, centrifugar 2000rpm 20 minuts a temperatura ambient
12. Recollir l'anell
13. 2 Rentats a 1500 rpm 5 minuts a temperatura ambient en RPMI incomplet
14. Marcatge de citometria (secció 10) amb anticossos anti-CD8-Cy-Chrome, anti-CD244-biotinilat i anti-CD229-biotinilat seguit de l'Avidina-Cy-Chrome.
15. Posar a cultivar a 10⁶ cèl·lules/ml RPMI complet

8. Anàlisi de Proteïnes

8.1 Immunoprecipitació

Aquesta tècnica ens permet identificar associacions entre proteïnes. Mitjançant anticossos específics contra la proteïna d'interès, la immunoprecipitem en condicions natives i després, en la membrana de nitrocel·lulosa es determinen les proteïnes associades. En els experiments presentats en la secció de resultats aquesta tècnica apareix freqüentment.

8.1.1 Tractament de les mostres, previ a la immunoprecipitació

El **tractament amb la droga Wortmanina** (inhibidora de l'activitat PI3K) es fa tot just es recullen les cèl·lules, tal i com s'especifica en el protocol d'aquesta mateixa secció .

En els casos que s'ha fet un **estímul amb anticossos** específics (previ a la immunoprecipitació) les cèl·lules s'han sotmès a un dejuni. El dejuni consisteix en mantenir les cèl·lules 16-18 hores a una concentració de FCS de l'1%, per tal de minimitzar l'activació basal.

També hi ha casos, que previ a la immunoprecipitació, s'ha fet una **biotinilació** de les mostres. Aquest pas és necessari quan no es tenen anticossos específics contra proteïnes de membrana (receptors), per detectar-les en condicions desnaturalitzades en la membrana de nitrocel·lulosa. En aquest cas, s'immunoprecipita contra la proteïna de membrana d'interès amb un anticòs que sí que reconeix la forma nativa de la proteïna i després, es determina la seva presència (en la membrana de nitrocel·lulosa) usant l'avidina, amb altra avidesa per la biotina. La biotinilació és prèvia als estímuls per activar (anticossos o pervanadat).

Durant el procés de la immunoprecipitació, cal mantenir els reactius i cèl·lules en gel.

Material

- Biotina (2 mg/ml en PBS)
- Tampó de Lisi: 20 mM Tris-Base (pH 7,5); 150 mM NaCl; 1% detergent CHAPS (per cèl·lules COS) o Tritó X-100 (per cèl·lules YT); 10 mM NaF; 1 mM Na_3VO_4 ; 1 mM PMSF; 1 mM NaPirofosfat.
- Proteïna A Sepharosa
- Tampó de càrrega (3X): 200 mM Tris pH 8.6; 6% SDS; 0.06% Bromophenol; 5% 2- β -Mercaptoetanol; 30% Glicerol
- Pervanadat a 100 μM es fa una dilució 1/100 de l'ortovanadat (100 mM Na_3VO_4) en PBS i s'afegeixen 2 μl de H_2O_2 . Aquesta reacció genera el pervanadat que és un potent inhibidor de les fosfatases de tirosines, hi ha un desequilibri en les fosforilacions i permet hiperfosforilacions per part de les cinases.

Protocol

1. Rentar les cèl·lules 2 x amb PBS.
2. Si cal, el primer és: Tractament amb droga (Wortmanina 100 mM) en RPMI sense FCS a 10^6 cel·lules/ml

3. Si cal: Biotinilació a 1 ml dilució de la Biotina/ 20×10^6 cèl·lules durant 20 minuts en gel. Rentar (1400 rpm 4°C 5 minuts) i Bloquejar amb RPMI sense FCS durant 20 minuts en gel.
4. Si cal: Estimular amb pervanadat o anticossos a 37°C. Es fa després del tractament amb wortmanina (si n'hi ha) i de la Biotinilació (si n'hi ha)
5. Centrifugar 1400 rpm 4 minuts 4°C
6. Lisar amb 1 ml de tampó de lisi durant 20 minuts en gel.
7. Centrifugar 14000 rpm 4°C 20 minuts
8. Recuperar els sobrenedant i fer els *pre-clearings* durant 1 hora a 4°C amb rotació amb 30 µl proteïna A Sepharosa
9. 14000 rpm 4°C 20 minuts. En l'últim rentat es guarden 50 µl pels lisats totals
10. Recuperar els sobrenedant i afegir anticòs (2-4mg) contra proteïna d'interès a immunoprecipitar. Incubar 1 hora 4°C en rotació
11. Afegir 30 µl proteïna A Sepharosa per immunoprecipitar. 1 hora 4°C en rotació
12. Rentar tres vegades la immunoprecipitació amb el tampó de lisi diluït a la meitat sense detergent
13. Afegir 50 µl del tampó de càrrega (en condicions reductores) a totes les mostres, es desnaturalitzen (10 minuts a 100°C) i les mostres ja estan preparades per córrer en el gel d'acrilamida .

8.2 Assaigs d'activitat d'ERK, p38 i Akt

També s'ha determinat el grau d'activació de les vies de les MAP cinases: ERK i p38 (Dong, et al.,2002) i d'Akt (Kharas and Fruman,2005). En aquest cas, no s'immunoprecipita, sinó que es treballa amb els lisats cel·lulars totals obtinguts després de l'estimulació. Es recullen les cèl·lules, es fa un rentat amb PBS i s'activen a 37°C amb els estímuls i temps oportuns, indicats en cada cas, a la secció de resultats (10^6 cèl·lules per punt d'activació en un volum de 200 µl de RPMI sense FCS), es fa un rentat amb PBS i es lisa amb 70µl de tampó de lisi. S'afegeixen 20 µl de tampó de càrrega, es desnaturalitza i ja es pot córrer el gel d'acrilamida. En certs experiments, previ a córrer el gel de proteïnes s'ha mesurat la proteïna per tal de carregar la mateixa quantitat. S'ha utilitzat la tècnica del Bradford. També s'ha quantificat la intensitat de la

banda en els Western-Blot usant un programa informàtic per quantificar bandes (Bio 1D)

8.3 Electroforesi de proteïnes (SDS-PAGE)

Es preparen dos fases de gel d'acrilamida, que varien en el percentatge d'acrilamida, pH i molaritat, per tal d'aconseguir un empaquetament (gel apilador) correcte de les mostres, prèvia a l'entrada a la fase resolutive (gel separador) on les mostres es separen en funció del pes molecular. En funció del pes de les proteïnes a resoldre, es treballa amb majors (15%) o menors grau (8%) d'empaquetament d'acrilamida en el gel separador; un alt percentatge per proteïnes de baix pes molecular i viceversa.

Gel Apilador (10ml)

Acrilamida/Bis-Acrilamida 30% 1,5 ml

Tris-Base 1M, pH 6,8 1,25 ml

Aigua MiliQ 7 ml

SDS 20% 50 µl

APS 20% 50 µl

TEMED 15 µl

Gel Separador (30ml)

Acrilamida/ Bis-Acrilamida 30% 8%-15%

Tris-Base 1M, pH 8,8 11,20 ml

Aigua MiliQ varia en funció de l'acrilamida

SDS 20% 150µl

APS 20% 150µl

TEMED 25 µl

El tampó d'electroforesi 10 X 1L: 30 gr Tris-Base; 144 gr Glicina i 10 gr SDS, pH 8,4. Es treballa a l'1X. SDS: Sodi Dodecilsulfat; APS: Persulfat d'Amoni; TEMED: N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamida. SDS-PAGE: Electroforesi en Gels de SDS-Poliacrilamida

Es prepara el gel, es carreguen les mostres i es posa a córrer aplicant una amperatge no superior als 60 mA des del pol negatiu al positiu.

8.5 Western-Blot

El gel d'electroforesi es transfereix a una membrana de nitrocel·lulosa que serà la que incubarem amb els anticossos d'interès.

Material

- Tampó de transferència: 25 mM Tris-Base; 129 mM Glicina; 20% Metanol (4°C)
- Tampó TTBS 10X (per rentar i incubar anticossos) 1L: 24 gr Tris-Base; 80 gr NaCl; 20 ml Tween 20%. Es treballa a l'1X
- Tampó *stripping* 2L: 17,5 gr NaCl; 3,15 gr Trizma (Tris-HCl) pH 2-3. Permet que les membranes es puguin reutilitzar per més d'una incubació, si es tracten amb aquest tampó durant 10 minuts amb moviment vigorós i es tornen a bloquejar

Protocol

1. S'agafa el gel d'electroforesi i es munta la transferència: el gel en contacte amb la membrana de nitrocel·lulosa (PVDF) i aquesta en contacte amb el pol positiu, que és cap on es fa la transferència.
2. Quan ja s'ha acabat la transferència, la membrana ja es pot passar a incubar amb els anticossos desitjats:
 - Bloqueig amb llet desnatada 2% o albúmina 2% (si és amb l'anticòs contra tirosines fosforilades). Incubar 1 hora a temperatura ambient
 - 3 rentats de 5 minuts amb TTBS
 - Anticòs primari. Incubar 1 hora a temperatura ambient
 - 3 rentats de 5 minuts amb TTBS
 - Anticòs secundari. Incubar 30 minuts a temperatura ambient
 - 3 rentats de 5 minuts amb TTBS i revelar amb el Supersignal Chemiluminiscense substrate

L'anticòs contra les tirosines fosforilades i l'Avidina estan ja conjugat amb la Peroxidasa i per tant no s'afegeix un secundari.

9. Immunocitoquímica

S'han obtingut imatges de microscopia confocal aplicant la tècnica de la immunocitoquímica, en cèl·lules COS i YT. Es treballa amb parelles de fluorocroms que no es solapin o que siguin fàcilment compensables per evitar interferències; es treballa amb les combinacions EGFP(verd)-Cy3(vermell) o ECFP(cyan)-EYFP(groc)

Material

- Tampó de Bloqueig: 0,2% llet; 2% FCS; 1% albúmina; 0,1mM Glicina; 0,01% Tritó X100 en PBS
- Tampó dilució anticossos: 1% albúmina en PBS
- Medi de muntatge Fluoromont

Protocol

Les cèl·lules han de créixer adherides en els cobreobjectes. Si són COS es cultiven aquí, si són YT s'adhereixen sobre cobreobjectes tractats amb Poli-Lisina.

1. Experiment de *capping* entre el 3BP2 i el CD244 o CD229.
 - Col·localització del 3BP2-EGFP amb el CD244 en cèl·lules YT: activació amb l'anticòs primari (30 minuts a 4°C), seguit d'un secundari ja fluorocromat amb Cy3 per no interferir en l'emissió de l'EGFP (15 minuts a 37°C). Tot en medi RPMI sense FCS. El secundari serveix tant de *cross-linker* com per marcar l'anticòs primari. Les cèl·lules es fixen amb Acetona -20°C 5 minuts i s'asseca.
 - En el cas de la col·localització 3BP2-EYFP amb CD229-ECFP en cèl·lules COS, es fa com el punt anterior, però el secundari no és fluorocromat, per què el CD229 es monitoritza amb l'ECFP.
2. Col·localització del 3BP2-EGFP amb el CD244 o CD229 (en presència o absència de Fyn) en cèl·lules COS: incubació amb l'anticòs contra el receptor (30 minuts a 4°C) seguit d'un secundari-Cy3 (15 minuts a 4°C) o d'un anti-mouse-biotinilat (15 minuts a 4°C) seguit d'una Avidina-Cy3 (15 minuts a 4°C). Les dilucions dels anticossos es preparen amb el tampó de dilució. Entre incubacions es fan de 2 a 5 rentats amb PBS.
3. Col·localització del 3BP2 amb Fyn, cal primer, fixar i permeabilitzar amb metanol 15 minuts a 4°C. Es bloqueja 30 minuts a 4°C, es posa l'anticòs contra Fyn 30 minuts a 4°C, secundari amb Cy3 30 minuts a 4°C.
4. Muntatge amb Fluoromont sobre els portaojectes i observació amb el microscopi confocal.

10. Citometria de Flux

El citòmetre de flux és un aparell que permet analitzar poblacions diferentment marcades amb fluorocroms, treballem normalment amb els canals FL-1 (emissió verda) i FL-3 (emissió taronja), fàcilment compensables.

Material

- Tampó de rentat: PBS; 2% FCS; 0,01% azida sòdica
- Tampó de fenotipat: 1% sèrum conill inactivat en el tampó de rentat. Les dilucions dels anticossos es fan amb aquest tampó.

10.1 Anàlisi de l'expressió de proteïnes

Protocol

- Quan s'analitza l'emissió de l'EGFP en les cèl·lules YT, s'agafen 10^4 cèl·lules, es renten amb el tampó de rentat i s'analitza l'emissió de fluorescència pel canal de la FL-1. Amb les línies de YT creades: 3BP2-YT i SH2-YT també s'ha fet citometria de *sorting*, mitjançant la qual es van fer dos enriquiments per tal d'obtenir les poblacions cel·lulars més positives per l'EGFP i per tant, amb més expressió de proteïna 3BP2 i SH2-3BP2.

- Si és un marcatge intracel·lular (3BP2 en Jurkat):

1. 10^6 cèl·lules per punt fixades amb Formaldehid al 5% en PBS durant 10 minuts en gel
2. Rentat amb el tampó de rentar i centrifugar 1400 rpm, 5 minuts a 4°C
3. Permeabilitzar amb NP-40 al 0,1% durant 20 minuts en gel
4. Repetir pas 2
5. Bloquejar amb 10% FCS
6. Incubar amb l'anticòs primari (20 µl sobrenedant del 3BP2), 1 hora en gel
7. Repetir pas 2
8. Incubar amb l'anticòs secundari (mouse-anti-κ biotinilat 1/200) 20 minuts en gel
9. Repetir pas 2
10. Afegir l'Avidina-PE (1/100)

11. Rentat 1400 rpm, 5 minuts a 4°C
12. Lectura al citòmetre en la FL-2

- Si és un marcatge de superfície (Expressió del CD244 o CD229 o altres marcadors):

1. $0,2-0,5 \times 10^6$ cèl·lules per tub
2. Rentat amb el tampó de rentar i centrifugar 1400 rpm, 5 minuts a 4°C
3. Incubar l'anticòs primari: Si és biotinitat a 1/200, sinó, 1 µg 1 hora en gel
4. Repetir pas 2
5. Si l'anticòs és biotinitat s'afegeix l'Avidina-Cy-Chrome 1/100, sinó 1/200 anti-κ-biotinitat (després s'afegeix l'Avidina-Cy-Chrome). Incubar 20 minuts en gel. Si és un marcatge directe es posa l'anticòs directament fluorocromat
6. Repetir pas 2
7. Llegir al citòmetre en FL-3 (Cy-Chrome)

10.2 Incorporació de Phalloïdina

La Phalloïdina es un derivat de l'*Amanita phalloides* amb molta afinitat per l'actina F o polimeritzada.

Protocol

1. Les cèl·lules CD8⁺ just després de produir-se, es transfecten transitòriament amb el 3BP2-EGFP o variant (secció 5.1.2)
2. Es cultiven 16-18 hores a 37°C, 5% CO₂
3. 2×10^5 cèl·lules s'activen amb els estímuls i temps corresponents (CD244) en 100 µl RPMI sense FCS
4. 1 rentat amb PBS, centrifugar 2000 rpm 3 minuts 4°C
5. Fixació amb PBS-3% PF (paraformaldehíd) 10 minuts en gel. Rentat com el pas 4
6. Permeabilització amb PBS-0,05% Saponina 15 minuts en gel. Rentat com el pas 4
7. Bloqueig amb PBS-1%BSA 40 minuts en gel. Rentat com el pas 4
8. Incubar amb la Phalloïdina-TRIC 1/200 en PBS-0,1% BSA 20 minuts en gel. Rentat com el pas 4
9. S'analitzen les cèl·lules vives i es mira l'emissió en FL-1 (EGFP) i FL-3 (Phalloïdina-TRIC)

10.3 Expressió del CD69

El CD69 és un marcador d'activació; un augment en l'activitat d'ERK és concomitant amb un increment del CD69 en la superfície cel·lular (Villalba, et al.,2000).

Protocol

1. Després de transfectar les cèl·lules Jurkat o CD8⁺ amb el 3BP2-EGFP o variant (secció 5.1.2) s'activen amb els estímuls oportuns (anticossos anti-CD3, CD229 o IgG com a control isotípic amb *sheep-anti-mouse* que és el *cross-linker*) 10⁵ cèl·lules en plaques de 96 pous
2. Incubar 16-18 hores 5% CO₂, 37°C
3. Es recullen les cèl·lules i es fa un rentat amb el tampó de rentat, centrifugar 1400 rpm, 5 minuts a 4°C
4. Incubar amb Anti-CD69-biotinilat diluït 1/400 (en tampó de fenotipat) 20 minuts en gel
5. Repetir pas 3
6. Anti-mouse-CyChrome diluït 1/200
7. Repetir pas 3
8. Anàlisi en el citòmetre en FL-1 (EGFP) i FL-3 (CD69) de les cèl·lules vives

11. Citotoxicitat Redirigida Dependent d'Anticòs (ADCC)

Material

- Histodenz (Sigma): 17 gr Histodenz de Sigma; 26 ml RPMI complet (amb FCS); 10 ml FCS fins a 100 ml Aigua MiliQ. Es filtra i es guarda a 4°C
- 5 mCi/ml Na₂⁵¹CrO₄

Protocol

- Preparació de les cèl·lules efectores i estímuls:

Els estímuls (anticossos anti-CD244 i control isotípic) s'afegeixen a una concentració final de 200 ng/ml (en 200 µl finals per pou) i les cèl·lules efectores (YT) es preparen per tenir relacions 20:1, 10:1, 5:1, 1:1 (Efectores:Diana).

- Preparació de les cèl·lules dianes (*target*) (10⁴ cèl·lules/pou):

1. 3×10^6 P815 resuspenses (sense Tripsina)
2. Centrifugar 5 minuts, 1500 rpm, temperatura ambient. Resuspenem amb 2 ml RPMI complet
3. Gradient: 2 ml Histodenz amb els 2 ml P815 del punt anterior: centrifugar 20 minuts, 1500 rpm, temperatura ambient
4. Recollir l'anell cel·lular entre medi i Histodenz
5. Rentat afegint 10 ml medi complet a les cèl·lules recollides: centrifugar 5 minuts, 1500 rpm, temperatura ambient. Resuspenem el pèl·let amb $75 \mu\text{l}$ FCS + $25 \mu\text{l}$ Cr^{51} 5 mCi/ml d'activitat: equival a 100-120 mCi.
6. Incubar 1-2 hores 37°C 5% CO_2
7. 2 Rentats com pas 5. En l'últim rentat, el pèl·let el resuspenem en 2 ml
8. Gradient com l'apartat 3
9. 3 Rentats com el pas 5. Resuspenem el pèl·let a 10^6 cèl·lules/10 ml RPMI complet
10. Afegim $100 \mu\text{l}$ P815 carregades amb el Cr^{51} en contacte amb els $100 \mu\text{l}$ finals de cèl·lules efectores i estímuls
11. Es reserven 4 o 6 pous. Es fa l'alliberació màxima: $100 \mu\text{l}$ P815 + $100 \mu\text{l}$ Tritó al 10% en medi complet i l'alliberació espontània: $100 \mu\text{l}$ P815 + $100 \mu\text{l}$ RPMI
12. Centrifuguem la placa 5 min, 500 rpm, temperatura ambient
13. Incubar 3-4 h 37°C 5% CO_2
14. Centrifuguem la placa 5 min, 500 rpm, temperatura ambient
15. Recollim 130-150 μl de sobrenedant en els tubets pel comptador de radiació gamma

Càlcul d'alliberació del Crom:

$$\text{Valor citotoxicitat} = \frac{(\text{valor pou- alliberació espontània})}{(\text{alliberació màxima- alliberació espontània})} \times 100$$

Si la relació entre les alliberacions Espontània/Màxima x 100 és superior a 15 es descarta l'experiment.

12. Assaig de producció d'IFN γ

Material

- Tampó Coating per 100 ml d'aigua MiliQ: NaHCO₃ 0,84 gr; Na₂CO₃ 0,56 gr a pH 9,5
- Anticossos per l'ELISA de l'IFN γ : anti-human IFN γ (clone NIB42) mAb, anti-human biotinilat IFN γ (clone 4SB3), and IFN γ *standard* de BD Pharmingen
- Tampó de Bloqueig: PBS-Tween 0,05% amb 10% FCS

Protocol

- Estimulació

1. S'afegeixen 100 μ l per pou de cèl·lules P815 a $0,5 \times 10^6$ /ml del medi RPMI amb FCS (en placa de cultius de 96 pous) i es deixa 24 hores a l'incubador
2. Rentat amb 200 μ l PBS per pou per eliminar cel·lules mortes
3. Afegir els estímuls: anti-CD244 i anti-Ig G control a 200 ng/ml en un volum final de 200 μ l del medi RPMI amb FCS per pou
4. 16 hores a l'incubador, 5% CO₂, 37°C
5. Recollir els sobrenedants

- ELISA

1. 50 μ l/ pou de l'anticòs de captura contra l'IFN γ (anti-human IFN γ (clone NIB42) mAb) a 2 μ g/ml en el tampó Coating en placa d'ELISA de 96 pous
2. Incubar 16 hores a 4°C
3. Rentar 2 vegades amb 200 μ l/ pou de PBS-Tween 0,05%
4. Bloquejar 2 hores a temperatura ambient amb 200 μ l/ pou de Tampó de Bloqueig
5. Rentat com en el pas 3
6. Afegir 50 μ l de cada sobrenedant i 50 μ l del tampó de Bloqueig per pou
7. Afegir 100 μ l per pou de la mostra patró (IFN γ *standard*) a una concentració final de 2,5 ng/ml i dilucions a la meitat fins 0,15 ng/ml
8. Incubar 16 hores a 4°C
9. Fer 4 rentats com en el pas 5
10. 100 μ l per pou de l'anticòs anti-human biotinilat IFN γ (clone 4SB3) a 1 μ g/ml
11. Incubar 1 hora a temperatura ambient
12. Fer 6 rentats com el pas 4

13. Afegir 100 µl/ pou d'Avidina Peroxidasa diluïda 1/5000
14. Incubar 30 minuts a temperatura ambient
15. Fer 8 rentats com els pas 5
16. Revelar amb 100 µl/ pou de la solució d'OPD que és el substrat de la Peroxidasa
17. Es mira l'OD a 450 nm i es calcula la producció d'IFN γ fent recte de regressió amb les mostres estàndard i multiplicat per 2 ja que les mostres es dilueixen a la meitat (pas 6)

IV. RESULTATS

RESULTATS

1. Identificació del 3BP2 com a lligand intracel·lular del receptor CD244

Per tal d'identificar proteïnes capaces d'interaccionar amb la cua citoplasmàtica del CD244 es va fer ús de la tecnologia del triple híbrid en llevats. Es va fer el cribatge d'una llibreria de cDNA de cèl·lules B humanes usant la cua citosòlica del CD244 com a esquer. En els limfòcits B, SAP gairebé no s'hi expressa, per tant era un bon sistema per trobar proteïnes diferents a SAP.

El vector d'expressió de llevats pBridge presenta dos punts de clonatge múltiple (MCS) i permet créixer en un medi deficient en triptòfan (-Trp). En un MCS es va clonar la regió intracel·lular del CD244 en pauta de lectura amb el domini d'unió (BD) del Gal 4. En l'altre MCS es troba clonada la cinasa Fyn, controlada per un promotor reprimible per metionina (Met). S'utilitza Fyn, ja que aquesta cinasa fosforila el CD244 (Sayos, et al.,2000). La cinasa Fyn està modificada de tal manera que la seva activitat no és letal pel llevat (Y420F i Y531F). Per altra banda té mutat el seu domini SH2 (R176Q), així s'evita que interfereixi en la interacció entre la cua citosòlica del CD244 fosforilada i dominis SH2 de proteïnes de la llibreria (Sayos, et al.,2001). Aquesta construcció es va transformar en la soca de llevats CG1945 de *Sacharomices cerevisiae* i es va seleccionar en un medi -Trp/-Met. Seqüencialment, els llevats seleccionats es van transformar amb la llibreria de limfòcits B humans. Els diferents inserts de la llibreria (un total de 10^6 inserts) estan clonats amb el domini d'activació (AD) del Gal4 en el vector pACT2, que permet créixer en medi deficient per la Leucina (-Leu).

Aquesta transformació es va plaquejar en el medi de selecció -Trp/-Met/-Leu/-His en presència del 3-AT. També es va plaquejar en un medi -Trp/-Met/-Leu per tal de calcular l'eficiència de transformació que va ser de 2×10^6 . Les colònies que creixien en el medi de selecció es cribaven també per assaig d'activitat β -galactosidasa qualitatiu i semiquantitatiu. D'aquesta manera es va trobar el clon 41a: en la placa 41, el primer clon que va aparèixer (a). La seqüència del clon corresponia a la molècula adaptadora

3BP2: des de l'aminoàcid 244 al l'extrem carboxi-terminal. En la figura 1 es presenta la seqüència aminoacídica completa del 3BP2 i en negreta, la seqüència corresponent al clon 41a

```

1  MAAEEMHWPVPMKAIGAQNLLTMPGGVAKAGYLHKKGGTQLQLLKWPLRFVIIHKRCVYYFKSSTSA
68  SPQGAFSLSGYNRMRAAEETTSNNVFPFKIIHISKKHRTWFFSASSEERKSWMALLRREIGHFHE
135  KKDLPLDTSDDSSDTSFYGAVERPVDISLSPYPTDNEDYEHDDDDSYLEPDSPEPGRLEDALMHP
202  PAYPPPPVPTPRKPAFSDMPRAHSFTSKGPGPLLPPPPPKHGLPDVGLAAEDSKRDPLCPRAEPCP
269  RVPATPRRMSDPPLSTMPTAPGLRKPPCFRESASPSPEPWTPGHGACSTSSAAIMATATSRNCDKLK
336  SFHLSPRGPPTSEPPVPANKPKFLKIAEEDPPREAAMPGLFVPPVAPRPPALKLPVPEAMARPAVL
403  PRPEKPQLPHLQRSPDGQSFRSFSFEKPRQPSQADTGGDDSDYEVPLPNSVFNNTTESCEVER
470  LFKATSPRGEPQDGLYCIRNSSTKSGKVLVWDETSNKVRNYRIFEKDSKFYLEGEVLVSVSGSMVE
537  HYHTHVLPSHQSLLLRHPYGYTGPR

```

Figura 1. Seqüència aminoacídica del 3BP2. La seqüència del clon 41a trobada mitjançant el triple híbrid correspon a la indicada en negreta des de la posició 244 a la 561.

1.1 3BP2

El 3BP2 és una proteïna d'uns 80 KDa, d'expressió preferent en cèl·lules del sistema immune. Està composta per un domini PH a l'extrem amino-terminal, una regió central amb tres dominis rics en prolins i motius tirosina i serina susceptibles a la fosforilació i a l'extrem carboxi-terminal un domini SH2 (Deckert, et al.,1998; Ren, et al.,1993). Es va identificar per primera vegada com una proteïna d'unió a la proteïna-tirosina cinasa (PTK) c-Abl (Ren, et al.,1993). Diversos estudis han determinat que el 3BP2 participa en l'activació de diferents cèl·lules de llinatge limfoide i mieloide, ja que la seva arquitectura modular li permet establir interaccions amb una diversitat de proteïnes que intervenen la senyalització intracel·lular de diferents receptors (la figura 2) (Deckert, et al.,1998; Foucault, et al.,2003; Foucault, et al.,2005; Jevremovic, et al.,2001; Maeno, et al.,2003; Qu, et al.,2005; Sada, et al.,2002). Tal i com es presenta en la figura 2, el clon 41a correspon bàsicament al domini SH2 i part de la regió central de la molècula completa del 3BP2.

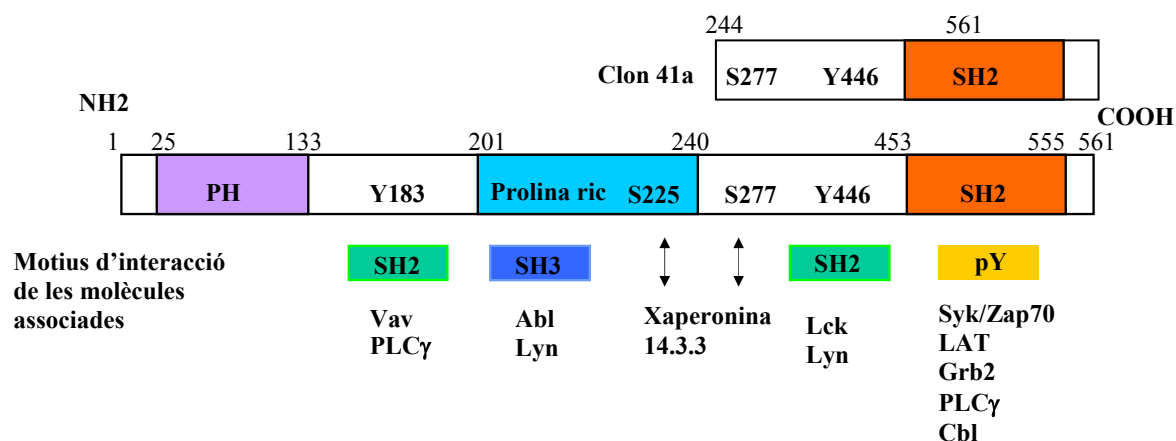


Figura 2. Esquema de l'estructura del 3BP2, clon 41a i molècules associades. Representació gràfica de l'arquitectura del 3BP2 indicant els dominis estructurals i motius que modulen la interacció amb els motius de les proteïnes amb les quals estableix una associació. També s'indiquen els motius que integren el clon 41a.

En el limfòcit T, en situació basal el 3BP2 es distribueix entre el citosol i la membrana, després de l'activació del receptor per l'antigen, el 3BP2 es fosforila i transloca a rafts (Deckert, et al.,1998). El domini SH2 del 3BP2 interacciona directament amb el domini catalític de Syk, cinasa que fosforila el 3BP2 en diferents residus tirosina (174, 183, 446) (Deckert, et al.,1998; Maeno, et al.,2003). S'ha descrit que, en un sistema de llevats, el 3BP2 murí estableix interaccions directes amb la cinasa Fyn (Deckert, et al.,1998). En limfòcit T, el domini SH2 de Lck interacciona amb la tirosina 446 fosforilada del 3BP2 (Qu, et al.,2005). Durant aquesta activació in vitro, el domini SH2 del 3BP2 coprecipita amb un complex compost per LAT, Grb-2, PLCγ, Cbl i Zap70. També Vav-1 està integrat en el múticomplex articulat pel 3BP2, tot interaccionant amb la tirosina 183 fosforilada de l'adaptador (Zakaria, et al.,2004). El 3BP2 promou la transcripció del gen de la IL-2 tot activant els factors de transcripció d'aquesta citocina: NFAT i AP-1. El 3BP2 a través dels seus dominis SH2 i PH i amb la col·laboració de Syk, assegura l'activació de Vav-1, Ras, Rac i Calcineurina, proteïnes involucrades en l'activació d'AP-1 i NFAT (Deckert, et al.,1998; Qu, et al.,2005).

En l'activació del receptor per l'antigen de la cèl·lula B, el 3BP2 també hi participa activament (Foucault, et al.,2005). En aquest tipus cel·lular el 3BP2 interacciona amb Syk, Vav-1 i la PLCγ, molècules que intervenen en l'activació d'NFAT. (Foucault, et al.,2005).

La funció del 3BP2 en el limfòcit T i B, està regulada a través de la interacció amb la xaperonina 14.3.3 (Foucault, et al.,2003). La fosforilació per la PKC o la PKA en les serines S225 i S277 de la regió rica en prolines del 3BP2, incrementen la interacció constitutiva amb la xaperonina 14.3.3, fenomen que condueix a una inhibició d'NFAT i terminació de l'activitat positiva (Foucault, et al.,2003).

Pel què fa l'activació de la cèl·lula NK, el 3BP2 incrementa la resposta citotòxica (Jevremovic, et al.,2001). Durant l'activació dels receptors Fc de la cèl·lula NK, el 3BP2 es fosforila i s'associa a molècules efectores: a través del domini SH2 interacciona amb LAT i mitjançant la tirosina 183 fosforilada, recluta Vav i PLC γ . Per assegurar una bona citotoxicitat mitjançada per receptors Fc cal un 3BP2 complet; tots els seus dominis i tirosines són imprescindibles (Jevremovic, et al.,2001).

En basòfils, durant l'activació del receptor de la IgE, el 3BP2 es fosforila i promou la fosforilació de la PLC γ , moviments de calci i la desgranulació, però no afecta ERK ni JNK (Sada, et al.,2002). In vitro, Lyn fosforila el 3BP2 en els mateixos residus tirosina que Syk. El 3BP2 interacciona amb Lyn de forma constitutiva a través de la regió rica en prolines i de forma induïble per fosforilació (tirosina 446). L'activació del 3BP2 incrementa l'autofosforilació de la cinasa Lyn (Maeno, et al.,2003).

Mutacions en el gen que codifica pel 3BP2, en la regió p16.3 del cromosoma 4, s'han relacionat amb una malaltia autosòmica dominant poc freqüent anomenada querubisme (Ueki, et al.,2001). Aquesta malaltia es caracteritza per una degradació excessiva dels ossos de les mandíbules superior i inferior, seguida de l'aparició de bosses cístiques plenes d'una massa tissular fibrosa composta per osteoclasts patològicament activats i cèl·lules estromals. Les mutacions responsables d'aquesta malaltia es concentren en les zones riques en prolines (Ueki, et al.,2001) i cap dels mutants del 3BP2 pot interaccionar amb la xaperonina 14.3.3 (Miah, et al.,2004). Un 3BP2 disfuncional no permet la correcta activació dels osteoclasts ni dels mastòcits estromals (Miah, et al.,2004; Ueki, et al.,2001). Aquest fet suggereix que el 3BP2 està implicat en la diferenciació i activació de cèl·lules d'origen mieloide.

1.2 L'associació del 3BP2 amb el CD244 és dependent de fosforilació

Mitjançant l'assaig semiquantitatiu d'activitat β -galactosidasa en llevats es va determinar si la interacció entre el 3BP2 i la cua citosòlica del CD244 era dependent de l'estat de fosforilació del receptor. Aquesta fosforilació la porta a terme Fyn ja que aquesta cinasa és capaç de fosforilar el receptor CD244 (Sayos, et al.,2000). El vector pBridge-CD244 amb un Fyn catalíticament inactiu es genera tot digerint amb l'enzim Bgl II i religant, ja que dues dianes de restricció per Bgl II apareixen en els extrems 5' i 3' del domini catalític de Fyn (Del Valle, et al.,2003). La figura 3 mostra la interacció del 3BP2 amb la regió citosòlica del CD244, només en condicions en les que Fyn és actiu.

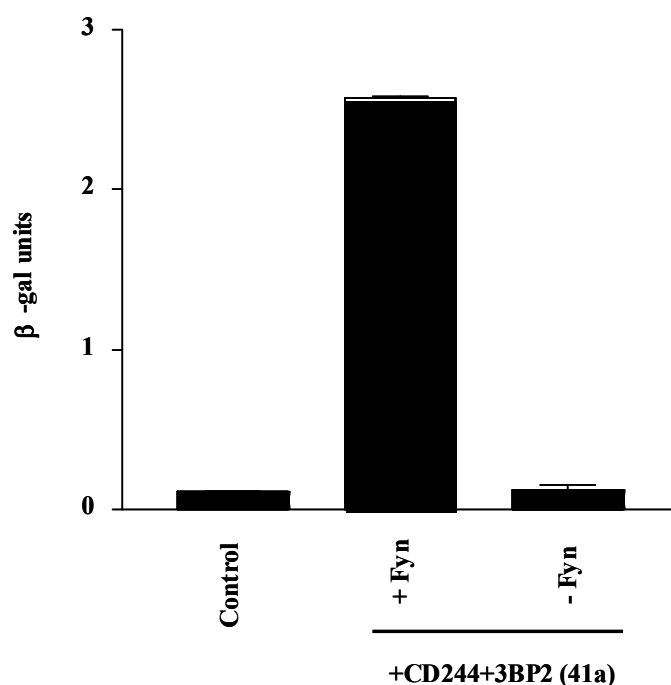


Figura 3. CD244 interacciona amb el 3BP2 quan Fyn és actiu en el sistema del triple híbrid en llevats. Els llevats es van cotransformar amb el 3BP2 (clon 41a) i el CD244 (amb o sense Fyn actiu) o amb els vectors buits (control). La interacció entre ambdues molècules amb Fyn actiu o inactiu s'analitzà mitjançant l'assaig β -galactosidasa semiquantitatiu.

1.3 Producció de transfectants estables pel 3BP2

Tant el CD244 com el 3BP2 s'expressen, de manera endògena, en les cèl·lules NK (Jevremovic, et al.,2001; Nakajima, et al.,1999), per tant es va estudiar la interacció

entre el CD244 i el 3BP2 en la línia de NK humanes anomenada YT. Existeixen anticossos monoclonals contra el CD244; un de comercial (C1.7, IgG1) i un que es va produir al nostre laboratori (clon 69, IgG1). Però degut a que comercialment no existeixen anticossos contra el 3BP2, es va optar per produir proteïnes de fusió del 3BP2 *full length* i del clon 41a del 3BP2 en pauta de lectura amb la proteïna verda fluorescent (EGFP), en el vector pEGFP-N3. Degut a que existeixen anticossos comercial contra l'EGFP, es pot determinar l'expressió del 3BP2 mitjançant tècniques bioquímiques. Les construccions reben el nom de 3BP2-EGFP i SH2-3BP2, corresponent respectivament al 3BP2 *full length* i al clon 41a. La figura 4 mostra el patró de distribució, marcadament diferent, de les dues construccions en cèl·lules COS. La construcció SH2-EGFP no presenta les agregacions característiques del 3BP2 *full length*, això és degut a que no té el domini PH responsable de l'associació de la molècules amb regions més insolubles de la cèl·lula (membrana i citoesquelet) (Deckert, et al.,1998).

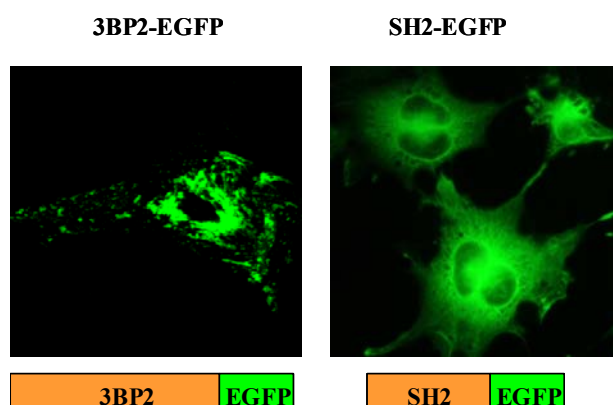


Figura 4. Perfil d'expressió del 3BP2-EGFP i 3BP2-SH2-EGFP en COS. Cèl·lules COS van ser transfectades amb les construccions 3BP2-EGFP i SH2-EGFP. 48 hores després de la transfecció, es van agafar imatges amb el microscopi de fluorescència confocal en el canal verd.

Es van produir transfectants estables policlonals pel 3BP2-EGFP i 3BP2-SH2-EGFP en la línia YT, anomenades 3BP2-YT i SH2-YT respectivament. Les expressions es van enriquir mitjançant citometria de *sorting*. En la figura 5 es presenta l'expressió del 3BP2 i 3BP2-SH2 en els transfectants corresponents.

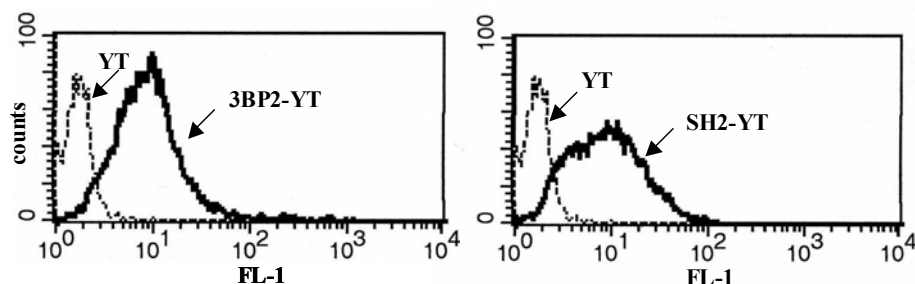


Figura 5. Nivells d'expressió del 3BP2-EGFP i 3BP2-SH2-EGFP en YT. L'expressió del 3BP2-EGFP i 3BP2-SH2-EGFP en els transfectants produïts comparada amb les YT parentals, s'analitza mitjançant citometria en el canal de fluorescència FL-1 que capta l'emissió de l'EGFP.

També es van controlar els nivells de CD244 en tots els transfectants. La figura 6 demostra com l'expressió del CD244 dels transfectants 3BP2-YT i SH2-YT és molt semblant a la de les YT parentals.

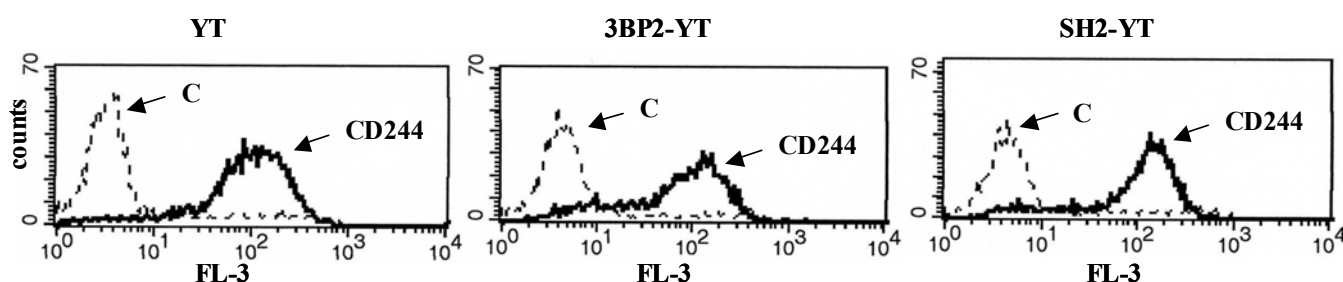


Figura 6. Nivells d'expressió del CD244 endogen en les cèl·lules YT, 3BP2-YT i SH2-YT. Aquestes tres línies es van marcar amb anticòs contra CD244, seguit d'un secundari biotinilat i streptavidina-CyChrome. L'anàlisi es fa en el canal FL-3 del citòmetre per evitar interferències amb la FL-1 de l'emissió de l'EGFP.

2. Característiques de la Interacció del CD244 amb el 3BP2

2.1 El CD244 recluta el 3BP2 en cèl·lules humanes NK, YT

Per tal de verificar la interacció dependent de fosforilació entre el CD244 i el 3BP2, es va portar a terme una immunoprecipitació en les cèl·lules YT parentals i 3BP2-YT. En aquest experiment també es va determinar si SAP era capaç de coprecipitar amb el CD244 i el 3BP2, fet que indicaria que la sobreexpressió del 3BP2 no està desplaçant

SAP del receptor. SAP és una molècula que s'uneix en condicions de fosforilació al receptor i s'ha descrit que la seva presència i funció és essencial per la correcta activació via el CD244 durant l'activitat de la cèl·lula NK (Parolini, et al.,2000; Tangye, et al.,1999). Després del tractament amb pervanadat, s'immunoprecipitaren les YT i les 3BP2-YT amb l'anticòs contra el CD244 i els productes de la immunoprecipitació es van sotmetre a anàlisi per Western-Blot. La figura 7 mostra com el CD244, el 3BP2-EGFP i SAP coprecipiten en les cèl·lules 3BP2-YT. En canvi, en les cèl·lules YT parentals, al no poder detectar el 3BP2 endogen (ja que treballem amb l'anticòs contra l'EGFP que detecta només el 3BP2-EGFP sobreexpressat) només observem el CD244 i SAP.

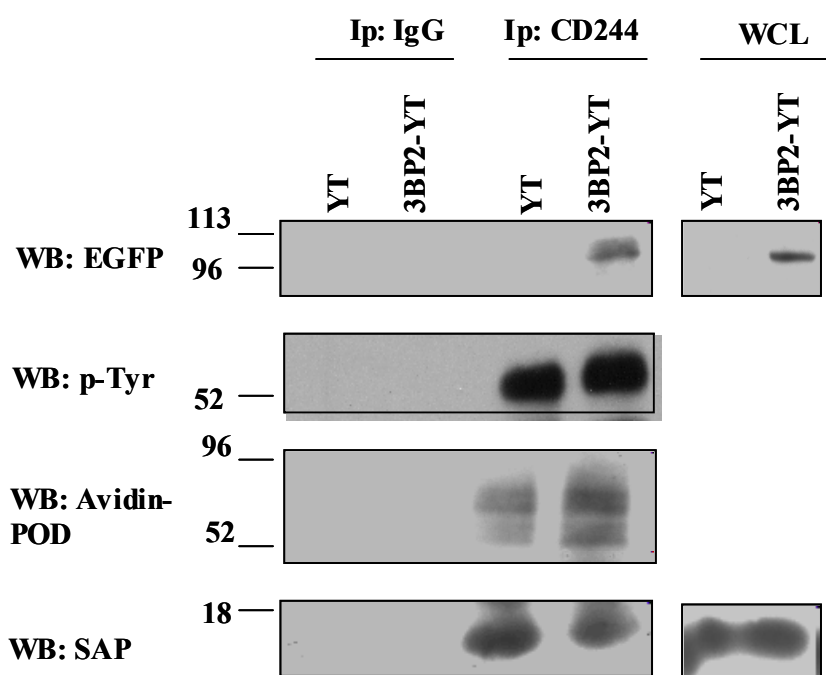


Figura 7. El CD244 coprecipita amb el 3BP2 i SAP en cèl·lules YT. 1×10^8 de cada tipus cel·lular (YT i 3BP2-YT) van ser biotinitades, activades amb pervanadat $100 \mu\text{M}$ durant 10 minuts a 37°C i lisades. La immunoprecipitació es va fer amb una IgG_1 com a control isotípic i amb l'anticòs contra el CD244. Es va córrer un gel SDS-PAGE al 12% i es va fer la transferència. Les membranes van ser incubades amb anticossos contra tirosines fosforilades p-Tyr (per observar grau el de fosforilació del CD244), contra l'EGFP (per detectar el 3BP2), contra SAP i amb Avidina-POD (per detectar el CD244 biotinitat).

2.2 El 3BP2 i la família d'adaptadors SAP no competeixen pel mateix motiu a la cua citosòlica del CD244

2.2.1 SAP

En l'experiment de coprecipitació (figura 7) a l'immunoprecipitar amb l'anticòs contra el CD244, no s'exclou que es puguin formar dos complexos independents CD244-3BP2 i CD244-SAP o un complex format per les tres molècules CD244-(3BP2 i SAP). Per diferenciar entre ambdues situacions es va passar a mapar el motiu a la regió citoplasmàtica del CD244 responsable de reclutar el 3BP2. El domini SH2 del 3BP2 s'ha descrit que té preferència per les tirosines fosforilades dins un consens de Y-E/M/V-N/V/I-X (Songyang, et al.,1994); la tirosina Y337 en la cua citosòlica del CD244 podria ser un motiu pel 3BP2. Per tant, es va fer mutagènesi dirigida de la Y337 i va ser substituïda per una fenilalanina. En la cua citosòlica del CD244, mostrada en la figura 8, apareixen quatre motius ITSM, tres dels quals entren en consens per SAP (i EAT-2): T-V/I-Y-X -X-V/I (Sayos, et al.,2000). Tal i com s'observa en aquesta figura, la tirosina 337 està englobada també dins un motiu per SAP.

Mitjançant assaig β -galactosidasa en llevats es va determinar si aquest motiu era important per reclutar el 3BP2. La mutació a fenilalanina de la tirosina 337 (Y337F) afecta la interacció amb el 3BP2, però no modifica la capacitat d'interaccionar amb SAP que es manté similar a la del CD244 salvatge.

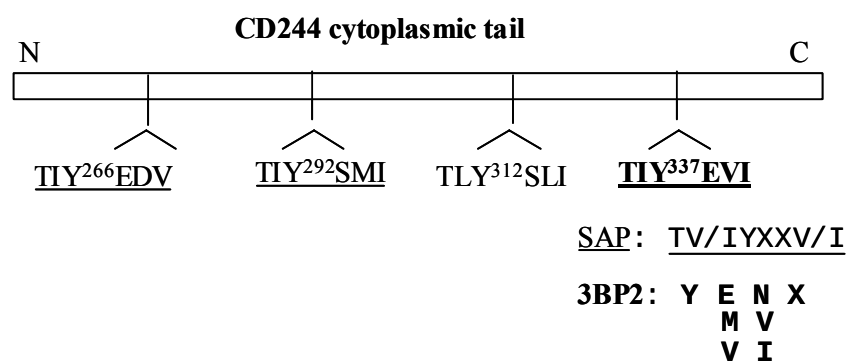


Figura 8. Motius per SAP i 3BP2 en el domini citosòlic del CD244. Motius per SAP (subratllats) i pel 3BP2 (en negreta) en la cua citosòlica del CD244.

Tal i com s'observa en la figura 9, la tirosina 337 és crítica pel reclutament del 3BP2, però no pel de SAP. Això suggereix que el CD244, 3BP2 i SAP podrien formar un complex trimolecular.

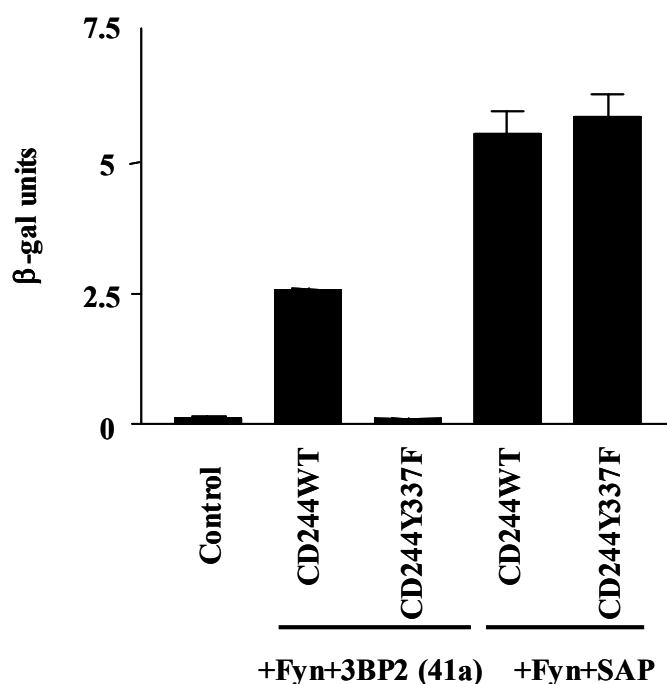


Figura 9. Mapatge en llevats del motiu d'interacció del 3BP2 en la tirosina 337 de la cua del CD244. Els llevats es van cotransformar amb el CD244 salvatge o CD244Y337F amb el clon 41a o SAP en condicions de Fyn actiu. Es va determinar la interacció mitjançant l'assaig d'activitat β -galactosidasa semiquantitatiu en llevats.

2.2.2 EAT-2

També es va determinar si la tirosina Y337 era el motiu d'interacció per EAT-2. EAT-2 interacciona només en condicions de fosforilació amb el CD244 (Morra, et al.,2001c). En ratolins, EAT-2 s'ha relacionat amb la inhibició de l'activitat de la cèl·lula NK via el CD244 (Roncagalli, et al.,2005). En aquest cas, el mapatge es va desenvolupar en cèl·lules COS transfectades amb el CD244 salvatge o CD244_{Y337F} juntament amb EAT-2 clonat amb pauta de lectura amb Flag, epítip contra el qual existeix un anticòs. En la figura 10 es presenta el mapatge on s'observa que la tirosina Y337 del CD244 no és el motiu d'unió per EAT-2, ja que la substitució d'aquesta tirosina per una fenilalanina no

condiciona l'associació de l'adaptador amb el receptor. En aquest experiment la transfecció o immunoprecipitació del CD244 en condicions de no fosforilació va ser molt superior a quan es tractar amb el pervanadat. Tot i així sense pervanadat són capaços de detectar interacció entre el CD244 i EAT-2. Això es deu a que la cotransfecció de CD244 i EAT-2 és suficient per induir fosforilació del receptor i associació d'EAT-2 (Morra, et al.,2001c). Probablement EAT-2 recluta alguna cinasa de la família Src en aquest tipus cel·lular (Calpe, et al.,2006). En les cèl·lules no transfectades apareix una banda inespecífica que quasi coincideix amb el CD244.

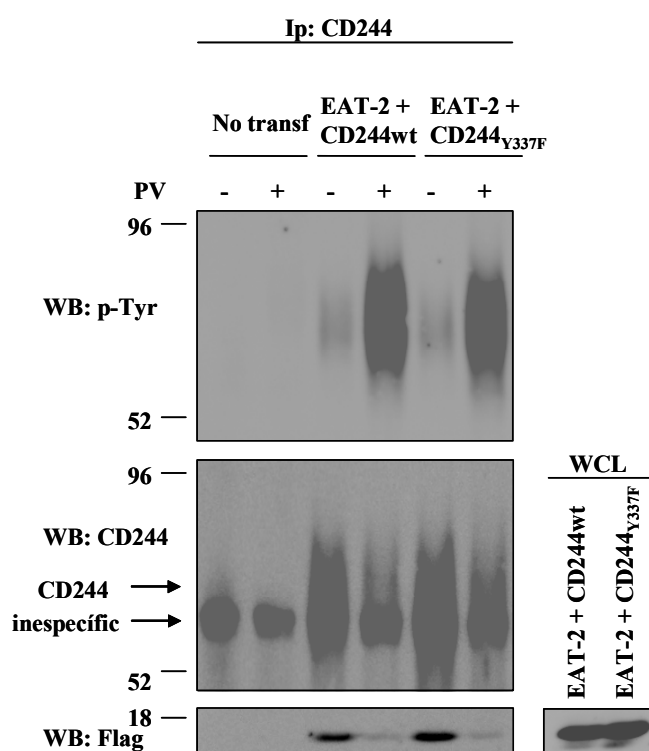


Figura 10. La tirosina Y337 en el CD244 no és el lloc d'unió per EAT-2. Cèl·lules COS es van transfectar amb el CD244 salvatge o CD244Y337F juntament amb EAT-2 clonat amb pauta de lectura amb Flag. 48 hores després, les cèl·lules es van activar amb 100µM de pervanadat durant 10 minuts a 37°C, lisar, immunoprecipitar amb un anticòs contra el CD244, es va fer el gel SDS-PAGE al 10% i la transferència. La membrana es va incubar amb els anticossos contra tirosines fosforilades, anti-CD244 i anti-flag.

2.3 Producció d'un anticòs monoclonal contra el 3BP2

Degut a que comercialment no existeix un anticòs contra el 3BP2, es va decidir produir un anticòs monoclonal contra el 3BP2 humà per tal de detectar l'expressió la proteïna endògena de la cèl·lula NK primària de sang perifèrica. Aquesta estratègia es va abordar immunitzant ratolins Balb/c amb el pèptid H-KHGLPDVGLAAEDSKRDPLC-NH₂, que en la seqüència aminoacídica del 3BP2 (figura 1) es localitza des de la posició 241 a la 260, per tant també pot detectar el clon 41 a del 3BP2. De la fusió, van créixer 660 clons que van ser cribats mitjançant la tècnica de l'ELISA, en la què s'analitzava la capacitat de l'anticòs en el sobrenedant, per reconèixer el pèptid del 3BP2. 105 clons van resultar ser positius en aquest primer cribatge. Seguidament es va fer un anàlisi per citometria en la què s'observava la capacitat de l'anticòs per reconèixer el 3BP2 de cèl·lules Jurkat fixades i permeablitzades. Només 5 clons van ser clarament positius. Es van passar com a mínim dues rondes de subclonatge per assegurar monoclonalitat i cada vegada, els clons que creixen s'analitzaven corresponentment. Finalment, per tal d'acabar de caracteritzar els anticossos es van portar a terme tècniques de Western-Blot i immunoprecipitació en cèl·lules COS transfectades amb el 3BP2-EGFP. L'anticòs que anomenem 256 va ser el que millor era capaç d'immunoprecipitar i detectar la proteïna nativa i desnaturalitzada tal i com es mostra en la figura 11. La banda que correspon al 3BP2-EGFP té un pes aproximat de $100 \text{ KDa} \cong 70 \text{ KDa del 3BP2} + 30 \text{ KDa de l'EGFP}$. Les bandes addicionals deuen ser subproductes de degradació.

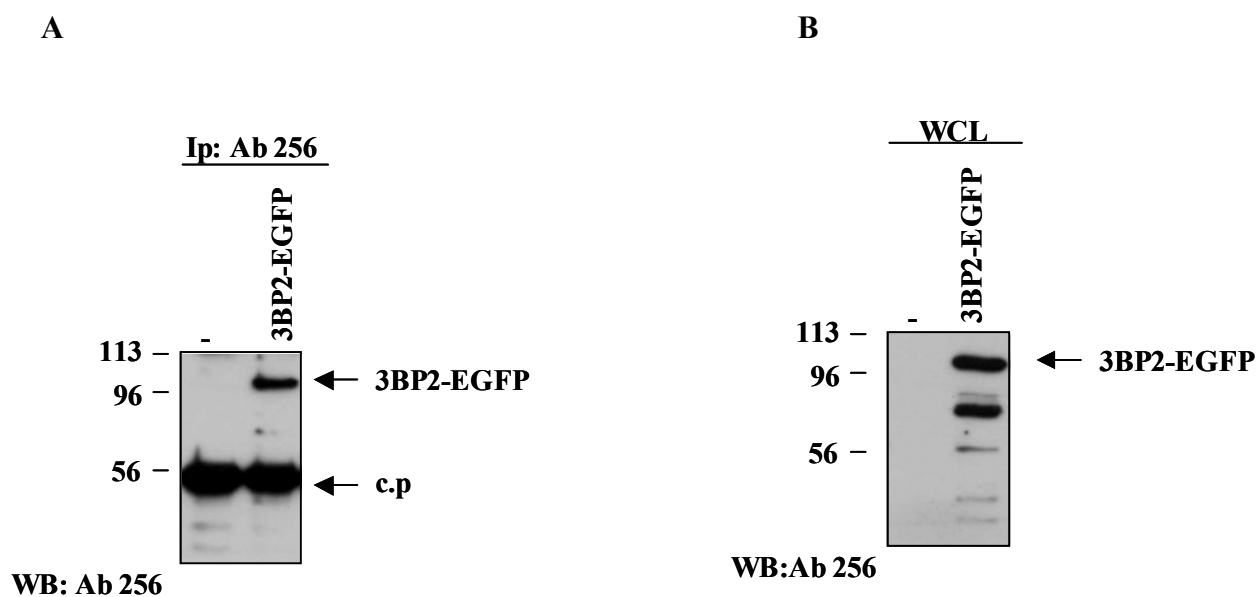


Figura 11. Caracterització per Western-Blot i immunoprecipitació de l'anticòs 256 contra el 3BP2. Cèl·lules COS es van transfectar o no amb la construcció 3BP2-EGFP. 48 hores després es van lissar i immunoprecipitar amb l'anticòs 256. Es va córrer el gel d'electroforesi SDS-PAGE al 10%, es va fer la transferència i la membrana, s'incubà amb l'anticòs 256 per detectar banda immunoprecipitada (A) i banda en les lisats totals (B). C.p: Cadena pesada de les immunoglobulines

Aquest anticòs també s'ha utilitzat per confirmar que els nivells endògens de 3BP2 en les cèl·lules YT parentals, 3BP2-YT i SH2-YT es mantenen similars (en la figura 12).

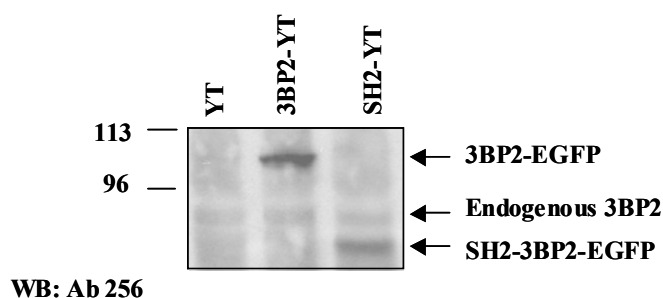
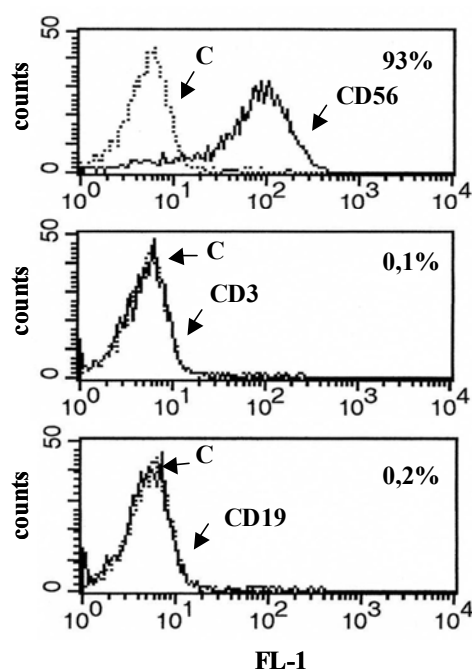


Figura 12. Nivells endògens del 3BP2 en YT, 3BP2-YT i SH2-YT. 10^6 cèl·lules de cada tipus es van lissar, es va córrer el gel d'electroforesi SDS-PAGE al 10%, es va fer la transferència i la membrana, incubar amb l'anticòs 256.

2.4 Interacció entre el CD244 i 3BP2 en NK primàries

Es va determinar la interacció entre el CD244 i el 3BP2 endògens en NK humanes primàries de limfòcits de sang perifèrica (PBLs). Les cèl·lules NK, obtingudes a partir de PBLs tal i com es descriu en la secció de material i mètodes, es sotmeten a un anàlisi per citometria per tal de coneixen la puresa mitjançant el marcador d'NK, CD56. La població obtinguda ha de ser CD56 positiva i CD3 (marcador de limfòcits T) i CD19 (marcador de limfòcits B) negativa (figura 13 A). En aquestes mateixes cèl·lules es va observar que el CD244 coprecipita amb el 3BP2 endogen de la cèl·lula (usant l'anticòs 256) després del tractament amb pervanadat (figura 13 B). Aquesta figura també ens permet observar que, en cèl·lules NK primàries, el 3BP2 endogen és molt més fàcil de detectar que en la línia cel·lular YT.

A



B

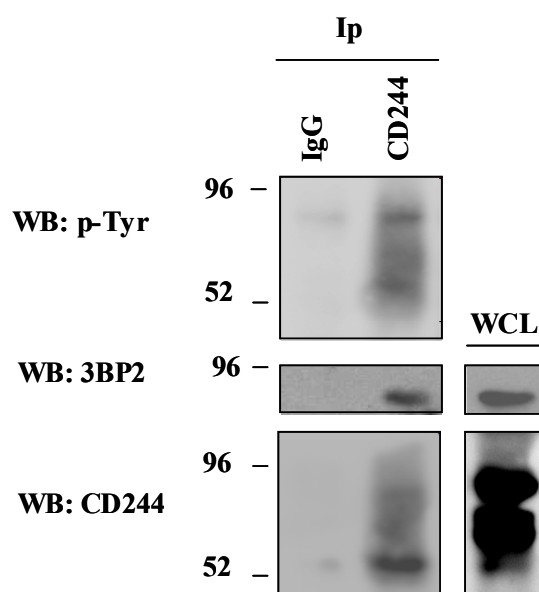


Figura 13. El CD244 interacciona amb el 3BP2 en NK primàries. (A) Anàlisi de citometria de la població de NK primàries usant anticossos contra el CD56, CD3 i CD19 conjugats a FITC directament. (B) Un total de 1×10^8 cèl·lules NK primàries van ser activades amb $100 \mu\text{M}$ de pervanadat 10 minuts a 37°C i posteriorment, lisades. La immunoprecipitació es va portar a terme amb una IgG control o l'anticòs contra el CD244. Les mostres es van córrer un gel SDS-PAGE al 10% i es va fer la transferència. La membrana de nitrocel·lulosa es va incubar amb anticòs contra tirosines fosforilades, contra el CD244 endogen i contra el 3BP2 endogen (anticòs 256).

2.5 Distribució subcel·lular del CD244 i 3BP2

Mitjançant tècniques de microscopia confocal es van obtenir imatges de la distribució i localització d'ambdues proteïnes en cèl·lules COS i YT.

2.5.1 El CD244 i el 3BP2 col·localitzen en cèl·lules COS

La interacció dependent de fosforilació entre ambdues molècules va ser observada en transfectants transitoris del CD244 i 3BP2-EGFP en absència o presència de Fyn, en cèl·lules COS. Tal i com s'observa en les imatges de la figura 14, només en presència de Fyn hi ha col·localització d'ambdues molècules. El 3BP2 deixa de localitzar-se al citoplasma, per situar-se a la membrana col·localitzant amb el CD244.

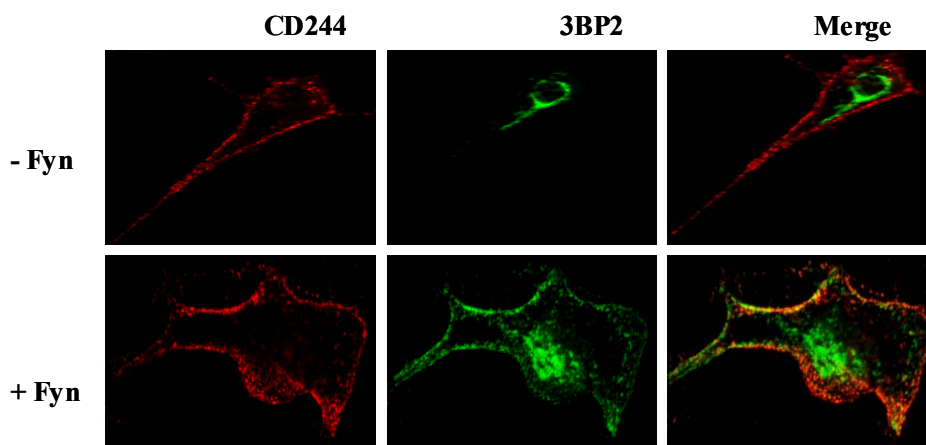


Figura 14. Col·localització del CD244 i 3BP2 en cèl·lules COS quan Fyn és present. Cèl·lules COS van ser transfectades amb el CD244 i el 3BP2-EGFP, amb o sense Fyn. 48 hores després de la transfecció, es va fer un marcatge del CD244 amb anti-mouse-biotinilat seguit d'Avidina-Cy3. En vermell i verd apareixen, respectivament, el CD244 i el 3BP2. La imatge del merge és la fluorescència solapada d'ambdues anteriors. Són imatges representatives del que s'observa en cada cas.

2.5.2 El CD244 i el 3BP2 col·localitzen en cèl·lules YT

Experiments de *co-capping* (o col·localització), es van portar a terme per determinar la distribució del CD244 i del 3BP2 durant l'activació del CD244 amb anticossos específics, en les cèl·lules 3BP2-YT. En condicions basals, el CD244 està bàsicament

localitzat de forma homogènia a la membrana, en canvi, el 3BP2 es troba uniformament distribuït entre el citosol i una mica a la membrana. Després de la lligació del CD244 amb anticossos, el 3BP2 i el receptor apareixen col·localitzant a la membrana en punts localitzats (figura 15).

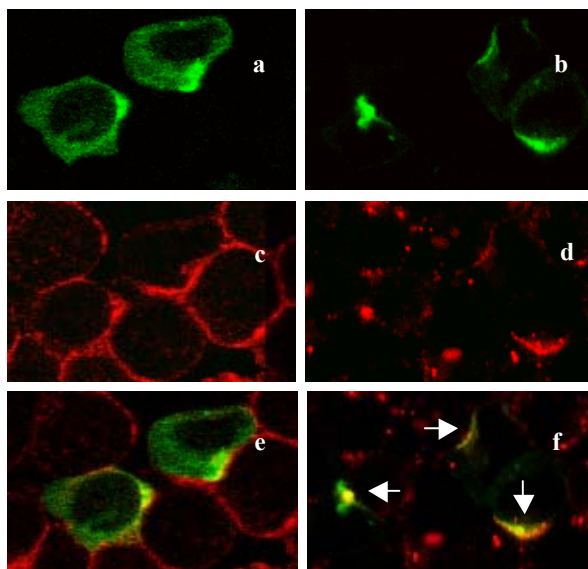


Figura 15. Col·localització del CD244 i 3BP2 en cèl·lules 3BP2-YT durant l'activació del CD244. Cèl·lules 3BP2-YT van ser incubades amb anti-CD244 més anti-mouse conjugat a Cy3 a 4°C (a, c, e) o 37°C (b, d, f) per tal d'induir *co-capping*. El 3BP2 i el CD244 es mostren per separat en verd (a, b) i vermell (c, d) respectivament, el merge (fluorescència solapada) es mostra en les imatges e, f.

2.6 La interacció entre el 3BP2 i el CD244 no es manté en models murins

En murins existeixen dues isoformes del CD244 que varien en la longitud de la seva regió intracel·lular (Schatzle, et al.,1999). La isoforma murina llarga i el CD244 humà tenen una alta homologia (66%) i ambdues presenten els quatre motius ITSM (Tangye, et al.,1999). Per tant, un experiment interessant era determinar si la interacció entre el CD244 i el 3BP2 es conservava en murins. Per abordar aquest aspecte es va fer ús de la tècnica del triple híbrid on es va determinar si ambdues molècules interaccionaven en condicions en les què la cinasa Fyn és activa, ja que aquesta interacció tal i com hem mostrat el la figura 2, és dependent de fosforilació. Treballem amb el clon 41a del 3BP2 humà ja que l'homologia d'aquesta seqüència, entre les espècies humanes i murines, és

superior al 80%. Pel què fa el CD244, treballem amb la isoforma murina llarga. Com a control positiu, es va utilitzar la interacció prèviament descrita, en cèl·lules de ratolins, entre SAP i el CD244 (Roncagalli, et al.,2005). L'assaig β -galactosidasa presentat en la figura 16 indica que en murins, la isoforma llarga del CD244 i el domini SH2 del 3BP2 no interaccionen directament.

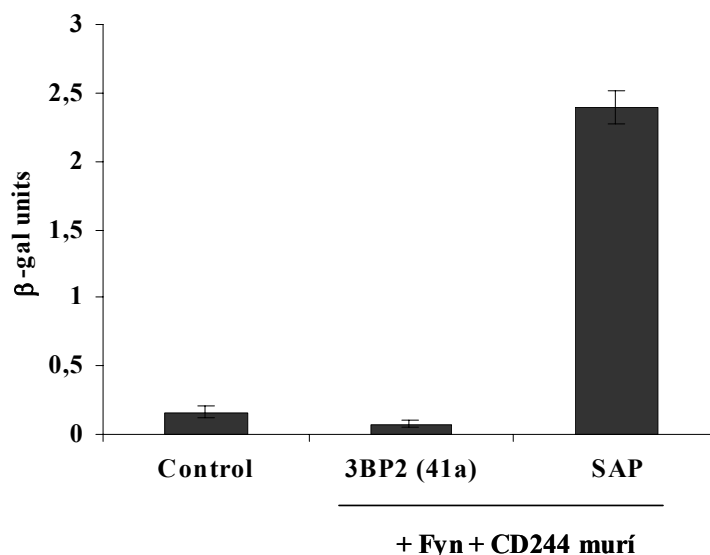


Figura 16. El 3BP2 no interacciona amb el CD244 murí. Els llevats van ser cotransformats amb el 3BP2 (41a) o SAP junt amb el CD244 murí (pBridge amb Fyn actiu) o amb els vectors buits com a control. Es va fer l'assaig β -galactosidasa semiquantitatiu d'interacció entre les molècules adaptadores i la cua citosòlica del receptor.

3. Dissecció de les vies d'activació desencadenades pel CD244 i 3BP2

A través de diverses tècniques i en diferents tipus cel·lulars, hem demostrat i mapat l'existència d'una interacció directa, en humans, entre el CD244 i el 3BP2. El següent pas era doncs, conèixer les vies desencadenades pel CD244, en les què el 3BP2 hi participa activament. Determinar esdeveniments proximals i distals a la membrana; fosforilacions, transduccions de senyals i repercussions fisiològiques, derivades de la interacció entre el CD244 i 3BP2.

3.1 La lligació del CD244 indueix la fosforilació del 3BP2

La fosforilació del CD244 és l'esdeveniment més proximal i immediat tot just després de l'activació del receptor amb l'anticòs (figura 17). Aquesta fosforilació del receptor va associada també, a la ràpida fosforilació del 3BP2. Per tant l'activació del CD244 implica l'activació del 3BP2 per fosforilació (figura 18)

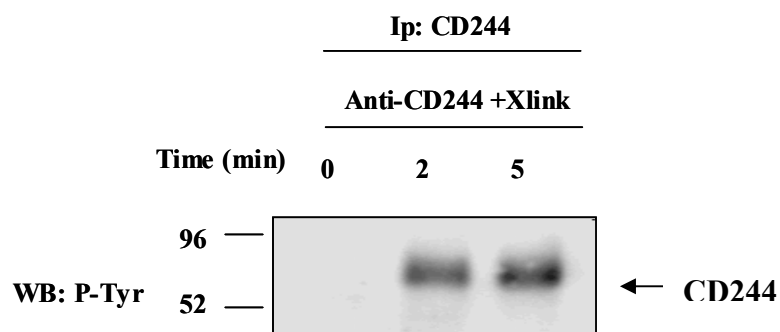


Figura 17. Cinètica de fosforilació del CD244. 1×10^8 cèl·lules 3BP2-YT es van activar amb anti-CD244 a 5 $\mu\text{g/ml}$ més el *cross-linker* (anticòs *sheep-anti-mouse*) a 10 $\mu\text{g/ml}$ durant el temps indicat a 37°C. Els lisats es van immunoprecipitar amb anti-CD244, es va córrer un gel SDS-PAGE al 10% i es va fer la transferència a una membrana. Es va determinar el grau de fosforilació del CD244 amb un anticòs contra tirosines fosforilades.

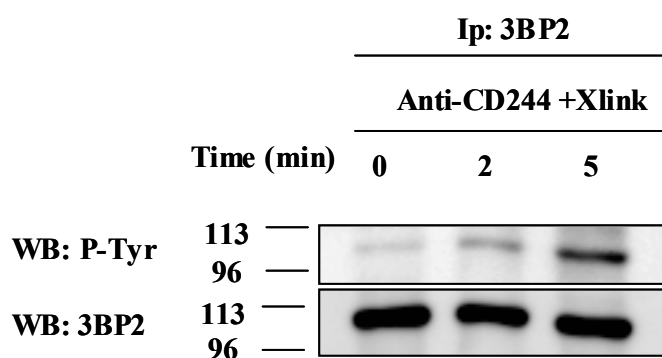


Figura 18. Cinètica de fosforilació del 3BP2. 1×10^8 cèl·lules 3BP2-YT es van activar amb anti-CD244 a 5 $\mu\text{g/ml}$ més el *cross-linker* (anticòs *sheep-anti-mouse*) a 10 $\mu\text{g/ml}$ durant el temps indicat a 37°C. Els lisats es van immunoprecipitar amb anti-3BP2 (anticòs 256) i es va córrer un gel SDS-PAGE al 10% i es va fer la transferència a una membrana. Es va mirar el grau de fosforilació i els nivells del 3BP2 amb l'anticòs contra tirosines fosforilades i amb l'anticòs 256, respectivament.

3.2 El 3BP2 recluta Vav després de l'activació del CD244

L'anàlisi dels esdeveniments més proximals a la membrana han revelat que el 3BP2 es fosforila ràpidament després de l'activació del CD244. El següent pas és conèixer quines molècules participen més distalment en les senyals mediades pel CD244 en el context d'interacció amb el 3BP2. S'ha descrit que la tirosina Y183 fosforilada del 3BP2, interacciona amb Vav, fenomen important per la correcte activitat de la cèl·lula NK (Jevremovic, et al.,2001).

Vav és una família de tres proteïnes; Vav-1 és específic del teixit hematopoètic, en canvi, Vav-2 i Vav-3 són més ubics. Es tracta d'un protooncogen amb activitat de factor bescanviador de nucleòtids de guanina (GEF) per la família de GTPases petites: Rho, Rac, Cdc42 i Ras; les activa bescanviant el nucleòtid de GDP que porten associat per un de GTP (Hornstein, et al.,2004; Reynolds, et al.,2004; Tybulewicz,2005). Està compost per un domini d'activitat GEF i de diversos dominis modulars d'interacció amb proteïnes i de regulació de la seva pròpia activitat. La funció de Vav està relacionada amb processos molt diversos: moviments de calci, activació de les vies d'ERK, reorganització del citoesquelet, transcripció gènica, diferenciació cel·lular, citotoxicitat etc. (Tybulewicz,2005).

Per tant, es va plantejar determinar, en el sistema 3BP2-YT, si la interacció entre el 3BP2 i Vav es donava després de la lligació del CD244 amb anticossos específics. Tal i com es mostra en la figura 19, l'activació del CD244 comporta el reclutament de Vav per part del 3BP2 fosforilat.

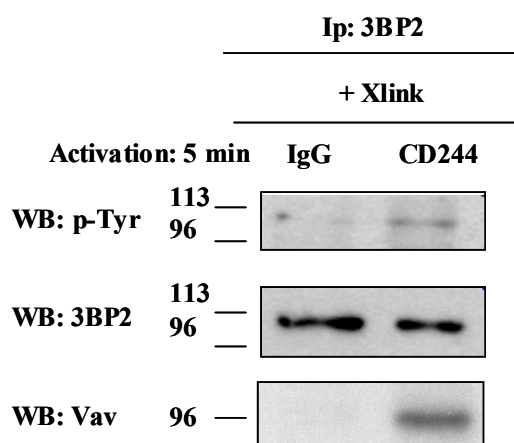


Figura 19. L'activació del CD244 comporta el reclutament de Vav per part del 3BP2. 1×10^8 cèl·lules 3BP2-YT van ser activades amb una IgG (com a control isotípic) o amb l'anti-CD244 (5 $\mu\text{g/ml}$) juntament amb el *cross-linker* (10 $\mu\text{g/ml}$) durant 5 minuts a 37°C. Els lisats es van immunoprecipitar amb l'anti-3BP2, es va córrer un gel SDS-PAGE al 10% i es va fer la transferència a una membrana. En la figura apareixen els blots corresponents a les tirosines fosforilades del 3BP2, al 3BP2 i a Vav-1.

3.3 El CD244 activa les vies d'ERK i p38

Durant l'activació de la cèl·lula NK via CD244, s'ha descrit que s'incrementa la fosforilació i activitat de les cinases de serina i treonina p38 i ERK. L'activitat p38 està relacionada tant amb la citotoxicitat com amb la producció d'IFN γ , en canvi, la via d'ERK només intervé en el procés de la citotoxicitat (Chuang, et al.,2001).

Ens vàrem plantejar quina o quines d'aquestes dues vies estaria influenciada per la sobreexpressió del 3BP2 en les YT. L'activitat de la via p38 i ERK es mesura determinant el grau de fosforilació d'aquestes cinases.

3.3.1 El 3BP2 incrementa en temps i magnitud l'activació d'ERK

La sobreexpressió del 3BP2, influeix positivament la via d'ERK després de l'estímul amb anticossos contra CD244. El 3BP2 manté incrementada la fosforilació d'ERK durant més temps (figura 20) i, disminueix el llindar d'activació, ja que en front d'un estímul menor o igual, s'aconsegueix una major activació (figura 21).

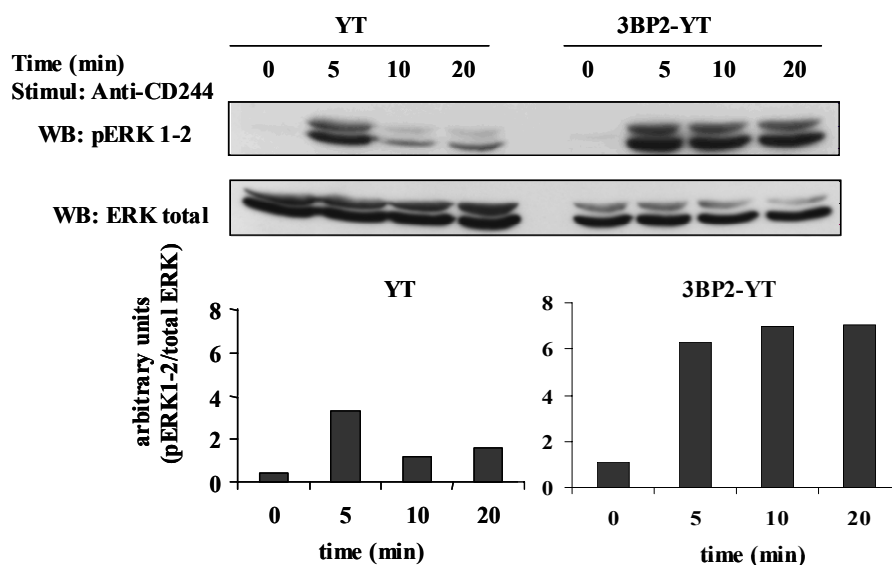


Figura 20. La sobreexpressió del 3BP2 permet una activitat mantinguda d'ERK després de l'activació del CD244. 10^6 cèl·lules per punt es van activar amb 5 $\mu\text{g/ml}$ d'anti-CD244 durant diferents temps. Els productes dels lisats es van córrer en un gel SDS-PAGE al 12%, es va fer la transferència i la membrana es va incubar amb l'anticòs contra l'ERK1-2 fosforilat i contra l'ERK total.

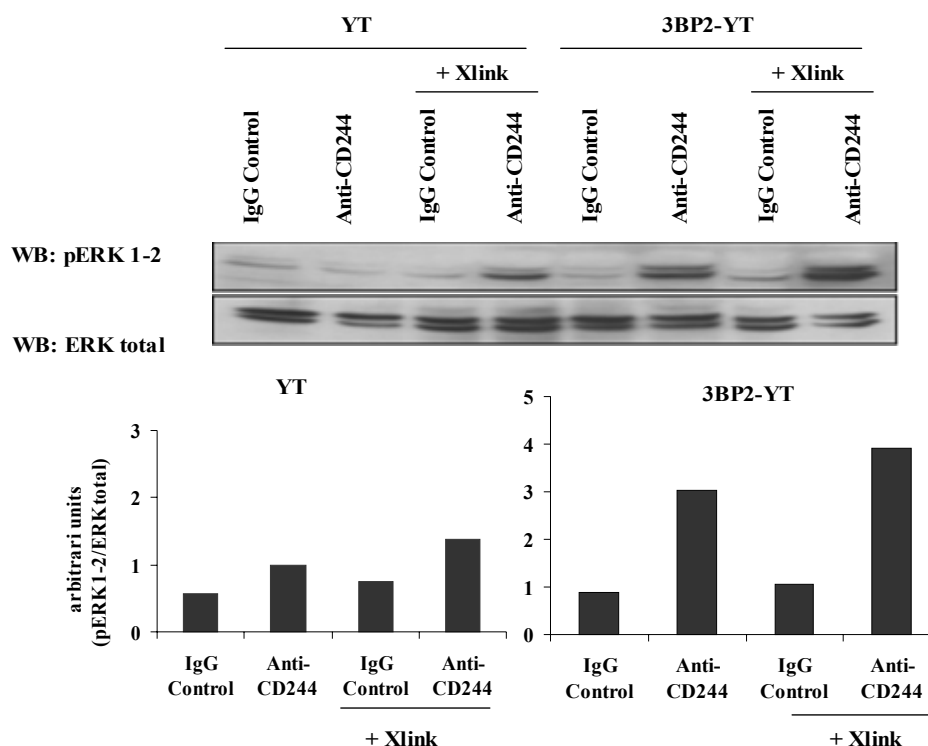


Figura 21. La sobreexpressió del 3BP2 disminueix el llindar d'activació del CD244. 10^6 cèl·lules per punt es van activar amb 5 $\mu\text{g/ml}$ d'estímuls (anti-CD244 i IgG control) i amb 10 $\mu\text{g/ml}$ de cross-linker on s'indica, durant 10 minuts. Els productes dels lisats es van córrer en un gel SDS-PAGE al 12%, es va fer la transferència i la membrana es va incubar amb l'anticòs contra l'ERK1-2 fosforilat i contra l'ERK total.

3.3.2 El 3BP2 no modifica la via de la p38

També es va assajar l'activitat de la p38 després de l'activació, en les cèl·lules YT i 3BP2-YT, del CD244 amb anticossos específics. A diferència del què s'observa per ERK, la sobreexpressió del 3BP2 no afecta l'activitat de la p38 (figura 22)

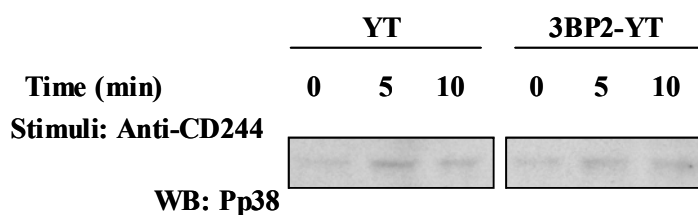


Figura 22. La sobreexpressió del 3BP2 no afecta la via p38 activada pel CD244. 10^6 cèl·lules per punt es van activar amb 5 $\mu\text{g/ml}$ d'anti-CD244 durant diferents temps. Els productes dels lisats es van córrer en un gel SDS-PAGE al 12%, es va fer la transferència i la membrana es va incubar amb l'anticòs contra la p38 fosforilada. La càrrega va ser prèviament corregida mesurant proteïna.

3.4 El CD244 promou la producció d'IFN γ

La resposta final de la cèl·lula NK activada via el CD244 és promoure tant la producció d'IFN γ com la lisi cel·lular (Chuang, et al.,2000). Vam comparar la producció de la citocina IFN γ via l'activació del CD244 amb l'anticòs C1.7 (comercial) i el 69 (produït al nostre laboratori) en les cèl·lules YT. L'experiment portat a terme presentat en la figura 23 va indicar que ambdós anticossos actuen de forma similar tot incrementat la producció d'IFN γ .

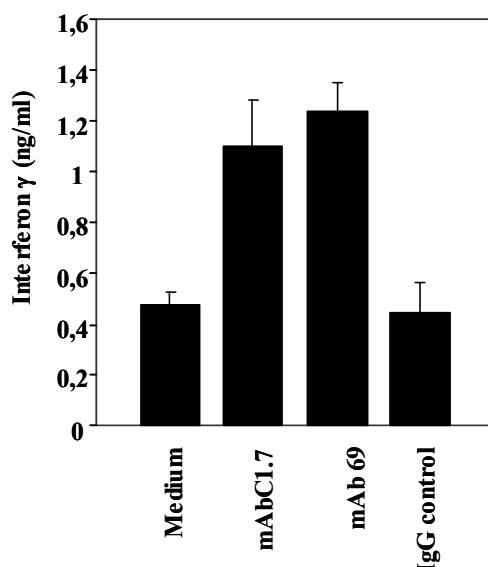


Figura 23. Producció d'IFN γ en les YT activant amb els anticossos C1.7 i 69. Es van sembrar 1×10^5 cèl·lules YT per pou, en una placa de 96 pous, junt amb 1×10^5 cèl·lules P815 (utilitzades com a *cross-linkers*). Els estímuls (mAb C1.7, mAb 69 i IgG control) es van afegir a 200 ng/ml. Es van incubar les cèl·lules 16h a 37°C i 5% CO₂, es van recollir els sobrenedats i es va mesurar l'IFN γ produït mitjançant la tècnica de l'ELISA.

3.4.1 La sobreexpressió del 3BP2 no afecta la producció d'IFN γ

Ja que el CD244 està activant l'alliberació de l'IFN γ en les YT, ens plantejarem conèixer el paper del 3BP2 en aquesta via. En limfòcit T i B la sobreexpressió del 3BP2 va acompanyada d'un augment en l'activitat del factor de transcripció NFAT; activador del promotor del gen de la IL-2 (Deckert, et al.,1998; Foucalt, et al.,2005; Zakaria, et al.,2004).

Es va portar a terme un experiment d'alliberació d'IFN γ via CD244 comparant les YT parentals amb les 3BP2-YT. Les dades obtingudes, mostrades en la figura 24, indiquen que la sobreexpressió del 3BP2 no va acompanyada d'un increment en els nivells d'IFN γ en resposta a l'activació del CD244 amb anticòs.

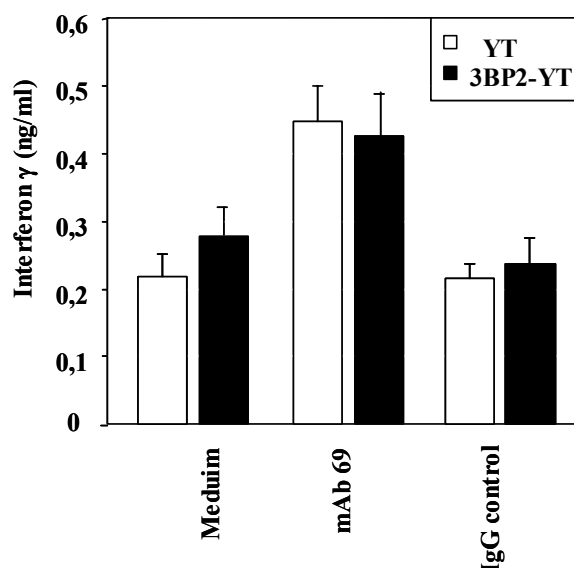


Figura 24. La secreció d'IFN γ no es veu incrementada per la sobreexpressió del 3BP2. Es van sembrar 1×10^5 cèl·lules YT o 3BP2-YT per pou, en una placa de 96 pous, junt amb 1×10^5 cèl·lules P815 (utilitzades com a *cross-linkers*). Els estímuls (mAb 69 i IgG control) es van afegir a 200 ng/ml. Es van incubar les cèl·lules 16h a 37°C i 5% CO₂, es van recollir els sobrenedant i es va mesurar l'IFN γ produït mitjançant la tècnica de l'ELISA.

3.5 Durant la senyalització via CD244, el 3BP2 incrementa la citotoxicitat cel·lular sense modificar la producció de l'IFN γ

3.5.1 La sobreexpressió del 3BP2 incrementa la citotoxicitat via CD244

Està descrit que l'activitat ERK és imprescindible per portar a terme la lisi mediada per la cèl·lula NK (Chiesa, et al.,2005). Per tant es va explorar si l'increment en la via d'ERK observada en les cèl·lules que sobreexpressen el 3BP2, després de la lligació del CD244 era concomitant amb un increment en la citotoxicitat mitjançada per la cèl·lula NK.

Per tal d'abordar aquest aspecte es van fer experiments de citotoxicitat. Cèl·lules YT, 3BP2-YT i SH2-YT es van posar en contacte amb cèl·lules dianes (P815), prèviament carregades amb el Cr⁵¹ i es va afegir l'anticòs contra el CD244. Les cèl·lules P815 són positives pels receptors Fc i per tant serviran també com a *cross-linkers* per l'anticòs (Nakajima, et al.,1999). El tractament amb l'anticòs contra el CD244 activa l'alliberació

dels grànuls citotòxics, que aleshores lisen les cèl·lules dianes, i conseqüentment alliberen el contingut de Cr^{51} . En l'experiment portat a terme es compara la capacitat lítica de les cèl·lules YT, 3BP2-YT i SH2-YT activades amb l'anticòs contra el CD244.

Es presenta en la figura 25 com la sobreexpressió del 3BP2 comporta, també, un increment en la citotoxicitat depenent d'anticòs (CD244) comparada amb la lisi de les YT parentals. Conseqüentment el dominant negatiu del 3BP2, sobreexpressat en les SH2-YT, provoca un decrement de la lisi mitjançada pel CD244.

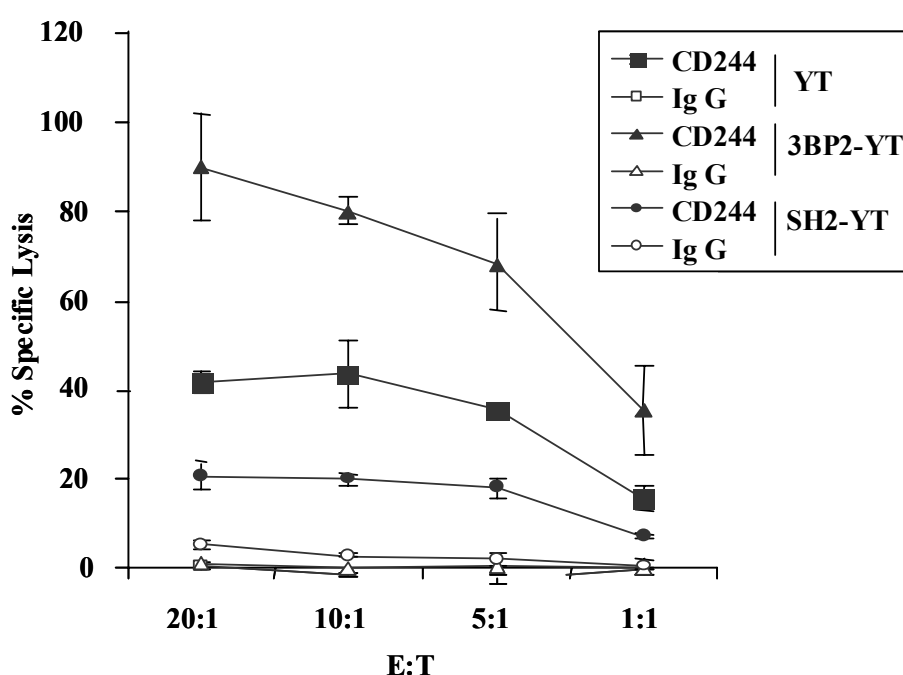


Figura 25. El 3BP2 incrementa la citotoxicitat de les YT via CD244. 10^4 cèl·lules dianes o target (T) P815 per pou, prèviament carregades amb el Cr^{51} es van posar en contacte amb diferents relacions numèriques de cèl·lules efectores (E) YT, 3BP2-YT i SH2-YT. E:T; 20:1, 10:1, 5:1, 1:1. Aquest contacte entre cèl·lula diana i cèl·lula efectora es va fer en presència de 200 ng/ml d'anti-CD244 o Ig G control. Es va incubar durant 3h a 37°C i 5% CO_2 , seguidament es van recollir sobrenedats i es va mesurar la radiació amb un comptador d'emissió gamma.

Al observar que la citotoxicitat portada a terme per les SH2-YT estava per sota de les YT parentals, es va voler determinar el grau de fosforilació de la via d'ERK, ja que tal i com s'ha comentat, la via d'ERK està en relació directe amb la lisi (Chuang, et al., 2001). La figura 26 posa de manifest com les cèl·lules SH2-YT que presenten menor

activitat lítica (figura 25), també presenten menor fosforilació d'ERK comparat amb les YT parentals. Aquesta disminució és encara més notable comparat amb les 3BP2-YT.

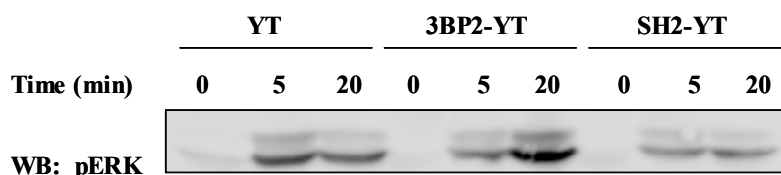


Figura 26. El dominant negatiu del 3BP2 presenta menor activitat d'ERK. 10^6 cèl·lules per punt es van activar amb 5 $\mu\text{g/ml}$ d'anti-CD244 durant diferents temps a 37°C . Els productes dels lisats es van córrer en un gel SDS-PAGE al 12%, es va fer la transferència i la membrana es va incubar amb l'anticòs contra l'ERK1-2 fosforilat. La càrrega va ser prèviament corregida mesurant proteïna.

3.5.2 El 3BP2 no afecta la producció d'IFN γ

Per tal de confirmar que el 3BP2 només està implicat en la via de la citotoxicitat de la cèl·lula NK activada pel CD244 i que no afecta la producció d'IFN γ que aquest receptor promou, es va determinar la producció d'aquesta citocina per part de les SH2-YT i es va comparar amb la de les YT i 3BP2-YT. Les SH2-YT, tot i bloquejar la lisi cel·lular, mantenen intacte l'alliberació de l'IFN γ amb nivells de producció de les YT i 3BP2-YT (figura 27).

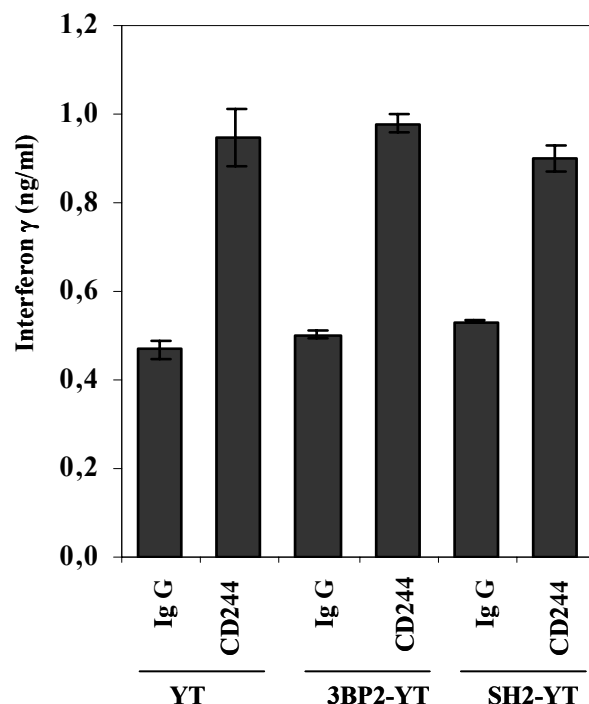


Figura 27. Ni la sobreexpressió del 3BP2 ni el dominant negatiu afecten la producció d'IFN γ en les YT activades amb el CD244. Es van sembrar 1×10^5 cèl·lules YT, 3BP2-YT o SH2-YT per pou, en una placa de 96 pous, junt amb 1×10^5 cèl·lules P815 (utilitzades com a *cross-linkers*). Els estímuls (anti-CD244 i IgG control) es van afegir a 200 ng/ml. Es va mantenir a l'incubador de cèl·lules durant 16h, es van recollir els sobrenedants i es va mesurar l'IFN γ produït mitjançant la tècnica de l'ELISA.

També es va analitzar l'activació de la p38 via CD244 entre les tres línies YT, 3BP2-YT i SH2-YT. La figura 28, mostra com l'activació d'aquesta cinasa es manté similar en les tres poblacions cel·lulars.

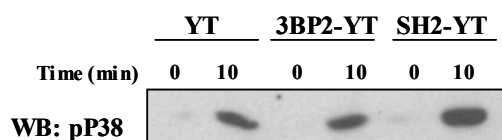


Figura 28. El 3BP2 no afecta l'activitat p38. 10^6 cèl·lules per punt es van activar amb 5 μ g/ml d'anti-CD244 0 i 10 minuts a 37°C. Els productes dels lisats es van córrer en un gel SDS-PAGE al 12%, es va fer la transferència i la membrana es va incubar amb l'anticòs contra la p38 fosforilada. La càrrega va ser prèviament corregida mesurant proteïna.

Per tant, durant la senyalització via CD244, el 3BP2 afecta i afavoreix específicament la via d'ERK i la citotoxicitat, sense modificar la p38 ni la producció de l'IFN γ .

3.6 El CD244 no interacciona directament amb la PI3K

La PI3K és una família d'enzims que catalitzen la fosforilació del grup 3-hidroxil de l'anell inositol dels fosfatidilinositols (PtdIns). La família de la PI3K està formada per tres classes I, II i III categoritzades en funció de la seva estructura, regulació i especificitat de substrat. La classe I és d'expressió en cèl·lules del sistema immunològic: es tracta d'un heterodímer compost per una subunitat catalítica (p110) i una reguladora (p85) que en modula l'activitat i la localització cel·lular. En situació basal, es troba en el citosol, però seguidament després de l'activació, és acostada a la membrana a través dels dominis SH2 presents en la seva subunitat reguladora, que reconeixen motiu tirosina fosforilats pY-X-X-M (Y és Tirosina, X qualsevol aminoàcid i M és Metionina) en receptors. L'activació de la PI3K requereix també d'interaccions addicionals amb les proteïnes G petites de la família Ras i Rac unides a GTP, localitzades a la membrana. En la membrana és on entra en contacte amb els seu substrat; converteix el PtdIns(4, 5)P₂ en PtdIns(3, 4, 5)P₃. Aquest metabòlit és el domini d'interacció pels dominis PH de les cinases de la família de Tec i Akt i també pel protooncogen Vav, que a l'interaccionar amb aquests fosfolípids canvien de conformació i es permet la seva activació també per fosforilació. A través de l'activació d'aquestes molècules, la PI3K està estretament relacionada, en les cèl·lules del sistema immune, amb moviments de calci, reorganització del citoesquelet, citotoxicitat, transcripció gènica, supervivència, etc. (Deane and Fruman,2004; Jiang, et al.,2000; Kharas and Fruman,2005).

En un treball realitzat per Aoukaty et al (Aoukaty and Tan,2002) es demostra el paper principal de la PI3K durant l'activació del CD244. Descriuen que la p85 s'associa amb el receptor just després de la seva activació; fenomen imprescindible per tal de que SAP interaccioni amb el receptor. Treballant amb un inhibidor de l'activitat PI3K (Wortmanina) conclouen que la fosforilació del CD244 es manté durant menys temps i que SAP no pot interaccionar amb el receptor. Finalment observen que l'activitat PI3K és rellevant per la citotoxicitat mitjançada pel CD244 en cèl·lules NK.

Ens vàrem plantejar determinar si l'associació entre la p85 i la regió citosòlica del CD244 tenia lloc d'una manera directe. Amb tal objectiu es va fer ús de la tècnica del triple híbrid en condicions on Fyn és actiu, ja que són interaccions dependents de fosforilació. Tal i com es mostra en la figura 29, la p85 no està interaccionant directament amb el CD244 humà ni murí.

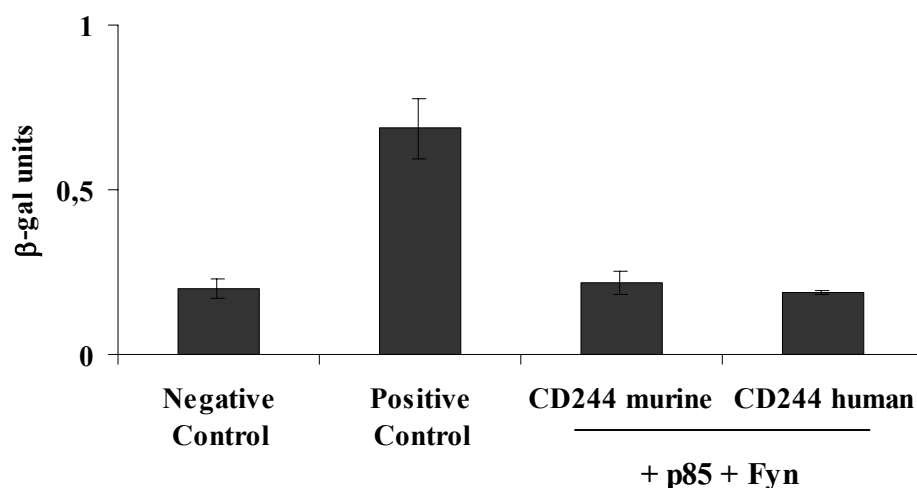


Figura 29. La p85 no interacciona directament amb el CD244 en llevats. Els llevats es cotransformen amb el CD244 humà o murí (amb Fyn actiu) juntament amb la p85. Com a control negatiu s'usen els vectors buits i com a control positiu el CD244 (amb Fyn actiu) i el 3BP2 (clon 41a). Es va realitzar l'assaig β-galactosidasa semiquantitatiu per determinar la interacció.

3.6.1 La sobreexpressió del 3BP2 resulta en una major fosforilació del CD244 i evita parcialment, la inhibició de la PI3K

Tot i que no existeix interacció directe entre el CD244 i la p85, ens vam plantejar seguir fent estudis amb la PI3K, ja que el paper d'aquesta molècula durant la resposta citotòxica de la cèl·lula NK està àmpliament descrita i també podria ser un mecanisme efector de la via CD244-3BP2. S'ha descrit que inhibidors de l'activitat PI3K bloquegen la lisi espontània i redirigida mitjançada per la cèl·lula NK (Aoukaty and Tan,2002; Chiesa, et al.,2005; Jiang, et al.,2000).

Per tant vàrem decidir tractar les cèl·lules YT i 3BP2-YT amb la wortmanina i determinar si la fosforilació del CD244 i el següent reclutament de SAP es veien alterades. Tal i com es mostra en la figura 30, la inhibició de l'activitat PI3K està afectant negativament tant la fosforilació del CD244 com el reclutament de SAP. D'altra banda la sobreexpressió del 3BP2 augmenta la fosforilació del CD244 i evita l'efecte inhibidor de la wortmanina sobre la fosforilació del receptor i reclutament de SAP.

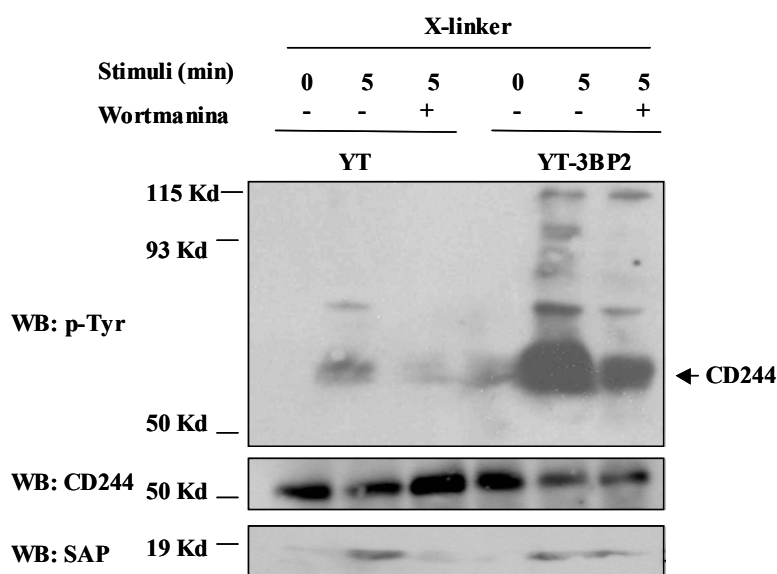


Figura 30. La sobreexpressió del 3BP2 evita parcialment l'efecte de la wortmanina sobre el CD244. 40x10⁶ cèl·lules YT i 3BP2-YT es van tractar amb la wortmanina a 100nM o amb el vehicle (RPMI) durant 30 min a 37°C. Seguidament es van incubar 1 min a 37°C amb el *cross-linker* sheep-anti-mouse (10 µg/ml) i a continuació es van activar amb o sense anti-CD244 (5 µg/ml) durant 5 min a 37°C. Les cèl·lules es van lisar, immunoprecipitar amb l'anti-CD244, es va córrer un gel SDS-PAGE al 10% i es va fer la transferència. En la figura apareixen els blots corresponents a la fosforilació en tirosines, al CD244 i a SAP.

3.6.2 El 3BP2 augmenta la fosforilació d'Akt

L'activitat de la PI3K freqüentment es mesura determinant el grau de fosforilació de l'Akt, també coneguda com PKB (proteïna cinasa B) (Jiang, et al.,2000). La unió del domini PH d'Akt als PIP3 generats per acció de la PI3K, li provoca un canvi conformacional durant el qual, quedaran exposats els motius fosforilables per part de la

PDK-1 (cinasa 1 dependent de fosfoinositol), responsables de l'activació d'Akt. Akt és una cinasa de serines i treonines que actua sobre diferents molècules efectores i factors de transcripció, intervenint en processos de reorganització del citoesquelet, diferenciació, cicle cel·lular, apoptosi, metabolisme, etc. (Kharas and Fruman, 2005).

Amb l'objectiu de determinar si la via de la PI3K estava sent afavorida pel 3BP2, es va portar a terme un activació, amb l'anticòs contra el CD244, en les YT parentals i 3BP2-YT i es van comparar els nivells d'Akt fosforilats. Com es comprova en la figura 31, l'activació de la via d'Akt és molt pobre en les YT parentals, en canvi, en les cèl·lules que sobreexpressen l'adaptador 3BP2, l'activitat Akt és marcadament superior.

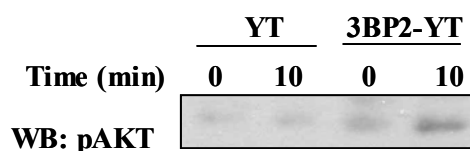


Figura 31. El 3BP2 afavoreix la fosforilació d'Akt. 10^6 cèl·lules per punt es van activar amb 5 µg/ml d'anti-CD244 0 i 10 minuts a 37°C. Els productes dels lisats es van córrer en un gel SDS-PAGE al 12%, es va fer la transferència i la membrana es va incubar amb l'anticòs contra l'Akt fosforilada. La càrrega va ser prèviament corregida mesurant proteïna.

3.7 El CD244 interacciona directament amb Csk

S'ha descrit que en humans el CD244 interacciona directament amb Csk, SHP-1, SHP-2 i SHIP en el tercer ITSM de la cua citosòlica del receptor. La sobreexpressió d'un CD244 amb aquest motiu mutat (canvi de la tirosina per una fenilalanina), provoca un increment de la citotoxicitat mediada per la cèl·lula NK (Eissmann, et al., 2005).

Csk és una cinasa que en situació basal es localitza a rafts tot interaccionant amb l'adaptador Cbp/PAG, a través d'una tirosina fosforilada en aquest modulador i el domini SH2 de Csk. En aquesta localització cel·lular, la cinasa Csk inhibeix les cinases de la família Src per fosforilació d'una tirosina reguladora negativa a l'extrem carboxi-terminal, que els provoca un replegament intramolecular amb el propi SH2. L'activació del TCR, comporta que la fosfatasa CD45 s'activi i aleshores Csk s'allibera de Cbp/PAG; per tant Csk s'allunya del seu substrat. Aquesta mateixa fosfatasa serà la

responsable de desinhibir les cinases Src responsables d'iniciar l'activació cel·lular per fosforilació del ITAMS (Koretzky and Myung,2001; Veillette, et al.,2002).

Ja que en murins, la isoforma llarga del CD244 (amb alta homologia amb el CD244 humà (Tangye, et al.,1999)) ha resultat ser un receptor inhibidor de la citotoxicitat (Lee, et al.,2004b), ens vàrem plantejar determinar si el CD244 murí podia interaccionar directament amb Csk. Tal i com es mostra en l'assaig de β -galactosidasa de la figura 32, tant en humans com en murins Csk és reclutat durant l'activació, al domini citosòlic del receptor.

Per tant, Csk seria un mecanisme inhibidor o terminador de l'activació d'aquest receptor, conservat entre ambdues espècies. SAP seria un mecanisme activador, també conservat en ambdues espècies. En canvi, el 3BP2 només actuaria positivament sobre el CD244 humà.

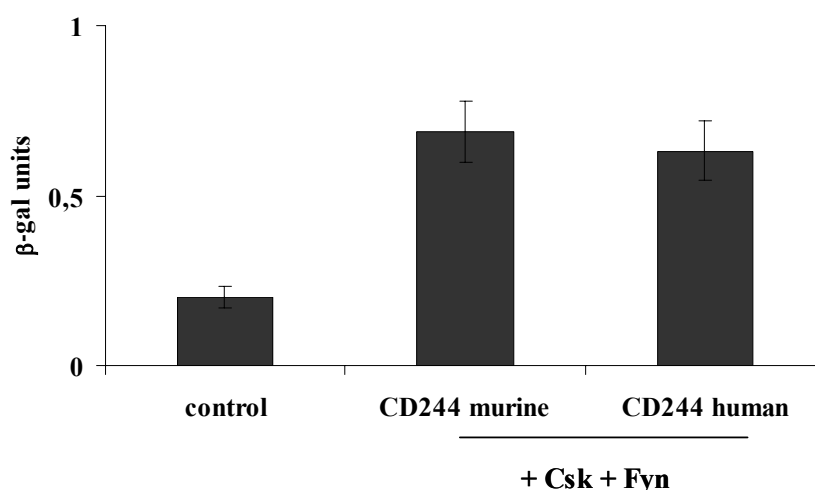


Figura 32. Csk interacciona amb el CD244 en llevats. Els llevats es van cotransformar amb el CD244 humà o murí (amb Fyn actiu) juntament amb Csk. Com a control negatiu s'usen els vectors buits. Es realitzà l'assaig β -galactosidasa semiquantitatiu per determinar la interacció.

4. Funció del CD244 i 3BP2 en els limfòcits CD8⁺

El CD244 s'expressa en els limfòcits T CD8⁺ de forma basal, però augmenta durant l'activació del TCR (Speiser, et al.,2001). Els limfòcits CD8⁺ són també cèl·lules citotòxiques, en les quals el CD244 també s'ha descrit que actua com a co-receptor estimulador de la seva activitat lítica (Dupre, et al.,2005; Speiser, et al.,2001). D'altra

banda, el 3BP2 també s'expressa en limfòcits T on juga un paper positiu en la producció de la IL-2 (Deckert, et al.,1998; Qu, et al.,2005).

Després de conèixer el paper del CD244 i del 3BP2 en cèl·lules NK, vàrem voler explorar la funció d'aquestes dues molècules en els limfòcit CD8

4.1 Perfil d'expressió del CD244 en els limfòcits CD8⁺

S'ha treballat amb limfòcits CD8⁺ primaris humans, obtinguts a partir de limfòcits de sang perifèrica tal i com es descriu en la secció de material i mètodes. Després de l'obtenció i enriquiment, es determinava el percentatge de cèl·lules CD8⁺, que tal i com es presenta en la figura 33 A, és superior al 80% de mitja de fluorescència.

Seguidament també es va monitoritzar l'expressió del CD244 en la membrana (figura 33 A). Tot i que en la majoria de sangs, l'expressió del CD244 és força elevada (70% de mitja de fluorescència), en alguns casos va caldre tractar les cèl·lules amb PHA per induir-ne l'expressió. En aquests casos, s'observa (figura 33 B) que l'expressió assoleix un pic a les 72 hores per tornar a davallar fins a una expressió basal.

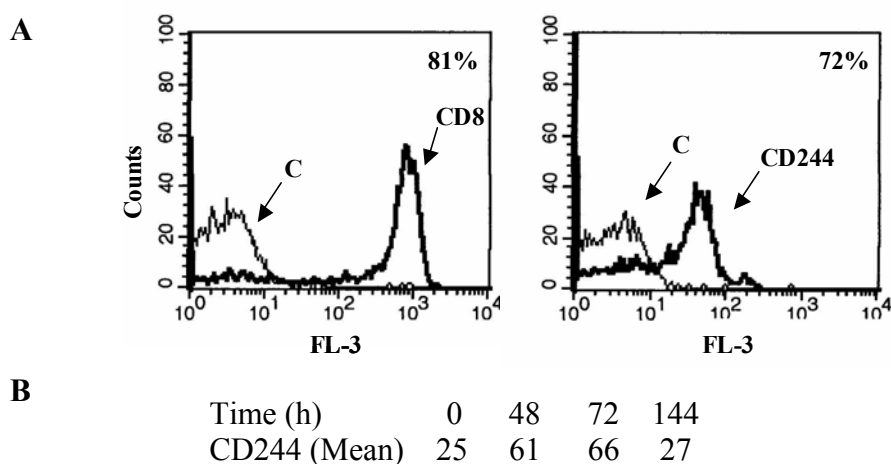


Figura 33. Grau de puresa de CD8⁺ i expressió del CD244. (A) Anàlisi de FACS dels limfòcits CD8⁺ amb un anticòs directe conjugat a Cy-Chrome i expressió del CD244 amb un anticòs contra el CD244 biotinilat seguit de l'avidina-Cy-Chrome. (B) Els limfòcits CD8⁺ s'activen fins a 6 dies amb PHA a 5µg/ml i s'analitza l'expressió del CD244 de la mateixa manera que en el panell A.

4.2 El CD244 estimula la reorganització del citoesquelet en els limfòcits CD8⁺

Entre la cèl·lula NK i CD8⁺ hi ha mecanismes comuns en la lisi: durant l'activitat lítica, en ambdós tipus cel·lulars, es forma una sinapsi en l'àrea de contacte entre la cèl·lula efectora i la diana (Dupre, et al.,2005; Lanier,2005). La correcta reorganització del citoesquelet és determinant per assegurar la formació d'aquesta sinapsi. Cèl·lules citotòxiques en contacte amb una droga que evita la polimerització dels filaments d'actina són incapaces de muntar una correcta lisi, ja que ni tant sols poden assemblar la maquinària lítica en el punt de contacte (Watzl and Long,2003).

La polimerització de filaments d'actina es pot determinar usant la Phalloïdina; tòxic derivat de l'*Amanita phalloides* amb elevada afinitat per l'actina polimeritzada o F. Per tant és un bon marcador de polimerització d'actina (reorganització del citoesquelet) en cèl·lules prèviament fixades i permeabilitzades. Per tant es va utilitzar aquesta eina per determinar el grau de polimerització d'actina en els limfòcits CD8⁺ activats via CD244. L'activació del CD244 és suficient per promoure la polimerització d'actina en limfòcits CD8⁺, observable als 5 minuts i incrementant fins als 30 (figura 34).

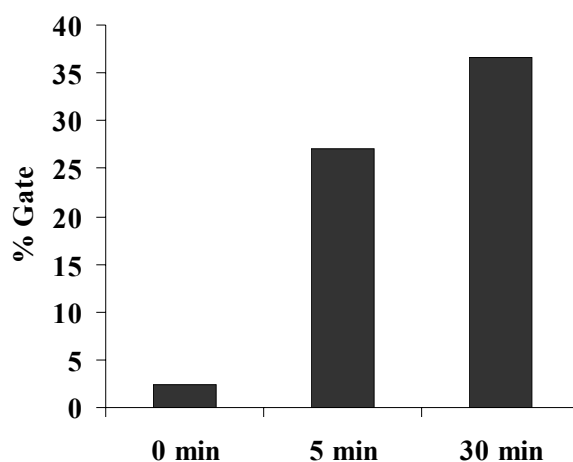


Figura 34. El CD244 promou la polimerització d'actina en limfòcits CD8⁺. Limfòcits CD8⁺ van ser activats amb anti-CD244 (5 µg/ml) i *cross-linker* (10 µg/ml) durant el temps indicat a 37°C. Es van fixar, permeabilitzar i marcar amb la Phalloïdina-TRIC. La fluorescència emesa per la Phalloïdina incorporada es va mesurar per FACS en FL-3. Els valors (%Gate) fan referència al percentatge de cèl·lules positives.

4.2.1 El 3BP2 incrementa la polimerització d'actina, en canvi, el mutant puntual del 3BP2 per Vav la disminueix

Seguidament es va voler conèixer quin era l'efecte del 3BP2 en aquest procés. Es van transfectar transitòriament cèl·lules CD8⁺ amb la construcció 3BP2-EGFP i es va fer el mateix experiment d'activació via CD244 i incorporació de Phalloïdina-TRIC. Per altra banda, també es va incorporar el mutant puntual del 3BP2 en la tirosina 183, responsable d'interaccionar amb Vav (Jevremovic, et al.,2001).

El paper de Vav en els processos de reorganització del citoesquelet i conseqüent estructuració dels rafts de membrana per formar la sinapsi, ha estat àmpliament descrit (Hornstein, et al.,2004). Vav a través de la seva activitat bescanviadora de nucleòtids (GEF) activa les proteïnes de la família de GTPases petites: Rac, Rho i Cdc24. Aquestes GTPases activen proteïnes directament relacionades amb l'actina. Vav d'altra banda, també interacciona directament, a través dels seus dominis modulars, amb proteïnes que s'associen a l'actina (Hornstein, et al.,2004; Tybulewicz,2005).

La incorporació de Phalloïdina és superior en les cèl·lules amb el 3BP2 salvatge. En canvi, el mutant puntual de Vav (Y183F), tot i presentar un pic als 5 minuts, no manté l'increment, sinó que atura la progressiva polimerització d'actina i per tant hi ha menor incorporació de la Phalloïdina. Per tant, l'activació del CD244 promou la via 3BP2-Vav per desencadenar la polimerització del citoesquelet d'actina (figura 35).

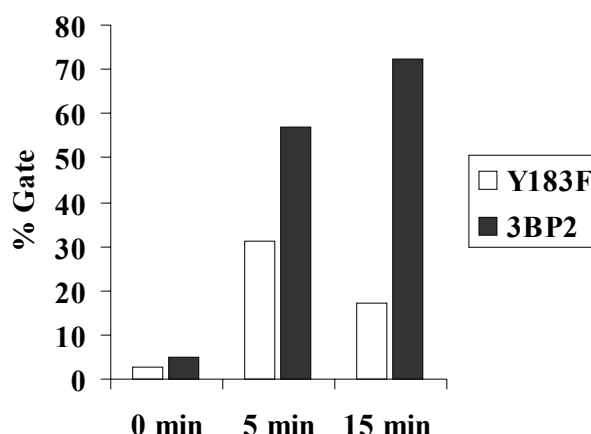


Figura 35. El 3BP2 potencia la polimerització d'actina a través de Vav després de l'activació del CD244 en cèl·lules CD8⁺. Limfòcits CD8⁺ es transfectaren amb el 3BP2-EGFP o el mutant Y183F-EGFP. 24 hores després, van ser activats amb anti-CD244 (5 µg/ml) i cross-linker (10 µg/ml) durant el temps indicat a 37°C. Es van fixar, permeabilitzar i marcar amb la Phalloidina-TRIC. La fluorescència emesa per la Phalloidina incorporada es va mesurar per FACS en FL-3 per evitar interferències de la FL-1 (emissió de l'EGFP). Els valors (%Gate) fan referència al percentatge de cèl·lules positives per la Phalloidina (FL-3). Els nivells d'electroporació són molt alts i per tant s'analitzen totes les cèl·lules de la FL-1 i es mira la incorporació de Phalloidina (FL-3).

4.2.2 El domini SH2 del 3BP2 bloqueja la polimerització d'actina via CD244 en els limfòcits CD8⁺

El mutant puntual del 3BP2 per Vav (Y183F), pot encara incrementar una mica la polimerització d'actina (figura 35). Per tant, podria ser que el CD244 activés, en part, una via independent del 3BP2. Per tal de saber si aquesta situació era possible, decidírem treballar amb el dominant negatiu del 3BP2. Cèl·lules CD8⁺ es van transfectar transitòriament amb la construcció SH2-EGFP, es van activar amb anti-CD244 i es va analitzar la incorporació de la Phalloidina-TRIC. Aquest experiment reforça la idea de que el 3BP2 juga un paper decisiu en la reorganització del citoesquelet, ja que el seu dominant negatiu bloqueja per complet aquest fenomen (figura 36).

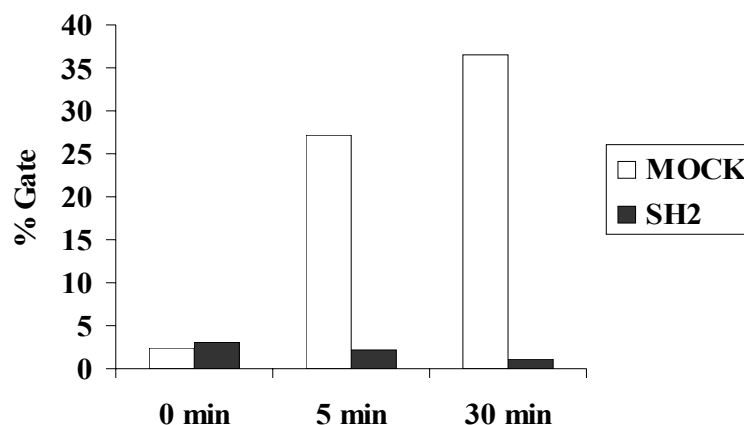
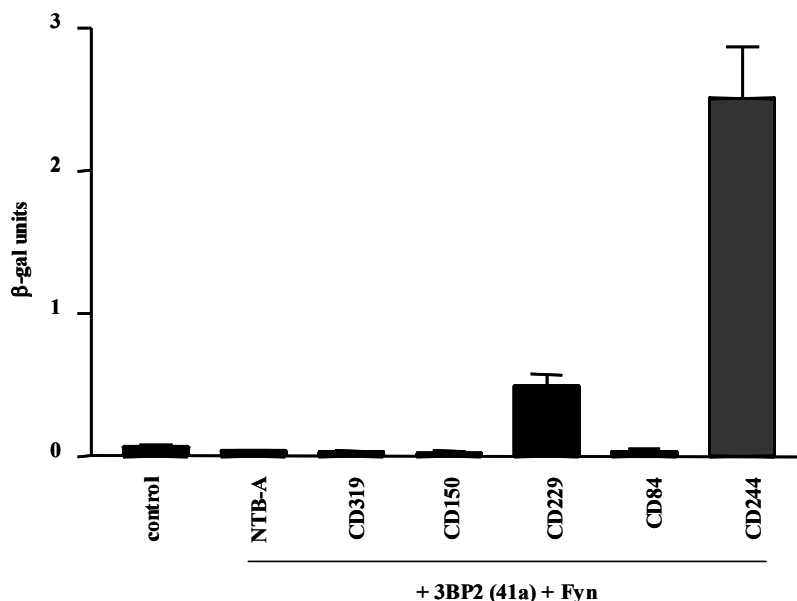


Figura 36. El dominant negatiu del 3BP2 bloqueja la polimerització d'actina després de l'activació del CD244 en cèl·lules CD8⁺. Limfòcits CD8⁺ es transfectaren amb el SH2-EGFP o el vector buit (mock). 24 hores després, van ser activats amb anti-CD244 (5 µg/ml) i *cross-linker* (10 µg/ml) durant el temps indicat a 37°C. Es van fixar, permeabilitzar i marcar amb la Phalloidina-TRIC. La fluorescència emesa per la Phalloidina incorporada es va mesurar per FACS en FL-3 per evitar interferències de la FL-1 (emissió de l'EGFP). Els valors (%Gate) fa referència al percentatge de cèl·lules positives per la Phalloidina (FL-3). Els nivells d'electroporació són molt alts i per tant s'analitzen totes les cèl·lules de la FL-1 i es mira la incorporació de Phalloidina.

5. El CD229 interacciona directament amb el 3BP2

També es va analitzar si el 3BP2 era capaç d'interaccionar directament amb altres membres de la família del CD150. Amb tal objectiu, es va portar a terme la tècnica del triple híbrid mitjançant la qual, analitzarem la capacitat d'interacció de la resta de membres de la família del CD150 amb el 3BP2 (clon 41). Es va detectar que només el CD229, a part del CD244, recluta directament el 3BP2 en condicions de fosforilació (figura 37 A). En el panell B de la figura 37 es presenten els motius per SAP (T-I/V-Y-X-X-I/V) i 3BP2 (Y-E/M/V-N/V/I-X) en les cues citosòliques de la família del CD150.

A



B

Membre CD150	Motius en el domini citosòlic	Unió al 3BP2
NTB-A	YVSV- <u>YASY</u> - <u>YSTI</u>	-
CD319	YIEE-YDTI- <u>YSTV</u> -YENV	-
CD150	YQTT- <u>YAQV</u> -YVAA- <u>YASV</u>	-
CD229	YSLV-YEKL- YEVF -YDPV- YVTE- <u>YAQV</u> - <u>YCSI</u> - YENF	+
CD84	<u>YTYI</u> -YDEI- <u>YSEV</u> - YEIV	-
CD244	<u>YEDV</u> - <u>YSMI</u> -YSLI- YEVI	++

Figura 37. Interacció de la família del CD150 vers el 3BP2, en llevats. (A) Els membres de família del CD150 clonats en pBridge amb Fyn actiu es van cribar vers el 3BP2 (clon 41 en pACT2). El control negatiu són els vectors pBridge i pACT2 buits. Es va determinar l'associació per l'assaig semiquantitatiu de l'activitat β -galactosidasa. (B) Motius per SAP (subratllats) i pel 3BP2 (en negreta) en la cua citosòlica dels membres de la família. Els rangs d'activitat β -galactosidasa induïda són: -: no activitat detectable, com pel control negatiu; +, d'1 a 2 unitats; ++, superior a 2 unitats.

5.1 La tirosina 606 en el CD229 és la responsable de reclutar el 3BP2

A continuació es va anar a caracteritzar més en detall la interacció entre el CD229 i el 3BP2. La cua citosòlica del CD229 presenta dos motius consens pel 3BP2 (Y-E/M/V-

N/V/I-X). La mutació de la tirosina 606 corresponent a la seqüència YENF, provoca que la l'associació entre el CD229 i el 3BP2 (que es dona només en condicions de fosforilació) desaparegui (figura 38).

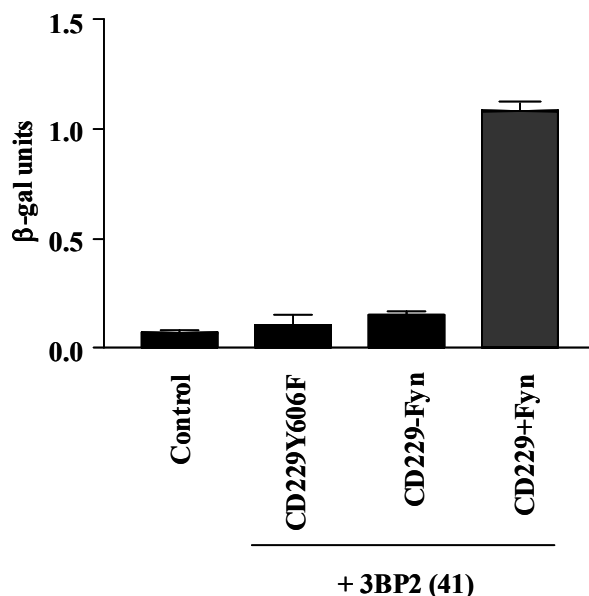


Figura 38. La tirosina 606 del CD229 és la responsable de reclutar el 3BP2. Les construccions CD229 amb Fyn actiu o inactiu i CD229 amb el mutant 606 es van cotransformar amb el clon 41 del 43BP2, en llevats. El control són els mateixos vectors buits. Seguidament s'analitzà la interacció mitjançant l'assaig β -galactosidasa semiquantitatiu.

5.2 Interacció entre el CD229 i el 3BP2

Seguidament es va anar a demostrar la interacció entre ambdues molècules mitjançant la tècnica de la immunoprecipitació, en cèl·lules de mamífer. Amb tal objectiu es van transfectar cèl·lules COS i es va procedir a immunoprecipitar amb l'anticòs anti-CD229 prèviament descrit (Del Valle, et al.,2003). En la figura 39 es pot observar com després de la fosforilació de la cua citosòlica del receptor per acció de Fyn, hi ha reclutament del 3BP2. Curiosament, també s'observa com la sola coexpressió del 3BP2 i CD229 és suficient per induir la fosforilació (tot i que menor) del receptor i aquesta fosforilació és prou com per induir associació d'ambdues molècules, suggerint que el 3BP2 està acostant al CD229 alguna cinasa de la família Src present en les cèl·lules COS. Aquest fet ja s'ha descrit per SAP i EAT-2; aquests dos adaptadors són capaços d'interaccionar directament amb Fyn (Calpe, et al.,2006; Latour, et al.,2003) i promoure la fosforilació del CD229 en cèl·lules COS (Morra, et al.,2001c; Sayos, et al.,2001).

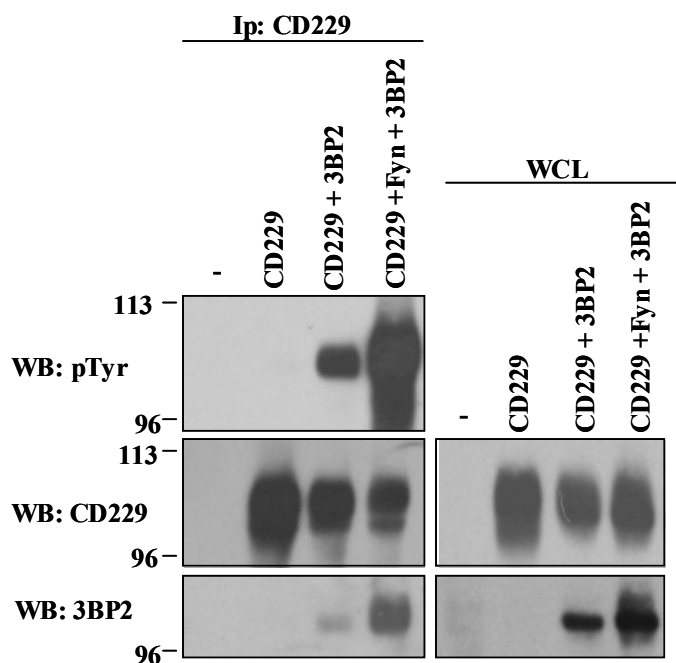


Figura 39. Interacció del CD229 i 3BP2 en cèl·lules COS. Cèl·lules COS es van transfectar amb les combinacions indicades; CD229, CD229 i 3BP2 amb o sense Fyn o res. 48 hores després es va procedir a la immunoprecipitació del CD229 amb l'anti-CD229. Es va córrer un gel d' SDS-PAGE al 8%, es va fer la transferència i la membrana es va incubar amb un anticòs contra tirosines fosforilades del CD229, contra el CD229 (mateix que l'usat per la immunoprecipitació) i contra el 3BP2.

5.2.1 Distribució subcel·lular del CD229 i 3BP2

Posteriorment es va analitzar la distribució d'aquestes dues molècules en cèl·lules COS transfectades amb el CD229 i el 3BP2-EGFP, en presència o absència de Fyn. S'obtingueren imatges de microscopia confocal de col·localització d'ambdues molècules només en condicions on Fyn era present. Tot i que certa col·localització és pot detectar sense Fyn, ja que com s'ha comentat, sense aquest cinasa també hi ha certa fosforilació del CD229 i interacció amb el 3BP2 (figura 40 A). També es van transfectar cèl·lules COS amb les construccions CD229-ECFP salvatge i CD229_{Y606F}-ECFP i 3BP2-EYFP, en aquest cas les cèl·lules es van tractar amb l'anticòs CD229, activació que promou la fosforilació del CD229 (Martin, et al.,2005). En aquest cas (figura 40 B) observem col·localització només entre el CD229 salvatge i 3BP2, no pas amb el CD229 amb la mutació del motiu 606 responsable d'unir el 3BP2.

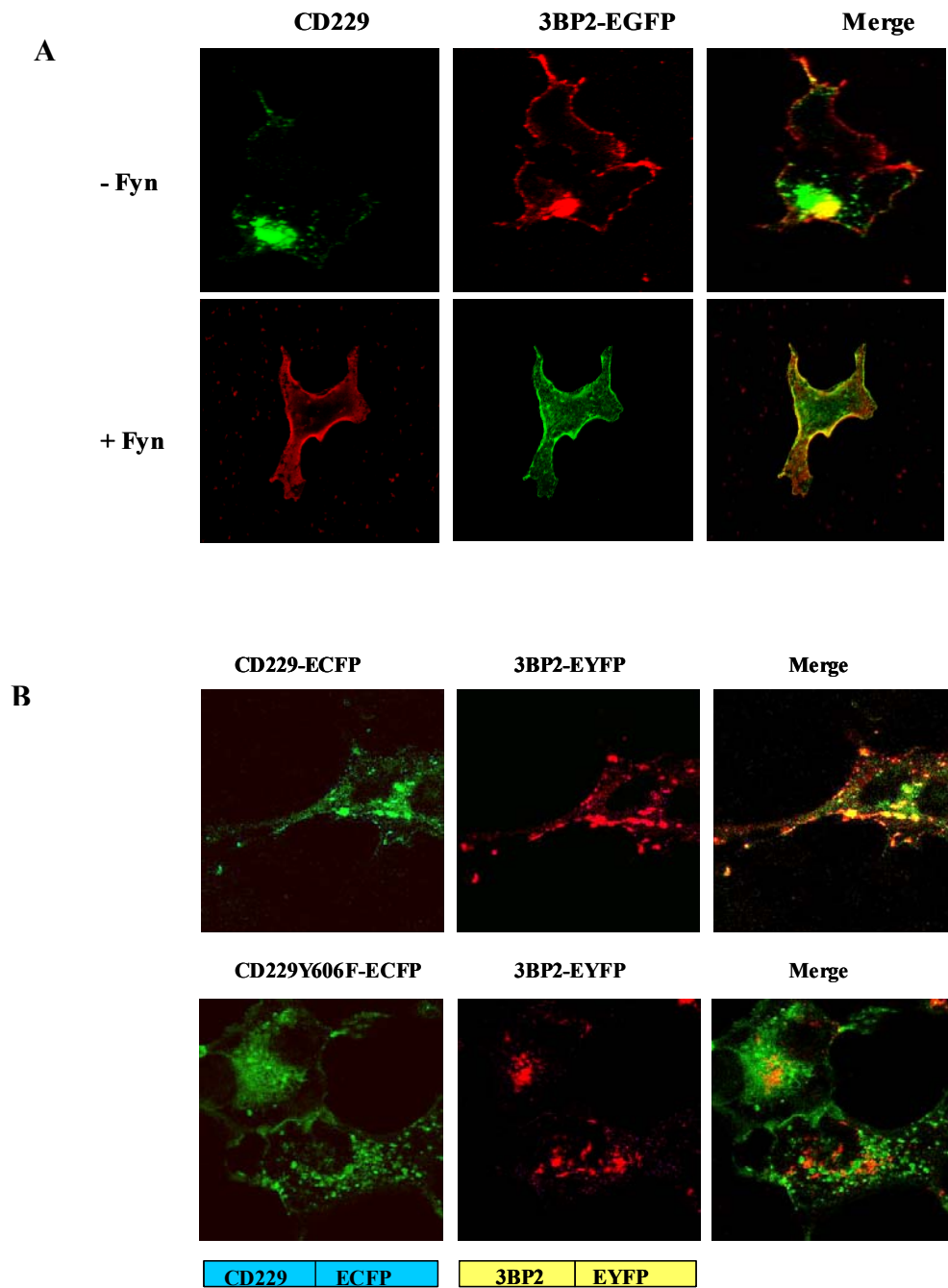


Figura 40. Col·localització del CD229 i 3BP2 en cèl·lules COS. (A) Cèl·lules COS es van transfectar amb el CD229, el 3BP2-EGFP i amb Fyn o sense. 48 hores després es va fer el marcatge amb anti-CD229 i anti-mouse-Cy3. Es van obtenir imatges de microscopia confocal i es va fer el merge (solapament) de les imatges. (B) Cèl·lules COS es van transfectar amb el CD229-ECFP o CD229_{Y606F}-ECFP i el 3BP2-EYFP. 48 hores després es va fer l'activació amb anti-CD229, seguit d'un *cross-linker* durant 15 minuts a 37°C. Es van obtenir imatges de microscopia confocal i es va fer el merge de les imatges.

5.3 La sobreexpressió del 3BP2 potencia la inhibició via CD229 en la cèl·lula T

Després de caracteritzar la interacció entre el CD229 i el 3BP2, calia determinar les repercussions funcionals d'aquesta associació. Amb aquest objectiu es van utilitzar cèl·lules Jurkat transfectades establement amb el HA-CD229 prèviament descrites (Martin, et al.,2005). Aquesta línia es va transfectar transitòriament amb el 3BP2-EGFP, el domini SH2-EGFP i un vector buit EGFP-N₃. Seguidament es van activar amb anti-CD3 en combinació amb l'anti-CD229 i es va analitzar l'expressió del CD69. El CD69 és un marcador d'activació; la seva expressió augmenta en la superfície de la membrana del limfòcit T en resposta a l'activació via TCR i com a conseqüència de l'activació de la via iniciada per Vav-RasGRP-Ras i ERK (Roose, et al.,2005; Villalba, et al.,2000). Per tant l'increment en l'expressió del CD69, dona una idea del grau d'activació de la via d'ERK. Aquesta via de les MAPK està relacionada amb l'activació de factors de transcripció que promouen la síntesi de citocines i per tant està en relació directe amb l'activació del limfòcit T (Dong, et al.,2002).

Les cèl·lules tractades amb la combinació CD3 i CD229 mostren una inhibició del 22% respecte les tractades amb CD3 més una IgG control. La sobreexpressió del 3BP2 incrementa aquest efecte inhibidor del CD229 sobre l'activació de l'expressió del CD69 induïda pel CD3 fins a un 46%. En canvi, quan sobreexpressem el domini SH2 del 3BP2, aquesta inhibició queda casi anul·lada amb només un 2% d'inhibició respecte les mateixes cèl·lules tractades amb CD3 i una Ig G control (figura 41).

També es va analitzar l'expressió del CD69 en limfòcits CD8⁺ de sang perifèrica humana activats amb la combinació CD3 amb una IgG control o amb l'anticòs contra el CD229. En aquest cas es van transfectar les cèl·lules amb el vector buit (mock) i amb el domini SH2 del 3BP2. Tal i com es presenta en la figura 42, l'activació CD3 més CD229 provoca una decrement de l'expressió respecte l'estímul CD3 més IgG control. En canvi, l'activació del CD3 i CD229 de les cèl·lules que sobreexpressem el dominant negatiu del 3BP2 és capaç de revertir l'efecte d'aquesta inhibició i provoca fins i tot un augment de l'expressió del CD69.

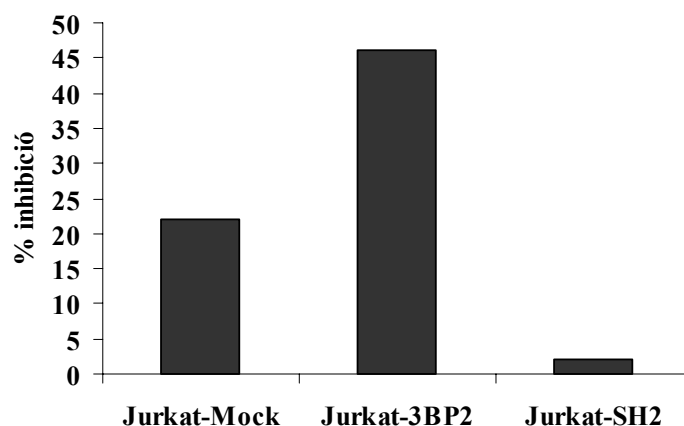


Figura 41. Efecte inhibidor del CD229 i 3BP2 sobre l'expressió del CD69 en Jurkat. Cèl·lules Jurkat van ser transfectades amb un vector buit (pN₃-EGFP), el 3BP2-EGFP i el SH2-3BP2-EGFP. 6 hores després de l'electroporació es van activar amb 1 µg/ml d'anti CD3 i anti CD229 o anti IgG amb 4 µg/ml del *cross-linker*. 16 hores després es van recollir les cèl·lules i es va fer el marcatge amb un anti-CD69 biotinitat seguit de l'avidina-CyChrome. En la gràfica es mostra el percentatge d'inhibició CD3 + CD229 respecte CD3 + IgG. L'anàlisi es fa sobre les cèl·lules que han incorporat el vector, per tant són FL-1 positives.

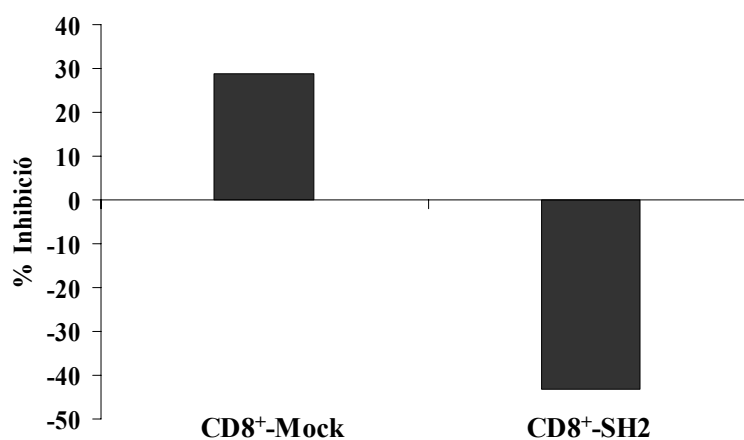


Figura 42. El dominant negatiu del 3BP2 reverteix l'efecte inhibidor del CD229 sobre l'expressió del CD69 en cèl·lules CD8⁺. Es van produir limfòcits CD8⁺ a partir de limfòcits de sang perifèrica i es van transfectar amb el vector (pN₃-EGFP) i el domini SH2-EGFP. 16 hores després de l'electroporació, les cèl·lules es van activar amb 1 µg/ml d'anti CD3 i anti CD229 o anti IgG amb 4 µg/ml del *cross-linker*. 16 hores després es van recollir les cèl·lules i es va fer el marcatge amb un anti-CD69 biotinitat seguit de l'avidina- CyChrome. En la gràfica es mostra el percentatge d'inhibició CD3 + CD229 respecte CD3 + IgG. L'anàlisi es fa sobre totes cèl·lules, ja que els nivells de transfecció són molt alts.

5.4 El CD229 interacciona directament amb Csk

El CD229 s'ha demostrat que és un receptor que atenua la senyal positiva del TCR en els limfòcits T (Martin, et al.,2005). Tal i com hem mostrat en les figures 41 i 42, aquesta funció inhibidora sembla estar potenciada per la sobreexpressió del 3BP2. Tot i així, la mutació del motiu 606 d'interacció pel 3BP2 i també per Grb-2, no bloqueja la inhibició mediada pel CD229 sobre el TCR (Martin, et al.,2005). Per tant ens plantejarem determinar si el CD229 interacciona directament amb una molècula relacionada amb la inhibició tal com Csk: potent cinasa inhibidora de l'activació del limfòcit T (Veillette, et al.,2002). També vam determinar si Csk continua interaccionant amb el CD229 quan la tirosina 606 és mutada per una fenilalanina. Mitjançant l'assaig β -galactosidasa en llevats on comparem el CD229 salvatge amb el CD229_{Y606F} podem concloure que el CD229 interacciona amb Csk i que el motiu tirosina 606, no és important per reclutar Csk (figura 43).

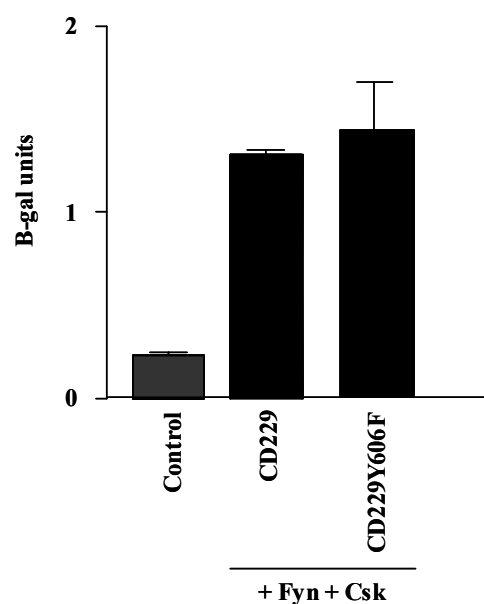


Figura 43. El CD229 interacciona amb Csk i la tirosina 606 del CD229 no és important per aquesta interacció. Els llevats es van cotransformar amb el CD229 salvatge o el CD229_{Y606F} en pBridge (amb Fyn actiu) i amb Csk en pGAD, o bé amb els vectors buits com a control negatiu. Es va determinar l'associació per l'assaig de l'activitat β -galactosidasa semiquantitatiu.

Segurament els nivells d'expressió del 3BP2 són importants controladors del procés inhibidor o potser, el 3BP2 sobreexpressat permet reclutar més Csk i per tant s'incrementa la inhibició.

6. El 3BP2 és fosforilat preferentment per Fyn

La fosforilació del 3BP2 és un pas imprescindible per la correcta activació del limfòcit T (Deckert, et al.,1998; Qu, et al.,2005). Ens proposarem conèixer quina cinasa de la família Src presents en els limfòcits T i NK, tals com Fyn i Lck fosforila el 3BP2. Per altra banda, tant Fyn com Lck són capaces de fosforilar el CD244 (Nakajima, et al.,2000; Sayos, et al.,2000) i el CD229 (Martin, et al.,2005). El resultat de l'experiment mostrat en la figura 44, indica que, tot i que el 3BP2 en condicions basals està tènueament fosforilat, Fyn incrementa molt el grau de fosforilació de l'adaptador, en canvi Lck, fosforila poc el 3BP2 comparat amb Fyn.

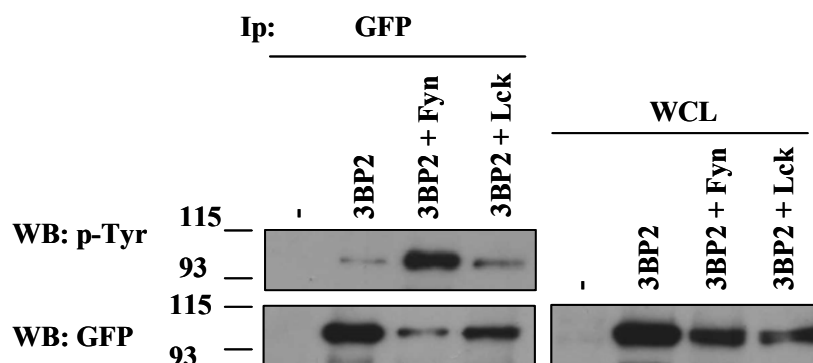


Figura 44. Fyn fosforila el 3BP2. Cèl·lules COS transfectades transitòriament amb 3BP2-EGFP sol o en combinació amb Fyn i Lck o res. 48 hores després, s'immunoprecipità amb anti-GFP, es va córrer el gel SDS-PAGE al 10% i es va fer la transferència. La membrana s'incubà amb anticòs contra les tirosines fosforilades i anti-GFP.

6.1 El 3BP2 interacciona amb Fyn

Davant del fet que la sola presència del 3BP2 és suficient per promoure la fosforilació del CD229 (figura 39) i que també sembla incrementar la fosforilació del CD244 (figura 30) ens plantejarem determinar si el 3BP2 interacciona directament amb la cinasa Fyn,

que fosforilaria tant els receptors com el 3BP2. Fins ara només s'havia descrit que el 3BP2 murí interacciona amb Fyn en llevats (Deckert, et al.,1998). Tant en cèl·lules COS, com en la línia d'NK YT, demostrarem que el 3BP2 interacciona directament amb Fyn (figura 45). Tot i que la fosforilació del 3BP2 amb pervanadat no és massa espectacular (Deckert, et al.,1998), és suficient per mostrar un increment en la interacció amb Fyn (figura 45 B).

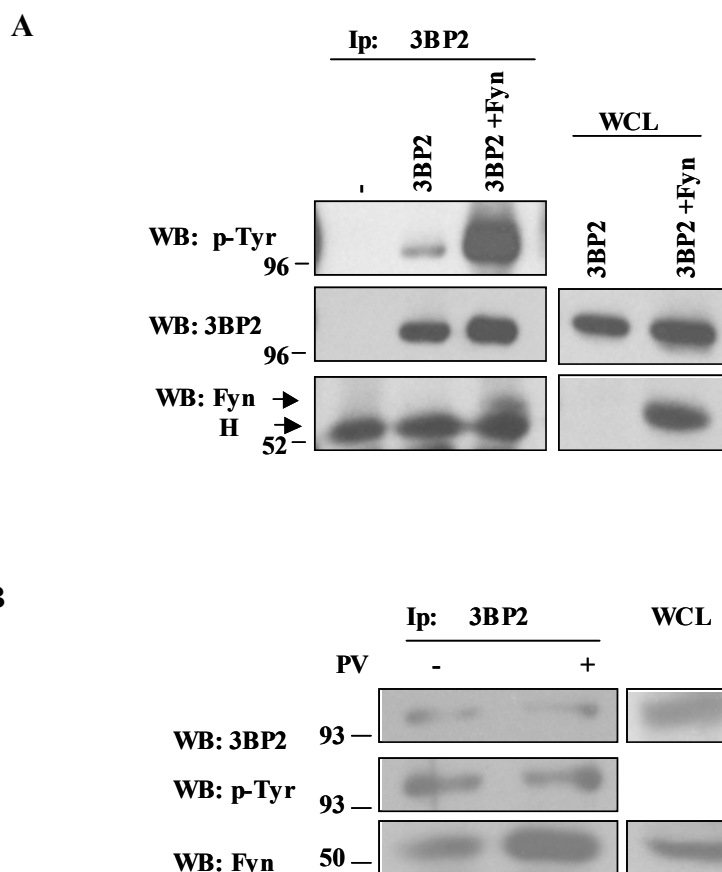


Figura 45. Interacció del 3BP2 amb Fyn. (A) Cèl·lules COS es van transfectar amb el 3BP2-EGFP amb o sense Fyn o amb res. 48 hores després, s'immunoprecipità amb anti-3BP2, es va córrer el gel SDS-PAGE al 10% i es va fer la transferència. La membrana s'incubà amb anticòs contra les tirosines fosforilades, anti-3BP2 i anti-Fyn. (B) 10⁸ cèl·lules 3BP2-YT s'activaren amb pervanadat 100µM durant 10 minuts a 37°C. A continuació, es lisaren i s'immunoprecipitaren amb l'anticòs contra el 3BP2, es va córrer el gel SDS-PAGE al 10% i es va fer la transferència. La membrana s'incubà amb anticòs contra les tirosines fosforilades, anti-3BP2 i anti-Fyn.

6.1.1 Distribució subcel·lular del 3BP2 i Fyn

També es van adquirir imatges de microscopia confocal per veure la interacció entre el 3BP2 i Fyn. En la figura 46 es presenta com aquestes dues molècules col·localitzen perfectament en cèl·lules COS transfectades amb el 3BP2-EGFP i amb Fyn. Curiosament, quan Fyn es troba expressat sense el 3BP2, la cinasa mostra una expressió més difusa i sobretot, al voltant de la membrana, en canvi quan apareix coexpressat amb el 3BP2, Fyn adquireix una distribució més empaquetada (*clusteritzada*) i coincideix casi totalment amb l'expressió, també molt empaquetada, del 3BP2 (mirar figura 4).

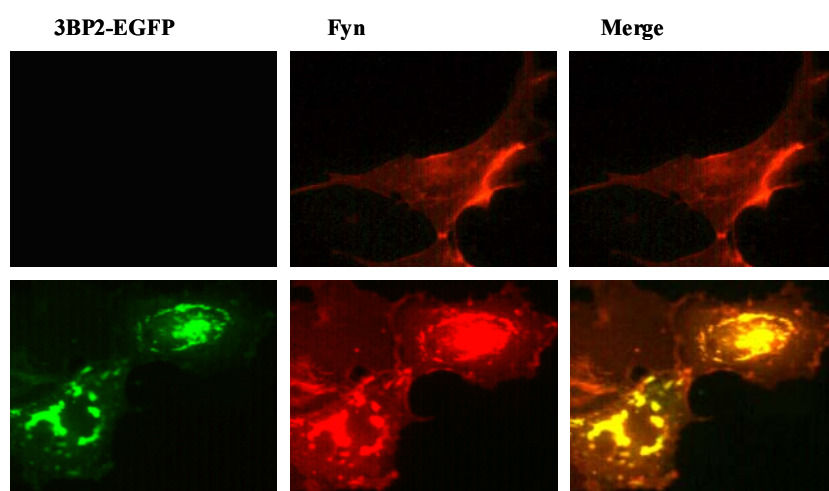


Figura 46. Col·localització del 3BP2 amb Fyn en cèl·lules COS. Cèl·lules COS es van transfectar amb el 3BP2-EGFP i amb Fyn. 48 hores després es va fer el marcatge amb anti-Fyn seguit d'un *cross-linker* anti-mouse-Cy3. Es van obtenir imatges de microscopia confocal de cèl·lules que co-expressaven el 3BP2 i Fyn i de cèl·lules que només havien incorporat Fyn. Es va fer el merge de les imatges.

7. Interacció dels membres de la família del CD150 amb SHP-1 i Csk

Els membres de la família del CD150 també mostren activitats inhibidores, com el CD244 murí (Lee, et al.,2004b), el CD229 humà (Martin, et al.,2005) i els membres CD244 i NTB-A (humans quan SAP no és present, en aquest dos casos) (Bottino, et al.,2001; Parolini, et al.,2000). Per tant ens plantejarem conèixer la capacitat que tenen

els membres de la família del CD150 per reclutar directament molècules amb capacitat d'inhibir com la fosfatasa SHP-1 i la cinasa Csk.

Durant l'activació, els membres de la família del CD150, interaccionen amb SAP i/o EAT-2 amb alta afinitat. Aquests adaptadors actuarien bloquejant l'associació de les fosfatasas SHP-1 i SHP-2 (Bottino, et al.,2001; Morra, et al.,2001c; Sayos, et al.,2001; Sayos, et al.,2000; Tangye, et al.,2000a). D'altres treballs han estat incapaços de detectar una interacció entre els membres de la família del CD150 i les fosfatasas (Bouchon, et al.,2001; Latour, et al.,2001; Parolini, et al.,2000). SHP-1 és una fosfatasa específica del teixit hematopoètica relacionada amb la inhibició, ja que actua desfosforilant els motius ITAMS, les cinases de la família Src, Syk, SLP-76, Vav i la PI3K. SHP-2 també és una fosfatasa, però d'expressió més ubíqua (Veillette, et al.,2002).

En front de tanta controvèrsia es va analitzar la interacció entre tots els membres de la família del CD150 vers la fosfatasa SHP-1 i Csk mitjançant la tècnica del triple híbrid que permet detectar interaccions directes. Tal i com es presenta en la figura 47, cap membre de la família del CD150 interacciona directament amb SHP-1. En canvi, sí que hi ha interacció entre el CD150, CD244, CD229 i NTB-A amb Csk (figura 47).

Membre de la família CD150	SHP-1	Csk
CD84	-	-
CD150	-	+
CD229	-	+
CD244	-	++
CD319	-	-
NTB-A	-	+

Figura 47. Interacció dels membres de la família del CD150 amb SHP-1 i Csk. Els membres de família del CD150 clonats en pBridge amb Fyn actiu es van cribar vers la fosfatasa SHP-1 i la cinasa Csk. Els rangs d'activitat β -galactosidasa induïda són: -: no activitat detectable, com pel control negatiu; +, d'1 a 2 unitats; ++, superior a 2 unitats.

V. DISCUSSIÓ

DISCUSSIÓ

Antecedents experimentals sobre el CD244

El CD244 o 2B4 pertany a la família de co-receptors CD150 (Engel, et al.,2003). Està compost per un domini extracel·lular format per dos dominis semblants als immunoglobulina (Variable i Constant tipus 2), una regió transmembrana i una cua citosòlica de 120 aminoàcids amb quatre motius ITSM (Tangye, et al.,1999). Tres d'aquests quatre motius ITSM, entren en consens amb el motiu d'interacció per SAP i EAT-2: T-V/I-Y-X-X-V/I (Morra, et al.,2001c; Sayos, et al.,2000). A través d'aquests motius, en condicions de fosforilació, el domini intracel·lular del CD244 recluta SAP i EAT-2 (Morra, et al.,2001c; Sayos, et al.,2000; Tangye, et al.,1999; Tassi and Colonna,2005). Alguns treballs han observat que la fosfatasa SHP-2 competeix amb SAP per unir-se al receptor fosforilat, en cèl·lules transfectades (Sayos, et al.,2000; Tangye, et al.,1999). D'altres treballs, però no han estat capaços de detectar tal interacció en cèl·lules NK (Nakajima, et al.,2000; Parolini, et al.,2000; Tassi and Colonna,2005), tot i que en un d'aquests estudis, es detecta reclutament de la fosfatasa SHP-1 (Parolini, et al.,2000).

En cèl·lules NK, l'activació del CD244 amb anticossos o amb el seu lligand natural (CD48), ha posat de manifest que actua com a co-receptor activador de la citotoxicitat i de la producció d'IFN γ (Tangye, et al.,2000b). Aquest paper positiu és totalment dependent de la capacitat que té per reclutar la molècula adaptadora SAP (Benoit, et al.,2000; Tangye, et al.,2000a). Concretament, les cèl·lules NK derivades de pacients amb la síndrome d'XLP mostren una inhibició de la citotoxicitat mediada per l'activació del CD244 (Parolini, et al.,2000).

Encara que en humans, el paper positiu del CD244 està àmpliament descrit (Chuang, et al.,2000; Tangye, et al.,2000b), en murins, l'aparició de ratolins genodeficients pel CD244 ha demostrat que en aquesta espècie, aquest receptor juga una funció inhibidora de l'activitat NK (Lee, et al.,2004b). A diferència del humans, en murins apareixen dues isoformes que varien en la longitud de la seva regió intracel·lular (Schatzle, et al.,1999; Stepp, et al.,1999). El 2B4 L, equival a la isoforma llarga amb una homologia del 66%

amb el CD244 humà, en canvi, el 2B4 S és la variant curta amb un sol motiu ITSM (Tangye, et al.,1999). Aquesta funció inhibidora és dependent de la isoforma llarga i de l'adaptador EAT-2, però independent de l'expressió de SAP (Lee, et al.,2004b; Mooney, et al.,2004; Roncagalli, et al.,2005).

Fins ara, la funció d'aquest receptor s'ha centrat bàsicament en el paper que desenvolupa en un context de presència o manca de la família d'adaptadors SAP. L'objectiu d'aquesta tesi ha estat conèixer nous lligands intracel·lular i dissecionar les vies de senyalització desencadenades pel CD244.

El domini SH2 del 3BP2 interacciona directament amb la tirosina 337 fosforilada en la regió citosòlica del CD244

En el treball presentat en aquesta tesi, s'ha identificat la interacció directe, fins ara no descrita, entre el domini SH2 de l'adaptador 3BP2 i la regió intracel·lular del CD244, només en condicions en què la cua citosòlica del receptor està fosforilada. Aquesta interacció s'ha caracteritzat usant diferents tècniques experimentals. La tècnica del triple híbrid en llevats (Sayos, et al.,2001) ens va permetre identificar, per primera vegada, la interacció directe entre el 3BP2 i el CD244. Per altra banda, també s'han creat transfectants estables, transitoris i un anticòs monoclonal contra el 3BP2 humà. Aquestes eines s'han usat per portar a terme experiments d'immunoprecipitació i microscopia confocal, que han permès detectar aquesta interacció en sistemes superior de cèl·lules de mamífer: en cèl·lules COS, en una línia establerta NK humana anomenada YT i en NK primàries humanes.

Els dominis SH2 tenen la característica general d'interaccionar amb tirosines fosforilades dins un motiu consens (Koretzky and Myung,2001). El domini SH2 del 3BP2 té preferència per unir-se a tirosines fosforilades que segueixen el motiu: Y-E/M/V-N/V/I-X (Songyang, et al.,1994). Analitzant la cua citosòlica del CD244 es va detectar un sol motiu que responia a les característiques indicades: Y₃₃₇ENV. Fent ús de la tècnica del triple híbrid es va confirmar que la tirosina 337 és imprescindible per reclutar el 3BP2. Curiosament, aquest motiu està integrat dins un motiu putatiu d'interacció per SAP. Era doncs interessant, conèixer si aquestes dues molècules

competien directament pel mateix motiu o coexistien dins una mateixa molècula de CD244. La mutació d'aquesta tirosina no afectava el reclutament per SAP i conseqüentment, SAP i 3BP2 no semblen competir pel mateix motiu i per tant, coprecipiten amb el CD244 en cèl·lules NK tractades amb pervanadat. Aquestes dues aproximacions experimentals, indicarien que ambdues proteïnes poden coexistir en una mateixa molècula de CD244.

El 3BP2 acosta Vav al receptor CD244 i potencia la citotoxicitat sense modificar la secreció d'IFN γ

L'adaptador 3BP2 va ser inicialment descrit com una proteïna d'unió a la cinasa Abl a través del domini SH3 de la cinasa, però les repercussions fisiològiques de tal interacció no han estat explorades (Ren, et al.,1993). Tot i així, la sobreexpressió del 3BP2 en diferents tipus cel·lulars d'origen hematopoiètic, han conclòs que es tracta d'una molècula que es fosforila i intervé en l'activació cel·lular. S'ha descrit que regula positivament l'activació del limfòcit T via TCR, participant en l'activació dels factors NFAT i AP-1 necessaris per transcriure el gen de la IL-2 (Deckert, et al.,1998; Qu, et al.,2005). Però la seva funció queda regulada negativament tot interaccionant amb la xaperonina 14.3.3 (Foucault, et al.,2003). També s'ha descrit que intervé activament en el decurs de l'activació del limfòcit B via BCR (Foucault, et al.,2005) i del mastòcit via el receptor d'alta afinitat per la IgE (Sada, et al.,2002).

Pel què fa la cèl·lula NK, el 3BP2 potencia la citotoxicitat mediada pels receptors Fc (Jevremovic, et al.,2001). El domini PH, la regió central, on hi ha tres zones riques en prolines, tirosines i serines fosforilables i el domini SH2 intervenen en el correcte desenllaç de la resposta citotòxica. En concret, la tirosina 183, motiu d'unió per Vav-1 i la PLC γ , ha resultat crucial per activar la citotoxicitat en cèl·lules NK. Finalment, també en cèl·lules NK, el domini SH2 permet, tant la fosforilació del 3BP2 com la interacció amb LAT (Jevremovic, et al.,2001).

També s'ha descrit que Vav-1 i la PLC γ formen part del complex proteic, format durant l'activació via CD244 en la cèl·lula NK (Chen, et al.,2004; Tassi and Colonna,2005; Watzl, et al.,2000).

Els nostres resultats mostren que l'activació del CD244 comporta la fosforilació del 3BP2, característic de l'activació de l'adaptador, i una conseqüent activació i reclutament de Vav-1.

El protooncogen Vav-1 (d'expressió preferent en cèl·lules del sistema hematopoètic) actua com a factor bescanviador de nucleòtids de guanina per la família de GTPases Rho/Rac/Cdc42, les quals promouen i regulen la reorganització del citoesquelet, l'activació d'ERK i la transcripció gènica (Tybulewicz, 2005). Tots aquests processos, activats per Vav-1, estan directament implicats en la citotoxicitat mediada per la cèl·lula NK (Billadeau, et al., 1998; Chuang, et al., 2001; Wei, et al., 1998). L'activació de la cèl·lula NK implica tant la producció d'IFN γ com l'alliberació de grànuls citotòxics, responsables de la lisi cel·lular (Cooper, et al., 2001). Però, són dues funcions controlades per rutes diferents, on Vav-1 participa d'una manera dicotòmica: afecta la citotoxicitat sense modificar la producció de l'IFN γ (Colucci, et al., 2001). Les cèl·lules NK derivades de ratolins genodeficients per Vav-1, són defectives en la seva habilitat per eliminar tumors in vivo i en la citotoxicitat redirigida in vitro. Tot i així, no totes les funcions es veuen compromeses, ja que la producció d'IFN γ i l'eliminació de la infecció amb *Listeria monocytogenes*, són normals (Colucci, et al., 2001). Concordant amb aquesta observació, les dades presentades en aquesta tesi, indiquen que l'activació del CD244 comporta la fosforilació i reclutament del 3BP2, seguit de Vav-1, de l'activació d'ERK i del conseqüent increment en la citotoxicitat. En canvi, no es modifica la producció de l'IFN γ , ni la fosforilació de la MAP cinasa p38, responsable d'activar la transcripció del gen d'aquesta citocina (Dong, et al., 2002). Aquest treball reforça dades prèvies en les què es descriu, mitjançant l'ús d'inhibidors selectius de la p38 i ERK, que el CD244 controla la citotoxicitat i la producció d'IFN γ a través de dues vies diferents (Chuang, et al., 2001).

El 3BP2 incrementa la fosforilació del CD244 i l'activitat PI3K

L'activitat PI3K és primordial durant la citotoxicitat mediada per la cèl·lula NK, ja que controla l'activació de Vav-1 i Rac-1 i per tant, supedita a la seva funció, l'activació d'ERK, responsable de la polarització dels grànuls citotòxics (Jiang, et al., 2000). També

s'ha descrit que l'associació de SAP al CD244 i activació de la cèl·lula NK via aquest receptor és dependent de l'activitat PI3K. Es proposa que la subunitat p85 d'unió de la PI3K, s'associa al CD244 i que la PI3K activa, permet que el CD244 es mantingui més temps fosforilat i recluti SAP (Aoukaty and Tan,2002). A l'analitzar la cua citosòlica del CD244 humà, observarem que no hi havia motius d'interacció directa amb el domini SH2 de la p85 (Y-X-X-M). La manca d'interacció directa entre ambdues molècules la confirmarem a través del sistema de triple híbrid. Tot i així, la inhibició de l'activitat de la PI3K resulta en una menor fosforilació del CD244 i reclutament de SAP. Curiosament, però, la sobreexpressió del 3BP2 comporta una major fosforilació del CD244 i un menor efecte de la inhibició de la PI3K sobre la fosforilació del receptor i conseqüent reclutament de SAP. L'observació que hem fet respecte la major activitat de la cinasa Akt en cèl·lules que sobreexpressen el 3BP2, concorda amb el fet que l'adaptador podria estar potenciant l'activitat PI3K. Una major activitat PI3K, potenciada per la sobreexpressió del 3BP2, desemboca en un increment superior de la fosforilació d'Akt (Jiang, et al.,2000). Aquesta major activitat de la PI3K, també la podríem relacionar amb l'increment d'activat ERK i de lisi (Jiang, et al.,2000), que mostren les cèl·lules que sobreexpressen el 3BP2.

El domini ric en prolines del 3BP2 podria interaccionar amb el domini SH3 de la p85, ja que aquesta associació, segons el programa bioinformàtic *motif scanner*, és possible. D'altra banda la interacció entre el 3BP2 i la PI3K podria venir mediada per la cinasa Abl. S'ha descrit que aquesta cinasa de tirosines, interacciona tant amb el domini ric en prolines del 3BP2 (Ren, et al.,1993) com amb el domini SH2 de la p85 (Kharas and Fruman,2005). Podríem especular que l'adaptador, tot associant-se directe o indirectament amb la p85, tindria la capacitat d'aproximar més unitats catalítiques de PI3K al CD244. De qualsevol manera, queda per conèixer el mecanisme pel qual la PI3K permet major fosforilació del CD244 i més reclutament de SAP. L'activitat PI3K pròxima a la membrana i al receptor CD224, incrementa la concentració del fosfatidilinositol-3-fosfats (Aoukaty and Tan,2002). S'ha descrit que aquest lípid creen llocs d'ancoratge per proteïnes amb dominis PH i així s'integren a la membrana i a complexos senyalitzadors (Dong, et al.,2002). Durant l'activació, el 3BP2 queda integrat a membrana probablement a través del seu domini PH (Deckert, et al.,1998). L'activitat de la PI3K podria afavorir el reclutament de més molècules de 3BP2 a la membrana en contacte amb el CD244. D'altra banda, hem observat que l'adaptador

interacciona amb la cinasa Fyn, probablement a través de la regió central del 3BP2 (Deckert, et al.,1998). També interacciona amb Lck a través de la tirosina 446 (YEKV), localitzada en la regió central de l'adaptador (Qu, et al.,2005). Finalment, tal i com hem presentat, el domini SH2 del 3BP2 és reclutat al CD244 actiu. Per tant, podríem proposar que el 3BP2 acosta les cinases Fyn i Lck, ambdues responsables de fosforilar el CD244 (Chen, et al.,2004; Nakajima, et al.,2000). D'aquesta manera, la sobreexpressió del 3BP2 permetria que la inhibició de la PI3K no afectés tant l'activació del CD244 en termes de fosforilació i reclutament de SAP.

Una altra possibilitat podria ser que el 3BP2 també estigués afavorint una via independent de la PI3K. D'aquesta manera, el tractament amb la wortmanina, no aboliria per complet la funció positiva de l'adaptador i podria acostar les Src cinases al receptor CD244 per fosforilar-lo.

El següent model (figura 1) intenta integrar i resumir el mecanisme pel qual el 3BP2, tot potenciant un major reclutament de Vav i una activitat de la PI3K superior, estaria afavorint una major citotoxicitat mediada per l'activació del CD244. En canvi, ni l'activitat p38 ni la conseqüent producció d'IFN γ es veuen modificades. Durant l'activació del CD244 hi ha el reclutament de SAP, Fyn i 3BP2. SAP la representem com una molècula que afecta a ambdues vies: Citotoxicitat i IFN γ . Fyn és una Src cinasa que fosforila tant el CD244 com el 3BP2, interacciona directament amb el 3BP2 (regió rica en prolines del 3BP2 i domini SH3 de Fyn, o via el domini SH2 de Fyn amb el motiu YEKV del 3BP2) i amb SAP (Arginina 78 de SAP amb el domini SH3 de Fyn). La participació de Fyn és crucial per assegurar que la senyal via CD244 es desencadeni (Chen, et al.,2004).

Model d'acció del 3BP2 en l'activació del CD244

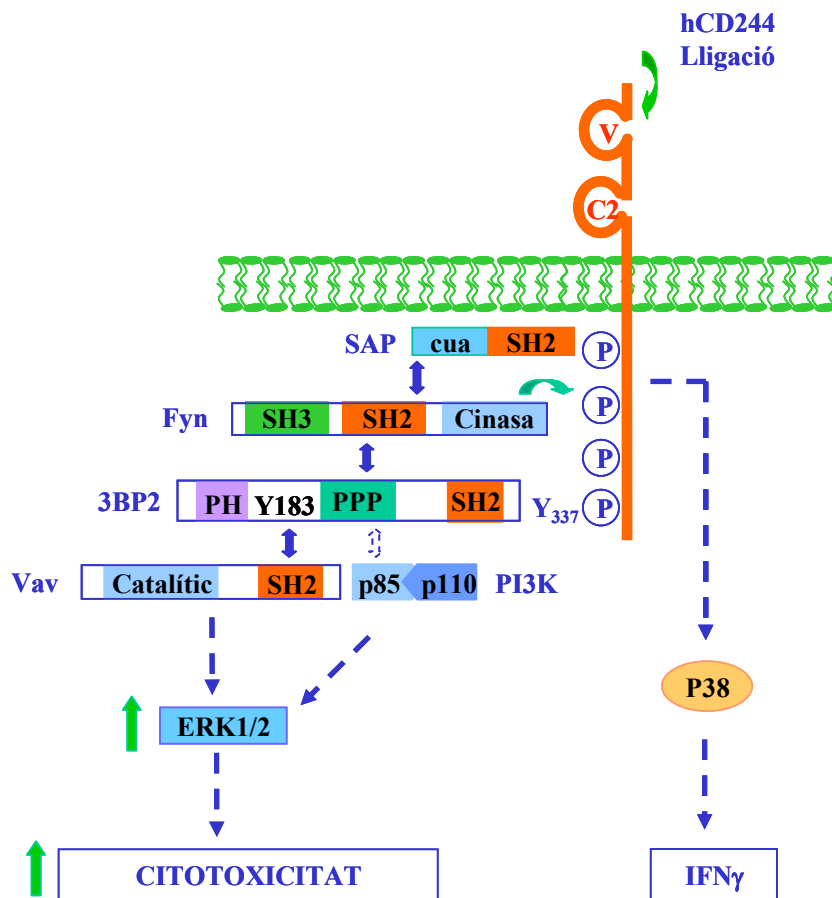


Figura 1. Model del mecanisme d'acció del 3BP2 després de l'activació del CD244 en cèl·lules NK. Després de l'activació del CD244, es fosforila la regió intracel·lular del receptor i el 3BP2 és reclutat en la tirosina 337, també SAP interacciona amb el CD244. El 3BP2 interacciona directament amb Vav, Fyn i possiblement amb la PI3K. El 3BP2 a través de Vav i de la PI3K estaria potenciant la via d'ERK i la conseqüent citotoxicitat. En canvi, el 3BP2 no participa en l'increment de la via de la p38 responsable de l'increment en l'IFN γ .

El CD244 humà interacciona amb 3BP2 i Csk

S'ha descrit que l'activació del CD244 humà, és totalment dependent de l'expressió de SAP (Tangye, et al.,2000a) (Benoit, et al.,2000). SAP és el responsable d'aproximar la cinasa Fyn necessària per activar la fosforilació del receptor (Chen, et al.,2004). Tot i que SAP és important per fosforilar el CD244, aquest adaptador només interacciona amb el receptor en condicions de fosforilació. El mecanisme pel qual el CD244 és ràpidament fosforilat seguint l'activació és encara desconegut, potser es deu a canvis conformacionals del receptor just després de la interacció amb els seu lligand natural o l'anticòs específic. Cèl·lules deficientes en SAP, són incapaces de desencadenar esdeveniments que impliquen fosforilació en tirosina de molècules efectores com Vav-1, en resposta a l'estimulació via CD244 (Chen, et al.,2004). Molt probablement davant d'aquesta situació, el 3BP2 no podria ser reclutat, el què explicaria la incapacitat d'activar les senyals mitjançades per Vav-1. Potser l'increment dels nivells del 3BP2 podria salvapassar aquest efecte inhibidor degut a la manca de SAP, ja que nosaltres hem observat que l'increment de 3BP2 va acompanyat d'un augment en la fosforilació del CD244. De moment, es desconeix com es regula l'expressió del 3BP2 en l'activació, tot i que hem mostrat que participa en l'activació del CD244.

S'ha proposat que durant els primers estadis de desenvolupament hematopètic de la cèl·lula NK humana, aquesta, no presenta receptors inhibidors, però sí activadors. Tot i així és capaç de desenvolupar tolerància pròpia, ja que el CD244 en aquest cas porta a terme una funció d'inhibició (Sivori, et al.,2002). Els mateixos autors (Sivori, et al.,2002), proposen que aquesta funció bé governada tant per la manca de SAP com per l'expressió de la fosfatasa SHP-1. En experiments portats a terme per nosaltres, hem descartat que SHP-1 participi de la inhibició per interacció directe amb el receptor. Tot i així, hi ha evidències experimentals que l'activació de la fosfatasa SHP-1 promou la desfosforilació i conseqüent inhibició del CD244 (Watzl, et al.,2000). Ja que Csk interacciona directament amb el CD244, és temptador especular que Csk pot intervenir directa i activament en la inhibició de la senyal mitjançada pel CD244, sobretot quan SAP no és present. Interessantment, cèl·lules NK derivades de pacients amb la síndrome de XLP, mostren una inhibició de la citotoxicitat en front el CD244 (Parolini, et al.,2000). Usant pèptids, també s'ha descrit la interacció entre Csk i el CD244 en el

motiu YSLI; tirosina 321 en la cua del CD244 (Eissmann, et al.,2005). Aquest motiu no s'havia descrit com a motiu consens d'interacció per Csk (Songyang, et al.,1994). De qualsevol manera, s'ha d'acabar de confirmar la interacció entre Csk i el CD244 en un sistema més fisiològic.

El CD244 murí no interacciona amb el 3BP2, però sí amb Csk

Inesperadament, el fenotip causat per la manca de CD244 en murins, ha revelat que en aquesta espècie, el CD244 és principalment un inhibidor de l'activitat NK (Lee, et al.,2004b). Tot i així encara hi ha evidències consistents de que en humans, el CD244 juga bàsicament un paper positiu (Assarsson, et al.,2005; Tangye, et al.,2000a; Tangye, et al.,2000b). Aquesta funció oposada portada a terme pel CD244, podria ser governada per diferències entre ambdues espècies. En realitat en les espècies murins, coexisteixen dues isoformes que varien en la longitud de la seva cua citosòlica i en la seva funció oposada (Schatzle, et al.,1999; Stepp, et al.,1999).

La funció inhibidora predominant del CD244 ha resultat ser independent de l'expressió de SAP i concorda amb nivells d'expressió superior de la isoforma llarga respecte la curta (Mooney, et al.,2004). S'ha proposat recentment que aquesta funció inhibidora depèn de l'associació d'EAT-2 al receptor i en concret, dues tirosines presents en l'adaptador, són responsables d'aquesta inhibició (Roncagalli, et al.,2005). S'ha descrit que la sobreexpressió d'EAT-2 va acompanyada d'una menor fosforilació seguint l'activació del CD244 (Roncagalli, et al.,2005), tot i així, es desconeix el mecanisme pel qual EAT-2 actua (Colonna,2005). En les nostres dades destaquem que el CD244 murí interacciona directament amb la cinasa inhibidora Csk i no amb l'adaptador positiu 3BP2. Seria temptador especular que la interacció o no amb el 3BP2 fos clau en la funció diferencial entre ambdues espècies. Podria ser que EAT-2 acostés Csk al receptor i aquesta cinasa col·laborés en la inhibició de la senyal.

El paper inhibidor que juga el CD244 tant en murins com en humans (quan SAP no és present) també es pot explicar pel fet que ambdós receptors coprecipiten amb la fosfatasa SHIP-1 (Bloch-Queyrat, et al.,2005; Chen, et al.,2004; Eissmann, et al.,2005). SHIP-1 desfosforila lípids prèviament fosforilats per la PI3K; per tant està intervenint

activament en la inhibició de la senyal, ja que degrada els segons missatgers generats per acció de l'activitat de la PI3K (Veillette, et al.,2002).

En el següent model (figura 2) s'intenta resumir les diferències que s'observen entre el CD244 humà i murí pel què fa el seu paper com a molècula activadora o inhibidora respectivament, de l'activitat de la cèl·lula NK: citotoxicitat i producció d'IFN γ .

Model de divergència funcional entre el CD244 murí i humà

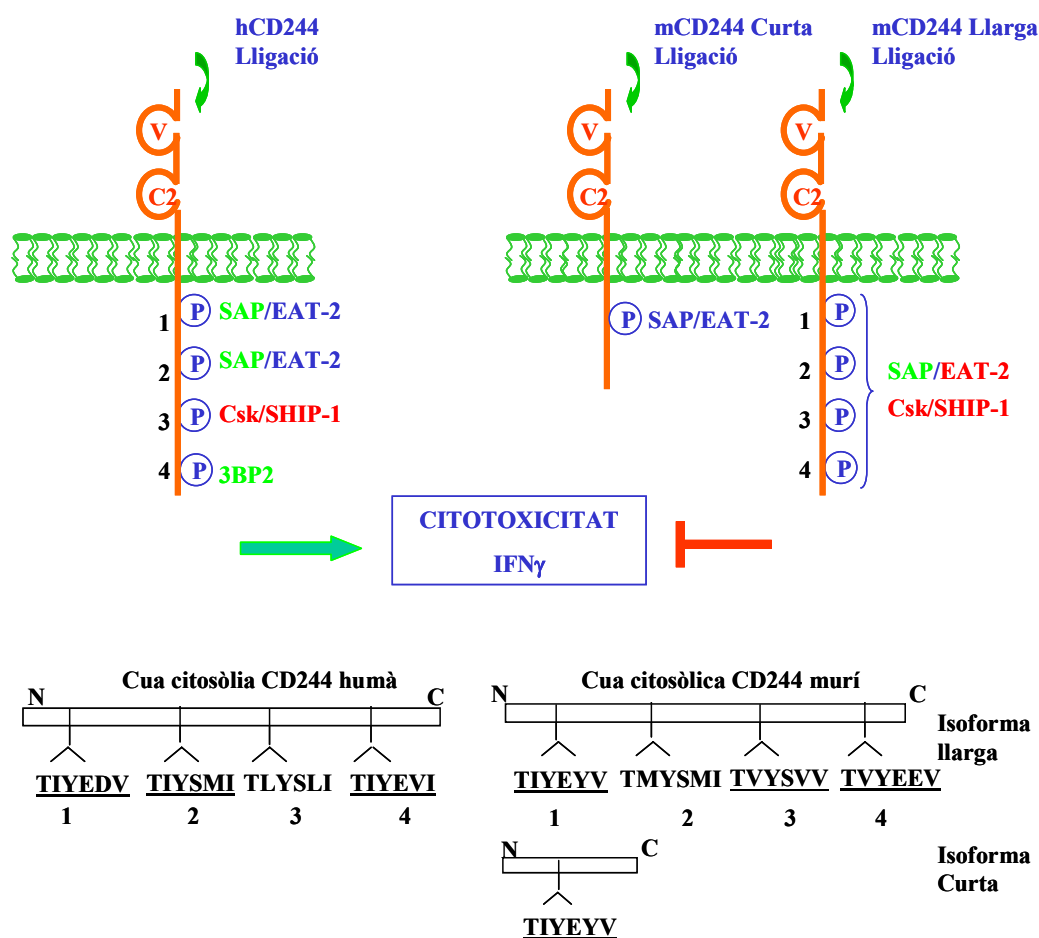


Figura 2. Model de la diferència funcional entre CD244 humà i murí. Durant l'activació del CD244 humà, les vies que s'activen comporten que la cèl·lula NK s'activi. En canvi, en l'espècie murina, l'activació del CD244 desemboca en unes senyals que provoquen la inhibició de l'activitat NK. Encara que la isoforma murina curta estigui més relacionada amb una activació, el balanç de la resposta queda governada per la inhibició mediada per la isoforma llarga. En vermell es presenten les molècules que estan relacionades amb la inhibició; en verd, les molècules positives i en blau, molècules la funció de les quals queda per concretar. També es presenten esquemàticament els motius ITSM en les cues citosòliques dels CD244 i subratllat s'indiquen els motius per SAP i EAT-2.

Funció dels altres membres d'expressió en la cèl·lula NK

Els receptors CD319 i NTB-A, comparteixen amb el CD244 la capacitat d'activar la citotoxicitat de la cèl·lula NK humana (Falco, et al.,2004; Kumaresan, et al.,2002). Encara que el CD319 presenti un motiu YENV pel 3BP2, tal interacció no es detecta. En canvi, el NTB-A ni presenta motius d'interacció pel 3BP2 (Fraser, et al.,2002). Per tant només el CD244 és capaç d'interaccionar directament amb el 3BP2.

Pel què fa SHP-1, ni el CD319 ni el NTB-A, hi estableixen interaccions directes. En canvi, el NTB-A, però no el CD319, recluta directament Csk. Pel què fa el CD319 encara no s'ha detectat una funció inhibidora; tant en presència com en absència de SAP, està actuant positivament (Bouchon, et al.,2001). Aquest paper sembla portar-lo a terme a través d'EAT-2, molècula que d'altra banda, és desplaçada del CD244 humà durant l'activació (Tassi and Colonna,2005). Per tant sembla que EAT-2 juga papers diferents en funció del receptor al què s'uneix. Si interacciona amb el CD244, en murins, aportaria mecanismes d'inhibició, encara no descrits (Roncagalli, et al.,2005). D'altra banda EAT-2 tot interaccionant amb el CD319 participaria, segurament en l'activació la cèl·lula NK (Tassi and Colonna,2005), en canvi, no s'ha pogut demostrar que en murins el CD319 interaccioni amb EAT-2 (Roncagalli, et al.,2005)

En el paper activador del NTB-A (Falco, et al.,2004), SAP ha resultat ser crucial ja que aquest receptor, mostra una funció inhibidora més que activadora en cèl·lules NK derivades de pacients amb la síndrome de XLP (Bottino, et al.,2001). En aquest mateix estudi observen que SHP-1 coprecipita amb el receptor, però la presència SAP el desplaça (Bottino, et al.,2001). Si aquesta fosfatasa és també responsable de la inhibició, no està actuant interaccionant directament amb el receptor. De qualsevol manera, Csk tot interaccionat directament amb el NTB-A durant l'activació i fosforilació per Fyn, podria directament estar relacionada amb les senyals inhibidores derivades de el NTB-A en absència de SAP. Curiosament, tot i que ja s'ha descrit el fenotip dels ratolins deficients pel Ly108 (nom que rep el NTB-A en murins), fins ara no s'ha descrit cap repercussió funcional en la cèl·lula NK, sinó que se l'associa a funcions en la cèl·lula T i eosinòfils (Howie, et al.,2005). Això es pot explicar perquè en aquesta espècie sembla que el Ly108 no s'expressa en la cèl·lula NK (Roncagalli, et al.,2005)

Totes les dades presentades i comentades, suggereixen que la senyalització desencadenada per cada un d'aquests tres membres (CD244, CD319 i NTB-A) és única i també varia entre les espècies humanes i murines. L'especificitat de la senyal radica en les molècules que s'uneix directament al receptor i amb les parelles d'unió que aquestes seleccionen. Per tant, aquestes molècules no són tan redundants pel què fa la seva funció.

El CD244 i el 3BP2 col·laboren en l'activació del limfòcit CD8⁺

Els limfòcits T CD8⁺ citotòxics, després de l'activació del TCR, augmenten els nivells de CD244 a la membrana i adquireixen la capacitat citotòxica i de producció d'IFN γ en front diferents estímuls, CD224 inclòs (Speiser, et al.,2001). L'activitat d'aquestes cèl·lules activades amb el CD244, és totalment dependent de l'expressió de SAP, ja que cèl·lules derivades de pacients amb la síndrome de XLP són incapaces de polaritzar correctament la maquinària lítica en l'àrea de contacte entre el CD244 i la cèl·lula diana (Dupre, et al.,2005; Sharifi, et al.,2004). Els fenòmens de reorganització del citoesquelet activats per Vav, són crítics a l'hora de polaritzar els grànuls de perforina i granzim B durant la resposta lítica (Billadeau, et al.,1998).

Inesperadament, observem que cèl·lules CD8⁺ acabades de produir, amb fenotip naïf, expressen prou bon nivells de CD244 com per estimular, per si sol, la reorganització del citoesquelet i que en aquest procés el 3BP2, tot interaccionat amb Vav, hi intervé positivament. Aquestes dades evidencien que el paper positiu mediat pel CD244 i el 3BP2 no són exclusius de la cèl·lula NK, sinó és un mecanisme conservat en altres cèl·lules citotòxiques, com són les CD8⁺.

El CD229 interacciona amb el 3BP2 i Csk

L'expressió del CD229 humà és la més restringida de tots els membres de la família del CD150: s'expressa selectivament en limfòcits T i B (de la Fuente, et al.,2001). Els nivells de CD229 a la membrana del limfòcit T i B, es regulen via la interacció amb l'adaptador associat a clatrina AP-2 en la tirosina 470 del receptor (Del Valle, et

al.,2003). Per altra banda, Grb-2, reclutat a la tirosina 606 durant l'activació del receptor, regula aquesta endocitosi (Martin, et al.,2005). El CD229 regula negativament les senyals d'activació d'ERK i alliberació de citocines induïda pel TCR (Martin, et al.,2005).

Les dades aportades en aquest treball indiquen que el CD229 interacciona amb el 3BP2 en la posició 606. En concordança amb el descrit fins ara, observem que en cèl·lules T Jurkat i CD8⁺, el CD229 atenua la senyal desencadenada pel TCR pel què fa l'augment d'expressió del marcador d'activació CD69 concomitant amb l'activació d'ERK (Roose, et al.,2005; Villalba, et al.,2000). La sobreexpressió del 3BP2 afecta positivament a l'activació via TCR, en sintonia amb el paper positiu del 3BP2 en limfòcits T (Deckert, et al.,1998). S'ha proposat que el 3BP2 fa de pont entre el TCR i LAT i d'aquesta manera connecta l'activació del receptor per l'antigen amb la senyalització desencadenada (Samelson,2002). El què nosaltres hem observat és que la coactivació CD3-CD229 en cèl·lules que sobreexpressen el 3BP2 presenten una menor expressió del CD69, quan les comparem amb les mateixes cèl·lules transfectades amb un vector buit. La sobreexpressió del domini SH2 del 3BP2 reverteix aquesta inhibició quasi totalment. Tot i així, la sobreexpressió del 3BP2 també incrementa l'expressió del CD69 via CD3, mentre que el dominant negatiu estaria afavorint una disminució de l'increment. Aquestes dades corroboren, el paper positiu del 3BP2 via CD3, però també posen de manifest que la sobreexpressió del 3BP2, d'alguna manera està incrementat la inhibició mediada pel CD229.

La tirosina 606 del CD229 (motiu tant per Grb-2 com per 3BP2, però no per SAP) no sembla ser la responsable de l'atenuació. La substitució d'aquesta tirosina per una fenilalanina continua regulant negativament l'activació de la cèl·lula T (Martin, et al.,2005). Els nivells de 3BP2 són baixos en les cèl·lules Jurkat, ja que el nostre anticòs contra el 3BP2 no els ha pogut detectar. En canvi, quan incrementem els nivells de 3BP2 sí que potenciem un increment en la inhibició de l'expressió del CD69 via CD3. Per tant, el 3BP2, en aquest tipus cel·lular, podria estar interaccionat amb alguna molècula inhibidora efectora que governés aquesta atenuació de la senyal. D'altra banda, Csk també interacciona amb la cua citosòlica del CD229, en un motiu diferent al 606, segons dades preliminars podria ser la tirosina 558 la responsable d'aquesta associació. Per tant, podríem especular que Csk podria participar en aquesta inhibició

parcial. Podria ser que el 3BP2 tot reclutant Fyn, augmentés la fosforilació del CD229 i d'aquesta manera, es reclutés més Csk.

El model de la figura 3, proposa el paper negatiu del 3BP2 i possiblement Csk, en la inhibició de l'activació del TCR via CD229. Aquesta inhibició s'aplicaria sobre l'activitat ERK; estretament relacionada amb l'expressió del marcador d'activació CD69 (Villalba, et al.,2000).

Model d'acció del 3BP2 i Csk en la senyalització del CD229

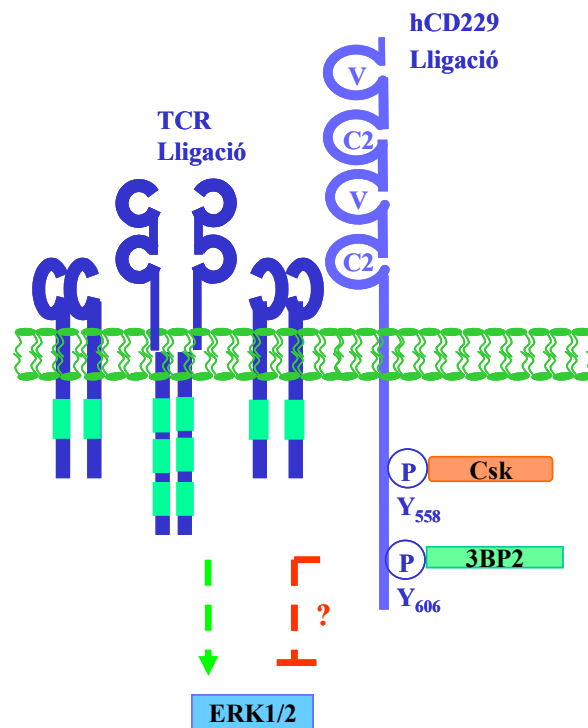


Figura 3. Model del mecanisme d'acció del 3BP2 i Csk durant la senyalització del CD229 en limfòcits T. El tractament amb anticossos específics contra el CD229, el receptor emet senyals negatives que atenuen la senyalització positiva del TCR. El 3BP2, potencia la inhibició mediada pel CD229 sobre l'activitat ERK. Csk tot interaccionat amb el CD229, també podria participar en la inhibició.

Deficiència en 3BP2

Mutacions puntuals en el gen que codifica pel 3BP2 (localitzat en el cromosoma 4p16.3) són responsables d'una malaltia autosòmica dominant anomenada querubisme (Ueki, et al.,2001). Aquesta malaltia s'associa amb una excessiva degradació dels ossos de la mandíbula superior i inferior amb formació de bosses cístiques plenes d'una massa fibrosa que conté osteoclasts i cèl·lules de l'estroma. Curiosament totes les mutacions fins ara identificades afecten tres aminoàcids localitzats entre la regió rica en Prolines i el domini SH2 del 3BP2 (Ueki, et al.,2001). En limfòcits T i B la interacció entre el 3BP2 (serina 277 prèviament fosforilada per la PKC) i la xaperonina 14.3.3, és la responsable d'atenuar la senyal positiva via TCR i BCR, ja que si s'evita aquesta interacció hi ha un increment de l'activació d'NFAT (Foucault, et al.,2003). En canvi, en mastòcits, la sobreexpressió dels mutants del querubisme, tot i que no interaccionen amb la xaperonina, afecten negativament la desgranulació del mastòcits (Miah, et al.,2004). Una possible explicació, és que la fosforilació del 3BP2 per acció de la PKC, és un mecanisme que queda per sota l'activació tant de Lyn com de la via Vav-Rac, en mastòcits. La sobreexpressió dels mutants del querubisme eviten que aquestes tres molècules efectores s'activin. Per tant, la fosforilació per part de la PKC i conseqüent interacció amb la xaperonina, poden ser, més aviat, esdeveniment secundaris. Precisament els mastòcits formen part de l'estroma present en les bosses cístiques de la mandíbula, en les persones afectades pel querubisme. Per tant una desregulació de l'activitat del mastòcits a l'hora de regular la correcta diferenciació de l'osteoclast, deu ser en part responsable, de la mala estructuració òssia (Miah, et al.,2004). Tot i que tampoc s'ha de descartar que hi hagi defectes en el propi osteoclast ja que també són de llinatge mieloide, com els mastòcits.

Encara no s'han descrit els ratolins genodeficients pel 3BP2. Tot i així, el fenotip del ratolí deficient per DAP-12 pot ajudar a entendre com seria el fenotip del ratolí deficient pel 3BP2. Tant DAP-12 com 3BP2 són molècules adaptadores amb un paper positiu en l'activitat de la cèl·lula NK i lligats a deficiències humanes que afecten al correcte desenvolupament dels osteoclasts. DAP-12 és un adaptador de tipus transmembrana amb motius ITAMs, associat a receptors activadors tant de cèl·lula NK com de llinatge mieloide (TREM) (Lanier,2001). Els ratolins deficient en DAP-12 presenten poblacions

de NK i mieloide correcte, en canvi tenen alteracions en les funcions de cèl·lules de llinatge mieloide, amb defectes en l'osteogènesi (Humphrey, et al.,2005). Tot i així, l'activació de cèl·lules NK deficients per DAP-12 són menys eficients a l'hora de lisar tumors sensibles (Lanier,2001). En humans, mutacions que comporten la pèrdua de funció de DAP-12 s'associen a una malaltia autosòmica recessiva, molt poc freqüent, anomenada síndrome d'Nasu-Hakola. Aquesta malaltia es caracteritza per defectes en els sistemes nerviós central i ossi, sense immunodeficiències aparents i amb població de NK correcte (Humphrey, et al.,2005). Es creu que la manca de greus problemes en la funció immunològica ve donada pel fet que altres adaptadors tals com FcR γ i ζ compensen la falta de DAP-12, fet que en ratolins no sembla passar (Lanier,2001) (Humphrey, et al.,2005).

Per tant el fenotip dels ratolins deficients per DAP-12 ens podrien ajudar a comprendre com serien els ratolins amb el 3BP2 eliminat. Ambdues molècules són adaptadors lligats a activitat de la cèl·lula NK i en humans la seva disfunció, va associada a defectes ossis. En humans, els defectes en el 3BP2, són degut a mutacions puntuals, per tant, probablement, encara retenen certa capacitat o activitat. En els ratolins genodeficients pel 3BP2 es perdrà totalment la proteïna i per tant, el fenotip podrà ser prou diferent, afectant un ampli rang de funcions cel·lulars.

El treball desenvolupat al llarg d'aquesta tesi, ha col·laborat en el coneixement de mecanismes moleculars i efectors, fins ara no descrits, en la senyalització dels receptors CD244 i CD229.

VI. CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1.- El receptor CD244 humà interacciona directament amb la molècula adaptadora 3BP2. La tirosina 337 del domini citosòlic del receptor, prèviament fosforilat per Fyn, és la responsable d'aquesta unió. En canvi, aquest motiu no és important pel reclutament de SAP ni EAT-2.

2.- En cèl·lules NK, durant l'activació del CD244 amb anticossos, el 3BP2 recluta Vav, augmenta l'activitat de la via d'ERK i la citotoxicitat redirigida. El 3BP2 també augmenta la fosforilació del CD244 i l'activitat de la PI3K. En canvi, no modifica l'activitat de la p38, ni la producció d'IFN γ .

3.- En limfòcits CD8⁺ l'activació del CD244 desencadena la polimerització del citoesquelet d'actina, procés afavorit pel camí de senyalització 3BP2-Vav.

4.- La interacció entre el CD244 i el 3BP2 no es conserva en l'espècie murina. En canvi, sí que es conserva el fet que tant el CD244 humà, com el murí, interaccionen directament amb la cinasa inhibidora Csk.

5.- El CD229 és l'altre membre de la família del CD150, que interacciona directament amb el 3BP2. Aquesta unió es dona en la tirosina 606 del domini citosòlic del receptor, prèviament fosforilat per Fyn. Csk també interacciona directament amb el CD229, en una posició diferent a la del 606.

6.- El 3BP2 induïx la fosforilació del CD229. En cèl·lula T, el tractament del CD229 amb anticossos específics, disminueix l'expressió del marcador d'activació CD69, induïda pel TCR. El 3BP2 potencia aquest fenomen inhibidor.

7.- El 3BP2 interacciona amb Fyn, cinasa responsable de fosforilar tant el 3BP2, com el CD244 i el CD229.

VII. BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. Aoukaty, A., and R. Tan. 2002. Association of the X-linked lymphoproliferative disease gene product SAP/SH2D1A with 2B4, a natural killer cell-activating molecule, is dependent on phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* 277:13331-13337.
2. Aoukaty, A., and R. Tan. 2005. Role for glycogen synthase kinase-3 in NK cell cytotoxicity and X-linked lymphoproliferative disease. *J Immunol* 174:4551-4558.
3. Assarsson, E., T. Kambayashi, C. M. Persson, B. J. Chambers, and H. G. Ljunggren. 2005. 2B4/CD48-mediated regulation of lymphocyte activation and function. *J Immunol* 175:2045-2049.
4. Assarsson, E., T. Kambayashi, J. D. Schatzle, S. O. Cramer, A. von Bonin, P. E. Jensen, H. G. Ljunggren, and B. J. Chambers. 2004. NK cells stimulate proliferation of T and NK cells through 2B4/CD48 interactions. *J Immunol* 173:174-180.
5. 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* 75:202-205.
6. Benoit, L., X. Wang, H. F. Pabst, J. Dutz, and R. Tan. 2000. Defective NK cell activation in X-linked lymphoproliferative disease. *J Immunol* 165:3549-3553.
7. Bhat, R., P. Eissmann, J. Endt, S. Hoffmann, and C. Watzl. 2005. Fine-tuning of immune responses by SLAM-related receptors. *J Leukoc Biol*.
8. Billadeau, D. D., K. M. Brumbaugh, C. J. Dick, R. A. Schoon, X. R. Bustelo, and P. J. Leibson. 1998. The Vav-Rac1 pathway in cytotoxic lymphocytes regulates the generation of cell-mediated killing. *J Exp Med* 188:549-559.
9. 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.
10. Bloch-Queyrat, C., M. C. Fondaneche, R. Chen, L. Yin, F. Relouzat, A. Veillette, A. Fischer, and S. Latour. 2005. Regulation of natural cytotoxicity by the adaptor SAP and the Src-related kinase Fyn. *J Exp Med* 202:181-192.
11. Boles, K. S., and P. A. Mathew. 2001. Molecular cloning of CS1, a novel human natural killer cell receptor belonging to the CD2 subset of the immunoglobulin superfamily. *Immunogenetics* 52:302-307.
12. Boles, K. S., S. E. Stepp, M. Bennett, V. Kumar, and P. A. Mathew. 2001. 2B4 (CD244) and CS1: novel members of the CD2 subset of the immunoglobulin superfamily molecules expressed on natural killer cells and other leukocytes. *Immunol Rev* 181:234-249.
13. Boles, K. S., H. Nakajima, M. Colonna, S. S. Chuang, S. E. Stepp, M. Bennett, V. Kumar, and P. A. Mathew. 1999. Molecular characterization of a novel human natural killer cell receptor homologous to mouse 2B4. *Tissue Antigens* 54:27-34.
14. Borowski, C., and A. Bendelac. 2005. Signaling for NKT cell development: the SAP-FynT connection. *J Exp Med* 201:833-836.
15. 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.
16. 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.
 17. Bouchon, A., M. Cella, H. L. Grierson, J. I. Cohen, and M. Colonna. 2001. Activation of NK cell-mediated cytotoxicity by a SAP-independent receptor of the CD2 family. *J Immunol* 167:5517-5521.
 18. Bromley, S. K., W. R. Burack, K. G. Johnson, K. Somersalo, T. N. Sims, C. Sumen, M. M. Davis, A. S. Shaw, P. M. Allen, and M. L. Dustin. 2001. The immunological synapse. *Annu Rev Immunol* 19:375-396.
 19. 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.
 20. Caloca, M. J., J. L. Zugaza, D. Matallanas, P. Crespo, and X. R. Bustelo. 2003. Vav mediates Ras stimulation by direct activation of the GDP/GTP exchange factor Ras GRP1. *Embo J* 22:3326-3336.
 21. Calpe, S., E. Erdos, G. Liao, N. Wang, S. Rietdijk, M. Simarro, B. Scholtz, J. Mooney, C. H. Lee, M. S. Shin, E. Rajnavolgyi, J. Schatzle, H. C. Morse, 3rd, C. Terhorst, and A. Lanyi. 2006. Identification and characterization of two related murine genes, Eat2a and Eat2b, encoding single SH2-domain adapters. *Immunogenetics*:1-11.
 22. Cannons, J. L., L. J. Yu, B. Hill, L. A. Mijares, D. Dombroski, K. E. Nichols, A. Antonellis, G. A. Koretzky, K. Gardner, and P. L. Schwartzberg. 2004. SAP regulates T(H)2 differentiation and PKC-theta-mediated activation of NF-kappaB1. *Immunity* 21:693-706.
 23. 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.
 24. 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.
 25. Chen, G., A. K. Tai, M. Lin, F. Chang, C. Terhorst, and B. T. Huber. 2005. Signaling lymphocyte activation molecule-associated protein is a negative regulator of the CD8 T cell response in mice. *J Immunol* 175:2212-2218.
 26. Chen, R., F. Relouzat, R. Roncagalli, A. Aoukaty, R. Tan, S. Latour, and A. Veillette. 2004. Molecular dissection of 2B4 signaling: implications for signal transduction by SLAM-related receptors. *Mol Cell Biol* 24:5144-5156.
 27. Chiesa, S., E. Tomasello, E. Vivier, and F. Vely. 2005. Coordination of activating and inhibitory signals in natural killer cells. *Mol Immunol* 42:477-484.
 28. Chuang, S. S., P. R. Kumaresan, and P. A. Mathew. 2001. 2B4 (CD244)-mediated activation of cytotoxicity and IFN-gamma release in human NK cells involves distinct pathways. *J Immunol* 167:6210-6216.

29. 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.
30. Chuang, S. S., M. H. Kim, L. A. Johnson, P. Albertsson, R. P. Kitson, U. Nannmark, R. H. Goldfarb, and P. A. Mathew. 2000. 2B4 stimulation of YT cells induces natural killer cell cytolytic function and invasiveness. *Immunology* 100:378-383.
31. Chung, B., A. Aoukaty, J. Dutz, C. Terhorst, and R. Tan. 2005. Signaling lymphocytic activation molecule-associated protein controls NKT cell functions. *J Immunol* 174:3153-3157.
32. 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.
33. Coffey, A. J., R. A. Brooksbank, O. Brandau, T. Ohashi, 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 et al. 1998. Host response to EBV infection in X-linked lymphoproliferative disease results from mutations in an SH2-domain encoding gene. *Nat Genet* 20:129-135.
34. Colonna, M. 2005. Fine-tuning NK cell responses: it's a family affair. *Nat Immunol* 6:961-962.
35. 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. *J Exp Med* 193:1413-1424.
36. Cooper, M. A., T. A. Fehniger, and M. A. Caligiuri. 2001. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 22:633-640.
37. 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.
38. 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.
39. Davidson, D., X. Shi, S. Zhang, H. Wang, M. Nemer, N. Ono, S. 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.
40. 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.
41. 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.
42. 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.

43. Deane, J. A., and D. A. Fruman. 2004. Phosphoinositide 3-kinase: diverse roles in immune cell activation. *Annu Rev Immunol* 22:563-598.
44. Deckert, M., S. Tartare-Deckert, J. Hernandez, R. Rottapel, and A. Altman. 1998. Adaptor function for the Syk kinases-interacting protein 3BP2 in IL-2 gene activation. *Immunity* 9:595-605.
45. 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.
46. Dong, C., R. J. Davis, and R. A. Flavell. 2002. MAP Kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol* 20:55-72.
47. Dupre, L., G. Andolfi, S. G. Tangye, R. Clementi, F. Locatelli, M. Arico, A. Aiuti, and M. G. Roncarolo. 2005. SAP controls the cytolytic activity of CD8+ T cells against EBV-infected cells. *Blood* 105:4383-4389.
48. Eissmann, P., L. Beauchamp, J. Wooters, J. C. Tilton, E. O. Long, and C. Watzl. 2005. Molecular basis for positive and negative signaling by the natural killer cell receptor 2B4 (CD244). *Blood* 105:4722-4729.
49. 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.
50. Facchetti, F., J. K. Chan, W. Zhang, A. Tironi, M. Chilosi, S. Parolini, L. D. Notarangelo, and L. E. Samelson. 1999. Linker for activation of T cells (LAT), a novel immunohistochemical marker for T cells, NK cells, mast cells, and megakaryocytes: evaluation in normal and pathological conditions. *Am J Pathol* 154:1037-1046.
51. 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.
52. Fennelly, J. A., B. Tiwari, S. J. Davis, and E. J. Evans. 2001. CD2F-10: a new member of the CD2 subset of the immunoglobulin superfamily. *Immunogenetics* 53:599-602.
53. Finco, T. S., T. Kadlecsek, W. Zhang, L. E. Samelson, and A. Weiss. 1998. LAT is required for TCR-mediated activation of PLCgamma1 and the Ras pathway. *Immunity* 9:617-626.
54. Fisher, R. C., and D. A. Thorley-Lawson. 1991. Characterization of the Epstein-Barr virus-inducible gene encoding the human leukocyte adhesion and activation antigen BLAST-1 (CD48). *Mol Cell Biol* 11:1614-1623.
55. Flaig, R. M., S. Stark, and C. Watzl. 2004. Cutting edge: NTB-A activates NK cells via homophilic interaction. *J Immunol* 172:6524-6527.
56. Foucault, I., Y. C. Liu, A. Bernard, and M. Deckert. 2003. The chaperone protein 14-3-3 interacts with 3BP2/SH3BP2 and regulates its adapter function. *J Biol Chem* 278:7146-7153.
57. Foucault, I., S. Le Bras, C. Charvet, C. Moon, A. Altman, and M. Deckert. 2005. The adaptor protein 3BP2 associates with VAV guanine nucleotide exchange factors to regulate NFAT activation by the B-cell antigen receptor. *Blood* 105:1106-1113.
58. 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.

59. Fruman, D. A. 2004. Phosphoinositide 3-kinase and its targets in B-cell and T-cell signaling. *Curr Opin Immunol* 16:314-320.
60. Gao, N., T. Dang, W. A. Dunnick, J. T. Collins, B. R. Blazar, and D. Yuan. 2005. Receptors and counterreceptors involved in NK-B cell interactions. *J Immunol* 174:4113-4119.
61. Garnett, D., A. N. Barclay, A. M. Carmo, and A. D. Beyers. 1993. The association of the protein tyrosine kinases p56lck and p60fyn with the glycosyl phosphatidylinositol-anchored proteins Thy-1 and CD48 in rat thymocytes is dependent on the state of cellular activation. *Eur J Immunol* 23:2540-2544.
62. 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.
63. Gonzalez-Cabrero, J., C. J. Wise, Y. Latchman, G. J. Freeman, A. H. Sharpe, and H. Reiser. 1999. CD48-deficient mice have a pronounced defect in CD4(+) T cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:1019-1023.
64. Graham, D. B., M. P. Bell, M. M. McCausland, C. J. Huntoon, J. van Deursen, W. A. Faubion, S. Crotty, and D. J. McKean. 2006. Ly9 (CD229)-deficient mice exhibit T cell defects yet do not share several phenotypic characteristics associated with SLAM- and SAP-deficient mice. *J Immunol* 176:291-300.
65. Henning, G., M. S. Kraft, T. Derfuss, R. Pirzer, G. de Saint-Basile, G. Aversa, B. Fleckenstein, and E. Mehl. 2001. Signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) regulates T cellular cytotoxicity. *Eur J Immunol* 31:2741-2750.
66. Horejsi, V. 2004. Transmembrane adaptor proteins in membrane microdomains: important regulators of immunoreceptor signaling. *Immunol Lett* 92:43-49.
67. Hornstein, I., A. Alcover, and S. Katzav. 2004. Vav proteins, masters of the world of cytoskeleton organization. *Cell Signal* 16:1-11.
68. Howie, D., F. S. Laroux, M. Morra, A. R. Satoskar, L. E. Rosas, W. A. Faubion, A. Julien, S. Rietdijk, A. J. Coyle, C. Fraser, and C. Terhorst. 2005. Cutting edge: the SLAM family receptor Ly108 controls T cell and neutrophil functions. *J Immunol* 174:5931-5935.
69. Howie, D., S. Okamoto, S. Rietdijk, K. Clarke, N. Wang, C. Gullo, J. P. Bruggeman, S. Manning, A. J. Coyle, E. Greenfield, V. Kuchroo, and C. Terhorst. 2002. The role of SAP in murine CD150 (SLAM)-mediated T-cell proliferation and interferon gamma production. *Blood* 100:2899-2907.
70. Hron, J. D., L. Caplan, A. J. Gerth, P. L. Schwartzberg, and S. L. Peng. 2004. SH2D1A regulates T-dependent humoral autoimmunity. *J Exp Med* 200:261-266.
71. Humphrey, M. B., L. L. Lanier, and M. C. Nakamura. 2005. Role of ITAM-containing adapter proteins and their receptors in the immune system and bone. *Immunol Rev* 208:50-65.
72. Janssen, E., and W. Zhang. 2003. Adaptor proteins in lymphocyte activation. *Curr Opin Immunol* 15:269-276.
73. Jevremovic, D., D. D. Billadeau, R. A. Schoon, C. J. Dick, and P. J. Leibson. 2001. Regulation of NK cell-mediated cytotoxicity by the adaptor protein 3BP2. *J Immunol* 166:7219-7228.
74. Jevremovic, D., D. D. Billadeau, R. A. Schoon, C. J. Dick, B. J. Irvin, W. Zhang, L. E. Samelson, R. T. Abraham, and P. J. Leibson. 1999. Cutting edge: a role for the adaptor protein LAT in human NK cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol* 162:2453-2456.

75. Jiang, K., B. Zhong, D. L. Gilvary, B. C. Corliss, E. Hong-Geller, S. Wei, and J. Y. Djeu. 2000. Pivotal role of phosphoinositide-3 kinase in regulation of cytotoxicity in natural killer cells. *Nat Immunol* 1:419-425.
76. Kambayashi, T., E. Assarsson, B. J. Chambers, and H. G. Ljunggren. 2001. Cutting edge: Regulation of CD8(+) T cell proliferation by 2B4/CD48 interactions. *J Immunol* 167:6706-6710.
77. Kharas, M. G., and D. A. Fruman. 2005. ABL oncogenes and phosphoinositide 3-kinase: mechanism of activation and downstream effectors. *Cancer Res* 65:2047-2053.
78. Kiel, M. J., O. H. Yilmaz, T. Iwashita, C. Terhorst, and S. J. Morrison. 2005. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* 121:1109-1121.
79. 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. Villeval. 2001. Cloning, expression, and function of BLAME, a novel member of the CD2 family. *J Immunol* 166:5675-5680.
80. 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.
81. Koretzky, G. A., and P. S. Myung. 2001. Positive and negative regulation of T-cell activation by adaptor proteins. *Nat Rev Immunol* 1:95-107.
82. 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 [In Process Citation]. *Eur J Immunol* 29:3466-3477.
83. 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.
84. Lanier, L. L. 2001. On guard--activating NK cell receptors. *Nat Immunol* 2:23-27.
85. Lanier, L. L. 2005. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* 23:225-274.
86. 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.
87. Latour, S., and A. Veillette. 2004. The SAP family of adaptors in immune regulation. *Semin Immunol* 16:409-419.
88. 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.
89. 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.
90. Lee, J. K., K. S. Boles, and P. A. Mathew. 2004a. Molecular and functional characterization of a CS1 (CRACC) splice variant expressed in human NK cells that does not contain immunoreceptor tyrosine-based switch motifs. *Eur J Immunol* 34:2791-2799.
91. 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.
92. Lee, K. M., M. E. McNerney, S. E. Stepp, P. A. Mathew, J. D. Schatzle, M. Bennett, and V. Kumar. 2004b. 2B4 Acts As a Non-Major Histocompatibility Complex Binding Inhibitory Receptor on Mouse Natural Killer Cells. *J Exp Med* 199:1245-1254.
93. Lee, K. M., J. P. Forman, M. E. McNerney, S. Stepp, S. Kuppireddi, D. Guzikor, Y. E. Latchman, M. H. Sayegh, H. Yagita, C. K. Park, S. B. Oh, C. Wulfig, J. Schatzle, P. A. Mathew, A. H. Sharpe, and V. Kumar. 2005. Requirement of homotypic NK cell interactions through 2B4(CD244)/CD48 in the generation of NK effector functions. *Blood*.
94. Li, C., C. Iosef, C. Y. Jia, V. K. Han, and S. S. Li. 2003. Dual functional roles for the X-linked lymphoproliferative syndrome gene product SAP/SH2D1A in signaling through the signaling lymphocyte activation molecule (SLAM) family of immune receptors. *J Biol Chem* 278:3852-3859.
95. Lindquist, J. A., L. Simeoni, and B. Schraven. 2003. Transmembrane adapters: attractants for cytoplasmic effectors. *Immunol Rev* 191:165-182.
96. Ma, C. S., N. J. Hare, K. E. Nichols, L. Dupre, G. Andolfi, M. G. Roncarolo, S. Adelstein, P. D. Hodgkin, and S. G. Tangye. 2005. Impaired humoral immunity in X-linked lymphoproliferative disease is associated with defective IL-10 production by CD4⁺ T cells. *J Clin Invest* 115:1049-1059.
97. Maeno, K., K. Sada, S. Kyo, S. M. Miah, K. Kawauchi-Kamata, X. Qu, Y. Shi, and H. Yamamura. 2003. Adaptor protein 3BP2 is a potential ligand of Src homology 2 and 3 domains of Lyn protein-tyrosine kinase. *J Biol Chem* 278:24912-24920.
98. Malissen, B., E. Aguado, and M. Malissen. 2005. Role of the LAT adaptor in T-cell development and Th2 differentiation. *Adv Immunol* 87:1-25.
99. Martin, M., J. M. Del Valle, I. Saborit, and P. Engel. 2005. Identification of Grb2 as a novel binding partner of the signaling lymphocyte activation molecule-associated protein binding receptor CD229. *J Immunol* 174:5977-5986.
100. 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.
101. Massaguer, 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* 56:117-128.
102. 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 lymphocyte activation molecule (SLAM, CDw150) is homophilic but self-associates with very low affinity. *J Biol Chem* 275:28100-28109.
103. McNerney, M. E., K. M. Lee, and V. Kumar. 2005. 2B4 (CD244) is a non-MHC binding receptor with multiple functions on natural killer cells and CD8⁺ T cells. *Mol Immunol* 42:489-494.
104. Messmer, B., P. Eissmann, S. Stark, and C. Watzl. 2006. CD48 Stimulation by 2B4 (CD244)-Expressing Targets Activates Human NK Cells. *J Immunol* 176:4646-4650.

105. Miah, S. M., T. Hatani, X. Qu, H. Yamamura, and K. Sada. 2004. Point mutations of 3BP2 identified in human-inherited disease cherubism result in the loss of function. *Genes Cells* 9:993-1004.
106. Mikhalap, S. V., L. M. Shlapatska, A. G. Berdova, C. L. Law, E. A. Clark, and S. P. Sidorenko. 1999. CDw150 associates with src-homology 2-containing inositol phosphatase and modulates CD95-mediated apoptosis. *J Immunol* 162:5719-5727.
107. 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.
108. 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. *J Immunol* 173:3953-3961.
109. Moran, M., and M. C. Miceli. 1998. Engagement of GPI-linked CD48 contributes to TCR signals and cytoskeletal reorganization: a role for lipid rafts in T cell activation. *Immunity* 9:787-796.
110. Morra, M., D. Howie, M. S. Grande, J. Sayos, N. Wang, C. Wu, P. Engel, and C. Terhorst. 2001a. X-LINKED LYMPHOPROLIFERATIVE DISEASE: A Progressive Immunodeficiency. *Annu Rev Immunol* 19:657-682.
111. 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. 2001b. Characterization of SH2D1A missense mutations identified in X-linked lymphoproliferative disease patients. *J Biol Chem* 276:36809-36816.
112. 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. 2001c. Structural basis for the interaction of the free SH2 domain EAT-2 with SLAM receptors in hematopoietic cells. *EMBO J.* 20:5840-5852.
113. Morra, M., R. A. Barrington, A. C. Abadia-Molina, S. Okamoto, A. Julien, C. Gullo, A. Kalsy, M. J. Edwards, G. Chen, R. Spolski, W. J. Leonard, B. T. Huber, P. Borrow, C. A. Biron, A. R. Satoskar, M. C. Carroll, and C. Terhorst. 2005. Defective B cell responses in the absence of SH2D1A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:4819-4823.
114. Nakajima, H., and M. Colonna. 2000. 2B4: an NK cell activating receptor with unique specificity and signal transduction mechanism. *Hum Immunol* 61:39-43.
115. 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.
116. 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.
117. Nanda, N., P. Andre, M. Bao, K. Clauser, F. Deguzman, D. Howie, P. B. Conley, C. Terhorst, and D. R. Phillips. 2005. Platelet aggregation induces platelet aggregate stability via SLAM family receptor signaling. *Blood* 106:3028-3034.
118. Nichols, K. E., G. A. Koretzky, and C. H. June. 2001. SAP: natural inhibitor or grand SLAM of T cell activation? *Nat Immunol* 2:665-666.

119. Nichols, K. E., C. S. Ma, J. L. Cannons, P. L. Schwartzberg, and S. G. Tangye. 2005a. Molecular and cellular pathogenesis of X-linked lymphoproliferative disease. *Immunol Rev* 203:180-199.
120. Nichols, K. E., J. Hom, S. Y. Gong, A. Ganguly, C. S. Ma, J. L. Cannons, S. G. Tangye, P. L. Schwartzberg, G. A. Koretzky, and P. L. Stein. 2005b. Regulation of NKT cell development by SAP, the protein defective in XLP. *Nat Med* 11:340-345.
121. 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.
122. Oya, K., J. Wang, Y. Watanabe, R. Koga, and T. Watanabe. 2003. Appearance of the LAT protein at an early stage of B-cell development and its possible role. *Immunology* 109:351-359.
123. 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.
124. Pasquier, B., L. Yin, M. C. Fondaneche, F. Relouzat, C. Bloch-Queyrat, N. Lambert, A. Fischer, G. de Saint-Basile, and S. Latour. 2005. Defective NKT cell development in mice and humans lacking the adapter SAP, the X-linked lymphoproliferative syndrome gene product. *J Exp Med* 201:695-701.
125. Peck, S. R., and H. E. Ruley. 2000. Ly108: a new member of the mouse CD2 family of cell surface proteins. *Immunogenetics* 52:63-72.
126. Peterson, E. J., J. L. Clements, Z. K. Ballas, and G. A. Koretzky. 1999. NK cytokine secretion and cytotoxicity occur independently of the SLP-76 adaptor protein. *Eur J Immunol* 29:2223-2232.
127. 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.
128. Punnonen, J., B. Cocks, J. Carballido, B. Bennett, D. Peterson, G. Aversa, and J. de Vries. 1997. Soluble and membrane-bound forms of signaling lymphocytic activation. *J Exp Med* 185:993-1004.
129. Qu, X., K. Kawauchi-Kamata, S. M. Miah, T. Hatani, H. Yamamura, and K. Sada. 2005. Tyrosine phosphorylation of adaptor protein 3BP2 induces T cell receptor-mediated activation of transcription factor. *Biochemistry* 44:3891-3898.
130. Ren, R., B. J. Mayer, P. Cicchetti, and D. Baltimore. 1993. Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site. *Science* 259:1157-1161.
131. Rethi, B., P. Gogolak, I. Szatmari, A. Veres, E. Erdos, L. Nagy, E. Rajnavolgyi, C. Terhorst, and A. Lanyi. 2005. SLAM/SLAM interactions inhibit CD40-induced production of inflammatory cytokines in monocyte derived dendritic cells. *Blood*.
132. Reynolds, L. F., C. de Bettignies, T. Norton, A. Beeser, J. Chernoff, and V. L. Tybulewicz. 2004. Vav1 transduces T cell receptor signals to the activation of

- the Ras/ERK pathway via LAT, Sos, and RasGRP1. *J Biol Chem* 279:18239-18246.
133. 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.
 134. 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.
 135. Romero, X., N. Zapater, M. Calvo, S. G. Kalko, M. A. de la Fuente, V. Tovar, C. Ockeloen, P. Pizcueta, and P. Engel. 2005. CD229 (Ly9) lymphocyte cell surface receptor interacts homophilically through its N-terminal domain and relocates to the immunological synapse. *J Immunol* 174:7033-7042.
 136. Roncagalli, R., J. E. Taylor, S. Zhang, X. Shi, R. Chen, M. E. Cruz-Munoz, L. Yin, S. Latour, and A. Veillette. 2005. Negative regulation of natural killer cell function by EAT-2, a SAP-related adaptor. *Nat Immunol*.
 137. Roose, J. P., M. Mollenauer, V. A. Gupta, J. Stone, and A. Weiss. 2005. A diacylglycerol-protein kinase C-RasGRP1 pathway directs Ras activation upon antigen receptor stimulation of T cells. *Mol Cell Biol* 25:4426-4441.
 138. Sada, K., S. M. Miah, K. Maeno, S. Kyo, X. Qu, and H. Yamamura. 2002. Regulation of FcepsilonRI-mediated degranulation by an adaptor protein 3BP2 in rat basophilic leukemia RBL-2H3 cells. *Blood* 100:2138-2144.
 139. Samelson, L. E. 2002. Signal transduction mediated by the T cell antigen receptor: the role of adapter proteins. *Annu Rev Immunol* 20:371-394.
 140. 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.
 141. 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.
 142. 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.
 143. 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.
 144. 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. *J Invest Dermatol* 105:592-596.
 145. Sharifi, R., J. C. Sinclair, K. C. Gilmour, P. D. Arkwright, C. Kinnon, A. J. Thrasher, and H. B. Gaspar. 2004. SAP mediates specific cytotoxic T-cell functions in X-linked lymphoproliferative disease. *Blood* 103:3821-3827.

146. 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.
147. Sidorenko, S. P., and E. A. Clark. 2003. The dual-function CD150 receptor subfamily: the viral attraction. *Nature Immunology* 4:19-24.
148. 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.
149. 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.
150. 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.
151. Smith, G. M., J. Biggs, B. Norris, P. Anderson-Stewart, and R. Ward. 1997. Detection of a soluble form of the leukocyte surface antigen CD48 in plasma and its elevation in patients with lymphoid leukemias and arthritis. *J Clin Immunol* 17:502-509.
152. Songyang, Z., S. E. Shoelson, J. McGlade, P. Olivier, T. Pawson, X. R. Bustelo, M. Barbacid, H. Sabe, H. Hanafusa, T. Yi, and et al. 1994. Specific motifs recognized by the SH2 domains of Csk, 3BP2, fps/fes, GRB-2, HCP, SHC, Syk, and Vav. *Mol Cell Biol* 14:2777-2785.
153. 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+ effector alpha beta T cells. *J Immunol* 167:6165-6170.
154. Stark, S., and C. Watzl. 2006. 2B4 (CD244), NTB-A and CRACC (CS1) stimulate cytotoxicity but no proliferation in human NK cells. *Int Immunol*.
155. Stefanova, I., V. Horejsi, I. J. Ansotegui, W. Knapp, and H. Stockinger. 1991. GPI-anchored cell-surface molecules complexed to protein tyrosine kinases. *Science* 254:1016-1019.
156. 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.
157. Sun, H., J. C. Biggs, and G. M. Smith. 2000. Antitumour activity of a chimeric antibody against the leucocyte antigen CD48. *Cancer Immunol Immunother* 48:595-602.
158. 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 p62dok (Dok1) and activates NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:7470-7475.
159. Tangye, S. G., J. H. Phillips, L. L. Lanier, and K. E. Nichols. 2000a. Functional requirement for SAP in 2B4-mediated activation of human natural killer cells as revealed by the X-linked lymphoproliferative syndrome. *J. Immunology* 165:2932-2936.
160. Tangye, S. G., H. Cherwinski, L. L. Lanier, and J. H. Phillips. 2000b. 2B4-mediated activation of human natural killer cells. *Mol Immunol* 37:493-501.

161. 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.
162. Tangye, S. G., K. E. Nichols, N. J. Hare, and B. C. van de Weerd. 2003. Functional requirements for interactions between CD84 and Src homology 2 domain-containing proteins and their contribution to human T cell activation. *J Immunol* 171:2485-2495.
163. 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.
164. Tassi, I., and M. Colonna. 2005. The cytotoxicity receptor CRACC (CS-1) recruits EAT-2 and activates the PI3K and phospholipase Cgamma signaling pathways in human NK cells. *J Immunol* 175:7996-8002.
165. Tatsuo, H., N. Ono, K. Tanaka, and Y. Yanagi. 2000. SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature* 406:893-897.
166. Thompson, A. D., B. S. Braun, A. Arvand, S. D. Stewart, W. A. May, E. Chen, J. Korenberg, and C. Denny. 1996. EAT-2 is a novel SH2 domain containing protein that is up regulated by Ewing's sarcoma EWS/FLI1 fusion gene. *Oncogene* 13:2649-2658.
167. Togni, M., J. Lindquist, A. Gerber, U. Kolsch, A. Hamm-Baarke, S. Kliche, and B. Schraven. 2004. The role of adaptor proteins in lymphocyte activation. *Mol Immunol* 41:615-630.
168. 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.
169. 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.
170. Tybulewicz, V. L. 2005. Vav-family proteins in T-cell signalling. *Curr Opin Immunol* 17:267-274.
171. Ueki, Y., V. Tiziani, C. Santanna, N. Fukai, C. Maulik, J. Garfinkle, C. Ninomiya, C. doAmaral, H. Peters, M. Habal, L. Rhee-Morris, J. B. Doss, S. Kreiborg, B. R. Olsen, and E. Reichenberger. 2001. Mutations in the gene encoding c-Abl-binding protein SH3BP2 cause cherubism. *Nat Genet* 28:125-126.
172. Vaidya, S. V., S. E. Stepp, M. E. McNerney, J. K. Lee, M. Bennett, K. M. Lee, C. L. Stewart, V. Kumar, and P. A. Mathew. 2005. Targeted disruption of the 2B4 gene in mice reveals an in vivo role of 2B4 (CD244) in the rejection of B16 melanoma cells. *J Immunol* 174:800-807.
173. Valdez, P. A., H. Wang, D. Seshasayee, M. van Lookeren Campagne, A. Gurney, W. P. Lee, and I. S. Grewal. 2004. NTB-A, a new activating receptor in T cells that regulates autoimmune disease. *J Biol Chem* 279:18662-18669.
174. 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.
175. Veillette, A. 2004a. SLAM Family Receptors Regulate Immunity with and without SAP-related Adaptors. *J Exp Med* 199:1175-1178.

176. Veillette, A. 2004b. Specialised adaptors in immune cells. *Curr Opin Cell Biol* 16:146-155.
177. Veillette, A. 2006. Immune regulation by SLAM family receptors and SAP-related adaptors. *Nat Rev Immunol* 6:56-66.
178. Veillette, A., S. Latour, and D. Davidson. 2002. Negative regulation of immunoreceptor signaling. *Annu Rev Immunol* 20:669-707.
179. Villalba, M., J. Hernandez, M. Deckert, Y. Tanaka, and A. Altman. 2000. Vav modulation of the Ras/MEK/ERK signaling pathway plays a role in NFAT activation and CD69 up-regulation. *Eur J Immunol* 30:1587-1596.
180. 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.
181. 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.
182. 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.
183. Wei, S., A. M. Gamero, J. H. Liu, A. A. Daulton, N. I. Valkov, J. A. Trapani, A. C. Lerner, M. J. Weber, and J. Y. Djeu. 1998. Control of lytic function by mitogen-activated protein kinase/extracellular regulatory kinase 2 (ERK2) in a human natural killer cell line: identification of perforin and granzyme B mobilization by functional ERK2. *J Exp Med* 187:1753-1765.
184. Welch, H. C., W. J. Coadwell, L. R. Stephens, and P. T. Hawkins. 2003. Phosphoinositide 3-kinase-dependent activation of Rac. *FEBS Lett* 546:93-97.
185. 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.
186. Wu, C., K. B. Nguyen, G. C. Pien, W. N., C. Gullo, D. Howie, M. Rodriguez-Sosa, M. J. Edwards, P. Borrow, S. A.R., A. H. Sharpe, C. A. Biron, and C. Terhorst. 2001. SAP controls T cell responses to virus and terminal differentiation of Th2 cells. *Nature Immunology* 2:410-414.
187. Yamasaki, S., and T. Saito. 2004. Inhibitory adaptors in lymphocytes. *Semin Immunol* 16:421-427.
188. Yilmaz, O. H., M. J. Kiel, and S. J. Morrison. 2006. SLAM family markers are conserved among hematopoietic stem cells from old and reconstituted mice and markedly increase their purity. *Blood* 107:924-930.
189. Zakaria, S., T. S. Gomez, D. N. Savoy, S. McAdam, M. Turner, R. T. Abraham, and D. D. Billadeau. 2004. Differential regulation of TCR-mediated gene transcription by Vav family members. *J Exp Med* 199:429-434.
190. Zhang, W., J. Sloan-Lancaster, J. Kitchen, R. P. Tribble, and L. E. Samelson. 1998. LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. *Cell* 92:83-92.
191. 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.
192. Zhang, W., C. L. Sommers, D. N. Burshtyn, C. C. Stebbins, J. B. DeJarnette, R. P. Tribble, A. Grinberg, H. C. Tsay, H. M. Jacobs, C. M. Kessler, E. O. Long, P.

E. Love, and L. E. Samelson. 1999. Essential role of LAT in T cell development. *Immunity* 10:323-332.

VIII. ANNEX

The Adaptor Protein 3BP2 Binds Human CD244 and Links this Receptor to Vav Signaling, ERK Activation, and NK Cell Killing¹

Ifigènia Saborit-Villarroya,* Juana M. Del Valle,* Xavier Romero,* Enric Esplugues,[†] Pilar Lauzurica,[‡] Pablo Engel,* and Margarita Martín^{2*}

Adaptor proteins, molecules that mediate intermolecular interactions, are crucial for cellular activation. The adaptor 3BP2 has been shown to positively regulate NK cell-mediated cytotoxicity. In this study we present evidence for a physical interaction between 3BP2 and the CD244 receptor. CD244, a member of the CD150 family, is a cell surface protein expressed on NK, CD8⁺ T, and myeloid cells. CD244 interacts via its Src homology 2 domain with the X-linked lymphoproliferative disease gene product signaling lymphocytic activation molecule-associated protein (SAP)/SH2 domain protein 1A. 3BP2 interacts with human but not murine CD244. CD244-3BP2 interaction was direct and regulated by phosphorylation, as shown by a three-hybrid analysis in yeast and NK cells. Tyr³³⁷ on CD244, part of a consensus motif for SAP/SH2 domain protein 1A binding, was critical for the 3BP2 interaction. Although mutation of Tyr³³⁷ to phenylalanine abrogated human 3BP2 binding, we still observed SAP association, indicating that this motif is not essential for SAP recruitment. CD244 ligation induced 3BP2 phosphorylation and Vav-1 recruitment. Overexpression of 3BP2 led to an increase in the magnitude and duration of ERK activation, after CD244 triggering. This enhancement was concomitant with an increase in cytotoxicity due to CD244 ligation. However, no differences in IFN- γ secretion were found when normal and 3BP2-transfected cells were compared. These results indicate that CD244-3BP2 association regulates cytolytic function but not IFN- γ release, reinforcing the hypothesis that, in humans, CD244-mediated cytotoxicity and IFN- γ release involve distinct NK pathways. *The Journal of Immunology*, 2005, 175: 4226–4235.

Cell surface receptors elicit an array of biochemical signals following engagement. The biological response of the cell requires that these signals be integrated appropriately. Adaptor molecules, proteins that contain modular domains that mediate protein-protein or protein-lipid interaction, are very important for the integration of this process. The adaptor protein 3BP2 was identified as a protein that interacts with the Src homology (SH)³ 3 domain of the protein tyrosine kinase Abl (1). 3BP2 is a 561 amino acid protein containing an N-terminal pleckstrin homology (PH) domain, an SH3-binding proline-rich region, and a C-terminal SH2 domain (1). It is predominantly expressed in hemopoietic/lymphoid tissues, and the SH2 domain of 3BP2 has

been shown to associate in vitro with Syk, ZAP70, linker for activation of T cells (LAT), Grb2, phospholipase C γ 1, and cbl from activated T cell lysates (2). More importantly, transient overexpression of 3BP2 induces transcriptional activation of the IL-2 promoter and its NFAT and AP-1 elements (2). This activity is dependent on the SH2 and PH domains of 3BP2. Recently, it has been reported that the chaperone protein 14-3-3 interacts with the proline-rich domains of 3BP2 and negatively regulates 3BP2 adaptor function in lymphocytes (3). In addition, 3BP2 binds to the SH2 and SH3 domains of the protein tyrosine kinase Lyn during Fc ϵ RI-mediated signaling in mast cells (4). Besides mast cells, 3BP2 also has a key regulatory role in NK cells. 3BP2-dependent regulation of NK cell-mediated cytotoxicity depends on the PH, SH2, and proline-rich regions (5). Moreover, phosphorylation of Tyr¹⁸³ on 3BP2, which recruits Vav-1 and phospholipase C γ , is critical to the ability of 3BP2 to positively regulate NK cell-mediated killing (5).

In this study, we show that 3BP2 is biochemically and functionally linked to the CD244 receptor in NK cells. CD244 (2B4) is expressed by all NK cells, basophils, and monocytes as well as a subset of CD8⁺ T cells (6). Engagement of CD244 by Abs or by its ligand CD48 induces natural cytotoxicity and IFN- γ production (7–10). It is a member of the CD150 (signaling lymphocytic activation molecule) subfamily of the CD2 family of receptors (11). The members of this subfamily are distinguished by the presence of the motif TV/IYxxV/I. When the tyrosine becomes phosphorylated, it associates with the signaling lymphocytic activation molecule-associated protein (SAP)/SH2 domain protein 1A, which when defective causes X-linked lymphoproliferative (XLP) syndrome, a severe immunodeficiency characterized by an abnormal immune response to EBV infection (9, 12). In patients with XLP

*Unitat d'Immunologia, Departament de Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica, Facultat de Medicina; and [†]Departament de Fisiologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

Received for publication February 16, 2005. Accepted for publication July 13, 2005.

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.

¹ This work was supported by Grants 02/3056 and PI030085 from Fondo de Investigación Sanitaria, Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain, and Grant MARATO-TV3-2000-TV4410. I.S.-V. is supported by a fellowship from the Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer. J.M.V. is supported by a fellowship from the Ministerio de Asuntos Exteriores, Beca de la Fundación Carolina. X.R. is a fellow of the Programa de Formació en la Recerca i la Docència, Universitat de Barcelona. M.M. is supported by a Ramón y Cajal contract from Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain.

² Address correspondence and reprint requests to Dr. Margarita Martín, Unitat d'Immunologia, Departament de Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, c/Casanova 143, Barcelona E-08036, Spain. E-mail address: martin_andorra@ub.edu

³ Abbreviations used in this paper: SH, Src homology; PH, pleckstrin homology; SAP, signaling lymphocytic activation molecule-associated protein; EGFP, enhanced GFP; XLP, X-linked lymphoproliferative; LAT, linker for activation of T cell.

disease, NK cells are defective in their activation through CD244 (13–16). Recently, it has been reported that CD244 and SAP co-localize to the immunological synapse upon the formation of conjugates between NK cells and target B cells and this finding highlights the role of CD244-SAP complex during the NK cell-mediated control of EBV infection (17). CD244 has also been found to associate constitutively with the adaptor molecule LAT via a dicysteine motif (CxC) located in the transmembrane domain of CD244 (18, 19). In this paper, we describe a novel interaction between CD244 and the adaptor protein 3BP2 in NK cells and show that 3BP2 links CD244 to downstream events regulating the cytotoxic function of CD244 without affecting IFN- γ secretion.

Materials and Methods

Cells and reagents

YT cells (human NK cells), 3BP2 enhanced GFP (EGFP) YT cells, P815 (murine mastocytoma), Daudi cells, and primary human NK cells were maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS, 2 mM L-glutamine, 1 mM HEPES, 100 U/ml penicillin, and 100 μ g/ml streptomycin (Invitrogen Life Technologies). NK cells were isolated by using a modification of the method previously described by Windebank et al. (20). Briefly, NK cells were obtained after coculturing human PBL with Daudi cells (ratio 3:1, respectively) for 1 wk. Daudi cells were pretreated with mitomycin C, 50 μ g/15 $\times$ 10⁶ cells (Sigma-Aldrich) for 4 h at 37°C and then washed extensively before the coculture. Afterward, T cells were removed by complement lysis using anti-CD3 Ab (clone T3b) from Dr. M. López-Botet, (University Pompeu Fabra, Barcelona, Spain). Dead cells were eliminated by Ficoll density gradient centrifugation. NK purity was assayed using CD19, CD3, and CD56 Abs directly conjugated to FITC (BD Pharmingen) by flow cytometry. NK cells were grown in normal media plus IL-2 (500 U/ml; BD Pharmingen). Biotin, peroxidase-conjugated anti-mouse IgG, and F(ab')₂ sheep anti-mouse were obtained from Sigma-Aldrich. HRP-conjugated anti-phosphotyrosine mAb mixture was from Zymed Laboratories. Avidin-peroxidase was from Roche Diagnostics. Monoclonal Ab against human CD84 (CD84 clone 2.15), with the same isotype as the CD244 Ab (IgG1), was used as a control IgG (21) in all experiments except in NK cell derived from blood immunoprecipitation, because CD84 is expressed (22). In this case, a mAb against murine P selectin (IgG1) was used as a control (23). Vav mAb was from Santa Cruz Biotechnology. Rabbit anti-human CD244 was a gift from Dr. E. Long (National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Rockville, MD). Streptavidin-CyChrome and anti-rabbit peroxidase were from DAKO. Phospho-ERK Ab was from Cell Signaling Technology and total ERK mAb was from Zymed Laboratories. The following mAbs were obtained from BD Pharmingen: anti-CD244 (clone C1.7), biotinylated anti-mouse Ig κ L chain, anti-human IFN- γ (clone NIB42) mAb, anti-human biotinylated IFN- γ (clone 4SB3), and IFN- γ standard.

Yeast three-hybrid screen

The cytoplasmic tail of human CD244, cloned in pBridge and transformed in the yeast strain CG1945, was used as bait to screen a human B cell cDNA library in the pACT2 vector (Clontech Laboratories). CD244 and mutated *c-fyn* (Fyn₄₂₀, Fyn₅₃₁ Y-F, and Fyn₁₇₆ R-Q) were inserted in the bicistronic vector pBridge (Clontech Laboratories). In the mutant *c-fyn*, the regulatory Tyr⁴²⁰ and Tyr⁵³¹ were substituted by phenylalanine. These mutations were designed to eliminate toxicity for the yeast cell. Arginine was substituted by glutamine to disable the binding properties of the SH2 of *c-fyn* as previously described (24). The vector pBridge containing CD244 in the absence of mutated *c-fyn* was generated after *Bgl*III digestion, ligation, and purification.

*Bgl*III restriction sites are present at 5' of *fyn* catalytic domain and at 3' in the second multiple cloning site in the pBridge plasmid, where *fyn* was cloned (*Not*I site was used for its cloning). Thus, *fyn* catalytic activity was depleted by digesting the pBridge vector with *Bgl*III, religating, and sequencing to further check the deletion as previously described (25, 26).

Plasmid constructs

Human CD244 cloned in pCI-neo was used as a template to generate CD244^{337 Y-F}. It was cloned in frame into the 3.1/V5-His vector (Invitrogen Life Technologies). The primers used to generate the mutation were as follows: 5'-AAT AGC ACT ATC TTT GAA GTG-3' and 5'-TCC AAT CAC TTC AAA GAT AGT-3'. The presence of the desired nucleotide changes was established by bidirectional nucleotide sequencing using dye

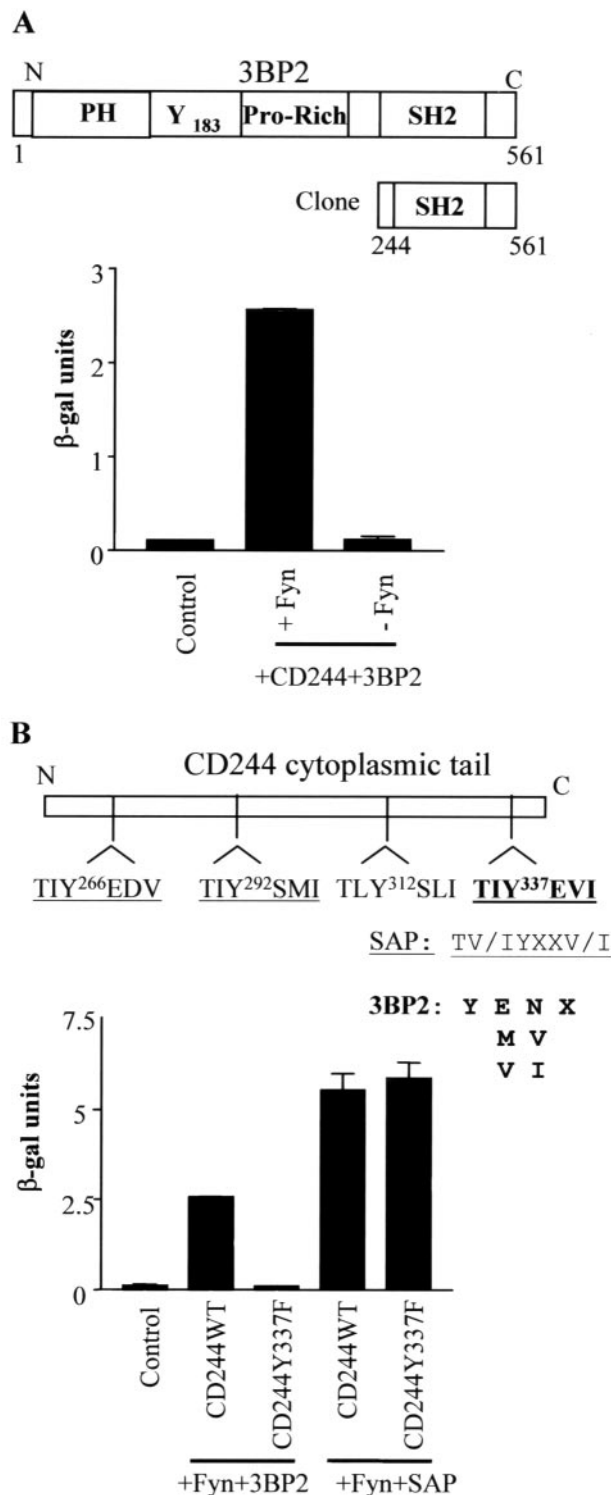


FIGURE 1. CD244 interacts with 3BP2 in yeast. **A**, Using the cytoplasmic tail of CD244 cloned in pBridge, we performed a semiquantitative β -galactosidase assay with a clone encoding 3BP2, under conditions in which Fyn was present or absent. **B**, β -Galactosidase assay was performed with CD244 wild type (CD244WT) and Tyr³³⁷ mutant (CD244Y337F) vs 3BP2 and SAP in the presence of Fyn activity. Controls were performed using the empty pBridge and pACT2 plasmids. SAP motifs are underlined, and 3BP2 consensus binding motif is in bold.

terminator chemistry (Applied Biosystems). For expression in yeast, the fusion proteins Gal4BD-cytoplasmic CD244_{WT} and Gal4BD-cytoplasmic CD244^{337 Y-F} were generated from CD244_{WT} and CD244^{337 Y-F} cDNAs, respectively, using the sense primer 5'-CCC GAA TTC CCC AAG GAA

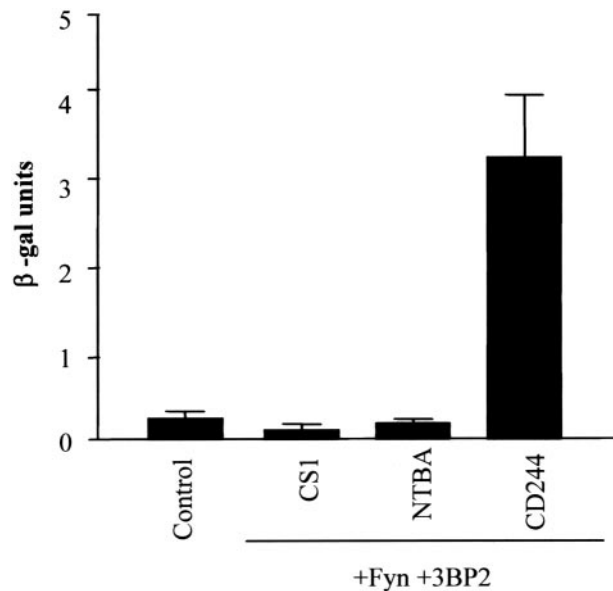


FIGURE 2. Only CD244 interacts with 3BP2 among NK expressed receptors within CD150 family. Cytoplasmic tails of the CD150 members with known function in NK cells (CS1, NTBA) were cloned in pBridge in the presence of Fyn. Yeast were cotransfected with each member or empty pBridge plus clone encoding 3BP2-pACT2, and a β -galactosidase (β -gal) assay was conducted.

TTT TTG-3' and the antisense primer 5'-GTC GAC TGC AAG AAA GGT GAG AAT TGC TG-3' and subcloned into the pBridge binding domain vector using the *EcoRI/SaII* sites.

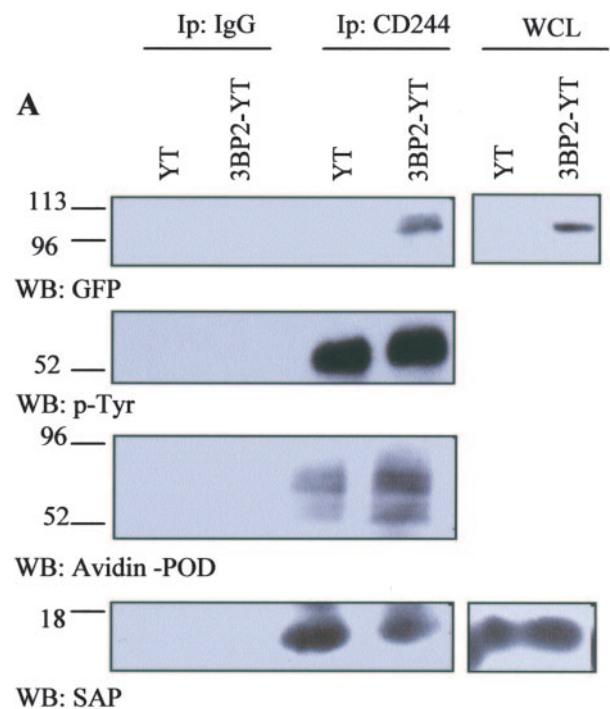
To generate the human 3BP2 construct, 3BP2 was amplified by PCR using cDNA from Jurkat cells as a template with the sense primer 5'-TCG GGG AGG CGG GCG TGG ATC-3' and the antisense primer 5'-ATG TCC GTC TGT GTG GCC TGG GGT CA-3'. The product of this PCR was used as a template for a second PCR using the primers 5'-GGG GAA TTC ATG GCG GCT GAA GAG ATG-3' and 5'-CCT AGG CCC AGT GTA GCC GTA G-3' and cloned in frame into the pCDNA3.1/V5-His vector (Invitrogen Life Technologies). To make a fusion protein with EGFP, we performed a PCR using 3BP2 pCDNA 3.1 as a template with the primers 5'-GGG GAA TTC ATG GCG GCT GAA GAG ATG-3' and 5'-CGC GGA TCC CCT AGG CCC AGT GTA-3'. The PCR product was cloned in frame into the pEGFP N3 (where EGFP is at the C-terminal of the fusion protein) vector (Clontech Laboratories) using *EcoRI* and *BamHI*. To generate a construct containing only the SH2 domain of 3BP2 (dominant negative) we used the primers: 5'-GGG GAA TTC ATG GCG CTC CCA GAT GTT GGC CTG GCG-3' and 5'-CGC GGA TCC CCT AGG CCC AGT GTA-3' and we cloned in frame into the pEGFP N3 using *EcoRI* and *BamHI*.

CD244 and 3BP2 Ab production

Anti-CD244 mAb (clone 69; IgG1) was generated by fusing NS1 with spleen cells from BALB/c mice immunized twice with a CD244-Ig fusion protein. The CD244-Ig was obtained by inserting the human CD244 sequence corresponding to the two extracellular domains into the mammalian expression vector signal pIg-Tail (R&D Systems). The CD244 oligonucleotides used were 5'-AGGG GGA TTC ATG CCA GGG TTC AGC TGA CCA-3' and 5'-A CCA GGA TCCACT TAC CTG TGA ATT CCT GAT GGG CAT TCT GAC-3'. Anti-3BP2 mAb (clone 256.5.1, IgG3) was generated by immunization of mice with the peptide H-KHGLPDVGLAAEDSKRDPLC-NH₂.

Transfections

For stable transfections, YT cells (1.25×10^7 cells) were electroporated with 3BP2-EGFP cDNA or only the SH2 domain of 3BP2 (SH2-3BP2-EGFP) cDNA ($2 \mu\text{g}$ per 1×10^6 cells) using 260 V and 950 μF . Cells were selected in medium containing G418 (2 mg/ml). Cells were then sorted based on EGFP fluorescence.



B

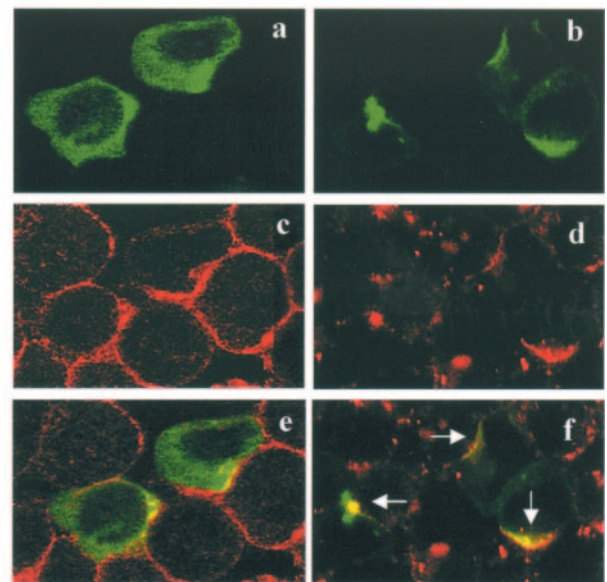


FIGURE 3. CD244 binds to 3BP2 in NK cells. CD244 activation induces cocapping of CD244-3BP2 in the plasma membrane. **A**, YT and 3BP2-YT cells were biotinylated and activated with pervanadate for 10 min. Immunoprecipitations were conducted with IgG, control, and CD244 Abs. Blots using anti-GFP, anti-phosphotyrosine, avidin-peroxidase (POD), and anti-SAP were performed. **B**, Cells were incubated with an anti-CD244 Ab at 4°C (**a**, **c**, and **e**) or 37°C (**b**, **d**, and **f**) to induce capping. 3BP2 and CD244 correspond to the green and red fluorescence, respectively.

Immunoprecipitation and immunoblotting

3BP2-EGFP YT cells (1×10^8) were biotinylated and activated with 100 μM pervanadate for 10 min, or anti-CD244 Ab (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) plus cross-linking (F(ab')₂ sheep anti-mouse, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for various lengths of time. Cells were starved overnight (RPMI 1640 with 1% FCS) to reduce basal levels of phosphorylation. Similarly, human NK cells (1×10^8) were activated

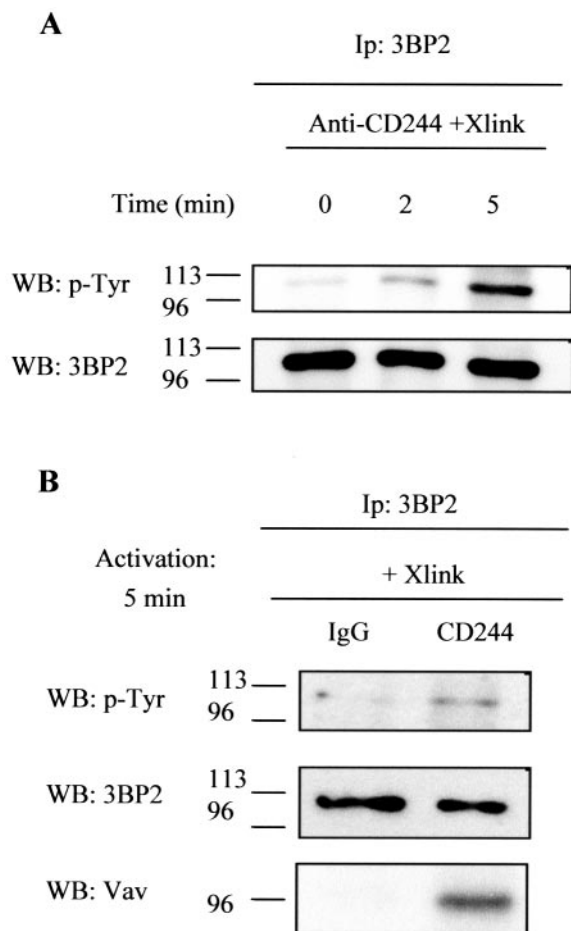


FIGURE 4. CD244 ligation induces 3BP2 phosphorylation and Vav recruitment. *A*, CD244 activation with anti-CD244 Ab plus cross-link (sheep anti-mouse) was performed at various times in 3BP2 YT cells. Samples were immunoprecipitated with anti-3BP2 Ab and blots using anti-phosphotyrosine (p-Tyr) and 3BP2 Ab were performed. *B*, 3BP2 YT cells were activated with anti-CD244 or IgG control for 5 min. 3BP2 immunoprecipitation was conducted and blots against phospho-tyrosine, 3BP2, and Vav-1 were done.

with 100 μ M pervanadate for 10 min. Immunoprecipitations were performed as described elsewhere (24).

ERK assay

A total of 1×10^6 3BP2-EGFP YT or YT cells were incubated with anti-CD244 for 5, 10, or 20 min at 37°C with or without cross-linking (sheep anti-mouse). Cells were lysed as previously described and run on a 12% SDS gel. Blots were incubated with Abs against phospho-ERK and total ERK.

Cytokine assay

A total of 1×10^5 YT cells per well were incubated in 96-well plates with either anti-CD244 Ab (clone C1.7) or anti-CD244 (clone 69) at 200 ng/ml, and P815 cells (1×10^5 cells per well) were used as a cross-linker. Similarly, YT, 3BP2-EGFP YT, or SH2-3BP2-EGFP YT cells were activated with various concentrations of anti-CD244 Ab (clone 69). Supernatants were collected after 18 h of culture and IFN- γ levels were measured by sandwich ELISA.

Cell-mediated cytotoxicity assay

P815 Fc receptor-positive target cells were labeled by incubating 1×10^6 cells with 2 MBq of $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (NEN Research Products) for 90 min at 37°C under 5% CO_2 in air. The target cells were then washed three times in culture medium. A total of 1×10^4 labeled target cells (100 μ l) were incubated with the effector YT cell suspension, 3BP2-EGFP YT cells, or

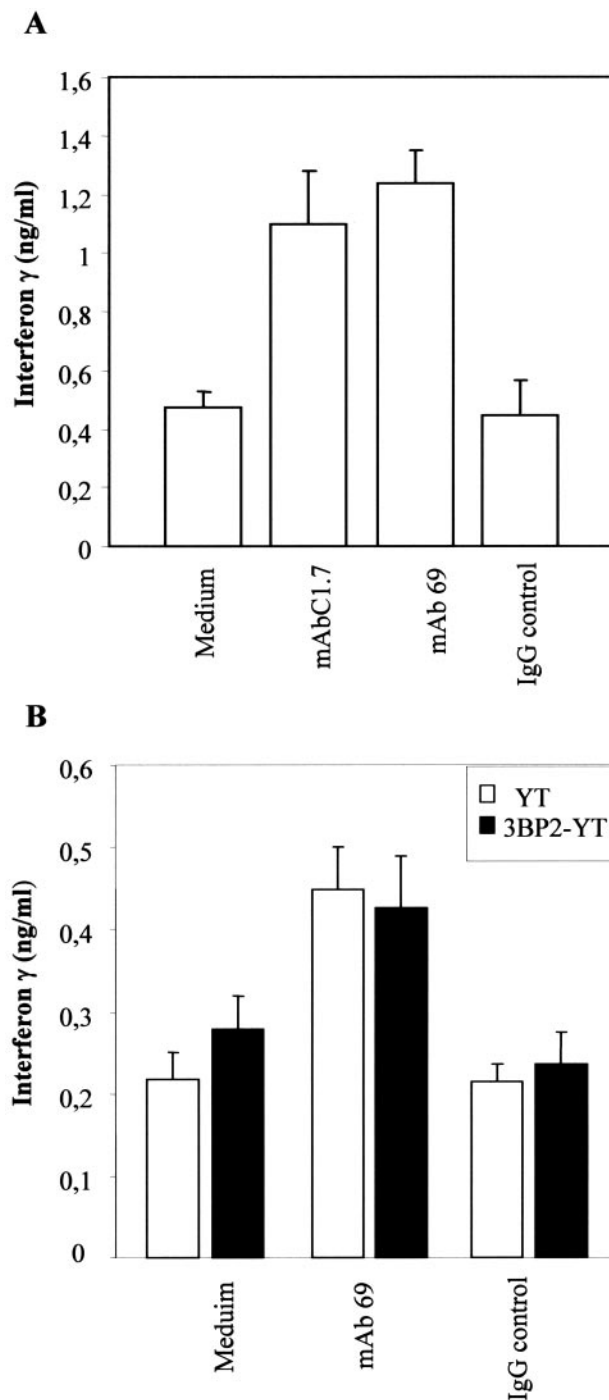


FIGURE 5. IFN- γ secretion is not enhanced in 3BP2-transfected cells. *A*, IFN- γ production induced by Abs anti-CD244 (clone C1.7 and clone 69) in YT cells. YT and 3BP2-YT cells were activated with IgG control and anti-CD244 (clone 69) Abs, following which supernatants were collected after 18 h and IFN- γ secretion measured (*B*). Measurements were made in triplicate and more than six independent experiments were performed.

SH2-3BP2-EGFP YT cells (100 μ l) in the presence of anti-CD244 or isotype control IgG (200 ng/ml). Effector YT or 3BP2-EGFP YT cells were resuspended at 1, 5, 10, or 20 times the number of labeled target cells. The cells were then incubated for 3 h at 37°C, and 100 μ l of the supernatant was removed from each well for gamma radiation counting. Specific lysis was calculated as previously described (27).

Immunofluorescence microscopy

3BP2-EGFP YT cells and YT cells (1×10^6 cells of each) were labeled in suspension with anti-human CD244 (clone 69) or mouse IgG1 isotype

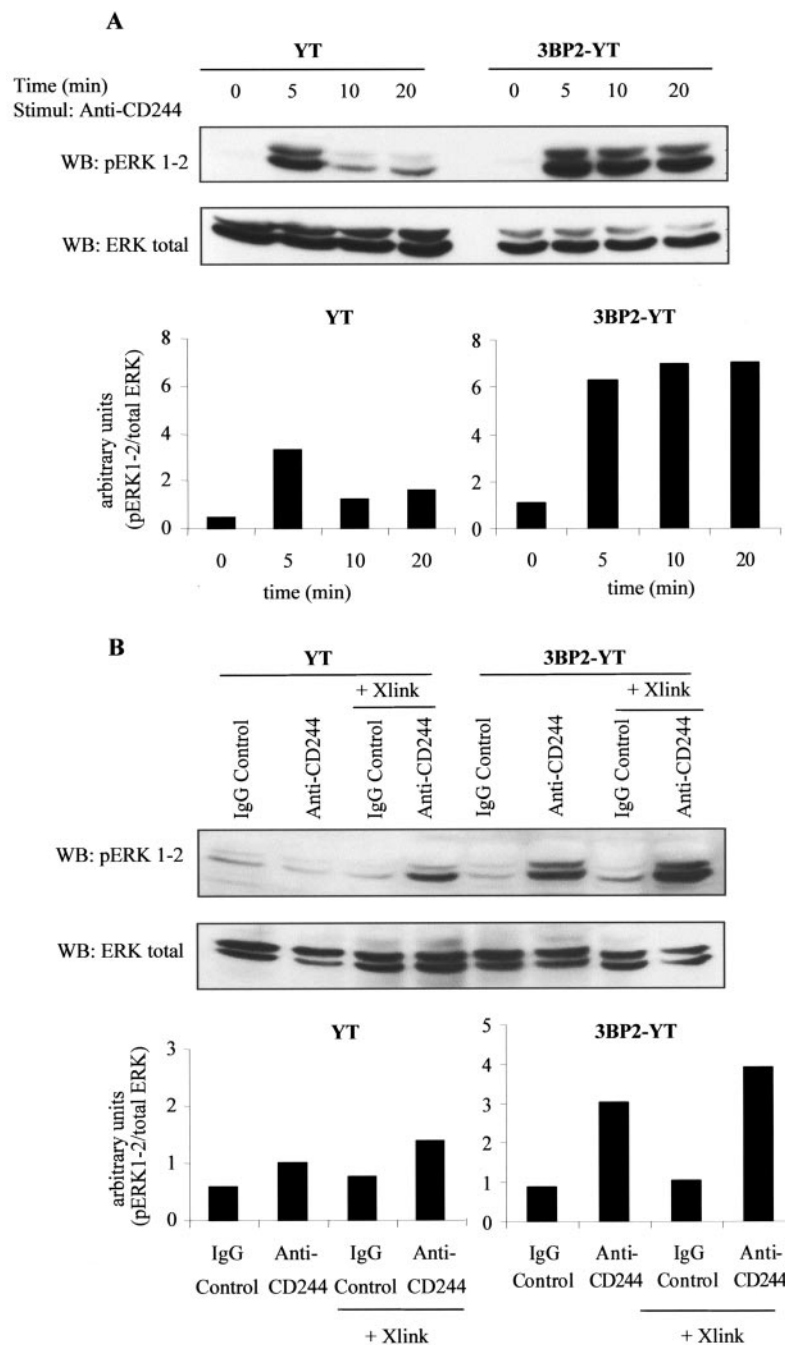


FIGURE 6. Increased expression of 3BP2 leads to sustained ERK phosphorylation. **A**, CD244 was triggered with anti-CD244 (5 μ g/ml) for various times (5, 10, and 20 min) in YT and 3BP2-YT. CD244 was ligated with anti-CD244 (5 μ g/ml) with or without cross-linking (10 μ g/ml, sheep anti-mouse) for 10 min (**B**). Cells were lysed and blots with anti-phospho-ERK and total ERK Abs were conducted.

control (1 μ g/ml) at 4°C for 25 min. After washing with ice-cold PBS, cells were incubated with 1 μ g/ml anti-mouse Cy3 (Jackson ImmunoResearch Laboratories) at 4°C (control) or 37°C (capping) for 15 min. Cells were then washed twice with ice-cold PBS, immobilized on polylysine-treated coverslips at 4°C for 15 min and fixed in methanol at -20°C for 15 min. Samples were washed and mounted in Fluoromount-G (Southern Biotechnology Associates). Fluorescence images were obtained using a confocal microscope (TCS NT; Leica).

Results

Identification of 3BP2 as intracellular ligand for CD244

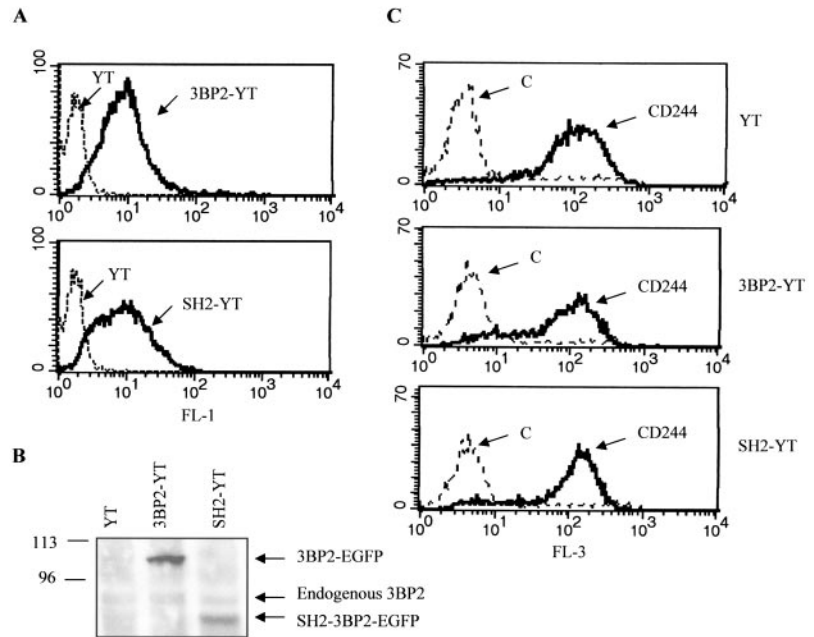
In an attempt to identify proteins able to bind CD244, we used the three-hybrid system described elsewhere (25). CD244 was fused in frame with the Gal4BD (Gal4 binding domain) and used to screen a B cell cDNA library. We chose this library to detect interactions other than with SAP (because SAP is not well expressed in these cells). Screening of $\sim 2 \times 10^6$ clones yielded a clone that encoded

the adaptor protein 3BP2. The sequence contained the entire SH2 domain, but the PH domain and proline-rich regions were absent (Fig. 1A).

Analysis of CD244-3BP2 interaction in yeast cells

We deleted the catalytic activity of Fyn to assess whether this interaction was constitutive or regulated by Fyn activity. Our results showed that the binding was mediated by the active kinase (Fig. 1A). These data suggest that tyrosine phosphorylation is required to allow CD244-3BP2 binding. Next, we analyzed tyrosine-based consensus motifs able to bind the SH2 domain of 3BP2. Tyr³³⁷ of the cytoplasmic tail of CD244 contains the 3BP2 consensus motif Y-E/M/V-N/V/I-X reported elsewhere (28). Replacement of this tyrosine with phenylalanine completely abrogated the binding of 3BP2 to CD244, indicating that Tyr³³⁷ is crucial for the CD244-3BP2 association (Fig. 1B). Because this tyrosine is also

FIGURE 7. Expression levels of 3BP2 and CD244 in YT and transfectant cells. **A**, Expression of 3BP2-EGFP and SH2-3BP2-EGFP in YT and transfectant cells by FACS analysis. EGFP was measured in FL-1 channel. **B**, Endogenous level of 3BP2 was assayed by immunoblot in these cells. One million cells of each type were lysed and run in 8% SDS-PAGE. Western blot using anti-3BP2 Ab was conducted. **C**, CD244 staining was performed using CD244 Ab plus biotinylated secondary Ab and streptavidin-CyChrome (measured in the FL-3 channel to avoid interferences with the EGFP emission).



contained in a SAP binding motif, we assayed SAP binding ability in this mutant. As shown in Fig. 1B, SAP binding was detectable at similar levels in wild-type CD244 (CD244_{WT}) and mutant Tyr337 CD244 (CD244_{Y337F}), indicating that this residue is not critical for SAP binding to the receptor. We also analyzed whether other members of the CD150 family of receptors such as NK-T-B cell Ag (NTBA) and CD2 subset 1 (CS1), which are expressed by NK cells and have an identified role in promoting cell-mediated killing (29–31), were able to bind to 3BP2 (Fig. 2). Although all these molecules interact with SAP as reported previously (25), only CD244 bound directly to 3BP2, suggesting that signals transduced by these receptors are not involved in the same signaling pathway.

CD244 colocalizes with and binds to 3BP2 in NK cells

To verify CD244 colocalization with 3BP2 association in NK cells, we used YT cells stably transfected with the fusion protein 3BP2-EGFP to perform immunoprecipitation of CD244 after pervanadate treatment. CD244 bound to 3BP2 under these conditions and we were able to coimmunoprecipitate CD244, 3BP2, and SAP (Fig. 3A). Immunofluorescence was used to examine CD244-3BP2 distribution in NK cells. CD244 was localized at the membrane of nonactivated YT cells, whereas 3BP2 was mostly found in the cytosolic compartment. To test whether 3BP2 was recruited to the plasma membrane in NK cells, cocapping experiments were done in 3BP2 YT cells with Abs against CD244. When 3BP2 YT cells were treated with anti-CD244 followed by a Cy3-conjugated anti-mouse Ab at 37°C for 15 min, the CD244 molecules were capped and we observed an overlap of 3BP2 and CD244 distribution in the plasma membrane (Fig. 3B). No capping was detected when the cells were incubated at 4°C.

CD244 ligation induces 3BP2 phosphorylation and Vav-1 recruitment

Analysis of upstream events of CD244 signaling showed that 3BP2 was phosphorylated after CD244 engagement in YT cells (Fig. 4A). Phosphorylation of 3BP2 allows the recruitment of the SH2 proteins and regulates NK cell function by mobilizing key downstream signaling effectors such as Vav (5). It has been reported that the proto-oncogene Vav interacts with phosphorylated

Tyr¹⁸³ of 3BP2 and that this position is critical to the ability of 3BP2 to positively regulate NK cell-mediated killing (5). We next analyzed whether CD244 ligation was able to phosphorylate 3BP2 allowing Vav-1 recruitment. As we show in Fig. 4B, CD244 ligation induces phosphorylation of 3BP2 and Vav coprecipitation.

IFN- γ release induced by CD244 is not enhanced in 3BP2-transfected cells

Next we examined downstream events following CD244 ligation such as IFN- γ release. The anti-CD244 Ab (clone 69) produced in our laboratory was able to induce IFN- γ secretion similarly to the commercial anti-CD244 (clone C1.7) (Fig. 5A). To assess the role of 3BP2 in CD244-induced IFN- γ secretion, we activated YT and 3BP2 YT cells with anti-CD244 (clone 69) and measured IFN- γ secretion after 18 h. Our data show that overexpression of 3BP2 does not increase CD244-induced IFN- γ secretion (Fig. 5B). The addition of IL-2 (20 U/ml) enhanced the release of IFN- γ induced by Abs against CD244 equally in both cell types (data not shown). Thus, our data indicates that 3BP2 signaling induced by CD244 activation does not regulate the pathway controlling IFN- γ release.

3BP2 increases and sustains phosphorylation of ERK1/2

CD244 signaling pathway involves phosphorylation of ERK (32). Next, we studied the role of 3BP2 signals in ERK activation following CD244 ligation. Both anti-CD244 (clone C1.7 and clone 69) types were used in these experiments with no difference in response. 3BP2 enhanced ERK phosphorylation after CD244 triggering (Fig. 6A). A transient phosphorylation of ERK, which peaked at 5 min, was observed in YT cells, whereas a sustained phosphorylation of ERK after 5 min was seen in 3BP2-transfected cells. The adaptor 3BP2 also lowered the threshold of activation because CD244 still induced a fine ERK phosphorylation without cross-linking in 3BP2-transfected cells (Fig. 6B). All these data indicate that CD244 signals through 3BP2 by increasing ERK activation.

CD244-mediated cytotoxicity is enhanced by 3BP2

We next explored whether 3BP2 enhancement of ERK phosphorylation after CD244 ligation was concomitant with an increase in cell-mediated killing by CD244. The levels of endogenous CD244

and 3BP2 were similar in YT, 3BP2-EGFP YT, or SH2-3BP2-EGFP YT cells (Fig. 7). We performed a ^{51}Cr release assay using P815 target cells and YT, 3BP2-EGFP YT, or SH2-3BP2-EGFP YT as effector cells at different ratios in the presence of anti-CD244, an isotypic control Ab, or media alone. 3BP2 increased CD244-induced cytotoxicity (Fig. 8A) compared with YT cells. Consequently, the dominant negative SH2-3BP2 did not enhance CD244-mediated cytotoxicity and even decreased the cell killing seen in the parental YT cells. Interestingly, SH2-3BP2 YT cells were still able to secrete IFN- γ after CD244 triggering, similar to the 3BP2 and parental YT cells (Fig. 8B).

CD244-3BP2 interaction also occurred in primary human NK cells

To show coimmunoprecipitation of CD244 and 3BP2 endogenous proteins in primary human NK we generated NK cells and expanded them in culture with IL-2 as described in *Materials and Methods*. These cells were >90% CD3 $^{+}$, CD19 $^{-}$, CD56 $^{+}$ (Fig. 9A). Cells were activated with pervanadate and were lysed and immunoprecipitated with an IgG control (IgG1) or anti-CD244 Ab (IgG1). As shown in Fig. 9B, CD244 coimmunoprecipitates with 3BP2 also in these cells. A 3BP2-specific Ab recognizes a single 80-kDa band in whole cell lysates in human NK cells tested.

Altogether, our data indicate that 3BP2 is a candidate molecule that links CD244 to Vav and modulates ERK activation and cytotoxicity, but may not be involved in cytokine release pathways (Fig. 9C).

Discussion

In the present study, we found that CD244 specifically and directly associates with the cytoplasmic adaptor 3BP2. This interaction requires the phosphorylation of CD244 cytoplasmic tail, as we found in yeast and in human NK cells. The interaction CD244-3BP2 comprises the SH2 of 3BP2. The Tyr³³⁷ in CD244 cytoplasmic tail present in the consensus motif (YEVI) is critical for 3BP2 binding. Although this tyrosine is found in a putative SAP binding motif, its mutation to phenylalanine does not abolish SAP recruitment. Consequently, 3BP2 and SAP coprecipitate with the receptor CD244 in NK cells after pervanadate treatment. 3BP2 was initially reported to participate in the regulation of the TCR-induced activation of T cells, because overexpression of 3BP2 increases the NFAT and AP-1-dependent transcription necessary for the production of IL-2 (2). More recently, 3BP2 has been found to be an active component of the activation cascade that leads to NK cell-mediated cytotoxicity (5). Three functional domains of 3BP2 have been described: the PH domain, the proline-rich region, and the SH2 domain. Deletion of the SH2 domain reduces the phosphorylation of 3BP2, whereas deletion of the PH domain or mutation of the proline-rich region does not have a biochemical effect. This indicates that the SH2 domain is involved in its targeting to the upstream regulators (5). We report that CD244 induces tyrosine phosphorylation of 3BP2 in YT NK cells. Interestingly, the binding partner of 3BP2, Vav-1, is a CD244-regulated substrate (33). Our data show specific Vav-1 recruitment to 3BP2 after CD244 ligation and indicate that 3BP2 is a link between CD244 and Vav signaling. Indeed, Vav-1 and Vav-2 associate with 3BP2 upon NK stimulation, and both molecules bind to the same sequence encompassing the phospho-Tyr¹⁸³ of 3BP2 (5).

The Vav proto-oncogenes act as a guanine nucleotide exchange factor for the Rho family of GTP-binding proteins, which are involved in regulation of signaling leading to cytoskeletal rearrangements and gene transcription (34). Vav-1 controls activation of ERK and promotes cytoskeletal changes, a process required for cell killing (35). Moreover, results from Vav-1-deficient mice sug-

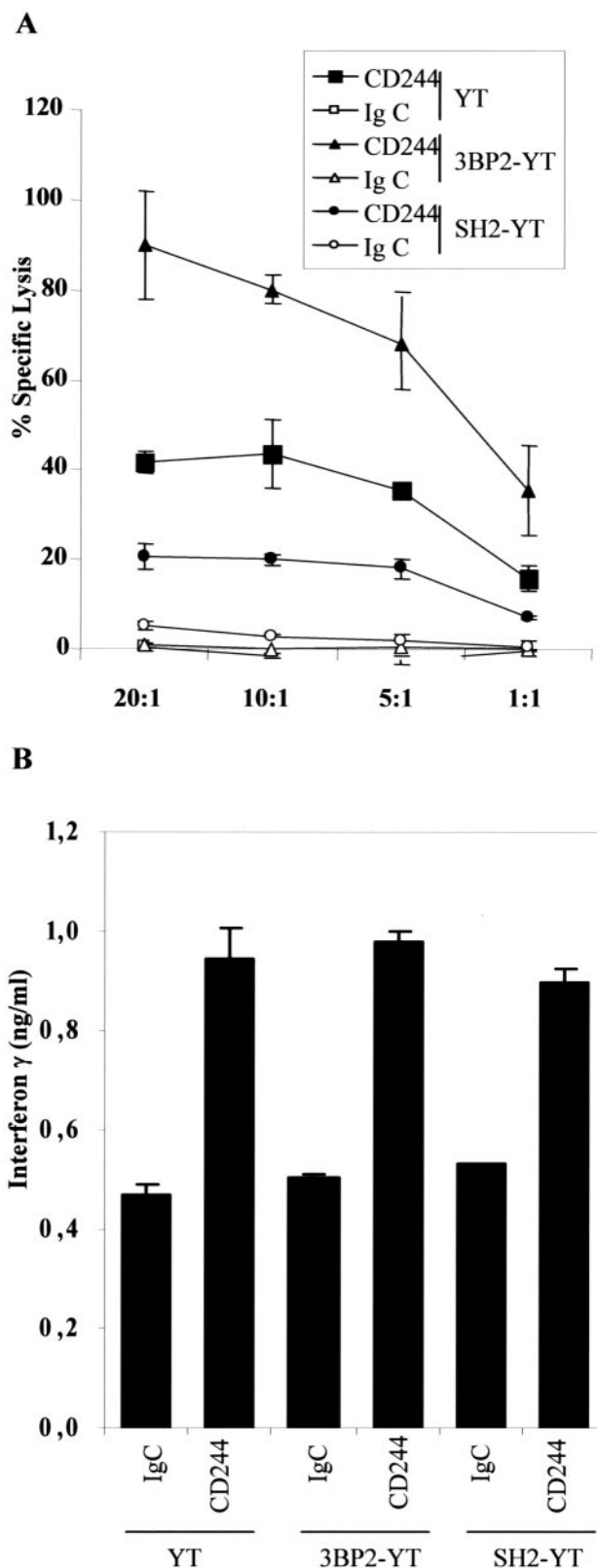


FIGURE 8. 3BP2 enhances cell killing after CD244 triggering without affecting IFN- γ secretion. *A*, YT, 3BP2-YT, and SH2-YT were tested for killing against P815 treated with anti-CD244 Ab or IgG control. *B*, In parallel, the cells were tested for IFN- γ secretion after CD244 triggering. Measurements were made in triplicate and three independent experiments were performed with similar results.

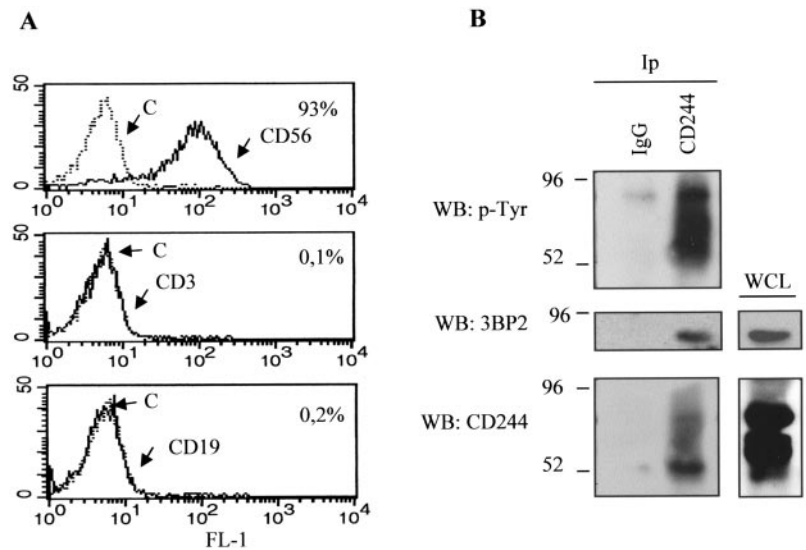


FIGURE 9. CD244 interacts with 3BP2 in primary human NK cells. **A**, FACS profile of NK cells generated from human PBL. **B**, A total of 1×10^8 cells/lane were activated with $100 \mu\text{M}$ pervanadate for 10 min and immunoprecipitation was conducted using and IgG control (IgG1) or CD244 Ab (IgG1). After SDS-PAGE, proteins were transferred to a polyvinylidene difluoride membrane and identified by Western blot analysis with anti-phosphotyrosine, anti-3BP2, or anti-CD244. **C**, Model of the action of 3BP2 after CD244 activation; distinct pathways are defined. Tyr³³⁷ from the cytoplasmic tail of CD244 binds to the SH2 domain of 3BP2. Engagement of CD244 induces phosphorylation of 3BP2 and Vav-1 recruitment. 3BP2 plays a role in the enhancement of ERK phosphorylation/activation and CD244-mediated killing without affecting IFN- γ secretion.

gest a functional dichotomy for Vav-1 in NK cells: a role in cytotoxicity but not in IFN- γ production (36). In agreement with this hypothesis, our data reveal that CD244 triggering leads to phosphorylation of 3BP2, Vav-1 recruitment, ERK activation, and a concomitant increase in cytotoxicity with no differences in IFN- γ secretion between normal and 3BP2-transfected cells. These results indicate that CD244-3BP2 association regulates cytolytic function but not IFN- γ release. These observations are also consistent with previous data reporting that CD244-mediated activation of cytotoxicity and IFN- γ release in human NK cells involves distinct pathways (32). In this study we found that CD244 mediated positive signals, and 3BP2 binding enhanced cytotoxicity. Indeed, overexpression of 3BP2-SH2 domain in YT cells resulted in a dramatic suppression of the CD244-mediated cell killing, suggesting that 3BP2-SH2 inhibited the function of endogenous 3BP2, which positively regulates CD244-mediated cell killing in NK cells.

CS1 and NTBA belong to the same family as CD244 and function in homotypic interaction, activating NK cell cytotoxicity (37, 38). We found that neither member binds to 3BP2 in yeast, suggesting that NTBA, CS1, and CD244 regulate NK function

through different pathways. Interestingly, engagement of CS1 by mAbs enhances target cell lysis by both normal and SAP-deficient NK cells (39). In contrast, NK cells from patients with XLP syndrome showed a marked reduction in CD244-mediated cytotoxicity (13, 15). It has also been proposed that CD244 and NTBA display inhibitory rather than activating functions in patients with XLP disease (16, 31). All these data suggest that the signals transduced by the various CD150-related receptors may be unique and that specificity of these signals may be defined by the distinctive arrays of intracytoplasmic tyrosine in these receptors.

CD244-signal has been reported to be absolutely dependent on SAP expression. In cells lacking SAP there is no increase in tyrosine phosphorylation in response to CD244 stimulation (33). In contrast CD244 underwent tyrosine phosphorylation when SAP was expressed. Vav-1 became tyrosine phosphorylated in CD244-stimulated normal human NK cells, but not in XLP-derived NK cells (33). 3BP2 binding depends on CD244 phosphorylation and this signal may be affected in XLP syndrome, which would explain the disruption of Vav signaling and cytolytic function.

CD244-mediated signaling is also influenced by the transmembrane domain of the receptor through its constitutive association with LAT in humans (18) and mice (19). However, CD244-mediated signaling is not influenced by the transmembrane or extracellular domains of the receptor, but rather it is defined solely by tyrosine-based motifs in the cytoplasmic tail (33).

Unexpectedly, the phenotype caused by lack of CD244 expression in mice has revealed that CD244 is primarily an inhibitory receptor in mouse NK cells (40). However, there is still evidence of a positive role for CD244 in human NK cells (14, 41, 42). Therefore, CD244 may act either as an inhibitory or an activating receptor, and this opposing role could be governed by differences between human and mouse NK cells. In fact, murine CD244 is expressed as two isoforms (short and long) that are generated by alternative splicing (43). They differ only in their cytoplasmic domains and exhibit opposing functions (44). The predominantly inhibitory function of murine CD244 seems to be independent of SAP expression and correlates with increased levels of CD244 long isoform over the short (45). Interestingly, the long form of murine CD244 does not contain putative 3BP2 binding motifs. Moreover, no binding to the SH2 domain of 3BP2 was detected with the murine cytoplasmic domain of the long form of CD244 in our yeast assays, whereas SAP binding (used as a control) was similar in mouse and human CD244 (data not shown). Thus, a distinct binding pattern of mediators can elicit a different array of functions. It is tempting to speculate that the positive or negative role of CD244 is based on differential binding partners such as 3BP2. Taken together, these data indicate that 3BP2 function up-regulates the CD244-mediated tyrosine phosphorylation of Vav-1 and thereby the signals leading to NK killing.

Acknowledgments

We thank Dr. E. Long for providing the rabbit anti-human CD244 Ab.

Disclosures

The authors have no financial conflict of interest.

References

- Ren, R., B. J. Mayer, P. Cicchetti, and D. Baltimore. 1993. Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site. *Science* 259: 1157–1161.
- Deckert, M., S. Tartare-Deckert, J. Hernandez, R. Rottapel, and A. Altman. 1998. Adaptor function for the Syk kinases-interacting protein 3BP2 in IL-2 gene activation. *Immunity* 9: 595–605.
- Foucault, I., Y. C. Liu, A. Bernard, and M. Deckert. 2003. The chaperone protein 14–3-3 interacts with 3BP2/SH3BP2 and regulates its adapter function. *J. Biol. Chem.* 278: 7146–7153.
- Maeno, K., K. Sada, S. Kyo, S. M. Miah, K. Kawauchi-Kamata, X. Qu, Y. Shi, and H. Yamamura. 2003. Adaptor protein 3BP2 is a potential ligand of Src homology 2 and 3 domains of Lyn protein-tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* 278: 24912–24920.
- Jevremovic, D., D. D. Billadeau, R. A. Schoon, C. J. Dick, and P. J. Leibson. 2001. Regulation of NK cell-mediated cytotoxicity by the adaptor protein 3BP2. *J. Immunol.* 166: 7219–7228.
- Nakajima, H., and M. Colonna. 2000. 2B4: an NK cell activating receptor with unique specificity and signal transduction mechanism. *Hum. Immunol.* 61: 39–43.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Sayós, 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.
- Benoit, L., X. Wang, H. F. Pabst, J. Dutz, and R. Tan. 2000. Defective NK cell activation in X-linked lymphoproliferative disease. *J. Immunol.* 165: 3549–3553.
- 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: 2932–2936.
- 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.
- 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: 337–346.
- Roda-Navarro, P., M. Mittelbrunn, M. Ortega, D. Howie, C. Terhorst, F. Sánchez-Madrid, and E. Fernández-Ruiz. 2004. Dynamic redistribution of the activating 2B4/SAP complex at the cytotoxic NK cell immune synapse. *J. Immunol.* 173: 3640–3646.
- 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.
- 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.
- Windebank, K. P., R. T. Abraham, G. Powis, R. A. Olsen, T. J. Barna, and P. J. Leibson. 1988. Signal transduction during human natural killer cell activation: inositol phosphate generation and regulation by cyclic AMP. *J. Immunol.* 141: 3951–3957.
- Martín, 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- γ secretion: adhesion is mediated by Ig-like domain 1. *J. Immunol.* 167: 3668–3676.
- Romero, X., M. Martín, 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. *Immunologia* 20: 57–66.
- Massaguer, 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: 117–128.
- Sayós, J., M. Martín, 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.
- Del Valle, J. M., P. Engel, and M. Martín. 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.
- Martín, M., J. M. Del Valle, I. Saborit, and P. Engel. 2005. Identification of Grb2 as a novel binding partner of the signaling lymphocytic activation molecule-associated protein binding receptor CD229. *J. Immunol.* 174: 5977–5986.
- Esplugues, E., D. Sancho, J. Vega-Ramos, C. Martínez-A, U. Syrbe, A. Hamann, P. Engel, F. Sánchez-Madrid, and P. Lauzurica. 2003. Enhanced antitumor immunity in mice deficient in CD69. *J. Exp. Med.* 197: 1093–1106.
- Songyang, Z., S. E. Shoelson, J. McGlade, P. Olivier, T. Pawson, X. R. Bustelo, M. Barbacid, H. Sabe, H. Hanafusa, T. Yi, et al. 1994. Specific motifs recognized by the SH2 domains of Csk, 3BP2, fps/fes, GRB-2, HCP, SHC, Syk, and Vav. *Mol. Cell Biol.* 14: 2777–2785.
- 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.
- Boles, K. S., S. E. Stepp, M. Bennett, V. Kumar, and P. A. Mathew. 2001. 2B4 (CD244) and CS1: novel members of the CD2 subset of the immunoglobulin superfamily molecules expressed on natural killer cells and other leukocytes. *Immunol. Rev.* 181: 234–249.
- 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.
- Chuang, S. S., P. R. Kumaresan, and P. A. Mathew. 2001. 2B4 (CD244)-mediated activation of cytotoxicity and IFN- γ release in human NK cells involves distinct pathways. *J. Immunol.* 167: 6210–6216.
- Chen, R., F. Relouzat, R. Roncagalli, A. Aoukaty, R. Tan, S. Latour, and A. Veillette. 2004. Molecular dissection of 2B4 signaling: implications for signal transduction by SLAM-related receptors. *Mol. Cell Biol.* 24: 5144–5156.
- Henning, S. W., and D. A. Cantrell. 1998. GTPases in antigen receptor signalling. *Curr. Opin. Immunol.* 10: 322–329.
- Turner, M., and D. D. Billadeau. 2002. VAV proteins as signal integrators for multi-subunit immune-recognition receptors. *Nat. Rev. Immunol.* 2: 476–486.
- Colucci, F., M. Turner, E. Schweighoffer, D. Guy-Grand, V. Di Bartolo, M. Salcedo, V. L. Tybulewicz, and J. P. Di Santo. 1999. Redundant role of the Syk protein tyrosine kinase in mouse NK cell differentiation. *J. Immunol.* 163: 1769–1774.

37. Flaig, R. M., S. Stark, and C. Watzl. 2004. Cutting edge: NTB-A activates NK cells via homophilic interaction. *J. Immunol.* 172: 6524–6527.
38. 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 NTB-A, a member of the CD2 molecular family: induction of cytotoxicity and cytokine release in human NK cells. *Eur. J. Immunol.* 34: 1663–1672.
39. Bouchon, A., M. Cella, H. L. Grierson, J. I. Cohen, and M. Colonna. 2001. Activation of NK cell-mediated cytotoxicity by a SAP-independent receptor of the CD2 family. *J. Immunol.* 167: 5517–5521.
40. 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.
41. Tangye, S. G., H. Cherwinski, L. L. Lanier, and J. H. Phillips. 2000. 2B4-mediated activation of human natural killer cells. *Mol. Immunol.* 37: 493–501.
42. Assarsson, E., T. Kambayashi, J. D. Schatzle, S. O. Cramer, A. von Bonin, P. E. Jensen, H.-G. Ljunggren, and B. J. Chambers. 2004. NK cells stimulate proliferation of T and NK cells through 2B4/CD48 interactions. *J. Immunol.* 173: 174–180.
43. 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.
44. 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. USA* 96: 3870–3875.
45. Mooney, J. M., J. Klem, C. Wülfing, 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. *J. Immunol.* 173: 3953–3961.