

CD50 (ICAM-3): Una nova molècula d'adhesió leucocitària. Clonació gènica i anàlisi funcional.

Manuel Juan i Otero

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

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

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

FACULTAT DE MEDICINA
UNIVERSITAT DE BARCELONA

DEPARTAMENT DE BIOLOGIA CEL·LULAR

I

ANATOMIA PATOLÒGICA.

TÍTOL:

**CD50 (ICAM-3):
UNA NOVA MOLÈCULA D'ADHESIÓ LEUCOCITÀRIA.
CLONACIÓ GÈNICA I ANÀLISI FUNCIONAL.**

Tesi presentada per MANEL JUAN I OTERO
per optar al grau de Doctor en Medicina i Cirurgia.

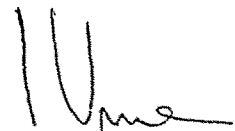
Barcelona, 27 de juliol de 1994.

El Dr. JORDI VIVES, professor associat del departament de Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona i Cap del Servei d'Immunologia de l' Hospital Clínic de Barcelona,

Certifica,

Que la memòria titulada "CD50 (ICAM-3): UNA NOVA MOLÈCULA D'ADHESIÓ LEUCOCITÀRIA. CLONACIÓ GÈNICA I ANÀLISI FUNCIONAL", presentada per En MANEL JUAN i OTERO per optar al grau de Doctor en Medicina i Cirurgia, ha estat realitzada sota la meua direcció al Servei d'Immunologia d'aquest Hospital. Considerant-la conclosa, autoritzem la seva presentació per a ser jutjada pel Tribunal corresponent.

I perquè consti, signo la present a Barcelona, el 23 de Juny de 1994



Dr. Jordi Vives.

Als meus pares, només el seu esforç personal constant al llarg de 30 anys pot explicar tot el que m'ha passat.

A la Rosa, sense ella res no hagués estat possible.

Necessitaria un segon volum per expressar el meu agraïment per tantes persones i tantes coses que m'han passat aquests anys, perquè sense elles poques coses d'aquesta tesi hauria arribat a fer. Intentaré resumint, limitant-me a donar les gràcies

Al Dr. Jordi Vives, que com a director d'aquesta tesi sempre ha estat reflexiu en les discussions sobre els treballs que s'hi presenten, apostant sempre, fins i tot de vegades de manera sorprenent, en les meves capacitats, i que com a Cap de Servei d'Immunologia ha assolit la creació de l'espai científic perfecte que m'ha permès gaudir d'una inestimable formació en recerca i a nivell assistencial, i a més a més dins d'un increïble ambient de companyerisme i amistat.

Al Prof. Oriol Bachs, que com a tutor d'aquesta Tesi Doctoral, ha demostrat una constant dedicació i interès per a assolir portar-la a bon terme, tranquil·litzant sempre els ànims davant dels problemes burocràtics.

A tota la gent del Departament de Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica, i d'entre ells al mateix Oriol Bachs, en Carles Enrich (al qual li dec la meva afecció per la fotografia), en Joan Serratosa i l'Eulàlia Rius que m'introduïren al treball del laboratori, fent-me aprendre a gaudir d'aquesta "estranya" vida, i molt especialment al Dr. Jordi Domingo i el Dr. Alfons Romero que a més a més em van introduir al món de la recerca, en un treball sobre hepatocarcinogènesi que em va apassionar durant tres anys.

Als doctors John Cambier, Kerry Campbell, Achim Friedrich, Ed Palmer i John Freed sense els quals no hagués pogut seqüenciar el CD50 durant la meva estada a Denver.

Al Ramon Vilella que a més d'haver produït els "nostres" 101-1D2, 140-11 i 152-2D11, ha estat un amic i conseller durant aquests darrers quatre anys.

Al Jaume Martorell un "mestre" de la feina tant de recerca com assistencial, amb qui hi coincideixo en gran part en la manera de veure la vida.

A la Teresa Gallart, que junt a la seva gran humanitat, destil·la "litres i litres" d'informació i idees sobre la Immunologia.

Al Toni Gayà, que és el pare intel·lectual de bona part de les idees més rendibles d'aquest treball, i que ha aconseguit fer-me sentir molt còmode treballant al seu costat, a pesar de la gran pressió competitiva que part del treball portava.

A l'Odette Viñas, que tantes hores de feina, tanta reflexió i tanta humanitat m'ha dedicat durant aquests darrers quatre anys.

A la Guadalupe Ercilla amb qui tantes hores al final de la tarda, i fins i tot alguns caps de setmana, hem compartit treball de laboratori.

Al Francisco Lozano, primer resident MIR i darrer adjunt del servei, al qual he tingut l'honor de conèixer en els dos estadis, sempre fidel a la seva manera de fer i a la seva dedicació per la feina.

A l'Oscar de la Calle, al qui en certa manera vaig venir a suplir, cosa absolutament impossible, quan ell va marxar, i que ara el considero un amic i còmplice en la nostra idea d'intentar arreglar el món.

A la Montse Plana i al Carles Serra, amb els quals tinc també una estima molt especial, per les llargues hores dedicades quan era "aquell R-1" acabat d'arribar, i que després s'han convertit en un punt de referència de la nostra més àmplia amistat.

A la Júlia Inglés i al Pablo Engels, sempre amics, i sempre disposats a ensenyar-me o ajudar-me en el que calgués, i calgui.

Al Pepe Alberola que mai va dubtar en explicar-me tot allò que sabia, que per cert era molt, i amb qui vaig compartir una excursió molt especial a Sant Maurici.

A l'Eva Martínez, una gran companya des de que era "R-O", em qui he compartit centenars, per no dir milers d'hores al treball i fora d'ell, i amb qui, per sobre de tot el que m'ha ensenyat, m'uneix una bona amistat.

Al Miguel Angel de la Fuente, amb qui he compartit també centenars d'hores de feina, i amb qui malgrat les "bronques" tingudes (o potser per elles, que m'han canviat de vegades la manera de veure les coses), sé que hi puc confiar totalment.

A l'Aura Pi, companya "d'esclavitud pel treball" durant els tres darrers anys, i amb qui hem compartit alguna alegria i moltes penes científiques.

A la Rosa Pino, pel seu esperit rebel que m'ha obert una altra perspectiva de la vida i amb qui comparteixo un "amor", el CD50.

Al Javier Calvo, amb qui sempre m'he sentit a gust, i amb qui sé que sempre tindrè una mà oberta.

A la Maria Simarro que sempre ha estat atenta per explicar-me coses i per a "passar-me" el darrer article que ha llegit.

A la Carme Vilardell, companya perfecte d'aquests darrers sis mesos de treball i amb qui espero arribi a augmentar al meva amistat.

A la Raquel, la Cristina i la Maite, una mica fora del grup del laboratori, però sempre entre el de les millors companyes.

A l'Elias Campo, un estímul en aquest hospital, i un exemple a seguir en molts i molt variats aspectes.

A la Matilde Romero, per la paciència i dolçor amb que em va ensenyar les bases del "joc del DNA", i amb qui com a conseqüència de compartir durant dos anys el mateix laboratori m'uneix una gran amistat.

A la Lourdes Places, sense la qui mai el JEM hagués presentat un patrons de fosforilacions tan bonics, i a qui li dec també molta tendresa i empena en com veure la vida.

Al Juanjo Barceló, un amic que m'ha ensenyat gairebé tot sobre el FACs i alguna cosa de música, sense la qual els dies i dies "passant el calci" haurien estat més insuportables del que van ser.

A l'Isabel Rojo per la confiança i amistat que sempre m'ha donat i amb qui hem d'aconseguir clonar aquella construcció del genòmic del CD27.

Al Jordi Milà a qui sovint li demanava "què en podries deixar una mica de ..." i que sempre m'els ha donat sempre sense fer més preguntes.

A la Maria Torradeflot, un estímul vital amb qui espero continuar la nostra bona amistat.

A la Pepa Solé, per com em va ensenyar a cultivar cèl·lules amb afecte i per l'ambient plàcid i de confiança que crea al seu voltant, i a la Paquita Isart, una gran persona i gran professional, a les dues perquè han aconseguit que les consideri dues grans amigues.

A la Mercè Bayo i la Cristina Moreno, sense la dedicació en la seva feina, mai no hagués pogut emprar molts dels productes que he fet servir en aquest treball, però sobretot per la seva tendresa, afecte i confiança durant aquests quatre anys llargs.

Als grans companys de la part d'abaix del laboratori (el Khalil i l'Angels), als vells amics de la part de dalt (Marisol, Virginia, Eugènia, Mari Carmen , Loli, Belén, Cristina F., Rosana, Elias, Laura, Mari, Montse M., Maria José, Fina, Verònica, Susana, Paquita, ...) i a la Lourdes R. i Montse C., a tots ells perquè han fet del laboratori d'Immunologia un lloc especial, ple d'encant.

Al Jordi Esparza i a la Mariona Cid, responsables directes d'una part important del treball d'aquesta tesi, col·laboradors en tot el que calgui i més, i sempre atents i reflexius sobre el CD50, perquè en tot moment, al llarg de ja dos anys de col·laboració, han sabut transmetre'm la vitalitat d'una i la ironia de l'altre, fent-me sentir sempre bé al seu costat.

Al meus grans amics de carrera (Josep Maria, Manel, Xavi, Patrícia, Maria, Anna, Jordi, Puri, ...) i d'abans (Xavier, Júlio, ...) doncs sense el seu suport fora de la feina no hagués tingut l'estabilitat personal necessària per a dur-la a terme.

A l'Enric, la Mercé i en Jordi, per moltes coses i molts anys, però especialment per llur "fe cega" en mi, mercès a la qual van aconseguir convèncer-me que podia arribar a fer aquesta tesi.

I molt especialment he d'expressar el meu agraïment per a l'Agustí Miralles, responsable també de bona part del treball científic i de moltes figures d'aquesta tesi, però sobretot de l'alegria i confiança que sap transmetre a tothom, i de tots aquells dies tant entranyables de dins i fora del laboratori passat junts, i per al Jordi Yagüe el meu mestre en immunologia i biologia molecular (mai no podré oblidar quan em va ensenyar "la doble hèlix del DNA" al precipitar), perquè sempre ha confiat en mi fins i tot davant de situacions difícils. A tots dos moltes gràcies per tot i especialment per ser els meus amics.

ÍNDEX

ÍNDEX	i
ABREVIATURES	vii
I.- INTRODUCCIÓ	1
1.1.- EL SISTEMA INMUNITARI I LES MOLÈCULES D'ADHESIÓ	3
1.1.1.- LA RESPOSTA INMUNITÀRIA : LA CÈL.LULA I EL SEU ENTORN	3
1.1.2.- LES MOLÈCULES DE MEMBRANA I L'ENTORN CEL.LULAR	4
1.1.3.- MOLÈCULES DE MEMBRANA I ANTICOSSOS MONOCLONALS : CONCEPTE DE CD	5
1.1.4.- MOLÈCULES DE MEMBRANA I MOLÈCULES D'ADHESIÓ	7
1.2.- CLASSIFICACIÓ DE LES MOLÈCULES D'ADHESIÓ	8
1.2.1.- CADHERINES	9
1.2.2.- SELECTINES	12
1.2.3.- INTEGRINES	20
1.2.3.1.- LFA-1	27
1.2.4.- SUPERFAMÍLIA DE LES INMUNOGLOBULINES	32
1.2.4.1.- ICAMs	39
1.2.5.- ALTRES MOLÈCULES D'ADHESIÓ	44
1.3.- INTERACCIONS LIMFOCITÀRIES MEDIATEDES PER LES MOLÈCULES D'ADHESIÓ	47
1.3.1.- INTERACCIONS LIMFÒCITS-ENDOTELI	47
1.3.2.- INTERACCIONS AL REONEIXEMENT ANTIGÈNIC	52

1.4.- ACTIVACIÓ LIMFOCITÀRIA I MECANISMES DE TRANSDUCCIÓ DE SENYALS	55
1.5.- DADES PRÈVIES SOBRE EL CD50	60
II.- HIPÒTESI DE TREBALL	65
III:- OBJECTIUS	69
IV.- RESULTATS	73
4.1.- CAPÍTOL I. CLONACIÓ I CARACTERITZACIÓ DEL cDNA DEL CD50	77
4.1.1.- RESUM	77
4.1.2.- INTRODUCCIÓ	78
4.1.3.- MATERIAL I MÈTODES	79
4.1.3.1.- Anticossos Monoclonals	79
4.1.3.2.- Marcatge de les proteïnes cel·lulars	79
4.1.3.3.- Immunoprecipitacions	82
4.1.3.4.- Conjugació d'AcMos a Sefarosa-CNBr	83
4.1.3.5.- Purificació de la proteïna per cromatografia d'afinitat i electroforèsi en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	84
4.1.3.6.- Purificació i microseqüenciació dels pèptids de CDw50 produïts per escissió específica amb CNBr	85

4.1.3.7.-	Digestió de DNA amb endonucleases de restricció	86
4.1.3.8.-	PCR interpeptídica amb oligonucleòtids d'elecció	87
4.1.3.9.-	Crivellament d'una genoteca de cDNA en fag λ gt10	88
4.1.3.10.-	Minipreparacions de fag. (Mètode LPB/PrK)	92
4.1.3.11.-	Subclonació dels fragments de PCR o del DNA del fag per lligació a vector bacterià	94
4.1.3.12.-	Transformació bacteriana per electroporació	95
4.1.3.13.-	Preparació de DNA plasmídic	97
4.1.3.14.-	Seqüenciació nucleotídica	98
4.1.3.15.-	Northern i Southern blot. Hibridacions de les membranes	101
4.1.4.-	RESULTATS	102
4.1.4.1.-	Anàlisi de les condicions d'elució i rentat per a la purificació del CD50	102
4.1.4.2.-	Purificació del CD50 i microseqüenciació proteica	103
4.1.4.3.-	Amplificació del cDNA a partir d'oligonucleòtids d'elecció	105

4.1.4.4.-	Clonació del cDNA del CD50, mapa de restricció i seqüència	106
4.1.4.5.-	Anàlisi genètica per Southern blot i estudi de l'expressió del mRNA en línies cel.lulars per Northern blot del CDw50	109
4.1.5.-	DISCUSSIÓ	110
4.1.6.-	BIBLIOGRAFIA	111
4.2.-	CAPÍTOL II. CDw50 I ICAM-3:	
	DOS NOMS PER A UNA MATEIXA MOLÈCULA	115
4.2.1.-	RESUM	115
4.2.2.-	ARTICLE	117
	Introduction	117
	Materials and methods	117
	Results and discussion	119
	Concluding remarks	120
	References	120
4.3.-	CAPÍTOL III. PAPER DEL CD50 EN LES	
	FUNCIONS ADHESIVES CEL·LULARS	125
4.3.1.-	RESUM	125
4.3.2.-	ARTICLE	127
	Introduction	127

Materials and methods	128
Results and discussion	129
Concluding remarks	132
References	132
4.4.- CAPÍTOL IV. PAPER DEL CD50 COM A	
MOLÈCULA TRANSDUCTORA DE SENYALS	137
4.4.1.- RESUM	137
4.4.2.- ARTICLE	139
Introduction	139
Materials and methods	140
Results and discussion	141
Concluding remarks	144
References	144
4.4.3.- ANNEX: RELACIÓ DE L'ESTIMULACIÓ	
CEL·LULAR DEL CD50 AMB LA INDUCCIÓ D'EFECTES	
CEL·LULARS QUE EVIDENCIEN ACTIVACIÓ	147
4.4.3.1.- INTRODUCCIÓ	147
4.4.3.2.- MATERIAL I MÈTODES	147
4.4.3.2.1.- Immunofluorescència	147
4.4.3.2.1.- Producció d'IL-2	148
4.4.3.3.- RESULTATS	148
4.4.3.3.- DISCUSSIÓ	150
4.5.- CAPÍTOL V. ANÀLISI DEL GEN DEL CD50 HUMÀ	
POLIMORFISMES GENÒMICS DEL CD50 (RFLP)	153

4.5.1.- RESUM	153
4.5.2.- INTRODUCCIÓ	153
4.5.3.- MATERIAL I MÈTODES	154
4.5.3.3.- Purificació de DNA eucariòtic	154
4.5.3.2.- Digestió dels DNA amb endonucleases de restricció	154
4.5.3.3.- Southern blot. Híbridacions de les membranes	155
4.5.4.- RESULTATS	156
4.5.5.- DISCUSSIÓ	158
4.5.6.- BIBLIOGRAFIA	159
V.- DISCUSSIÓ	161
VI.- CONCLUSIONS	171

ABREVIATURES.

a.a.	Amino-àcids.
AcMos o <i>mAb</i>	Anticossos Monoclonals (de l'anglès <i>Monoclonal Antibodies</i>).
APCs	Cèl·lules Presentadores de l'Antigen (de l'anglès <i>Antigen Presenting Cells</i>).
BcR	Receptor de cèl·lules B.
bp	Parells de bases.
[Ca ²⁺] _i	Concentració de calci intracel·lular.
cDNA	DNA complementari.
CNBr	Bromur de Cianògen.
Con A	Concanavalina A.
cpm	comptes per minut.
DTT	DiThioTreitol.
FCS	Sèrum Fetal de Vedella (de l'anglès <i>Fetal Calf Serum</i>).
GAM	Sèrum de cabra contra immunoglobulines de ratolí (de l'anglès <i>Goat Anti-Mouse</i>).
GPI	Glicosil-fosfatidilinositol (de l'anglès <i>Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol</i>).
HEVs	Vènules d'endoteli alt (de l'anglès <i>High Endothelial Venules</i>).
HLA	Antígens Leucocitaris Humans (de l'anglès <i>Human Leukocyte Antigens</i>).
HUVEC	Cèl·lules Endotelials de Vena Umbilical Humana (de l'anglès <i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>).
ICAMs	Molècules d'adhesió intercel·lulars (de l'anglès <i>InterCellular Adhesion Molecules</i>).
IF	Immunofluorescència.
IFN	Interferó.
Ig	Immunoglobulina.

CD50 i la resposta immunitària

IgSF	Superfamília de les Immunoglobulines (de l'anglès <i>Immunoglobulin SuperFamily</i>).
IL	Interleucina.
IMDM	Medi modificat per Iscove a partir del de Dulbecco (de l'anglès <i>Iscove Modified Dulbecco's Medium</i>)
kb	Kilobases.
kD	Kilodaltons.
LÀD	Deficiència d'Adhesió Leucocitària (de l'anglès <i>Leukocyte Adhesion Deficiency</i>).
LFA	Antigen associat a la funció leucocitària (de l'anglès <i>Leukocyte Function-associated Antigen</i>).
LPS	Lipopolisacàrid (endotoxina).
MAP-kinasas	Proteïna Activada per Mitògens (de l'anglès <i>Mitogen-activated protein</i>)-kinasa.
M.E.	Matriu Extracel·lular.
MHC	Complex Major d'Histocompatibilitat (de l'anglès <i>Major Histocompatibility Complex</i>).
MLC	Cultiu Limfocitari Mixt (de l'anglès <i>Mixed Lymphocyte Culture</i>).
mRNA	RNA missatger.
N-glyc.	N-glicosilació o Glicosilació en un residu d'Asparagina (N).
NP-40	Nonidet-P 40
O.D.	Densitat Òptica (de l'anglès <i>Optical Density</i>).
O-glyc.	O-glicosilació.
PAGE	Electroforesi en Gel de PoliAcrilamida (de l'anglès <i>PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>).
PBLs	Limfòcits de Sang Perifèrica (de l'anglès <i>Peripheral Blood Lymphocytes</i>).
PBMCs	Cèl·lules Mononucleades de Sang Perifèrica (de l'anglès <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>).
PBS	Tampó salí fosfat (de l'anglès <i>Phosphate-Buffered Saline</i>).

PCR	Reacció en Cadena de la Polimerasa (de l'anglès <i>Polymerase Chain Reaction</i>).
PE	Ficoeritrina (de l'anglès <i>Phycoerytrin</i>).
PHA	<i>Phytohaemagglutinin</i> o Fitohemagglutinina.
PKC	Proteinkinasa C.
PMA	<i>Phorbol 12-Myristate 13-Acetate</i> .
PSTKs o PSKs	Protein-Serin/Treonin-Kinases.
PSTPs o PSPs	Protein-Serin/Treonin-Fosfatases.
PTKs	Protein-Tirosin-Kinases.
PTPs	Protein-Tirosin-Fosfatases
rpm	Revolucions Per Minut.
SDS	Dodecil Sulfat Sòdic (de l'anglès <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>).
SDS-PAGE	Electroforesi en Gel de PoliAcrilamida i Dodecil Sulfat Sòdic (de l'anglès <i>Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>).
SF	Superfamília.
ssDNA	DNA d'esperma de Salmó.
t.a.	Temperatura ambient.
TCA	Tricloracètic.
TcR	Receptor de cèl·lules T.
TNF	Factor de Necrosi Tumoral (de l'anglès <i>Tumor Necrosis Factor</i>).
4-VP	4-VinilPiridina

INTRODUCCIÓ

I. INTRODUCCIÓ.

1.1.- EL SISTEMA IMMUNITARI I LES MOLÈCULES D'ADHESIÓ.

1.1.1.- LA RESPOSTA IMMUNITÀRIA: LA CÈL·LULA I EL SEU ENTORN.

El manteniment de la integritat i la identitat de l'individu en front a agressions externes o internes és la funció principal del sistema immunitari. En els animals superiors, i entre ells l'ésser humà, aquesta funció del sistema immunitari es centra en la capacitat de reconèixer el que és propi en front del que és estrany, mitjançant una complexa xarxa d'elements cel·lulars circulants, dispersos arreu de l'organisme. La peculiaritat d'aquest procés de reconeixement i resposta immunitaris es defineix en base a tres propietats característiques del mateix: l'especificitat, la clonalitat i la memòria.

El que la funció immunitària tingui com a característiques la clonalitat i l'especificitat, per les quals una única cèl·lula i la seva descendència (clona) reconeixen específicament un determinat element antigènic, no suposa que aquest reconeixement i la resposta ulterior involucrin només a les cèl·lules que constitueixen la clona; ans al contrari, tant al reconeixement com a la cascada de reaccions posteriors, diferents subtipus cel·lulars intervenen en un complex sistema de comunicacions intercel·lulars. Així, la comunicació entre cèl·lules juga un paper clau a tots els processos que configuren la resposta immunitària: la presentació antigènica, l'expansió clonal, la inducció del component humoral de la resposta específica, la citotoxicitat, ... I a més a més de la pròpiament anomenada resposta immunitària, existeix un altre

seguit de processos que també involucren la comunicació de les cèl·lules del sistema immunitari amb altres elements de l'organisme: el desenvolupament i la diferenciació cel·lular, la recirculació, la migració i la localització (*homing*) leucocitàries, la resposta inflamatòria inespecífica, la coagulació sanguínia, la cicatrització, la reparació tisular, ... Per això justament parlem del sistema immunitari com una unitat de funció definida per una xarxa d'elements cel·lulars dispersos arreu de l'organisme, però intercomunicats entre sí i el seu entorn.

1.1.2.- LES MOLÈCULES DE MEMBRANA I L'ENTORN CEL·LULAR

Per a dur a terme la intercomunicació cel·lular amb l'entorn, les cèl·lules del sistema immunitari basen la seva capacitat de resposta, especialitzada segons els diferents subtipus cel·lulars, en el reconeixement de l'estat d'aquest entorn a través d'un ampli ventall de **molècules de membrana**. Si bé, estrictament parlant, només dues d'elles, el TcR (el Receptor antigènic de les cèl·lules T) i el BcR (el receptor antigènic de les cèl·lules B) dels limfòcits són les responsables de l'especificitat i la clonalitat del reconeixement, la resposta completa i eficaç tan sols s'assoleix quan els equilibris d'interaccions i senyalitzacions inter i intracel·lulars cooperen eficientment en el reconeixement específic de la molècula estranya (antigen). Així, juntament amb la interacció específica entre el receptor antigènic i l'antigen, les altres molècules de membrana, bàsicament glicoproteïnes, juguen un paper accessori (d'aquí el que, clàssicament, s'anomenin molècules accesoris) però fonamental en el desenvolupament de la resposta immunitària, ja siguin com elements moduladors de la senyalització intracel·lular, com receptors de molècules solubles (interleucines) o com receptors/l·ligands d'altres molècules de la

membrana que permeten el contacte entre les cèl·lules que cooperen en la resposta. Fins i tot, el reconeixement de l'antigen pel receptor de les cèl·lules T necessita de la presentació de l'antigen (àdhuc existeix un subgrup cel·lular especialitzat anomenat Cèl·lules Presentadores d'Antígen, APCs) i només es produeix dins del context d'una glicoproteïna pròpia d'un grup de molècules anomenades en humans HLA, a través d'una interacció cèl·lula a cèl·lula. El paper de les molècules de membrana s'amplia i es fa cabdal, en tots aquests altres processos immunitaris previs o paral·lels a la resposta (*homing*, desenvolupament, resposta inflamatòria, ...) i, fins i tot, en aquells elements posteriors que componen la tercera característica de la resposta immunitària, la memòria. Malgrat que el paper que juguen aquestes estructures de membrana en la memòria immunitària és encara objecte d'estudi, la presència/absència o l'increment/disminució en llur expressió a la membrana és sens dubte un marcador de l'estat de diferenciació cel·lular, i per tant de memòria cel·lular.

1.1.3.- MOLÈCULES DE MEMBRANA I ANTICOSSOS MONOCLONALS: CONCEPTE DE CD.

L'adveniment de la tecnologia dels Hibridomes (cèl·lula resultant de la fusió de dues cèl·lules diferents, en aquest cas un limfòcit B i una cèl·lula mielomatososa) per l'obtenció d'Anticossos Monoclonals (AcMos) [Kohler & Milstein, 1975], ha possibilitat la definició, gràcies a l'especificitat d'aquests AcMos, de moltes d'aquestes estructures de membrana característiques, i ahora co-responsables, de la resposta immunitària. Treballs cooperatius en Tallers (Workshops) internacionals per la comparació de la reactivitat dels diferents AcMos contra aquestes molècules de superfície dels leucòcits

humans, han permès l'agrupament dels mateixos segons l'estructura antigènica de membrana que reconeixen. Així, per extensió, cada molècula antigènica humana distinta reconeguda per un grup específic d'aquests AcMos es anomenada Grup de Diferenciació (*Clusters of Differentiation*) o CD, doncs les primeres molècules descrites definien subpoblacions cel·lulars amb distints estadis de diferenciació cel·lular. La nomenclatura CD s'acompanya d'un número diferenciador, des de l'1 fins al 130, definit al *V International Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens* [Schlossman et al, 1994] que intenta englobar totes les molècules leucocitàries humanes reconegudes per AcMos. En aquells casos en els que el treball del Workshop, si bé és suggeridor de que certs AcMos reconeixen una estructura diferent, no permet la certesa absoluta de l'exclusivitat del terme CD, la terminologia aplicada és CDw (w de Workshop). Quan posteriors Tallers determinen de manera inequívoca aquesta especificitat, la lletra w desapareix del terme (aquest és el cas de la molècula CD50 objecte d'anàlisi d'aquesta tesi, que inicialment, com a conseqüència del IV Workshop, s'anomenà CDw50, adquirint en el V Workshop l'actual denominació CD50). La importància d'aquests estudis internacionals no tan sols radica en l'agrupament i validació de l'especificitat dels AcMos presentats (aspecte que al darrer *V Workshop* s'ha vist culminat per l'elaboració d'una base de dades informàtica de gran utilitat i de lliure accés [Shaw, 1993]) sinó que també ha permès la definició de noves molècules que posteriorment han estat més pregonament analitzades. D'aquesta manera, la definició de molècules úniques pels nous CDs és validada quan treballs posteriors clonen i seqüencien a nivell del cDNA les molècules que inequívocament reconeixen els AcMos que permeteren definir el CD. Alhora també es concreten, a nivell d'una única molècula, les

funcions analitzades a través dels AcMos, potentíssimes eines per l'estudi de la funció biològica associada a la molècula de membrana reconeguda.

1.1.4.- MOLÈCULES DE MEMBRANA I MOLÈCULES D'ADHESIÓ.

A nivell funcional, cal distingir clarament entre les molècules que juguen el seu paper de comunicació intercel·lular a distància (receptors d'interleucines i factors de creixement) i les que intervenen directament en el contacte cèl·lula a cèl·lula mitjançant la interacció entre una glicoproteïna de membrana (receptor) en una de les cèl·lules que interaccionen i una segona molècula de superfície (l·ligand) en l'altra cèl·lula. Aquestes molècules anomenades inicialment molècules accessòries del reconeixement immunitari, juguen com ja s'ha dit, una funció d'interrelació cel·lular no únicament lligada al reconeixement antigènic de la resposta immunitària. Per això, de manera més àmplia i correcte es coneixen com a **molècules d'adhesió**. Cal assenyalar a més a més que aquest paper de les molècules d'adhesió en la unió cèl·lula-cèl·lula, es diversifica en alguns dels casos cap al reconeixement de certes estructures moleculars extracel·lulars, que permeten el contacte directe de la cèl·lula amb l'entorn tisular definit per aquesta xarxa multimolecular anomenada Matriu Extracel·lular (M.E.). Les molècules d'adhesió fan d'aquesta manera de pont entre les estructures exteriors (altres cèl·lules o M.E.) i les interiors (citoesquelet o complexos enzimàtics). Alhora, el concepte de molècula d'adhesió no es troba circumscrit només a les molècules del sistema immunitari, sinó que també inclou aquelles molècules de membrana responsables del contacte intercel·lular o amb la M.E. de qualsevol llinatge cel·lular (cèl·lules del sistema nerviós, cèl·lules epitelials, cèl·lules del desenvolupament embrionari, ...).

1.2.- CLASSIFICACIÓ DE LES MOLÈCULES D'ADHESIÓ.

La identificació de funcions i estructures comuns entre els diversos components de l'ampli ventall de molècules d'adhesió ha permès llur classificació en quatre grans grups: les Cadherines, les Selectines, les Integrines i la Superfamília de les Immunoglobulines. Afegirem en aquesta introducció un cinquè grup com a calaix de sastre que anomenarem "altres molècules d'adhesió" i que inclou totes aquelles molècules leucocitàries que malgrat presentar una clara funció adhesiva no es poden incloure en cap dels quatre grups primers. A nivell terminològic existeix una certa discrepància de termes a l'anomenar aquests cinc grans tipus de molècules d'adhesió, especialment els quatre primers. Així sovint s'empra el nom de Família per les Cadherines, les Selectines i les Integrines, mentre que el terme de Superfamília (SF), es reserva normalment per la SF de les Immunoglobulines. Aquesta terminologia tan habitual, no es correspon amb la definició inicial [Dayhoff et al, 1983], que valora purament l'anàlisi de seqüències, dels conceptes de Família i Superfamília: estructuralment sota el terme de "Família" hom agruparia les proteïnes amb una identitat en la seqüència aminoacídica superior al 50%, mentre que sota el concepte de "Superfamília" s'agruparien similituds del 50% o menors en les seqüències. Aquest ampli rang en l'aplicació del concepte de SF, suposa que, als nivells de semblança més baixos (15-25%) a on sovint es troben diversos components d'una SF, altres consideracions sobre l'estructura secundària són les que permeten l'agrupació de les molècules dins d'una SF. Així en front de l'ús força generalitzat del terme Família per les Cadherines, Selectines i Integrines, donat el baix grau d'homologia (inferior al 50%) entre els diversos components de cada grup semblaria convenient unificar els criteris i promoure l'ús del terme SF pels grans grups. D'aquesta manera el terme de Família podria reservar-se per als

subgrups de molècules funcionalment i estructuralment més propers. Malgrat tot, i donat que les tres Selectines, segons el domini que s'analitzi, formen part de tres SF diferents i més àmplies, la de les Lectines tipus C o Calci dependent, la de l'EGF i la de les Proteïnes de Control del Complement, potser el més convenient és emprar el terme de Grup Funcional de Molècules d'Adhesió.

Pel fet que alguns dels components dels cinc Grups Funcionals no són glicoproteïnes amb funció immunitària, la descripció següent pretén només presentar esquemàticament les característiques principals dels cinc Grups de Molècules d'Adhesió, centrant-se especialment en els aspectes més immuno-relacionats d'aquestes molècules.

1.2.1.- CADHERINES.

Sota el terme de Cadherines hom engloba al menys 11 glicoproteïnes de membrana humanes [Suzuki et al, 1991] i vàries de distints vertebrats. Fins i tot, algunes molècules de *Drosophila*, amb identitat significativa amb les Cadherines dels vertebrats, han estat descrites [Mahoney et al, 1991]. Totes elles són molècules d'adhesió dependent de calci, és a dir que sense la presència d'aquest catió les interaccions que estableixen es destrueixen. D'aquí el seu nom de Cadherines, una combinació de paraules entre els mots calci i adherir, Ca-adherir, amb un sufix (-ina) que el substantivitza [Takeichi, 1989]. L'ur dependència del calci va més enllà del manteniment de les unions que estableixen, doncs la presència d'aquest ió a més a més les protegeix de l'ur proteolisi, mentre que en absència de calci esdevenen ràpidament degradades. Aquestes molècules participen en unions generalment homofílques (entre la mateixa molècula), malgrat que de vegades la unió heterofílca (entre molècules distintes) de Cadherines diferents, encara que

infreqüent és també possible [Takeichi, 1990; Suzuki et al, 1991]. L'ur paper fonamental es defineix durant el desenvolupament embrionari mantenint l'estructura multicel·lular i determinant la localització cel·lular en els patrons morfogènics [Townes & Holtfreter, 1955; Nose et al, 1988]. Aquest paper morfogènic en el teixit adult es centraria en la interacció cel·lula a cel·lula (zona adherent) en els teixits sòlids per al manteniment de l'estructura tisular i la compartimentalització de diferents espais (polarització) dins de la cel·lula, en relació al citoesquelet. Hi ha evidències [Behrens et al, 1989] de que l'expressió alterada de certes Cadherines podria jugar un paper en la invasió i metàstasi tumoral.

Entre les onze Cadherines destaquen sis molècules identificades en vertebrats, les anomenades B-, E-, M-, N-, P- i T-Cadherina, les característiques principals de les quals es resumeixen en la següent taula (Taula 1). A l'estructura general de les Cadherines, ressalta l'alt nivell d'homologia aminoacídica (43-58%) amb 3-5 zones repetitives, trobant-se entre les tres primeres els llocs d'unió de calci (motius conservats DXNDN o DXD) i un altre motiu conservat LDREXXXXYXL. L'ur domini extracel·lular N-terminal, d'uns 110 aminoàcids, conté la seqüència HAV que li confereix l'especificitat d'unió [Nose et al, 1990]. Un domini transmembrana d'uns 20 aminoàcids es completa amb una curta cua citoplàsmica C-terminal a on les Cadherines poden ser fosforilades, regulant-se l'ur funció. Aquesta funció vindria definida per la capacitat d'unió amb altres proteïnes intracel·lulars (especialment a filaments d'actina a través de les catenines α , β i γ , l' α -actinina i la vinculina) mitjançant el seu domini citoplàsmic [Ozawa et al, 1990]. D'aquesta manera i a través de l'ur ancoratge al citoesquelet, les Cadherines asseguren, d'una manera estable i alhora regulable, les interaccions que les defineixen com a molècules d'adhesió intercel·lulars.

Taula 1

Nom	Altres noms	Estructura	Localització	Lligands
B-Cadherina	K-CAM	P.m. 120 i 122 kD (doblet). 3 punts de N-glyc. potencials. 5 zones repetitives.	Descrit en teixit embrionari d'aus, es troba en teixit nerviós, diversos epitelis i múscul esquelètic.	Desconeguts, potser media una interacció homofíllica.
E-Cadherina	Uvomorulina, ARC-1, L-CAM, Cell-CAM120/180	P.m. 124 i 135 kD (doblet). 5 punts de N-glyc. potencials. 5 zones repetitives.	Epitelis no-neuronals, regulant-se en el desenvolupament i apareixent també en certs estadis neoplàsics	E-Cadherina (interac. homofíllica). Interacció citoplàsmica amb Cateninas
M-Cadherina	Cadherina Muscular	P.m. 104 kD. 5 punts de N-glyc. potencials. 5 zones repetitives.	Cèl·lules musculars en diferenciació (miotubs) i en mioblastes	Desconeguts (no conté la seqüència HAV).
N-Cadherina	A-CAM, Cadherina Neural, N-Cal-CAM.	P.m. 130 kD. 7 punts de N-glyc. potencials. 5 zones repetitives.	Teixit nerviós, cardíac, del cristal·lí i al múscul estriat.	N-Cadherina (interac. homofíllica). Interacció citoplàsmica amb Cateninas
P-Cadherina	Cadherina placentària.	P.m. 118 kD. 4 punts de N-glyc. potencials. 5 zones repetitives.	Diferents teixits epitelials embrionaris i placentaris.	N-Cadherina (interac. homofíllica). Interacció citoplàsmica amb Cateninas
T-Cadherina	Cadherina truncada.	P.m. 95 i 110 kD (doblet). 7 punts de N-glyc. potencials. 5 zones repetitives. Unida a membrana a través de GPI.	Teixit nerviós, muscular estriat, cardíac, renal, retinià i pulmonar.	T-Cadherina (interac. homofíllica). No pot presentar cap interacció citoplàsmica.

La manca de paper descrit, fins al moment, per a les Cadherines dins de la resposta immunitària, fa que la descripció dels membres d'aquestes molècules d'adhesió no es desenvolupi en aquest treball més enllà del presentat en aquesta introducció.

1.2.2.- SELECTINES.

Malgrat que les Selectines són un grup, fins ara, petit de molècules d'adhesió, format per només tres glicoproteïnes, la seva importància clau en els mecanismes d'interacció cèl·lula a cèl·lula i cèl·lula-M.E., ha fet que des del 1989, any de la descripció de llurs seqüències proteïques, s'hagin acumulat un ampli ventall de dades al respecte del paper d'aquestes glicoproteïnes. El nom Selectina va ser proposat en un abstract a un congrés per Michael P. Bevilacqua [Bevilacqua, 1989] com un joc de paraules que pretenia emfatitzar la capacitat d'aquestes molècules de *seleccionar* les diverses interaccions cel·lulars, alhora que presentaven una expressió *selectiva*, i llur funció de reconeixement d'estructures carbohidratades (funció *lectina*). Aquesta funció lectina va impulsar l'ús alternatiu del terme Lec-CAM (*Lectin Cell Adhesion Molecule*) que ha caigut en desús, com ha passat amb la majoria dels molts diversos noms que han tingut els tres components de la família. Així les tres molècules E-Selectina, L-Selectina i P-Selectina, anomenades així per les poblacions cel·lulars a on s'expressen (E- d'endoteli, L- de leucòcits i P- de Plaquetes, malgrat que també s'hi troba a l'endoteli), es troben al llarg de la bibliografia amb molts noms diferents segons els autors i les èpoques dels treballs que en parlen (Taula 2). Darrerament i amb un intent unificador, han estat reclassificades en el darrer *V International Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens* amb els noms de CD62E, CD62L i CD62P respectivament. Aquesta terminologia, malgrat no estar gaire d'acord amb la costum dels altres *Workshops* d'assignar un número independent per cada molècula identificada, ha estat proposada partint del CD62, grup de diferenciació ja assignat a la P-Selectina en el *IV Workshop*, en un intent de simplificar el que podria haver estat una complicada nomenclatura. Aquest mateix principi s'ha aplicat per altres molècules com les diverses cadenes α de les Integrines $\beta 1$ (CD49a-f) o les cadenes mb-1 i B29 del BcR (CD79a-b).

Taula 2

Nom (CD)	Altres noms	Estructura	Expressió cel·lular	Lligands (localització)
E-Selectina (CD62E)	ELAM-1, LECAM-2	11 punts de N-glyc. potencials. 6 dominis CCP. 32 aminoàcids citoplàsmics amb 6 Ser i 8 Tyr fosforilables. P.m. 107-115 kD	Endoteli activat (Inducció a les 3-6 h per acció de LPS o/i citocines: IL-1 β , TNF α).	s-Le ^x i el seu isòmer s-Le ^a . Semblen estar en varies glicoproteïnes [CLA (Antigen limfocitari cutani)] de granulòcits, monòcits i certes subpoblacions limfocitàries.
L-Selectina (CD62L)	LAM-1, LECAM-1, MEL-14, gp90 ^{MEL-14} , TQ1, LEU-8, mLHR, DREG.56	7 punts de N-glyc. potencials. 2 dominis CCP. 17 aminoàcids citoplàsmics amb 2 Ser fosforilables. P.m. 74 kD (limf.) o 90-100 kD (neutr.)	Present a gairebé totes les cèl·lules leucocitàries madures i immadures (limfòcits T i B, neutròfils, monòcits ...). S'allibera (<i>shedding</i>) després de l'activació.	Glúcid fuco-sulfo-sialitzat relacionat amb s-Le ^x i l'epítot MECA-79 presents en: CD34, GlyCAM-1 (secretat) i MAdCAM-1. Localització: moll de l'os, endoteli activat i certs endotelis venulars (HEVs).
P-Selectina (CD62P)	PADGEM, GMP-140, LECAM-3	12 punts de N-glyc. potencials. 9 dominis CCP. 34 aminoàcids citoplàsmics amb 2 Ser i 1 Tyr. P.m. 140 kD.	Plaquetes/megacariòcits (grànuls α) i endoteli (cossos de Weibel-Palade). Apareix ràpidament (minuts) en membrana després de la degranulació (Histamina, Trombina, ..)	s-Le ^x i s-Le ^a , presents en varies glicoproteïnes (PSGL-1) de plaquetes, neutròfils, monòcits i certes subpoblacions limfocitàries.

ELAM : *Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule*, LECAM : *Leukocyte-Endothelial Cell Adhesion Molecule*, LAM : *Lymphocyte Adhesion Molecule*, PADGEM : *Platelet Activation Dependent Granule External Membrane Protein*, GMP : *Granule Membrane Protein*, s-Le : *sialyl-Lewis*, HEV : *High Endothelial Venule*, GlyCAM : *Glycosylation-dependent Cell Adhesion Molecule*, MAdCAM : *Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule*, PSGL : *P-Selectin Glycoprotein Ligand*.

Les tres Selectines constitueixen un clar exemple del que hem anomenat Grup Funcional ja que presenten un alt grau d'homologia estructural [Springer & Lasky, 1991] proteica i genètica, donat que els seus gens es troben

agrupats en una curta regió del cromosoma 1 humà. Per llurs seqüències proteiques, i en funció del domini proteic analitzat, les Selectines formen part de la SF estructural de Lectines tipus C (calci dependent), la SF de l'EGF i la SF de les CCP (*Complement Control Proteins*) o CRP (*Complement Regulatory Proteins*) (Figura 1). Així a nivell del domini N-terminal, es troba llur capacitat d'unió de tipus Lectina Calci dependent. Tot seguit, en direcció C-terminal, hom hi troba un domini o motiu de 33-38 aminoàcids de tipus EGF (*Epidermal Growth Factor*), anomenat d'aquesta manera per haver estat descrit per primer cop en el Factor de Creixement Epidèrmic. El paper funcional d'aquests dominis EGF, malgrat no estar clar, és sens dubte clau, doncs llur delecció aboleix l'adhesió cel·lular. És possible que el domini EGF mantingui la conformació estructural del domini lectina, o bé reconeixi el component proteic del lligand [Seigelman et al, 1990; Kansas et al, 1991]. Un nombre variable (2, 6 i 9) de dominis tipus CCP, formats per 58-64 residus, proporciona l'esquelet estructural de les Selectines, unint-se al domini transmembrana de 23 aminoàcids per 10-15 residus espaiadors. Aquest esquelet de dominis CCP optimitzarien en cada cas la interacció de la Selectina amb el lligand, separant de la membrana el lloc d'unió (dominis lectina/EGF) i augmentant la flexibilitat molecular. Tampoc es pot descartar un paper regulador d'algun factor del complement, per part d'aquests dominis CCP, funció gens inapropiada en els llocs d'inflamació, a on les Selectines determinen l'arribada de les cèl·lules involucrades. Una curta porció intracitoplàsmica (17-35 a.a.), amb funció poc clara, completa l'estructura general de les Selectines.

De manera general, les Selectines a través de llurs dominis lectínics vehiculitzen el reconeixement de certes seqüències oligosacàridiques en diverses molècules amb qui defineixen la interacció molecular intercel·lular.

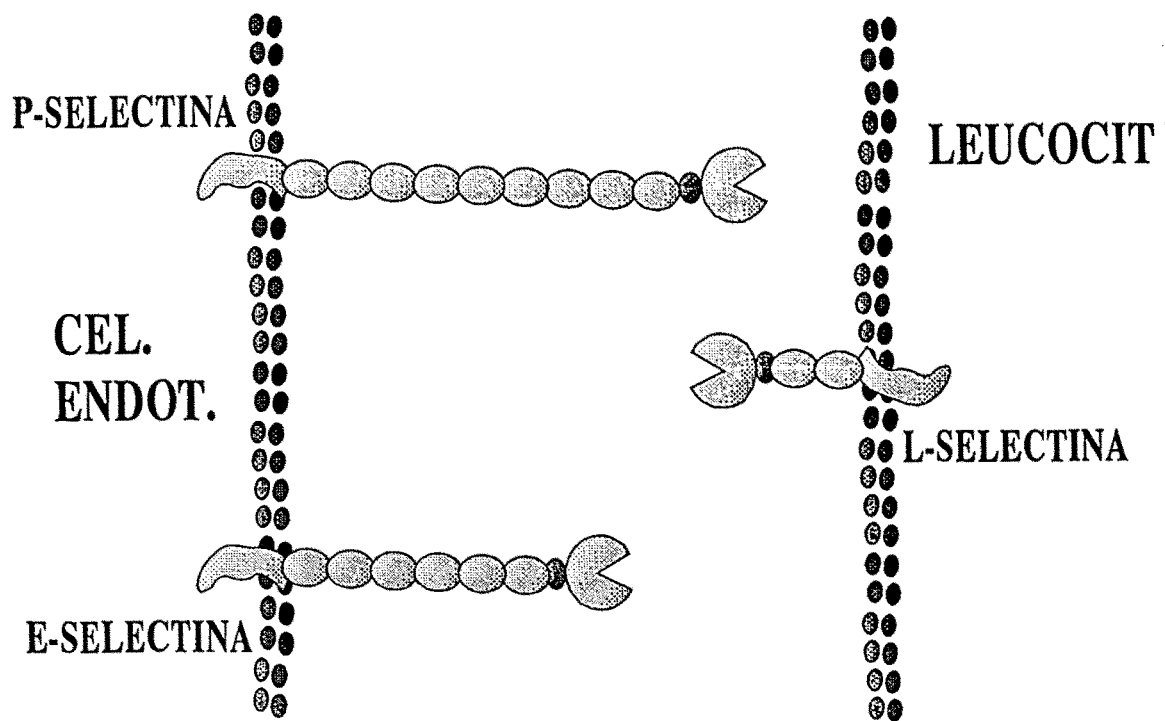


Figura 1. Esquema de l'estructura de les Selectines.

Aquest tipus de contacte molecular amb seqüències glucídiques explica el perquè de manera general les Selectines reconeixen diversos lligands. El paper funcional, el grau d'afinitat en la interacció i la distribució cel·lular d'aquests lligands o co-receptors són aspectes fonamentals per a definir la funció de les Selectines. Així, llur presència o absència en cada tipus cel·lular i llur capacitat d'interacció amb les Selectines, delimiten el paper funcional de cada Selectina. Els lligands de les Selectines (especialment la L- i la P-Selectines) són glúcids units amb molècules tipus mucina (macroglucoproteïnes riques en serines i treonines), mitjançant punts d' O-glicosilació. La seqüència glucídica millor analitzada de les reconegudes per les Selectines és una forma sialitzada del grup sanguini Lewis a i x. La seqüència glucídica de l'oligosacàrid sialil-Lewis^x (s-Le^x) és $\text{Neu5Ac}\alpha\text{2-3Gal}\beta\text{1-4(Fuc}\alpha\text{1-3)GlcNAc-R}$, mentre que el de l'oligosacàrid sialil-Lewis^a (s-Le^a) és $\text{Neu5Ac}\alpha\text{2-3Gal}\beta\text{1-3(Fuc}\alpha\text{1-4)GlcNAc-R}$,

és a dir un intercanvi en la posició d'ancoratge de la Galactosa i la Fucosa amb la N-Acetil-Glucosamina. Ambdues seqüències glucídiques s-Le^{x,a} són reconegudes tant per la L- com la E-Selectina, però en estructures proteïques diferents. La necessitat de conjunció de la seqüència glucídica i peptídica queda plenament demostrada amb la necessitat de la transfecció simultània en cèl·lules COS del c-DNA de la proteïna PSGL-1 (*P-Selectin Glycoprotein Ligand 1*) i de l'enzim responsable de la fucosilació, α 3/4fucosiltransferasa, per obtenir un lligand funcional per la P-Selectina. Cap dels dos c-DNA per sí sol és capaç d'induir l'expressió de l'activitat lligand del CD62P [Moore et al, 1993; Sako et al, 1993]. El grau d'implicació del diversos lligands en les interaccions és controvertit, i els experiments *in vitro* no tenen sempre una clara correspondència amb la realitat de les interaccions *in vivo*. Així, mentre certs estudis definien el reconeixement de certs epítops glucídics de la L-Selectina per part de la P- i l'E-Selectina [Picker et al, 1991a], en l'actualitat altres lligands glicoproteics [Picker et al, 1991b; Moore et al, 1993] semblen tenir un paper més important en les interaccions que realment vehiculitzen les Selectines. Malgrat que la identificació de lligands concrets per a cada Selectina ha representat en els darrers anys un importantíssim avenç, encara no es coneixen tots els lligands reconeguts per les Selectines i encara menys quin és el paper funcional de cadascun d'ells en cada moment. L'existència d'una deficiència genètica en la biosíntesi de fucosa, amb la consegüent manca de lligands per la E- i la P-Selectina [von Andrian et al, 1993] que comporta una malaltia anomenada LAD-II (*Leukocyte Adhesion Deficiency-II*) clínicament similar al LAD-I per dèficit de les β_2 Integrines (caracteritzat per una resposta inflamatòria ineficient), és una evidència *in vivo* de l'important paper d'aquestes Selectines.

Vehiculitzar el reconeixement inicial de l'endoteli vascular per part de les cèl·lules leucocitàries, a la resposta inflamatòria o a la recirculació limfocitària, és la funció adhesiva principal que porten a terme les Selectines amb llurs lligands. La funció adherent de les Selectines es defineix primer en la fase d'enganxament o lligament (*tethering*) leucocitària, i tot seguit en el rodolament (*rolling*) de les cèl·lules leucocitàries circulants, ambdues fases imprescindibles per a permetre llur posterior migració transendotelial. Així, les Selectines són les molècules responsables de mediar una làbil, però adherent, interacció inicial (enganxament) dels leucòcits a la paret vascular en diferents teixits. Aquesta interacció caracteritzada per unes constants d'associació (k_{on}) i de dissociació (k_{off}) molt ràpides [Lawrence & Springer, 1991; Ushiyama et al, 1993] permet el consegüent rodolament dels leucòcits en la direcció del flux circulat [Ley et al, 1991; Lawrence & Springer, 1991; Mayadas et al, 1993], mercès a que aquestes interaccions Selectina-ligand duren uns milisegons i permeten contactes successius tot al llarg de les superfícies cel·lulars leucocitària i endotelial. El control de l'expressió de les diverses Selectines i sobretot dels seus lligands és el que determina l'especificitat de les interaccions, definint així la capacitat de **seleccionar** que tenen aquestes molècules d'adhesió. Les Selectines són així les responsables principals de l'exquisida especificitat de la recirculació limfocitària, determinant que els diferents limfòcits segons llur funció efectora, i sobretot segons on han tingut el seu primer contacte amb l'antigen, circulin per determinats teixits (mecanisme anomenat *homing*), en un mecanisme de vigilància limfocitària dirigida i eficient. Així, de manera genèrica les molècules de membrana leucocitàries responsables d'aquesta recirculació dirigida s'anomenen *homing receptors*, que es podria traduir com a receptors de localització o aniuament,

mentre que per l'altra banda els seus correceptors vasculars, donada llur capacitat d'adreçar els leucòcits a llocs concrets, es coneixen amb el nom d'Adressines (*Addressins*). Així, en el cas de les Selectines, el CD62L es consideraria un *homing receptor* i els seus lligands vasculars Adressines, mentre que el CD62P i CD62E s'haurien de considerar Adressines, i llurs col·ligands leucocitaris, els receptors de localització. Aquesta terminologia clàssica, molt clara conceptualment, resulta poc útil quan s'estudien molecularment aquestes interaccions, doncs fa que la funció Selectina dependent de que sigui per la L- o per la P- o la E-Selectines faci considerar aquestes molècules receptors de localització o Adressines. Per això el que és important, més que la terminologia, és poder definir les Selectines com les molècules d'adhesió que en el reconeixement de llurs lligands específics determinen la unió dels limfòcits a l'endoteli venular dels ganglis limfàtics i dels teixits limfoides associats a les mucoses, definint per aquesta interacció les zones de recirculació limfocitària.

El paper de les Selectines, especialment per llur diferent capacitat de regulació en la superfície cel·lular, esdevé encara més important en els mecanismes inflamatoris a on determinen la primera part del procés d'arribada i migració transendotelial de granulòcits, neutròfils i limfòcits a la zona afectada. Aquest mecanisme de migració cel·lular es porta a terme a través de dos submecanismes, el d'haptotaxis (o migració cel·lular a favor de gradient de major adhesivitat), i el de quimiotaxis (o migració cel·lular a favor de gradient de concentració de certes substàncies activadores anomenades agents quimiotàctics). Les Selectines són responsables de l'inici de l'haptotaxis, permetent l'enganxament i el rodolament de les cèl·lules circulants sobre l'endoteli de la vènula post-capilar de la zona inflamada.

Aquest procés que afecta a diferents subgrups cel·lulars segons la cinètica d'expressió de les Selectines endotelials, es produeix a favor de gradient (haptotaxis) cap a la zona inflamatòria. Així, per un costat, la P-Selectina s'indueix ràpidament, en minuts, en les cèl·lules endotelials després de llur activació per mitjancers solubles de la inflamació (Histamina, Trombina, ...) que provoquen l'exocitosi dels cossos de Weibel-Palade que ja contenen aquesta P-Selectina preformada. D'aquesta manera es produirà ràpidament el reconeixement de la P-Selectina amb els seus lligands dels leucòcits, mentre la L-Selectina, constitutivament present en aquestes cèl·lules circulants col·laborarà, al reconèixer els seus lligands en l'endoteli, en aquesta primera fase de l'adhesió inflamatòria. Més tard (3-6 h) la inducció de l'aparició de la E-Selectina a l'endoteli per l'acció de la IL-1, LPS o el TNF- α , productes de la resposta inflamatòria vehiculitzada pels primers leucòcits que varen arribar, permetrà l'adhesió d'altres cèl·lules responsables de la resposta immunitària al teixit inflamat. Així, juntament amb aquestes cinètiques d'aparicions a la superfície cel·lular, serà la presència o absència de determinats sucres en cada element circulant el que determinarà quina població o subpoblació cel·lular es reclutarà a la zona inflamada, en cada moment. És doncs la conjunció de la cinètica de l'aparició i de l'expressió diferencial en cada subpoblació (amb patrons de glicosilació proteica diferent) de cada co-ligand el que defineix quins elements cel·lulars intervenen en cada instant en un procés inflamatori.

El paper de les Selectines dins del context integral d'interaccions moleculars que es produeixen a la recirculació limfocitària i la inflamació es revisarà més endavant en aquesta introducció sota una visió més globalitzadora que permet relacionar-les amb les altres molècules d'adhesió que intervenen (veure 1.3.1.- Interaccions Leucòcits-Endoteli.)

1.2.3.- INTEGRINES.

La capacitat de certes molècules de membrana d'unir o **integrar** diverses estructures de l'entorn extracel·lular (altres cèl·lules o M.E.) amb els components intracel·lulars (citoesquelet) és el que motiva que s'empri el nom d'Integrines per a englobar més de 20 glicoproteïnes heterodimèriques de membrana. El nom Integrina va ser proposat en 1986 [Tamkun et al, 1986], arran de la clonació de la subunitat β del receptor de ratolí per a la fibronectina, doncs integrava la interacció del citoesquelet intracel·lular amb la matriu extracel·lular. Constituida ràpidament com una superfamília de molècules de membrana [Hynes, 1987], el nombre dels seus membres supera els 20 heterodímers de membrana, que per la seva funció vehiculitzen un ampli ventall d'interaccions que van des del reconeixement de diverses estructures de la matriu extracel·lular, fins al contacte cèl·lula-cèl·lula. Llurs peculiars característiques funcionals (capacitat de transduir senyals intracel·lulars, regulació de llurs funcions per variacions en l'expressió de membrana o canvis en l'afinitat per llurs lligands, diversa capacitat d'interacció amb diversos components intracel·lulars, multiplicitat de lligands, ...) fan de les Integrines un dels grups de molècules d'adhesió més versàtil i que ha rebut més atenció per part de treballs específics i revisions actualitzadores [Hynes, 1987; Albelda & Buck, 1990; Larson & Springer, 1990; Ruoslahti, 1991; Hynes, 1992; Springer, 1994].

Les Integrines són heterodímers formats per dues cadenes, anomenades α i β , unides no covalentment (Figura 2). Fins al moment es coneixen més de 20 Integrines diferents formades, al menys, per la combinació de 15 diferents cadenes α i 9 cadenes β . Normalment cada cadena β pot expressar-se amb diverses cadenes α , però també és possible la combinació de una cadena α amb varies cadenes β . La conjunció del codi per a definir la cadena α i del codi per a la β , permet una nomenclatura estructural simplificadora de les Integrines

(sistema codificat de nomenclatura per subunitats). Malgrat que hi ha una tendència cada cop més gran per anomenar les Integrines per aquesta codificació de les cadenes α i β (o amb la nomenclatura CD corresponent) persisteixen encara nomenclatures anteriors que en molts casos són més emprades que el sistema codificat. La identitat de la cadena β permet la classificació de les Integrines en varis grups que presenten una certa relació funcional entre ells. La Taula 3, basant-se en el tipus de cadena β , ens permet classificar les Integrines en 4 grans grups i alhora resumir l'especificitat funcional de les diverses Integrines: les β_1 Integrines anomenades VLA (*Very Late Antigen*) doncs alguns dels seus membres s'indueixen tard a l'activació, les β_2 Integrines (LFA-1, Mac-1 i p150/95) anomenades també LeucoIntegrines per expressar-se només en leucòcits, les β_3 Integrines anomenades Citoadhesines per vehiculitzar fonamentalment la unió cel·lular a la M.E. i les β_7 Integrines sense cap altre nom fins al moment.

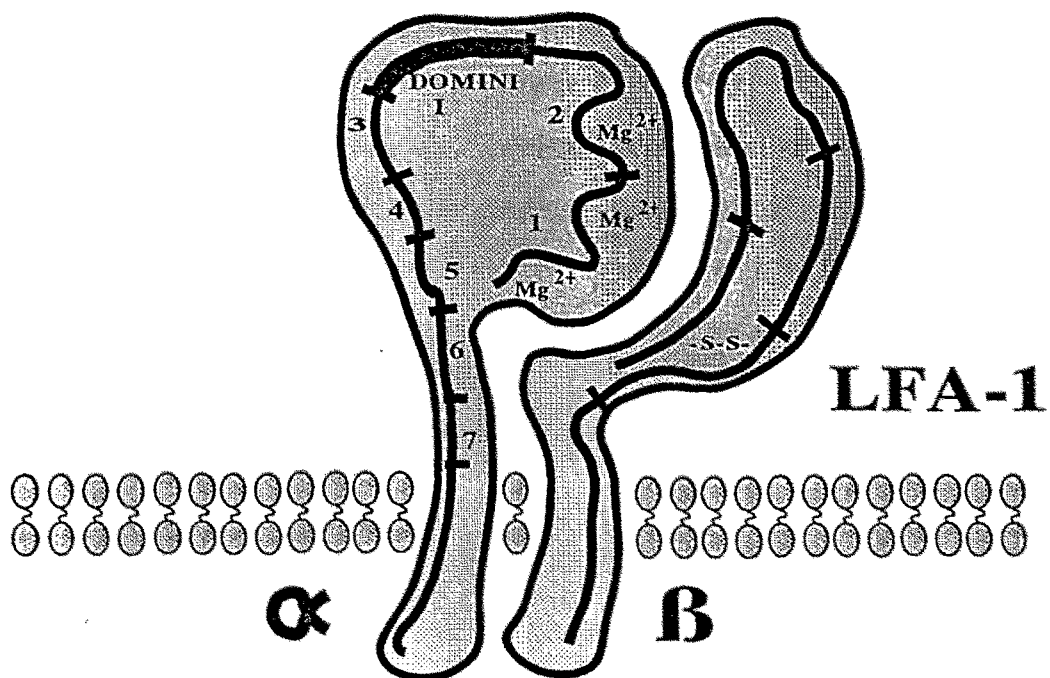


Figura 2. Esquema de l'estructura de les integrines.

Taula 3

Famílies de Receptors (subunitats i altres noms)	Distribució cel·lular	Lligands i contra-receptors (seqüenc. reconeixement)
β_1 Integrines (VLA, CD29, GPIIa)		
$\alpha_1\beta_1$ (CD29/CD49a, VLA-1)	Àmplia (T act., monòcits, melan., múscul llis.	Col, LM
$\alpha_2\beta_1$ (CD29/CD49b, VLA-2, GPIIa, ECMRI, Col Receptor)	Àmplia (T, B, Plaq., C.En., Fibroblastes, ...)	Col, LM (DGEA)
$\alpha_3\beta_1$ (CD29/CD49c, VLA-3)	Àmplia (B, tiroides, .)	FN (RGD ?), Col, LM
$\alpha_4\beta_1$ (CD29/CD49d, VLA-4, LPAM-2)	Leucòcits i melan.	FN (EILDV), VCAM-1
$\alpha_5\beta_1$ (CD29/CD49e, VLA-5, FN Receptor, GPIc-IIa)	Àmplia (T, monòcits, fibrobl, plaq., ...)	FN (RGD)
$\alpha_6\beta_1$ (CD29/CD49f, VLA-6, LM Receptor)	Plaq, Granul., T, monòcits, ...	LM
$\alpha_7\beta_1$ (H36 β_1)	Múscul, melan.	LM
$\alpha_8\beta_1$	C.Ep., SNC, melan.	?
$\alpha_V\beta_1$ (CD29/CD51, VLA-V)	C.Ep., Ronyó, ...	VN, FN (RGD)
β_2 Integrines o LeucoIntegrines (Leu-CAM, CD18)		
$\alpha_1\beta_2$ (CD11a/CD18, LFA-1)	Panleucocitari	ICAM-1, -2, -3
$\alpha_M\beta_2$ (CD11b/CD18, Mac-1, CR3)	Granul. i monòcits.	C3bi, FG, Factor X, ICAM-1
$\alpha_X\beta_2$ (CD11c/CD18, p150/95)	Macròfags, monòcits, granul. i algunes T.	C3bi, FG
β_3 Integrines (Citoadhesines, CD61)		
$\alpha_{IIb}\beta_3$ (CD41/CD61, gpIIb/IIa)	Plaq.	FG (KQAGDV), FN, VN, vWF, Thbr (RGD)
$\alpha_V\beta_3$ (CD51/CD61, VN Receptor)	Plaq., C.En., algunes B.	VN, FG, vWF, FN, Col, Osp, Thbr, ? (RGD)
β_7 Integrines (β_7)		
$\alpha_d\beta_7$ (CD49d/CD-, VLA-4 alt, LPAM-1)	Subpoblacions B i T, IEL	VCAM-1, MAdCAM-1, FN (EILDV)
$\alpha_H\beta_7$ ($\alpha_{IEU}\beta_7$, $\alpha_E\beta_7$, HML-1, M290).	IEL (2-6% PBL), leucèmies B, limfomes T.	? (HEV de les plaques de Peyer).
Altres Integrines:		
$\alpha_6\beta_4$ (CD104/CD49f, $\alpha_E\beta_4$, TSP 180, VLA-6 alt, LM Receptor)	Hemidesmosomes (C.Ep., C.Schw, i C.En).	LM, ? epiligrina
$\alpha_V\beta_5$ (CD51/CD-, $\alpha_V\beta_X$, $\alpha_V\beta_{3b}$)	C.Ep. tímiques, fibroblastes, carcinoma	VN (RGD), FN
$\alpha_V\beta_5$ (CD51/CD-)	C.Ep.	FN (RGD)
$\alpha_V\beta_8$ (CD51/CD-, $\alpha_V\beta_8$)	Placenta, ronyó, SNC.	?
$\alpha_V\beta_U$ (CD51/CD-)	Fibroblastes	?

T: Limfòcits T, B: Limfòcits B, Plaq.: Plaquetes, Granul.: Granulòcits, Melan.: melanoma, C.En.: Cèl·lules Endotelials, C.Ep.: Cèl·lules Epiteliales, C.Schw: Cèl·lules de Schwann, SNC: Sistema Nerviós Central, VLA: *Very Late Antigen*, Leu-CAM: *Leukocyte-Cell Adhesion Molecules*, IEL : *IntraEpithelial Lymphocytes*, VCAM: *Vascular Cell Adhesion Molecule*, MAdCAM : *Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule*, ICAM: *Intercellular Adhesion Molecule*, Col: Col·lagen, FN: Fibronectina, LM: Laminina, VN: Vitronectina, FG: Fibrinògen, vWF: Factor von Willebrand, Osp:Osteopontina, Thbr: Trombospondina.

Les Integrines constitueixen un grup funcional ampli de molècules amb una estructura bàsica heterodimèrica que varia segons els diferents membres. Entre les cadenes α i β no existeix cap homologia, per la qual cosa a l'utilitzar el terme de superfamília per les Integrines seria més correcte parlar de superfamília de les cadenes α i superfamília de les cadenes β de les Integrines. Un nivell superior de complexitat s'assoleix a través del *splicing* alternatiu de diverses subunitats [Hynes, 1992] com les subunitats β_1 , β_3 , β_4 , α_3 , α_6 , i α_{11b} . El significat funcional d'aquestes formes no és del tot clar, però es possible que pugui suposar un nou paper intracel·lular de la Integrina.

Les nou cadenes β definides fins al moment presenten una forta homologia en les seqüències amino-acídiques (entre un 37 i un 48 %), amb un grau de glicosilació variable (entre 6 i 12 punts de N-glicosilació) i un pes molecular que varia entre 95 i 130 kD, a excepció de la cadena β_4 que pesa 220 kD. Aquestes subunitats β es caracteritzen per 4 zones o dominis amb 37 residus cisteínics (és el que hom anomena els 4 dominis rics en cisteïnes), perfectament ben conservats i establint ponts di-sulfur intracatenaris, en una zona d'uns 190 a.a. que defineix el cos estructural de les subunitats β [Calvete et al, 1991]. El total de cisteïnes en les cadenes β arriba a 56 (excepte la β_4 que en té 48), doncs també defineixen altres ponts di-sulfur intracatenaris a la zona N-terminal, provocant el plegament globular característic de la zona d'unió amb llurs lligands. Seguint a una única regió transmembrana, la zona citoplàsmica, poc conservada entre les diferents subunitats β , és també curta (40-50 a.a.), excepte a la cadena β_4 que conté una llarga cua citoplasmàtica de 1018 a.a. amb 4 dominis repetitius fibronectínics de tipus III (Figura 2). Aquesta estructura bàsica, altament

conservada entre espècies tant distants com l'home, el ratolí, la granota o fins i tot la *Drosophila*, presenta certes peculiaritats en les diferents subunitats β , centrades principalment en la zona citoplàsmica. A part de les ja esmentades de la cadena β_4 , podem dir que mentre les subunitats β_1 i β_3 conserven una regió citoplasmàtica de fosforilació en tirosines [Tapley et al, 1989; Horvath et al, 1990], la subunitat β_2 presenta 7 punts de possible fosforilació en serines i treonines [Chatilla et al, 1989; Valmu et al, 1991], destacant entre ells la importància de la fosforilació del residu serínic 756 [Hibbs et al, 1991]. El paper funcional d'aquestes diferències es relacionaria amb la diferent capacitat funcional de les Integrines i amb els mecanismes que regulen aquesta funció.

Les subunitats α presenten menor homologia estructural entre elles (sobre un 25%). Totes tenen entre 18 i 24 residus cisteínics, estant al menys 14 d'ells molt conservats entre totes les subunitats α conegudes, i 7 motius repetitius de 24-45 a.a., espaiats per segments no-repetitius de 20-35 a.a., a l'extrem N-terminal. Els 3 o 4 darrers dominis d'aquestes 7 regions repetitives contenen els característiques llocs d'unió catiónics (DXN/DXDGXXD), que determinen la dependència funcional de les Integrines a la presència de cations Ca^{2+} o Mg^{2+} . Algunes cadenes α presenten a més a més un domini extra característic, anomenat domini I (insertiu/interactiu), entre els dominis 2 i 3, la qual cosa permet classificar les subunitats α , en dos grans grups en funció de la presència ($\alpha_1, \alpha_2, \alpha_L, \alpha_M, \alpha_X$) o absència ($\alpha_3, \alpha_5, \alpha_6, \alpha_7, \alpha_8, \alpha_{\text{lib}}, \alpha_V$) d'aquest domini I (cal no confondre aquest domini I "insertiu" amb el domini 1 repetitiu). Simultàniament però de manera oposada, la ruptura ($\alpha_3, \alpha_5, \alpha_6, \alpha_7, \alpha_8, \alpha_{\text{lib}}, \alpha_V$) o no ($\alpha_1, \alpha_2, \alpha_L, \alpha_M, \alpha_X$) post-traduccional de la subunitat en dos cadenes, una transmembrana de 25-30 kD i una altra més

llarga i extracel·lular, unides per un pont di-sulfur, és un altre criteri de subdivisió de les subunitats α . Només la cadena α_4 no presenta ni el domini I, ni els dos fragments units per ponts di-sulfur, malgrat que sí pot patir ruptura post-traduccional amb dos fragments de 70 i 80 kD units no-covalentment. Cap d'aquestes característiques estructurals aïlladament determina que un tipus de cadena α s'associï amb una determinada cadena β , ni que reconeixi un tipus de lligand o altre. Cal destacar, però, que els gens per les cadenes α de les LeucoIntegrines (α_L , α_M i α_X) estan a poca distància cromosòmica, ocupant els tres la localització 16p11-13.1 [Corbí et al, 1988]. Com les subunitats β , les cadenes α són proteïnes amb un grau de glicosilació variable (5-24 punts de N-glyc.) que tenen també un extrem N-terminal globular, responsable de la unió amb el seu lligand i regulat per cations bivalents, un únic pas trans-membrana i una cua C-terminal citoplàsmica no molt llarga (20-58 a.a.).

L'estructura de les cadenes α i β de les Integrines es complementa en una unitat funcional heterodimèrica amb un extrem globular extracel·lular d'unió al lligand, una doble tija que l'ancora a la membrana lipídica [Carrell et al, 1985; Nermut et al, 1988] i una doble cua citoplàsmica de molt diversa longitud per on la Integrina interacciona amb els components intracitoplàsmics (citoesquelet, complexos enzimàtics), transmetent i rebent les senyals cel·lulars. Parlar de les diverses funcions que desenvolupen l'ampli ventall d'Integrines i com es regulen aquestes funcions supera la intenció d'aquesta introducció. No és pot, però, deixar de citar el caràcter bifuncional de les Integrines que al reconèixer llurs lligands, no només seleccionen un o varis tipus d'interaccions (com es veu en la taula 3 les Integrines sovint presenten

varis lligands, alhora que, també sovint, un determinat lligand pot ésser reconegut per diverses Integrines), sinó que també "informen" a la cèl·lula d'aquest reconeixement, vehiculant-hi al seu interior diversos tipus d'efectes: canvis morfològics i de la mobilitat cel·lulars (aplanament, polarització de la distribució molecular, adherència, transmigració, ...) [Ingber, 1991; Shimizu et al, 1992a] com a conseqüència de la inducció de diverses associacions moleculars (al citoesquelet, a complexos transductors de senyals, ...) [Otey et al, 1990; Mosher, 1991] i de diversos senyals intracel·lulars (activació de bombes i canals iònics, inducció de fosforilacions en tirosina de diverses proteïnes, ...) [Ingber et al, 1990; Kornberg et al, 1991] que poden induir l'expressió de diversos gens (col·lagenases, factors de transcripció...) [Werb et al, 1989, Yamada et al, 1991] o co-estimular altres mecanismes activadors [Roberts et al, 1991; van Seventer et al, 1992]. Tot això suposa també un control exquisit de la funció Integrina per part de la pròpia cèl·lula que modula l'expressió [Shimizu et al, 1990] i/o l'afidècia funcional, activant [Wilkins et al, 1991; Rothlein & Springer, 1986a] o inactivant [Tapley et al, 1989] les diverses Integrines.

Centrant-se en el paper de les Integrines amb una funció clara en les interaccions inter-leucocitàries i leuco-endotelials ($\alpha_1\beta_2$, $\alpha_M\beta_2$, $\alpha_X\beta_2$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_4\beta_7$), podem dir que les Integrines ocupen un lloc central en la funció adherent d'aquestes cèl·lules circulants. Per un costat determinen la detenció del rodolament i la fixació dels leucòcits a l'endoteli durant la recirculació i la inflamació [Lawrence & Springer, 1991; Bevilacqua, 1993; Springer, 1994; Adams & Shaw, 1994], i per un altre, són molècules essencials per les interaccions interleucocitàries [Takada et al, 1989; Springer, 1990a-b; Bednarczyk & McIntyre, 1990] homo i heterotípiques. Així en la interacció

possiblement de major relevància immunitària, el reconeixement antigènic, la Integrina $\alpha_1\beta_2$ (CD11a/CD18), més correntment anomenada LFA-1 (*Leukocyte Function-associated Antigen-1*), juga un paper estabilitzador i determinant del reconeixement [Sánchez-Madrid et al, 1982; Spits et al, 1986]. Per ésser el LFA-1 l'únic lligand descrit fins al moment del CD50 (ICAM-3) i perquè juntament amb el seu important paper en totes les interaccions descrites i estudiades en aquesta tesi, és sens dubte un arquetip de la funcionalitat de les Integrines, s'analitza més àmpliament en el següent apartat.

1.2.3.1 - LFA-1.

LFA-1 (*Leukocyte Function-associated Antigen-1*) és el nom més utilitzat de la Integrina leucocitària $\alpha_1\beta_2$ (CD11a/CD18), és a dir una β_2 Integrina (LeucoIntegrina). Aquesta Integrina de distribució panleucocitària determina potser el conjunt d'interaccions de més gran interès en la resposta immunitària [Larson & Springer, 1990]. Present en les cèl·lules de les sèries limfocítica, granulocítica i monocítica (a excepció d'alguns macròfags tisulars) [Kurzinger et al, 1981; Springer et al, 1987], la seva funció adhesiva es vehiculitza a través dels seus tres lligands, les molècules ICAM (*Intercellular Adhesion Molecules*) ICAM-1 [Marlin & Springer, 1987], ICAM-2 [Staunton et al, 1989a] i ICAM-3 [de Fougères & Springer, 1992], de les quals l'ICAM-3 (CD50) és la molècula objecte d'aquesta tesi. La seva estructura general és la d'una β_2 Integrina amb una cadena α_1 . La cadena β_2 és comuna a Mac-1 i p150/95, les altres dos β_2 Integrines que juntament amb el LFA-1 constitueixen la família de les anomenades LeucoIntegrines [Kishimoto et al,

1989]. La cadena α_L , que presenta un domini I i tres llocs d'unió catiónics [Kurzinger & Springer, 1982], aporta les peculiaritats que distingeixen el LFA-1 del Mac-1 i de la p150/95. El LFA-1 juga un importantíssim paper immuno-regulador mitjançant la seva participació en les interaccions entre leucòcits [Dustin & Springer, 1991] o en l'adhesió dels leucòcits a altres tipus cel·lulars, entre els quals destaquen les cèl·lules endotelials [Bevilacqua, 1993]. Malgrat que, en certs macròfags que no expressen LFA-1, es pot induir la seva expressió amb l'estimulació per LPS (lipopolisacàrid) o IFN- γ , la seva activitat funcional vé regulada principalment per la capacitat d'augmentar la seva afinitat pels lligands i, de manera indirecta, per la inducció de l'expressió de l'ICAM-1, el lligand pel qual el LFA-1 presenta la major afinitat. L'activitat funcional del LFA-1 depèn de la presència de cations Mg^{2+} i en menor grau de Ca^{2+} [Martz, 1980; Rothlein & Springer, 1986a] i potser també de Sr^{2+} (Fidgdor, comunicació personal), i especialment d'un canvi funcional de la molècula induïda per diferents estímuls tals com el reconeixement de l'antigen per part del receptor específic, lectines mitogèniques, ésters de forbol [Rothlein & Springer, 1986a; Dustin & Springer, 1989] o l'activació d'un grup cada cop major d'altres molècules accesorries com el CD43, el CD2, el CD7 o el CD28 [Axelsson et al, 1988; van Kooyk et al, 1989; Shimizu et al, 1992b], o el propi LFA-1 [van Kooyk et al, 1991; Landis et al, 1993]. Aquest procés d'activació del LFA-1, clau per l'estabilització de l'adhesió cel·lular mediada per aquesta molècula, suposa un canvi conformacional de l'heterodímer, detectable per l'aparició d'un nou epítop en la cadena α_L reconeixible per l'AcMo NKI-L16 i dependent de la presència de Ca^{2+} [van Kooyk et al, 1991]. Aquest canvi en la conformació de la porció extracel·lular del LFA-1 es produiria per un efecte encara no ben definit sobre la part citoplàsmica, possiblement a través de la fosforilació de la cadena β_2 , a la

serina 756, [Hara & Fu, 1986; Hibbs et al, 1991] ja que la cadena α_L es troba basalment fosforilada [Chatila et al, 1989]. El fet que aquesta activació sigui fisiològicament transitòria [Dustin & Springer, 1989] ha permès hipotetitzar un esquema del procés d'activació del LFA-1 força convincent, segons el qual el LFA-1 passaria per tres estats diferents: un primer estat de baixa afinitat a les cèl·lules en repòs, sense la presència de l'epítotop d'activació i amb una distribució difusa de les molècules de LFA-1 en la membrana, un segon estat intermedi pre-activat, amb les molècules polaritzades al lloc d'interacció i amb la conformació d'activació, però encara amb baixa afinitat per als seus lligands, i un tercer estat a on la fosforilació de la molècula donaria lloc a un LFA-1 plenament actiu i amb alta afinitat envers els ICAMs [Figdor et al, 1990]. Aquest procés seria transitori i la desactivació per la defosforilació del LFA-1 permetria l'alliberament de les interaccions establertes. Aquesta hipòtesi permet explicar la funció del LFA-1 en la majoria de les interaccions que vehiculitza amb els seus tres lligands, però darrerament apareixen evidències de que aquest procés no és idèntic pels tres ICAMs [Binnerts et al, 1994], que malgrat llurs similituds estructurals en els dos dominis externs, podrien contactar en diferents llocs d'unió del LFA-1. De fet la unió del LFA-1 amb l'ICAM-1 és, hores d'ara, l'única parcialment definida a nivell molecular, doncs ha estat objecte d'estudi per diversos grups. Mentre la zona citoplàsmica de la subunitat β_2 s'ha demostrat imprescindible en aquest reconeixement, dada que està en línia directa amb llur capacitat d'esdevenir fosforilable i proporcionar la forma activa del LFA-1 [Hibbs et al, 1991], el domini I, insertiu, de la cadena α_L també regularia la funció Integrina del LFA-1 [Landis et al, 1993]. Més recentment, els dominis 5 i 6 de la cadena α_L s'han

involucrat en les zones d'interacció directa LFA-1/ICAM-1 [Stanley et al, 1994].

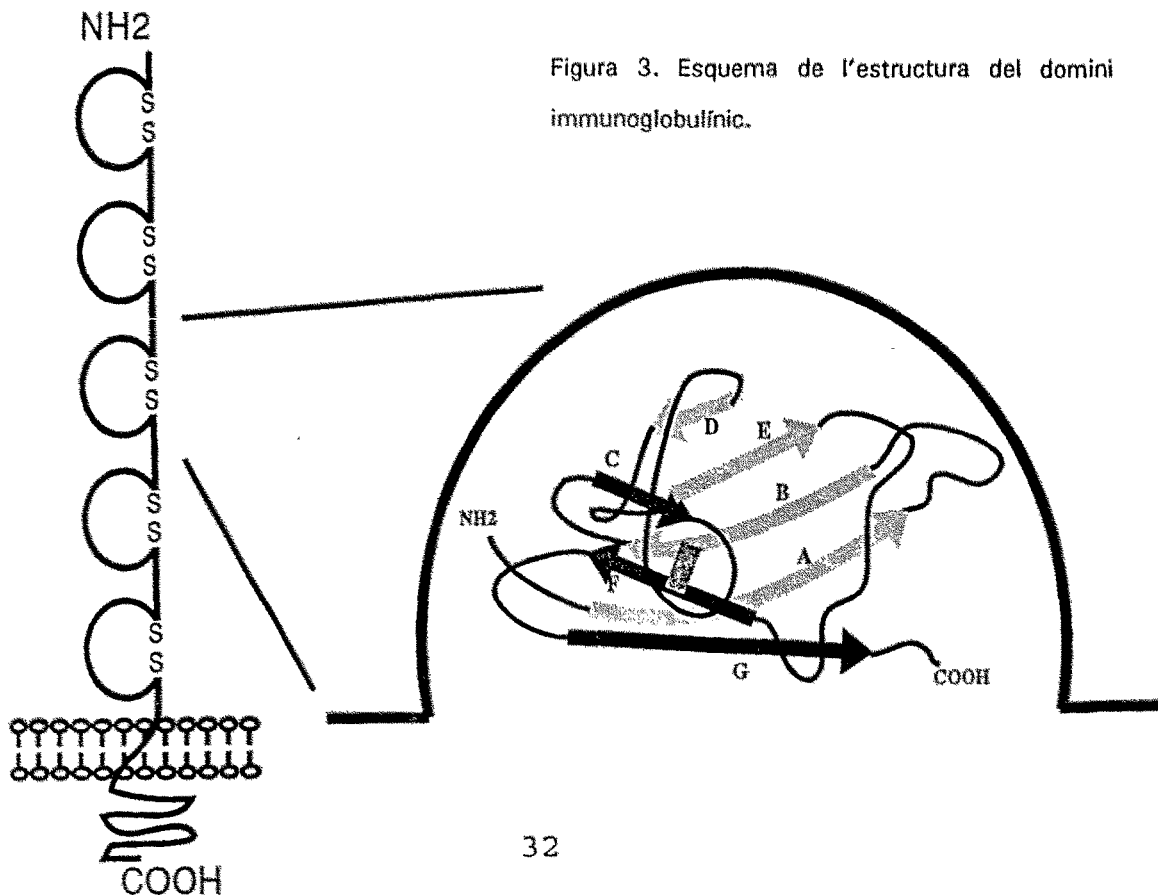
Les interaccions a on el LFA-1 juga un paper clau van des de la presentació de l'antigen i el subsegüent reconeixement antigènic de les cèl·lules T col·laboradores [Golde et al, 1985] o citotòxiques [Sánchez-Madrid et al, 1982], a l'adhesió a endoteli durant els processos de recirculació i inflamació [Oppenheimer-Marks et al, 1991], passant pels diversos contactes que es produeixen a les agregacions homotípiques [Rothlein & Springer, 1986a; Martz, 1987]. Aquestes interaccions poden involucrar al LFA-1 de manera bidireccional, en els contactes interleucocitaris, o monodireccional, en les interaccions dels leucòcits amb altres elements cel·lulars. En totes elles, la unió del LFA-1 amb llurs lligands determina la interacció adhesiva més potent i decisiva. A més a més el LFA-1 funciona com una molècula transductora de senyals amb un paper co-estimulador de la resposta immunitària molt important, capaç d'incrementar els nivells citoplàsmics de calci, potenciar la proliferació cel·lular i augmentar la síntesi de IL-2 promoguda per l'estimulació amb CD3 [van Noesel et al, 1988; Pardi et al, 1989; Wacholtz et al, 1989; Moy & Brian, 1992; van Seventer et al, 1992; Damle et al, 1992b]. Aquesta capacitat co-estimuladora es demostra encara més decisiva segons la subpoblació involucrada, com passa amb la població de cèl·lules T CD4⁺ verges (CD45RA⁺) que, a diferència de les memòria (CD45RO⁺), només són completament estimulades quan, a més a més del reconeixement antigènic, es co-estimulen a través del LFA-1 [Fisher et al, 1992].

La importància de totes aquestes interaccions i senyalitzacions vehiculitzades pel LFA-1 i les altres dos LeucoIntegrines, Mac-1 i p150/95, en el funcionament normal del sistema immunitari queda ben palesa en la

immunodeficiència anomenada Deficiència d'Adhesió Leucocitària-1, o LAD-1 (*Leukocyte Adhesion Deficiency*), caracteritzada en la seva forma més severa per un defecte genètic de la cadena β_2 de les LeucoIntegrines, localitzat en el cromosoma 21 i d'herència autosòmica recessiva [Marlin et al, 1986; Kishimoto et al, 1987; Anderson & Springer, 1987]. Aquest defecte, comporta de fet una profunda alteració dels mecanismes de reconeixement i contacte cel·lular, que *in vivo* es manifesta especialment per una ineficaç resposta immunitària inespecífica, pel compromís de la capacitat fagocítica i quimiotàctica leucocitària. Clínicament, aquest dèficit d'adhesió provoca un retard característic en la caiguda del cordó umbilical que evoluciona cap a les infeccions bacterianes recurrents associades a una resposta inflamatòria anòmala que impedeix la formació de pus per l'alteració de l'arribada dels neutròfils als llocs afectats. *In vitro*, a part de l'alteració de la capacitat fagocítica i quimiotàctica dels neutròfils, els limfòcits no responen bé als mitògens com la PHA o la ConA, i la activitat NK i la citotòxica són clarament ineficients, bàsicament a conseqüència de la manca de LFA-1 [Kensky et al, 1985]. Malgrat tot, el dèficit de LFA-1 sembla parcialment compensable *in vivo* per la via de les β_1 Integrines, doncs la funció limfocítica roman relativament inalterada en el malalt. La malaltia, que es presenta des de formes insidioses a formes molt greus, que poden ser fatals en pocs anys si el pacient no rep un transplantament de moll de l'ós, és el millor exemple de la importància de les interaccions que vehiculen les LeucoIntegrines i llurs co-receptors.

1.2.4.- SUPERFAMÍLIA DE LES IMMUNOGLOBULINES.

Sota el terme de Superfamília de les Immunoglobulines (IgSF) s'engloben totes aquelles proteïnes que presenten en llur estructura el característic domini globular de 70-110 a.a., format per dues làmines β antiparal·leles, estabilitzades en la majoria del casos per un pont disulfur intracatenari, que defineix una zona compacta de 55-75 a.a. [Williams, 1987; Hunkapiller & Hood, 1989] (Figura 3), anomenat domini immunoglobulínic, per la descripció d'aquesta unitat estructural en les Immunoglobulines (Ig). L'existència de seqüències homòlogues que determinaven unitats estructurals similars a les de les Igs (*Immunoglobulin-like domains*) en altres proteïnes, va portar a la definició a l'any 1982 [Williams, 1982] del que seria la primera "superfamília" de proteïnes de membrana leucocitària. Constituida per més de 100 proteïnes que presenten aquest peculiar domini, més del 40% de les glicoproteïnes leucocitàries descrites pertanyen a aquest gran grup funcional [Barclay et al, 1993].



Malgrat que les identitats de seqüència sovint no superen el 15-25%, l'anàlisi detingut de les seqüències dels diversos components de la IgSF mostra la màxima conservació a nivell dels residus responsables del plegament de les làmines β immunoglobulíniques, mentre que la màxima diversitat es troba a la zona de les nanses terminals. Estructuralment, es distingeixen dos grans grups de dominis immunoglobulínics amb patrons de plegament similars, però clarament diferents: els dominis de tipus variable (tipus V) o simplement dominis V (homòlegs als dominis de la regió Variable de les Ig) i els dominis de tipus constant (tipus C) o simplement dominis C (homòlegs als dominis de les regions Constants de les Ig). A la vegada els dominis C s'han dividit en dos subgrups: els dominis C1 i els dominis C2 (o dominis H). De fet, per alguns autors, els dominis H (C2), més curts i compactes que els V o els C1, són un tercer grup a part, possiblement derivat evolutivament d'un precursor comú dels dominis V i C1. Aquest domini C2 (H) és la unitat estructural més freqüentment trobada a l'analitzar les seqüències de la majoria de les molècules d'adhesió pertanyents a la IgSF [Pigott & Power, 1993]. Una divergència estructural adicional es troba en aquells dominis que conserven les seqüències responsables del característic plegament immunoglobulínic, però que no presenten el pont disulfur estabilitzador, prèviament considerat element essencial de l'estructura. Altres consideracions estructurals i sobre la importància evolutiva de la conservació d'aquest domini immunoglobulínic al llarg de l'arbre filogenètic, van més enllà del propòsit d'aquest apartat que només pretèn situar les característiques generals del grup de molècules a on s'inclou el CD50, el motiu d'aquesta tesi.

Com ja s'ha dit, moltes són les molècules de membrana que s'enquadren dins de la IgSF. Des dels diversos components dels receptors per l'antigen (BcR i TcR), fins a certs dominis de receptors d'interleucines (IL-1R o CDw121), un gran grup de molècules d'adhesió presenten també dominis immunoglobulínics, purs o associats a dominis d'altres superfamílies, i per tant s'enquadren dins d'aquest grup. Les molècules d'adhesió de la IgSF intervenen en un gran nombre d'interaccions importants per la resposta immunitària, la recirculació leucocitària i els mecanismes inflamatoris [Dustin & Springer, 1991]. La versatilitat funcional del domini immunoglobulínic, permet que a través d'ell es vehiculin interaccions homoflíques amb dominis immunoglobulínics (CD31/CD31) o d'altres membres de la IgSF (CD2/CD58), o heteroflíques amb dominis d'altres grups funcionals, no immunoglobulínics, com les interaccions amb diverses Integrines (ICAMs/LFA-1, VCAM-1/VLA-4). Cal destacar que, així com alguns dels membres de la IgSF no tenen encara assignada una funció clara (CD7, CD33, CD1) [Barclay et al, 1993], en els darrers anys s'han anat definint diferents co-receptors de molècules de la IgSF que estaven en aquesta situació de certa indefinició funcional, i que medien interaccions adhesives entre diversos subgrups cel·lulars. Així, la interacció CD28/CD80 (B7), tant crítica en la col·laboració T-B, és un arquetip de la importància funcional de la capacitat transductora de senyals de les molècules d'adhesió de la IgSF. També en aquest grup, i com passava amb les Integrines, les diverses molècules d'adhesió han anat associant-se a diferents mecanismes de transducció intracel·lular de senyals co-estimuladors: l'activació de les cèl·lules T a través del CD2 és un exemple clar d'aquesta bifuncionalitat de la molècula [Meuer et al, 1984; Holter et al, 1986], mediada per la zona citoplasmàtica de la molècula i possiblement dependent de la co-

expressió funcional en membrana del complex TcR/CD3 [Bockenstedt et al, 1988]; el senyal co-estimulador aportat pel CD28, que es desenvolupa per una via separada a la de la senyalització del TcR [Moretta et al, 1985] estabilitzant els nivells de mRNA de certes citocines [Lindsten et al, 1989], s'ha vist que és un element clau que defineix si la cèl·lula T respondrà eficientment a l'estímul antigènic vehiculat a través del complex TcR o entrarà en una situació d'anèrgia, anomenada també de manera més general tolerància [Harding et al, 1992]. De fet aquesta parella CD28/CD80 presenta més lligands a un i altre costat, doncs, per part dels limfòcits T existeix una molècula homòloga al CD28 que també reconeix el CD80, però que només es troba a l'activació, l'anomenat CTLA-4 (*Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4*) [Harper et al, 1991], i per part dels limfòcits B es parla de la família de molècules CD80, doncs a més a més del B7, ara anomenat B7.1, la ja anomenada via CD28/CTLA-4 té un segon lligand, el B7.2 [Azuma et al, 1993; Freeman et al, 1993]. Cal assenyalar que aquesta bifuncionalitat fa que sovint certes interaccions on la capacitat transductora de senyals és molt notable, com la del CD28/CD80, no siguin considerades adhesives i per tant no s'incloguin dins del grup de molècules d'adhesió. Així i sota criteris clàssics de classificació, en la Taula 4, es resumeixen les principals característiques de sis de les molècules de membrana leucocitària pertanyents a la IgSF, que es comporten com a molècules d'adhesió, intervenint en les interaccions leucocitàries més importants. Altres molècules de membrana dels leucòcits i altres molècules d'adhesió de la IgSF, però bàsicament expressades en estirps cel·lulars no-leucocitàries com el SNC (NCAM, fasciclina II i III), epitelis (Cell-CAM 105) o teixit embrionari (CEA), sobrepassen la intenció d'aquesta introducció.

Taula 4

Nom (CD)	Altres noms	Estructura	Expressió cel·lular	Lligands (localització)
CD2	T11, LFA-2.	Dominis: 1V + 1C2. 45-58 kD	Cèl·lules T, NK i timòcits.	CD58
CD4	T4	Dominis: 2V + 2C2. 55 kD	Sub. de cèl·lules T i timòcits, monòcits i macròfags	HLA classe II (regió no-polimòrfica). gp120 VIH.
CD8	T8	Homo o Hetero-dímers de CD8 α (1V + esquelet 0-glyc., 32-34 kD) i CD8 β (1V + esquelet 0-glyc., 32-34 kD).	Subpoblacions de cèl·lules T i timòcits, i en baix nivell en algunes NK.	HLA classe I (regió no-polimòrfica).
CD22	BL-CAM	Dominis: CD22 α , 1V + 4C2 (130 kD) i CD22 β , 1V + 6C2 (140 kD).	Subpoblació de cèl·lules B madures (es perd a l'activació)	CD45RO CD75
CD31	PECAM-1, endo-CAM	Dominis: 6 C2 130-140 kD 9 punts de N-glyc.	Plaquetes, neutròfils, monòcits, i endoteli. Subgrup de T	CD31 (Homofilic). ? (Heterofilic).
CD54	ICAM-1	Dominis: 5 C2. 85-110 kD. 8 punts de N-glyc.	Baixa expressió constitutiva en cèl. T, B, monòcits, macròfags i endoteli vascular. Alta expressió després de l'activació.	LFA-1 (Domini 1). Mac-1 (Domini 3). Rinovirus (Dom. 1). CD43. Eritròcits infectats pel <i>Plasmodium falciparum</i> .
CD58	LFA-3	Domini: 1V + 1C2 55-70 kD (dues formes: GPI-unida i transmembrana)	Leucòcits, eritròcits (E-rosetes), cèl. endotelials i epitelials.	CD2 (LFA-2)
CD102	ICAM-2	Dominis: 2 C2 55-65 kD. 6 punts de N-glyc	Endoteli vascular, limfòcits i monòcits, cèl. dendrítiques.	LFA-1
CD106	VCAM-1, INCAM-110	Dominis: 6 o 7 C2 90-110 kD	Endoteli vascular activat, macròfags, cèl. dendrítiques.	$\alpha_4\beta_1$ (VLA-4) i $\alpha_4\beta_7$ (LPAM-1).
CD -	MadCAM	Dominis: 3 C2 i una regió similar a la mucina entre els dominis 2 i 3.	Certs endotelis venulars (HEV): Plaques de Peyer.	$\alpha_4\beta_7$ (LPAM-1) pel domini 1 i L-Selectina per la regió mucínica.

LFA : Leukocyte Function-associated Antigen, BL-CAM : B Lymphocyte-Cell Adhesion Molecule, ICAM : Intercellular Adhesion Molecule, PECAM-1: Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule, VCAM : Vascular Cell Adhesion Molecule, MADCAM : Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule, HEV : High Endothelial Venules.

El paper de totes aquestes molècules d'adhesió de la IgSF cobreix i amplia els camps ja comentats al parlar de la funció de llurs lligands, extenent-se des de la recirculació leucocitària a les respostes immunitàries específiques i inespecífiques. De fet la detecció d'interaccions antígen-independents, que obren els ulls a l'importància en el reconeixement limfocitari d'altres molècules diferents al receptor antigènic [Shaw et al, 1986; Spitz et al, 1986], es centra en la unió entre LFA-1 i els ICAMs, i entre CD2 i CD58, molècules totes elles, a excepció de la Integrina LFA-1, de la IgSF. Si bé de la interacció LFA-1/ICAMs ja hem parlat i en seguirem parlant en aquesta tesi, de la interacció CD2/CD58 sols remarcarem la seva importància en les unions interlimfocitàries [Sánchez-Madrid et al, 1982]. Aquesta interacció CD2/CD58, responsable del clàssic roseteix dels limfòcits T amb eritròcits d'ovella (E-rosetes), es regula molt finament per la densitat de les molècules en la superfície [Selvaraj et al, 1987], i possiblement per la disminució durant l'activació de la càrrega neta negativa en la superfície cel·lular [Shortman et al, 1975]. El que és clar, és que durant el reconeixement antigènic la interacció CD2/CD58 juga un paper central tant per la gran afinitat de la adhesió que vehicula com per la capacitat co-estimuladora del CD2 respecte al senyal produït pel TcR [Bierer et al, 1988].

Les interaccions leucòcits-endoteli, tant importants en els mecanismes de recirculació i inflamació, obren l'espectre de les molècules d'adhesió cap a les cèl·lules endotelials. En aquest camp, juntament amb els contactes que estableixen les Selectines amb els seus lligands i el LFA-1 amb els ICAMs, destaquen les interaccions d'altres dos membres de la IgSF: VCAM-1 (CD106) i MadCAM-1. VCAM-1 (*Vascular cell adhesion molecule 1*), també coneguda

com INCAM-110, és una molècula de membrana descrita en endoteli activat per citokines i també en un subgrup de cèl·lules no-vasculars (cèl·lules dendrítiques, cèl·lules estromals de la medul·la òssia, [Rice et al, 1991]. De 90 o 110 kD, segons el tipus de *splicing* alternatiu, VCAM-1 és induïble *in vitro* per l'activació amb IL-4 (a diferència de l'E-Selectina o l'ICAM-1), IL-1 o TNF α [Wellicome et al, 1990; Schleimer et al 1991]. Els lligands de VCAM-1 són les Integrines $\alpha_4\beta_1$ (VLA-4) i $\alpha_4\beta_7$ [Rüegg et al, 1992; Chan et al, 1992] i a través d'elles, VCAM-1 vehiculitza la fase de reforçament del contacte leucòcit-endoteli [Oppenheimer-Marks et al, 1991]. Per la seva banda MAdCAM-1 (*Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule-1*), és també una molècula de membrana característica de les vècules d'endoteli alt o HEVs (*High Endothelial Venules*) del teixit limfoide associat a la mucosa intestinal, amb tres dominis de la IgSF i una regió similar a la mucina entre el domini 2 i 3 [Briskin et al, 1993]. La seva funció és determinar la recirculació dels limfòcits intestinals, a través de la unió dels carbohidrats de la regió mucínica a la L-Selectina [Berg et al, 1993], i mitjançant els seus dominis immunoglobulínics a la Integrina $\alpha_4\beta_7$ [Hu et al, 1992; Berlin et al 1993], però no a la $\alpha_4\beta_1$ (VLA-4).

L'estructura en dominis, funcionalment força independents (independència relacionada genèticament amb llur codificació per un o dos exons), de les molècules d'adhesió de la IgSF, explica per sí mateixa gran part de la pluriespecificitat del reconeixement. Alhora, "l'èxit" evolutiu d'aquesta família també s'explica per aquesta "independència genètica" i per la versatilitat funcional del domini immunoglobulínic. La possibilitat d'associacions amb altres dominis de diverses estructures proteíniques ha permès que no es pugui parlar d'una funció definida per aquesta família de molècules de superfície. Aquesta diversitat impedeix el tracte exhaustiu de les

funcions d'aquestes molècules. Per tant, donat que la molècula objecte d'aquesta tesi, el CD50, forma part de la subfamília ICAMs, descriurem a continuació, com a exemple comparatiu, les característiques funcionals més importants d'aquesta nova subfamília.

1.2.4.1.- ICAMs.

Amb el terme ICAMs (*Intercellular Adhesion Molecules*), s'agrupen fins al moment 3 molècules de la IgSF (ICAM-1, ICAM-2 i ICAM-3), formades per 2 ó 5 dominis immunoglobulínics amb un grau variable de N-glicosilació, una regió transmembrana i una curta cua citoplàsmica. Descrites per llur capacitat d'unió al LFA-1, la seva expressió basal o induïble en diverses poblacions cel·lulars determina la capacitat dels leucòcits d'adherir-se via LFA-1 a d'altres leucòcits (agregació homotípica) o altres cèl·lules (adhesió heterotípica). Així, llur expressió constitutiva o induïble en l'endoteli determina la capacitat d'adherir-se dels leucòcits (LFA-1⁺) a la paret vascular (LFA-1⁻) durant els processos de recirculació o inflamació [Bevilacqua, 1993], i llur presència a les cèl·lules presentadores d'antígens (APCs) i als limfòcits possibilita una resposta immunitària eficient [Springer, 1990b].

L'ICAM-1 (CD54) és una molècula altament glicosilada (un 50% dels seus 90-110 kD es deuen a la N-glicosilació) amb 5 dominis extracel·lulars de la IgSF (Figura 4a), i que funcionalment es va definir com el primer contra-receptor del LFA-1 que vehiculitzava l'agregació homotípica [Rothlein et al, 1986b] i l'adhesió a l'endoteli [Dustin & Springer, 1988] dependents d'aquesta β_2 Integrina. Definida la seva seqüència proteica per la clonació del seu c-DNA [Simmons et al, 1988; Staunton et al, 1988], els seus cinc dominis

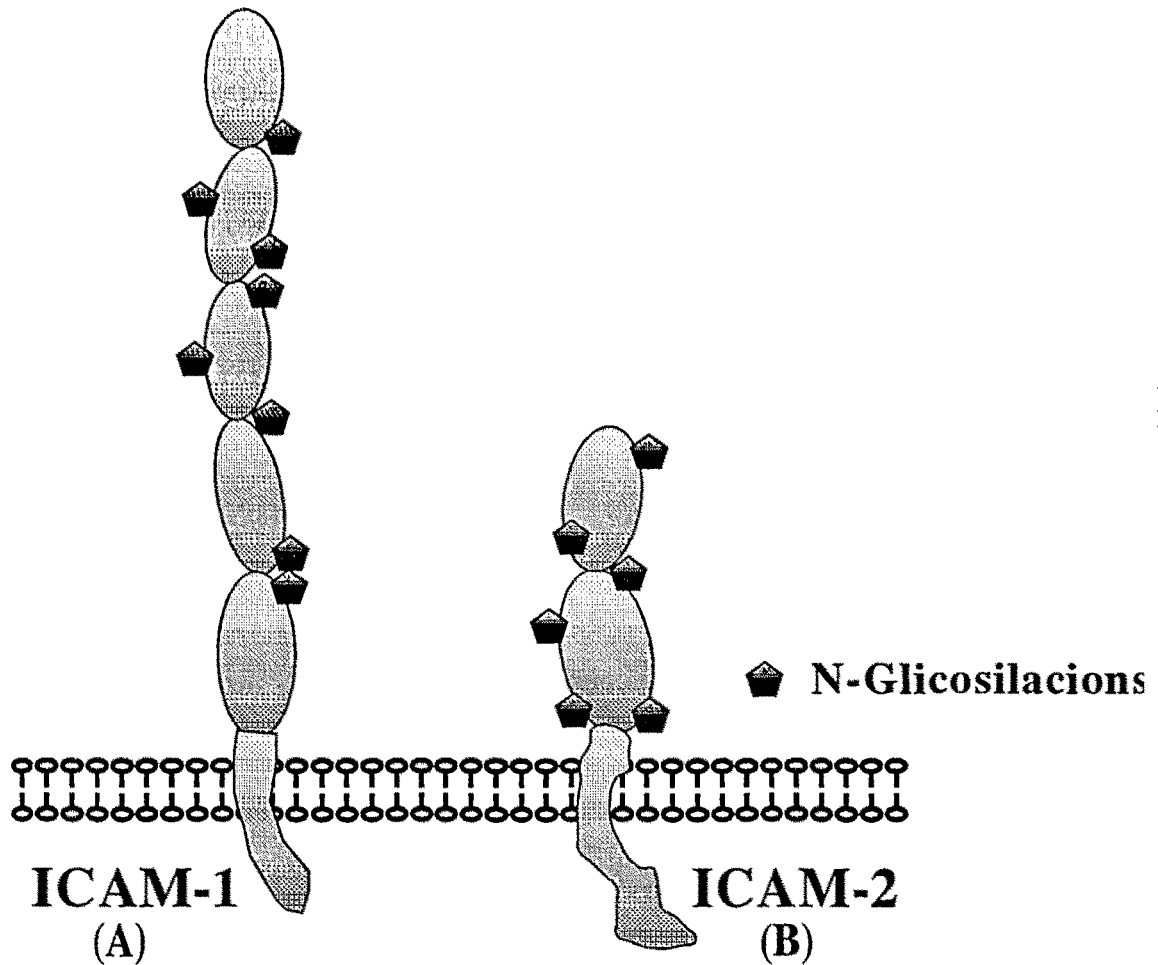


Figura 4. Esquema de l'estructura proteica de l'ICAM-1 (A) i l'ICAM-2 (B).

presentaven certa homologia amb els cinc dominis del NCAM, però, a diferència d'aquest, no interaccionen homofil·licament sinó amb un membre de la família de les Integrines, el LFA-1. Posteriorment, s'ha descrit que ICAM-1 interacciona no només amb el LFA-1 ($\alpha_1\beta_2$, CD11a/CD18) [Marlin, et al, 1987], a través dels dominis 1 i 2, sinó també amb el Mac-1 ($\alpha_M\beta_2$, CD11b/CD18) [Diamond et al, 1991], bàsicament a través del domini 3. També, és descrita la seva interacció amb el CD43 [Rosenstein et al, 1991], però aquesta unió no ha estat complementada amb dades funcionals d'interès. Més interessant, és

la identificació de l'ICAM-1 com el receptor major dels rinovirus humans [Greve et al, 1989; Staunton et al, 1989b; Tomassini et al, 1989], els principals causants del refredat comú. Al igual que amb la unió al LFA-1, el domini I de l'ICAM-1 seria el lloc d'unió directa per als rinovirus. També, s'ha descrit la unió de l'ICAM-1 amb eritròcits infectats amb *Plasmodium Falciparum* [Berendt et al, 1989], mercès al mateix domini 1 però a través d'una zona diferent [Berendt et al, 1992; Ockenhouse et al, 1992], implicant així aquesta molècula en la virulència del paràsit com a element determinant de la disseminació de la malaltia.

Entre totes les característiques funcionals de l'ICAM-1, destaca, potser com la més important, la regulació de la seva expressió per l'activació cel·lular [Dustin et al, 1986]. Així, els baixos nivells d'expressió en limfòcits i monòcits, s'incrementen sota l'acció de mitògens o per mecanismes d'activació més específics (línies cel·lulars transformades pel virus d'Epstein-Barr). A l'endoteli vascular, aquest mecanisme inductor de l'expressió es troba regulat també per agents activadors com el LPS, l'IFN- γ , el TNF- α i la IL-1, i en fibroblastes també és possible induir-lo per l'efecte inflamatori de la IL-1 i el IFN- γ [Pober et al, 1986]. Aquests mecanismes inductors de l'expressió en membrana són el fruit de la mobilització de dipòsits intracel·lulars preformats, com passa als monòcits [Dougherty et al, 1988], i/o de la inducció de nou m-RNA que codifica per la formació de *novò* de proteïna, com passa sobretot a l'endoteli [Simmons et al, 1988]. Els mecanismes reguladors de la inducció de nou m-RNA, han estat parcialment estudiats, detectant-hi llocs d'unió per a factors coneguts de transcripció (SP-1, AP-1 i NF-kB) [Voraberger et al, 1991]. Tota aquesta regulació de l'expressió sustenta fortament el paper suggerit per

a l'ICAM-1 que com a molècula endotelial controlaria el tràfic leucocitari via LFA-1 en els llocs d'inflamació [Springer, 1994], afavorint la fase de reforçament (*strengthening*) de l'adhesió i especialment la posterior migració transendotelial [Oppenheimer-Marks et al, 1991]; com a molècula present en les APCs i els limfòcits activats col·laboraria en el reconeixement antigènic, éssent imprescindible per la realització de la funció citotòxica del limfòcits [Martz, 1987].

Cal esmentar, també, la descripció d'una forma soluble d'ICAM-1, detectada també per a altres molècules d'adhesió, que s'incrementa en diverses patologies inflamatòries, però per la qual encara no s'ha demostrat una capacitat funcional definida [Rothlein et al, 1991].

Per altra part, l'ICAM-2 (CD102) és també una proteïna de membrana altament glicosilada (un 50% del seu pes molecular, 55-65 kD, es deu a N-glicosilacions) constituïda per dos dominis C2 de la IgSF (Figura 4, B). Malgrat ser molt més petita que l'ICAM-1, també reconeix al LFA-1 ($\alpha_1\beta_2$), però a diferència d'aquest no té fins al moment cap altre lligand conegut. Suposada la seva existència per la incapacitat dels AcMos anti-ICAM-1 d'inhibir l'agregació homotípica via LFA-1 de certes línies cel·lulars [Rothlein et al, 1986a], i per l'existència d'una via d'adhesió a endoteli dependent de LFA-1, però independent d'ICAM-1 [Dustin & Springer, 1988], l'ICAM-2 es va determinar a través de l'aïllament del seu c-DNA d'una llibreria d'expressió en eucariòtes, gràcies a un mètode de crivellament funcional, basat en la unió de les cèl·lules transfectades amb la llibreria a LFA-1 purificat en presència d'AcMos anti-ICAM-1 [Stauton et al, 1989]. L'anàlisi de la seqüència va servir per demostrar les característiques estructurals de l'ICAM-2, que presentava dos dominis de la IgSF similars als dos dominis N-terminals de l'ICAM-1 (35%

d'homologia). Analitzada posteriorment la seva expressió i funcionalitat [de Fougerolles et al, 1991], l'ICAM-2 es trobà constitutivament expressat en limfòcits en repòs (però no en timòcits), en monòcits, però no en neutròfils, en cèl·lules endotelials on presenta un alt nivell d'expressió, i de manera també important en les cèl·lules dendrítiques [Hart & Prickett, 1993]. Per altra banda la poca capacitat d'increment de la seva expressió pels diferents estímuls activadors que indueixen l'expressió d'ICAM-1, fa que a l'ICAM-2, hom li atribueixi la funció interactiva amb el LFA-1 en les interaccions a on intervenen limfòcits en repòs i especialment cèl·lules endotelials no estimulades. Resulta interessant esmentar en aquest punt que l'efecte dels ICAMs no es limita a la funció estabilitzadora de les interaccions, doncs alguns treballs experimentals demostren que el tipus d'unió que vehiculen modula d'alguna manera la capacitat transductora dels seus lligands, clarament diferent entre ICAM-1 i ICAM-2, al menys [Damle et al, 1992b].

Dels treballs funcionals amb l'ICAM-1 i l'ICAM-2, es despenia l'existència d'una tercera molècula [de Fougerolles et al, 1991; Hart & Prickett, 1993] relacionada amb la via d'adhesió dependent de LFA-1. Aquestes evidències van portar a la descripció i caracterització del ICAM-3 [de Fougerolles & Springer, 1992], el tercer lligand del LFA-1. Donada la identitat de l'ICAM-3 i el CD50, tal com es demostra en el treball d'aquesta tesi, em remeto a l'apartat "1.4. Dades prèvies sobre el CD50", als resultats i a la discussió de la mateixa per definir les característiques d'aquesta tercera molècula d'adhesió de la subfamília dels ICAMs.

1.2.5.- ALTRES MOLÈCULES D'ADHESIÓ.

Fora d'aquest quatre grans grups funcionals (Cadherines, Selectines, Integrines i la Superfamília de les Immunoglobulines) es troben encara altres molècules d'adhesió [Pigott & Power, 1993; Cid & Esparza, 1993], algunes d'elles amb característiques adhesives funcionalment molt importants ja sigui a nivell dels leucòcits, com el CD44 o el PSGL-1, o a nivell de l'endoteli, com les clàssiques Adressines (GlyCAM-1, CD34) o les VAPs (*Vascular adhesion protein*).

El CD44, anomenat també Pgp-1 (*Phagocytic glycoprotein-1*), ECMRIII (*Extracellular Matrix Receptor* tipus III), Ly-24 o GP90-Hermes, és una molècula de 80-90 (forma hematopoiètica) o 130-140 (forma epitelial) kD, segons diferents *splicings* del m-RNA i segons diverses modificacions post-traduccional per la seva conjugació a condroitin sulfat o glicosilació. Homòloga en la seva seqüència proteica a la proteïna d'unió, i a una part de la proteïna del cos, del cartílag [Goldstein et al, 1989], el CD44 actúa com el principal receptor de l'àcid hialurònic. La seva expressió és àmplia: la majoria d'eritròcits (és el cos proteic del sistema antigènic eritrocític Lutheran [Idzerda et al, 1989]), monòcits i macròfags, granulòcits, timòcits medul·lars, limfòcits T i B madurs, fibroblastes, cèl·lules de la glia, múscul esquelètic, ... La forma de 130-160 kD s'expressa també en epitelis, expressió que augmenta clarament en certs carcinomes afectant el potencial d'expansió d'aquests tumors [Sy et al, 1991]. Per la seva funció el CD44 és una clàssica molècula d'adhesió, que permet la localització de cèl·lules circulants mercès al contacte que estableix amb certes Adressines endotelials d'algunes HEVs [Shimizu et al, 1992a], o amb la matriu extracel·lular (fibronectina, col·làgen, laminina) [Jalkanen & Jalkanen, 1992], però que també participa com a molècula co-

estimuladora en el reconeixement antigènic [Huet et al, 1989; Denning et al, 1990]. Juntament amb el CD44, també s'hi troba a nivell leucocitari el lligand de la P-Selectina, el PSGL-1 (*P-Selectin Glycoprotein Ligand-1*), una glicoproteïna homodimèrica mucínica formada per dos subunitats de 120 kD unides per ponts disulfur, aïllada pel crivellament en una llibreria d'expressió [Moore et al, 1992; Sako et al, 1993]. Aquesta molècula constitueix l'esquelet proteic on la glicosilació per la α 3/4-fucosil transferasa produeix el lloc d'unió reconegut per la P-Selectina.

A nivell endotelial, juntament amb dues Adressines que funcionen com a lligands de la L-Selectina, el CD34 [una molècula de membrana amb un extrem mucínic associat a un domini globular, que s'expressa a nivell de l'endoteli de les HEVs dels ganglis limfàtics perifèrics [Baumhueter et al 1993] (encara que també és característica de les cèl·lules hematopoiètiques immadures)] i la GlyCAM-1 (*Glycosylation-dependent Cell Adhesion Molecule-1*) [una molècula també mucínica, però secretada per les HEVs dels ganglis limfàtics perifèrics [Lasky et al, 1992]], destaquen altres dos glicoproteïnes, anomenades genèricament VAPs (*Vascular Adhesion Protein*). La molècula VAP-1 [Salmi & Jalkanen, 1992] de 90 kD es localitza principalment en les HEVs dels ganglis limfàtics perifèrics, amígdals, i en un subgrup de vècules del teixit sinovial, pell, cervell, ronyons, fetge i cor. Fora d'aquests endotelis també es detecta en cèl·lules dendrítiques dels centres germinals i en el múscul llis. La seva expressió s'incrementa substancialment en els vasos de les zones inflamatòries de les dermatosis cròniques i les malalties inflamatòries intestinals [Salmi et al, 1993]. Aquestes dades, juntament amb experiments d'adhesió de limfòcits, suggereixen que aquesta molècula, a través d'un

l·ligand limfocitari desconegut, jugaria un paper important en els mecanismes de recirculació limfocitària i en alguns processos de transmigració limfocítica que es produeixen durant la inflamació. Més recentment, hom ha descrit una nova molècula de 70-kD present en un subgrup d'endotelis venulars i en un subgrup de PBLs (preferentment B i T-CD8⁺) que s'ha anomenat L-VAP-2 [Airas et al, 1993], i que també media en part el contacte limfòcit-cèl·lula endotelial.

També en aquest grup, com passava dins de la IgSF amb el CD28/CD80 (de fet hauriem de parlar de la interacció CD28-CTLA-4/família CD80), existeixen interaccions adhesives amb un paper activador cel·lular molt important, en certs casos decisius: la parella CD5/CD72, descrita com a adhesiva en la cooperació T-B [Van de Velde et al, 1991] té en el CD5 una molècula clarament estimuladora de les cèl·lules T; la interacció CD40/CD40L (també anomenat gp39, 5c8 o TRAP) és fonamental per evitar l'entrada en apoptosi de les cèl·lules B, en un tipus d'interacció similar a la CD28/CD80 però a la inversa. Com que els contactes que vehiculen aquestes molècules són decisius a nivell co-estimulador, es considera que constitueixen més aviat uns canals per la comunicació recíproca entre les cèl·lules T i B que molècules pròpiament d'adhesió [Clark & Ledbetter, 1994]. Malgrat això, l'acumulació d'evidències que suporten la capacitat transductora de moltes de les clàssiques molècules d'adhesió (LFA-1, CD2, CD44, ...), fa que aquesta separació conceptual entre molècules activadores i molècules d'adhesió s'estigui plantejant cada cop més com una unitat bivalent, com a dues cares de la mateixa moneda.

1.3. INTERACCIONS LIMFOCITÀRIES MITJANÇADES PER LES MOLÈCULES D'ADHESIÓ.

Aquest ampli ventall de molècules d'adhesió descrites fins ara s'integra en un també ampli i complex conjunt de respostes. Com ja s'ha dit, les molècules d'adhesió possibiliten la relació de la cèl·lula amb l'entorn a través de la internalització del missatge que vehiculen amb llur contacte amb la Matriu Extracel·lular (M.E) o amb altres molècules d'adhesió d'altres cèl·lules. Aquests "ponts d'unió" entre l'exterior i l'interior de la cèl·lula, determinen la funció cel·lular a cada instant. En aquest apartat analitzarem de manera global com totes aquestes molècules d'adhesió controlen la funció dels limfòcits, les cèl·lules centrals de la resposta immunitària, determinant i modulant la participació limfocitària en dues de les interaccions cel·lulars més importants i complexes, el contacte limfòcit-endoteli i la col·laboració limfòcit-APC en el reconeixement antigènic, determinant de la resposta immunitària.

1.3.1. INTERACCIONS LIMFÒCITS-ENDOTELI.

En el continu procès de recirculació limfocitària, els limfòcits, que han de passar des de la corrent sanguínia al teixits circundants, han d'atravessar la paret formada per les cèl·lules de l'endoteli vascular i la membrana basal. En aquest procès de transmigració les cèl·lules circulants (leucòcits en general) inicien aquest procès migratori mercès al contacte amb les cèl·lules endotelials. En els darrers anys, s'han anat acumulant dades moleculars i cel·lulars de com aquest procès es du a terme en els leucòcits, la qual cosa ha permès estructurar un model àmpliament acceptat i coherent que ho descriu i que sembla aplicable amb petites modificacions als limfòcits [Osborn, 1990;

Dustin & Springer, 1991; Bevilacqua, 1993; Adams & Shaw, 1994; Oppenheimer-Marks & Lipsky, 1994; Springer, 1994]. Aquest procés d'interacció limfòcit-endoteli es produeix constantment durant la recirculació limfocitària i esporàdicament, com a resposta a un agressor, durant l'arribada dels limfòcits a llocs lesionats (inflamació). Ambdós mecanismes serien, de manera esquemàtica, similars en les seves etapes, encara que molt diferent al considerar la manera i els mecanismes que els produeixen, i a nivell de les molècules que interactuen en cada situació. Bàsicament, aquests processos passarien per diverses fases (Figura 5). En un primer moment, el leucòcit i l'endoteli estableixen el seu primer contacte a través de les Selectines. Les Selectines, ja fos la L-Selectina limfocitària i/o la E- o P-Selectines endotelials, interaccionen dèbilment, però de manera eficient, i intermitent (donada llurs ràpides tasses d'associació i de dissociació) amb les glicoproteïnes que reconeixen, provocant la fase d'enganxament o lligament (*tethering*) limfocitària, i tot seguit el rodolament (*rolling*) a favor del flux sanguini i del gradient d'adhesivitat (haptotaxi), característic d'aquesta arribada limfocitària [Lawrence & Springer, 1991]. El procés d'enganxament ràpidament és potencia a través de l'activació de les Integrines limfocitàries, bàsicament $\alpha_L\beta_2$ (LFA-1), $\alpha_4\beta_1$ (VLA-4) i/o $\alpha_4\beta_7$. Aquest mecanisme d'activació, fonamental per la funció Integrina, en el cas de la inflamació sembla vehiculitzat a través de substàncies quimiotàctiques, en general immobilitzades pels proteoglicans de la superfície endotelial, que no només atreuen el limfòcit a favor del gradient de concentració (concepte de quimiotaxis), sinó que també l'activen (*triggering*), especialment a través de la seva funció Integrina. Si bé els limfòcits poden produir diverses citocines atraients per a monòcits o neutròfils (IL-8, MCP-1, I-309), només unes poques del subgrup de les C-C quimiocines

(MIP-1 α , -1 β i l'anomenada RANTES) són reconegudes per petites subpoblacions de limfòcits [Schall et al, 1990; Tanaka et al, 1993]. De fet, tant la quimiotaxi com l'activació cel·lular que es produeix són degudes als receptors de les quimiocines que transmeten senyals intracel·lulars, via proteïnes G [Chaffin & Perlmutter, 1991], activant així la funció d'aquelles Integrines. L'activació de les Integrines provoca així l'aturada limfocitària i l'augment definitiu de l'adhesió a l'endoteli, fase de reforçament (*strengthening*), quan l'endoteli presenta els lligands corresponents: ICAM-1 o ICAM-2 per a $\alpha_1\beta_2$ (LFA-1), VCAM-1 per a $\alpha_4\beta_1$ (VLA-4) i $\alpha_4\beta_7$, i MAdCAM-1 per a $\alpha_4\beta_7$). Els quimiotàctics i les Integrines seguiran després actuant per assolir la darrera fase, la migració transendotelial i localització intratissular definitiva, a on les Integrines reconeixedores de la M.E. juguen un paper fonamental.

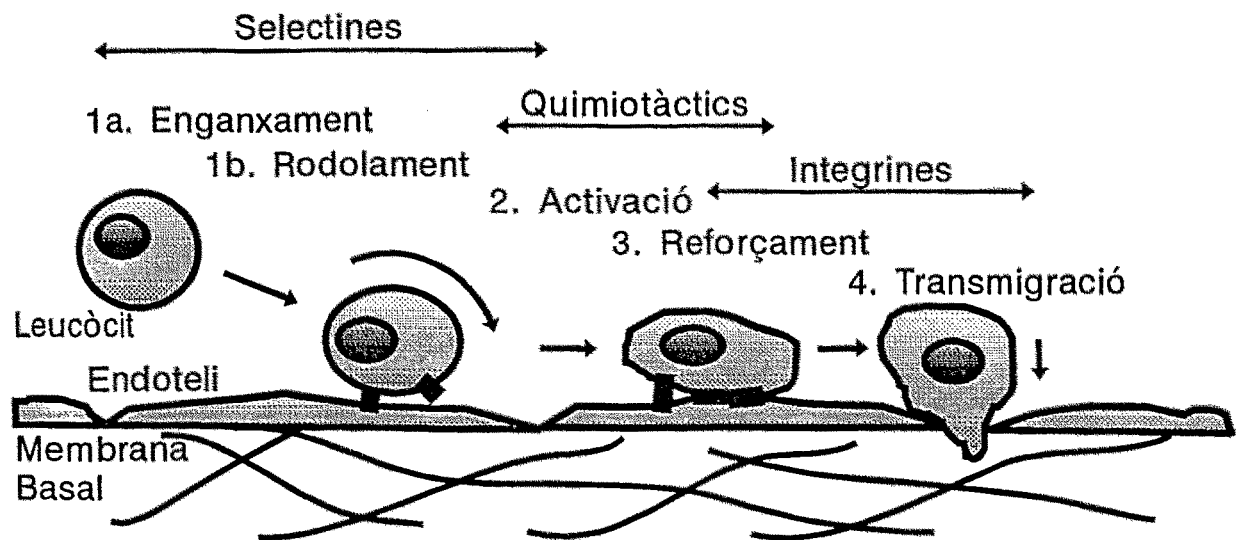


Figura 5. Fases successives en l'adhesió de limfòcits a l'endoteli.

Aquest esquema d'interaccions dibuixa un seguit de contactes, en perfecte ordre, que ha fet postular una interessant hipòtesi de funcionament, basada en la codificació, a tres nivells, de les interaccions moleculars mitjançant un sistema numèric (Selectines i lligands centenars, quimioatracients i receptors decenes, i Integrines i lligands unitats), que condicionaria el contacte entre limfòcit i endoteli només quan per l'expressió de les molècules presenten concordància entre els codis establerts [Springer, 1994]. Així hi haurien leucòcits, que per les seves molècules de membrana, induïdes o constitutivament expressades, hom els hi atribuiria un codi (per exemple, 131) que només interaccionaria eficientment amb les cèl·lules endotelials que presentessin, constitutivament o fruit de l'activació, el codi complementari (per exemple, 131', però no amb 122'), és a dir els lligands d'aquelles molècules leucocitàries.

Aquest procés d'enganxament i transmigració endotelial és, de manera esquemàtica, similar en els limfòcits tant en la recirculació com en els mecanismes de localització durant la inflamació. De fet, durant la inflamació, especialment la crònica que és la que més involucra als limfòcits [Oppenheimer-Marks & Lipsky, 1994], es produiria un augment massiu i molt localitzat del procés de tràfic, en una zona molt restringida, a on es troba l'estímul antigènic extern o autoimmunitari, que de manera contínua ja es produeix habitualment. Aquesta localització massiva de limfòcits afecta principalment als limfòcits memòria [MacKay, 1992] que troben expressats, mercès l'efecte en l'endoteli dels teixits inflamats de diverses citocines (IFN- γ , TNF- α) les Selectines endotelials i/o els lligands de les Integrines [Chisholm et al, 1993; Scheynius et al, 1993]. A nivell ganglionar, l'augment de la recirculació durant la inflamació altera el patró normal de migració i fa que els limfòcits memòria no utilitzin exclusivament la via de les HEVs (veure més

endavant) [MacKay et al, 1992]. Arran de les dades que s'obtenen, el paper de les citocines en aquest procés sembla també clau, mitjançant l'activació limfocitària necessària per al reforçament de l'adhesió per la via de les Integrines. Així recentment, la MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein-1*), que es considerava que actuava només en els monòcits, s'ha identificat com un potent quimiotàctic per a un subgrup de limfòcits memòria activats [Springer, 1994], juntament amb les quimocines RANTES i MIP-1 α .

En la recirculació normal dels limfòcits, l'esquema general establert presenta certes peculiaritats. Així en la recirculació es produeix el contacte limfòcit-endoteli a través dels receptors de localització (*homing receptors*) i les Adressines endotelials, d'una manera continua, però molt específica. En la recirculació pel sistema limfoide aquest contacte s'ha especialitzat en l'endoteli de les HEVs (*High Endothelial Venules*). Aquestes cèl·lules endotelials altes presenten diferents Adressines en diferents teixits limfoides (ganglis limfàtics perifèrics, plaques de Peyer, amígdales, ...), definint d'aquesta manera la població que recircula. A més a més, els limfòcits verges, que no han tingut contacte previ amb l'antigen, utilitzen vies de recirculació diferents a les que empren un cop han contactat amb l'antigen i s'han transformat en els limfòcits memòria [MacKay, 1992]. De fet, els limfòcits verges entren preferentment en els ganglis limfàtics a través de les HEVs, mentre que els limfòcits memòria ho fan a través de l'endoteli tisular. L'expressió de noves molècules en membrana, o el seu augment d'expressió, modulats en últim terme pel tipus de resposta antigènica que s'ha desenvolupat, és la que determina aquest canvi en el patró de recirculació, que, a més a més, es caracteritza per produir-se preferentment a través del teixit a on s'ha produït el primer contacte amb l'antigen [Picker and Butcher,

1992; MacKay, 1992]. Aquí, la hipòtesi ja comentada del sistema de codis [Springer, 1994], es presenta molt útil per explicar perquè una determinada subpoblació limfocitària recircula per una determinada àrea, contactant només limfòcit i endoteli amb codis compatibles.

1.3.2. INTERACCIONS LIMFOCITÀRIES AMB LA MATRIU EXTRACEL·LULAR.

Entre les interaccions de les cèl·lules amb el seu entorn, a més a més dels contactes intercel·lulars, destaquen els contactes de les cèl·lules amb la xarxa glicoproteica de l'anomenada Matriu Extracel·lular (M.E.). A la majoria dels teixits sòlids, les cèl·lules defineixen l'estructura tissular mercès a aquestes interaccions amb la M.E. Fins i tot, en alguns d'ells (teixit òssi, teixits fibrosos, ...) l'estructura tisular ve definida per l'estructura de la M.E. i les cèl·lules es limiten a completar-la i/o mantenir-la. En la majoria dels teixits, la M.E. defineix el fenotip de les pròpies cèl·lules; així, les interaccions entre aquestes cèl·lules i els diversos components de la M.E. determinen els processos de desenvolupament i diferenciació cel·lular en el teixit. De nou aquí les molècules d'adhesió de les membranes cel·lulars condicionen, amb llur reconeixement de la M.E., un conjunt de senyals intracel·lulars que acaben per definir la pròpia funció tisular. En el cas de les cèl·lules del sistema immunitari, la seva característica recirculació no comporta la inexistència de les interaccions cel·lulars amb la M.E., ans el contrari aquestes interaccions són fonamentals en la majoria dels processos en que intervenen. De fet, la resposta immunitària pròpiament no es desenvolupa en el flux circulatori, sino a nivell dels diferents teixits, i és aquí precisament a on el reconeixement de la M.E. es fa important. Així, cada cop es determinen més situacions a on les interaccions limfòcit-M.E. són molt importants. L'exemple més clar el constitueix el fenomen inflamatori, a on la M.E. contribueix a localitzar la zona

de resposta, coestimulant a través dels receptors cel·lulars (bàsicament les integrines leucocitàries β_1 i β_3) la funció limfocítica; i quelcom de similar es pot dir també per a la resta de leucòcits. La gran quantitat de molècules (col·làgen, thrombospondina, laminina, agrina, fibronectina, ...) que constitueixen les M.E. dels diversos teixits fa que una descripció de les mateixes superi els límits d'aquesta introducció [Engel, 1991]. Malgrat tot cal destacar la laminina i la fibronectina per ser lligands coneguts de les integrines β_1 , concretament VLA-4 i VLA-5 (veure taula 3), i com a tals haver-se emprat en un dels capítols d'aquest treball per analitzar l'activació que el CD50 indueix sobre la funció integrina limfocitària.

1.3.3. INTERACCIONS AL RECOONEIXEMENT ANTIGÈNIC.

El mecanisme central del reconeixement antigènic, contacte entre l'antigen i el receptor específic, es modula i fins i tot es controla de manera important per efecte de les anomenades molècules accessòries. Entre elles, les molècules d'adhesió són una peça clau en aquest procès, i especialment en el reconeixement antigènic de les cèl·lules T. Així, els limfòcits T col·laboradors, les cèl·lules centrals de la resposta immunitària, reconeixen l'antigen només quan aquest és presentat de manera específica per una APC (cèl·lula presentadora d'antígen), dins del context de les glicoproteïnes codificades pels gens del Complex Major d'Histocompatibilitat (MHC), anomenades sistema HLA en els humans. El caràcter restringit d'aquest reconeixement, dins del context HLA, fa que només es pugui portar a terme a través d'un contacte cèl·lula a cèl·lula, mentre que les seves característiques físiques (baixa afinitat del receptor antigènic de la cèl·lula T, TcR) fan que calgui l'estabilització d'aquest reconeixement a través de la major avidesa de

les molècules d'adhesió (major nombre de molècules a la membrana amb afinitat superior). Aquest és el paper clàssicament atribuït en el reconeixement antigènic a les molècules d'adhesió, l'estabilització necessària per l'eficient interacció entre el TcR i el complex antígen/HLA. Aquesta estabilització del reconeixement, possibilita l'estimulació cel·lular a través del TcR, però alhora aquesta estimulació necessita també, per assolir una resposta immunitària eficient, anar acompanyada per una co-estimulació cel·lular. La co-estimulació s'assoleix mercès a la capacitat transductora de senyals d'aquestes i altres molècules de membrana. Moltes són les molècules que intervenen en aquest doble procés d'estabilització/senyalització: algunes considerades inicialment com senyalitzadores també aporten certa capacitat adhesiva a la interacció; les d'altres considerades inicialment només estabilitzadores, aporten també senyals de co-estimulació intercel·lular. Estem doncs en front d'una situació ambivalent, a on sovint les capacitats adhesiva i de senyalització esdeven dues cares de la mateixa moneda. Així, les molècules d'adhesió sovint tenen una capacitat co-estimuladora important, tal com ja s'ha assenyalat en aquesta introducció. En la Figura 6, s'esquemmatitzen les interaccions adhesives

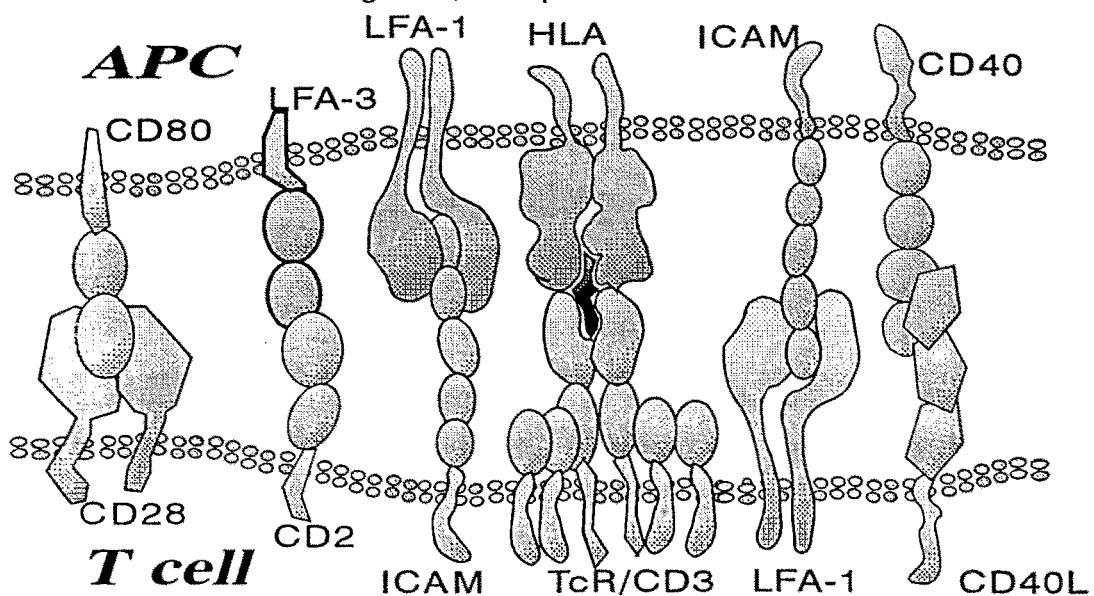


Figura 6. Esquema de les interaccions entre cèl·lules T i APC.

més importants entre una cèl·lula T i una APC: a part de la del TcR i el MHC, les específicament co-estimuladores CD40/CD40L i CD28/CD80, i les principalment adhesives CD2/CD58 i LFA-1 amb els seus lligands ICAMs (en la figura es representa l'estructura de l'ICAM-1, però l'ICAM-2 i sobretot l'ICAM-3 també intervenen de manera important). De fet, l'esquema de la figura 6 correspondria especialment a la cooperació T-B, un tipus de presentació antigènica amb el limfòcit B com a APC, a on el diàleg entre cèl·lules és molt complex [Clark & Ledbetter, 1994], i a on s'han descrit moltes més interaccions (CD45RO/CD22, CD5/CD72, ...) de les aquí presentades.

Les interaccions interleucocitàries de les molècules d'adhesió s'han estudiat en diferents models cel·lulars: el reconeixement al·logènic en el Cultiu Limfocitari Mixt (MLC, *Mixed Lymphocyte Culture*), resposta citotòxica en front l'antigen, i fins i tot, en l'agregació homotípica a conseqüència de determinats estímuls (Lectines, agents promotors tumorals com la PMA, AcMos contra certes molècules,). Tots ells són models experimentals que s'han demostrat útils per a poder definir els processos interleucocitaris en que les molècules d'adhesió intervenen, permetent també definir-hi les vies d'adhesió i/o activació que utilitzen aquestes molècules. Per altre part, l'accessibilitat dels limfòcits i de línies limfoblàstiques de creixement continuat ha permès una anàlisi a nivell bioquímic d'aquestes molècules i dels mecanismes intracel·lulars que vehiculen.

És en aquest context, d'interaccions en els processos de reconeixement, d'on va partir l'estudi del CD50 i en el qual s'ha desenvolupat el treball de la present tesi.

1.4. ACTIVACIÓ LIMFOCITÀRIA I MECANISMES DE TRANSDUCCIÓ DE SENYALS.

La resposta immunitària basa la seva actuació en la resposta específica dels limfòcits en front dels agents estranys, els antígens. Aquesta actuació passa per un seguit de processos que, de manera general, condueixen a l'activació i a un increment dirigit de la funció limfocitària, i posterior acció controlada d'altres cèl·lules auxiliars (macròfags, ...) [Janeway & Bottomly, 1994]. Concretament l'activació dels limfòcits T col·laboradors pel reconeixement específic per a l'antigen presentat per les APCs en el context de les molècules HLA de classe II, és, com ja hem dit, el mecanisme central que regula la majoria dels processos de la resposta immunitària. Des del receptor de l'antigen, fins als receptors de citocines, moltes són les molècules que, col·laborant entre elles, condueixen a un estat d'activació del limfòcit, que el porta a proliferar i a respondre en front de l'antigen. En el cas dels limfòcits T aquesta resposta d'activació es concreta en la producció de diverses limfocines (IL-2, IL-4, IFN γ , ...), que determinen en gran mida el tipus de resposta que es produeix, i en l'aparició o increment de l'expressió de diverses molècules de membrana que condicionen la resposta global posterior dels mateixos limfòcits. Durant aquesta activació limfocitària, tant la producció de citocines com l'aparició de molècules de membrana (de vegades és un augment del nombre de glicoproteïnes ja expressades per cèl·lula) són processos interrelacionats que es succeeixen i que poden ser conseqüència l'un de l'altre. Les molècules de membrana que apareixen de nou durant l'activació reben el nom de molècules d'activació. Així, l'estudi de la producció de citocines i la determinació de l'aparició de marcadors d'activació (CD25, CD69, ...) són dos eines molt útils per tal de conèixer la resposta limfocitària.

En el procés d'activació limfocitària, juntament amb el reconeixement antigènic, intervenen moltes molècules de membrana, tant els receptors de les citocines com les ja esmentades molècules d'adhesió. Al llarg de la descripció dels diversos grups funcionals de molècules d'adhesió hem comentat que sovint moltes d'aquestes molècules que estableixen les interaccions cèl·lula-cèl·lula també són capaces de transduir senyals co-estimuladors cap a l'interior de la cèl·lula. Aquesta capacitat co-estimuladora, en alguns casos (CD28/CD80, CD40/CD40L) és tant important, que la capacitat adhesiva pot passar a segon terme, anomenant-les de manera general molècules accessòries. Aquesta distinció no evita que les clàssiques molècules d'adhesió (LFA-1, CD2), siguin de fet també potents molècules co-estimuladores [Wacholtz et al, 1989; Pardi et al, 1989; Holter et al, 1986] amb un paper clau en l'activació limfocitària.

Els mecanismes de transducció de senyals, tant del receptor específic per l'antigen, com dels receptors de citocines o de les molècules accessòries i d'adhesió, constitueixen una complexa xarxa de processos bioquímics interrelacionats [Weiss & Littman, 1994]. Normalment s'inicien a través de molècules citoplasmàtiques que són les que presenten la capacitat catalítica per a desenvolupar els diversos processos que desemboquen en la regulació de l'expressió gènica cel·lular (en alguns casos la mateixa molècula de membrana té capacitat catalítica, com la funció fosfatasa del CD45). Aquestes molècules citoplasmàtiques, sovint en forma de complexos multimoleculars, interaccionen associant-se i dissociant-se de les molècules de membrana transductores, reconeixent d'alguna manera la seva unió al lligand. És evident que el control bioquímic d'aquestes associacions (bàsicament fosforilacions

d'una o altra molècula) és un mecanisme cabdal en la regulació dels processos de transducció de senyals.

Moltes són les vies bioquímiques de transducció de senyals descrits (producció de nucleòtids cíclics, especialment AMP-cíclic i GMP-cíclic, canvis iònics i de pH, augments en les concentracions de certs cations, especialment Ca^{2+} i Mg^{2+} ,), però són els mecanismes de fosforilació i defosforilació els que semblen ocupar un lloc central, iniciant, regulant i sovint finalitzant les altres vies [Perlmutter et al 1993]. Les fosforilacions proteiques són processos que poden canviar la conformació de la proteïna o bé la seva associació amb d'altres proteïnes. La fosforilació proteica és un procés molt controlat cel·lularment, i així, mentre que la incorporació d'un grup fosfat a l'esquelet proteic (fosforilació) es realitza a través d'uns enzims anomenats proteinkinases (enzims amb activitat fosforilant), les defosforilacions les realitzen altres enzims anomenats proteínfosfatases (enzims amb activitat defosforilativa). Bàsicament es descriuen dos grans grups de fosforilacions proteiques: les fosforilacions en serines o treonines, i les fosforilacions en tirosines. Aquests mecanismes utilitzen vies bioquímiques ben diferents doncs existeixen protein-serin/treonin-kinases (PSTKs o PSKs) i protein-tirosin-kinases (PTKs), juntament amb protein-serin/treonin-fosfatases (PSTPs o PSPs) i protein-tirosin-fosfatases (PTPs) que tenen sovint efectes contraposats; de manera general podriem dir que, mentres les fosforilacions en serines/treonines solen disminuir l'efecte o variar l'expressió de les proteïnes que fosforilen, les fosforilacions en tirosines solen activar o augmentar l'efecte de les proteïnes que fosforilen [Alberola-Ila & Lozano, 1990].

Existeix cada cop un major nombre de kinases i fosfatases, però cal esmentar aquí algunes de les que es consideren més importants en l'activació cel·lular dels limfòcits [Perlmutter et al, 1993; Weiss & Littman, 1994]: entre

les PSKs destaca la Proteinkinasa C (PKC), dependent de la presència de Ca^{2+} , que amb diferents isoformes vehicula una via cabdal de l'activació limfocitària a través de les fosforilacions en serines i treonines de diverses-molècules (entre elles el propi CD50, objecte de la tesi), diferents PSKs dependents de AMP-cíclic (PKAs) i les MAP-kinases (*Mitogen-activated protein-kinasa*); entre les PTKs cal assenyalar aquelles de la família src (entre les que destaquen la $p56^{\text{lck}}$ i la $p59^{\text{fyn}}$ especialment, i les $p53/56^{\text{lyn}}$, $p55^{\text{blk}}$ i $p62^{\text{yes}}$, també conegudes com a *lck*, *fyn*, *lyn*, *blk* i *yes*), i les més recentment descrites ZAP-70 i PI3-kinasa; per últim entre les fosfatases cal destacar l'activitat PTP del CD45, una molècula de membrana amb un paper clau com a molècula co-estimuladora.

Com exemple molt esquemàtic del funcionament d'aquestes vies, es pot comentar una via clàssica de transducció de senyals, l'activació via TcR [June, 1991, Kolanus et al, 1993]. En ella (Figura 7), el reconeixement antigènic pel TcR activa varies PTKs associades (*fyn*, ZAP-70, ...) que fosforilant una proteïnlipasa, bàsicament la proteïnlipasa-C, produeixen l'alliberament de diacilglicerol (DAG) i inositol-fosfats (IPs). Certes fosforilacions més i els IPs produïts, essencialment l' IP_3 i l' IP_4 són capaces d'induir l'increment de la concentració de Ca^{2+} intracel·lular i aquest provocar l'activació de la Calmodulina (CaM) que a la seva vegada activa noves kinases i noves vies de fosforilacions. Per la seva part, el DAG produït activa translocant la PKC, que indueix una nova via de fosforilacions importantíssimes. En aquest esquema, les molècules co-estimuladores, algunes com el CD45 amb activitat PTP intrínseca, contribuirien al procés modulant aquestes o noves vies de senyalització. Sigui com sigui, les fosforilacions proteiques acaben controlant

els altres mecanismes de transducció de senyals intracel·lulars, activant o inactivant en darrer terme els factors reguladors de la transcripció genètica i per tant disminuint o augmentant la síntesi de proteïnes, que al cap i a la fi és el que defineix l'activació cel·lular (Fig 6).

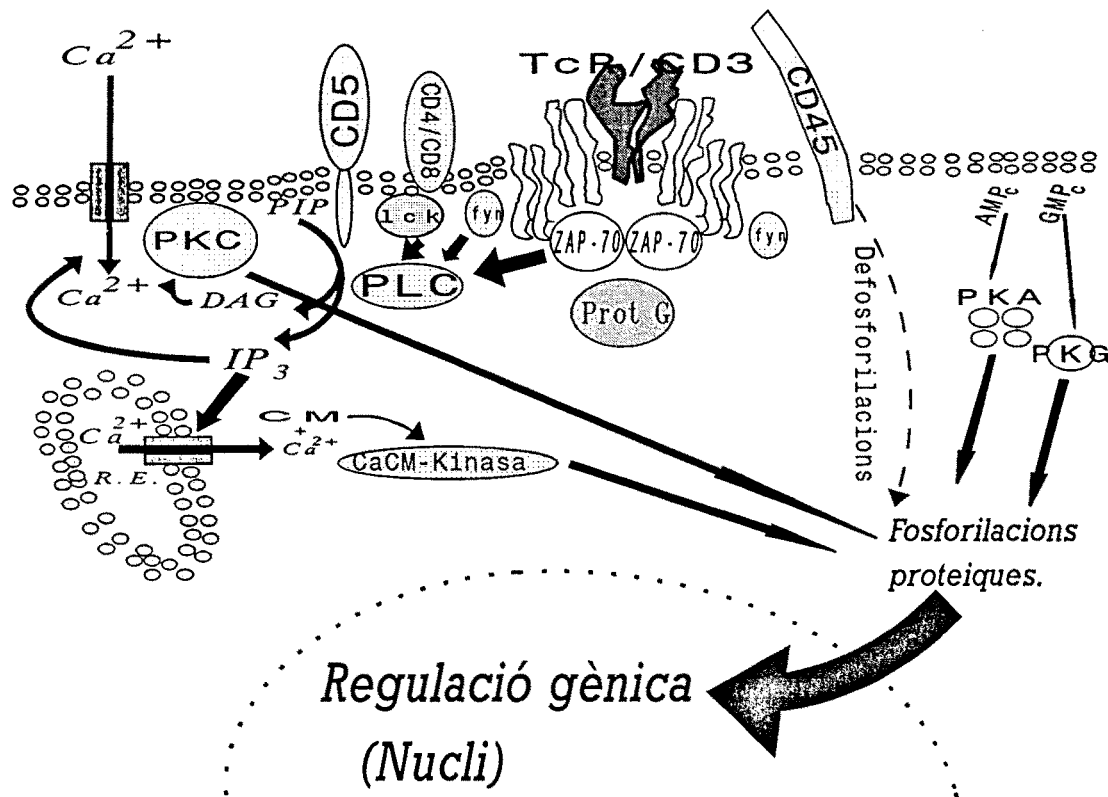


Figura 7. Esquema de les vies de transducció de senyals implicades en el reconeixement antigènic dels limfòcits T i l'acció de diverses molècules accessòries.

En aquest context de vies de senyalització intracel·lular, és d'on cal partir per comprendre el paper de la molècula CD50, l'objecte de la present tesi, com a molècula co-estimuladora de l'activació limfocitària. Així, només a través de la influència del CD50 sobre la xarxa de vies de senyalització intracel·lular es podrà dibuixar el perfil correcte del que és el primer ICAM transductor de senyals, el CD50.

1.5. DADES PRÈVIES SOBRE EL CD50.

Definit a conseqüència de l'estudi internacional d'AcMos realitzat en el *IV International Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens* (1989) per la peculiar reactivitat de dos AcMos, produïts al nostre laboratori pel Dr. R. Vilella, els anomenats 101-1D2 i 140-11, el grup de diferenciació 50, conegut aleshores com CDw50 [Hadam, 1989], describia el que semblava, i ha resultat ser, una nova molècula panleucocitària humana. La característica reactivitat d'aquells dos AcMos d'origen murí en front a subpoblacions i línies cel·lulars leucocitàries humanes (similar al LFA-1, però perfectament distingible per la seva peculiar reactivitat, especialment en front de la línia B-limfoblastoide U-266), definia una molècula de 110-130 kD, altament glicosilada. Un següent estudi exhaustiu publicat posteriorment [Vilella et al, 1990] confirmava aquestes dades, afegint-hi una completa taula de reactivitat cel·lular (Taula 5) en la que destaca la positivitats en front de RPMI-8226, diferent a la de LFA-1, i definint clarament aquesta molècula com a una glicoproteïna humana de superfície, panleucocitària i monomèrica de 130 kD, amb ponts disulfur intracatenaris i altament N-glicosilada. Però la dada més interessant que aquest estudi presentava era la capacitat que tenien aquells dos AcMos que reconeixen i defineixen el CD50, per a bloquejar la proliferació cel·lular del Cultiu Mixt Limfocitari (MLC), resposta *in vitro* de PBMCs d'un individu enfrontades amb PBMCs irradiades d'un altre. Així, es caracteritzava la participació decisiva del CD50 en l'al·loreconeixement, doncs si es bloquejava mitjançant la incubació amb els anti-CD50 la seva funció, es produïa una clara inhibició de la proliferació cel·lular. La participació del CD50 en l'al·loreconeixement, era en aquest treball pregonament analitzada, doncs

Taula 1 Reactivitat cel·lular del CDw50 (extret i adaptat de [Vilella et al, 1990], amb el permís del Dr. Vilella).

Tipus cel·lular	Percentatge de positivitat	
	101-1D2	140-11
Sang Perifèrica		
Cèl·lules Mononuclears	82	81
" " + PHA(3 dies)	87	85
Limfòcits T (E+)	95	95
Limfòcits No-T (E-)	47	42
Limfòcits B*	95	95
Monòcits	76	69
Granulòcits	99	97
Plaquetes	<5	<5
Eritròcits	<5	<5
Thimòcits	59	62
Línies T ^b		
CEM	+++	+++
MOLT-4	++	++
JURKAT	++	++
HSB2	+++	+++
HPB-ALL	0	0
Línies B ^b		
DAUDI	0	0
RAJI	+	+
RPMI-8226	+++	+++
NALM-6	0	0
KM3	+	+
RAMOS	++	++
Línies no-limfoides ^b		
HL-60	+	+
U-937	++	++
K-562	0	0
HELA	0	0

a) Doble fluorescència.

b) +++ =>90%, ++ =50-90%, + =20-50%, 0 = <20%.

a part d'inhibir la resposta proliferativa del MLC quan qualsevol dels dos AcMos anti-CD50 disponibles aleshores eren incubats durant tot el cultiu, també es produïa quan es preincubaven només amb la cèl·lules responedores (no-irradiades), i/o amb les cèl·lules estimuladores (irradiades). Aquesta dada

feia sospitar que la seva acció era més inhibidora del contacte intercel·lular que media l'al·loreconeixement (adhesió) que mediada per un senyal inhibidor (que només hauria d'ésser efectiu sobre les cèl·lules no-irradiades). A més a més s'analitzava que l'efecte inhibidor era dependent de dosi, i que sobretot era eficaç quan l'anti-CD50 s'incubava al principi del MLC. Aquesta dada, per sí sola ja feia intuir la funció del CD50 en el reconeixement, suggerint per tant que ens trobavem davant d'una nova molècula d'adhesió. Un tercer treball [Lozano et al, 1992a] determinava la capacitat del CD50 per esdevenir fosforilat, ja esmentada en el treball previ [Vilella et al, 1990]. Aquest estudi de 1992, definia aquesta fosforilació més profundament, determinant que es produeix en residus serínics després de l'activació de la Proteinkinassa-C (PKC, *Protein Kinase C*) tant per l'acció estimulants *in vitro* dels èsters de forbol (PMA, i d'altres) com per l'activació cel·lular que s'indueix a través de l'estimulació també *in vitro* dels AcMos anti-CD3, una activació més similar a la que es produeix fisiològicament en el reconeixement antigènic via el complex TcR/CD3. Aquesta capacitat del CD50 per a esdevenir fosforilat, malgrat no afectar aparentment la seva expressió en membrana, indicava una possible via de regulació d'aquesta molècula, les conseqüències funcionals de la qual encara no s'han analitzat. El quart treball aparegut sobre el CD50 [Lozano et al, 1992b] definia una línia cel·lular CD50 deficient, l'anomenada PPL.1, derivada de la línia limfoblastoide T Jurkat, que pot esdevenir una eina molt útil en l'anàlisi de la funcionalitat del CD50. És important assenyalar que el treball deixava clar que la deficiència de CD50 de la PPL.1 no era reversible sota estímuls comuns (mitògens, estimulacions, ...), ni semblava influir en el fenotip global de les cèl·lules, valorat per citofluorimetria d'altres marcadors

cel·lulars. Cal esmentar també aquí que durant la realització d'aquest treball es va produir (Dr. Vilella) un tercer AcMo que reconeixia la mateixa molècula anti-CD50, l'anomenat 152-2D11, i que ha estat emprat profusament al llarg de l'estudi desenvolupat en aquesta tesi. Tal i com es veurà en diversos aspectes de la tesi, aquest AcMo ha resultat especialment útil en tots aquells estudis on es valorava la capacitat transductora de senyals. A més a més, l'estudi epitòpic de la reactivitat dels tres anti-CD50 [Vilella et al, 1993], va determinar que els tres AcMos reconeixen epítops diferents del CD50, la qual cosa encara els converteix en eines més útils en l'anàlisi de la funció del CD50.

Aquest era el conjunt de dades, referents al CD50, de les que es disposava a l'inici del treball presentat en aquesta tesi i que definien aquesta molècula com una glicoproteïna monomèrica d'expressió panleucocitària en humans, que possiblement actuava com una molècula d'adhesió i la funció de la qual podria regular-se mitjançant fosforilació. La present tesi aporta les dades que permeten la definició estructural i funcional del CD50, que portaren a la determinació de la identitat del CD50 amb el tercer lligand del LFA-1 (anomenat també ICAM-3) i que han fet d'aquesta molècula una de les molècules d'adhesió més importants en els contactes dels limfòcits, especialment en els que s'estableixen en les primeres fases del reconeixement antigènic. Cal esmentar que les primeres dades que describien l'ICAM-3 cel·lularment i bioquímicament (molt similar a la descripció de Vilella et al, 1990) apareixeren durant la realització d'aquest treball [de Fougerolles & Springer, 1992] i no influïren més enllà de suggerir i permetre la realització de la segona part dels resultats d'aquesta tesi (4.2- CD50 i ICAM-3: Dos noms per una mateixa molècula.).

HIPÒTESI DE TREBALL

II. HIPÒTESI DE TREBALL.

El conjunt de dades disponibles a l'inici d'aquest treball, feia pensar en el CD50 com a una glicoproteïna de membrana d'expressió pràcticament restringida al llinatge leucocitari i que possiblement actuava com una molècula d'adhesió humana, a l'intervenir en l'al·loreconeixement. Així, com a hipòtesi de treball, vàrem partir de la consideració del CD50 com a molècula d'adhesió, consideració que porta a valorar la possibilitat de que presenti tot un conjunt de possibles funcions adhesives i transductores de senyals. La seva expressió panleucocitària feia preveure que si s'arribava a la confirmació de la inclusió del CD50 dins de la categoria de les molècules d'adhesió seria possible definir un ampli ventall de capacitats i funcions, en relació a les distintes interaccions que a nivell de les diverses poblacions leucocitàries podria vehiculitzar. Així doncs, per tal de confirmar la idea del CD50 com a molècula d'adhesió, començarem els treballs de clonació gènica amb la finalitat d'arribar a definir la seva funció a través de la seva estructura. Donat que el nombre de molècules de membrana leucocitària que han sigut definides a nivell de seqüència aminoacídica predita a partir de llurs cDNA clonats és cada vegada major (i en el moment de l'inici del treball ja era força important), i que la comparació de seqüències proteïques en les bases de dades esdevé cada vegada més efectiva pel que fa a la troballa d'homologies que suggereixen funcions, decidírem intentar la clonació del cDNA del CD50 (aleshores encara anomenat CDw50), per tal d'intentar implicar-lo en un família o grup funcional de molècules conegudes. D'aquesta manera, la seqüència parcial proteica

obtinguda a partir dels pèptids generats per rotura selectiva amb CNBr (Bromur de Cianògen) de la proteïna purificada per cromatografia d'afinitat, va suggerir que el gen del CD50 codificaria realment una molècula d'adhesió de la IgSF dins de la família dels ICAMs. La clonació posterior del CD50 i una anàlisi comparatiu, gairebé en paral·lel, dels AcMos anti-CD50 i els anti-ICAM-3 (una molècula que havia estat en aquells moments recentment caracteritzada a través d'un AcMo [de Fougerolles & Springer, 1992]) demostraren la identitat del CD50 com el tercer lligand del LFA-1, el tercer ICAM (ICAM-3). D'aquesta manera, la inclusió definitiva del CD50 dins del grup de les molècules d'adhesió va portar a la segona part d'aquest treball que es plantejava com a hipòtesi central l'existència de bifuncionalitat per al CD50, en consonància amb les dues funcions que sovint tenen les molècules d'adhesió, una funció adhesiva, vehiculant la interacció entre leucòcits i amb les cèl·lules endotelials, i una funció co-estimuladora a través de diversos mecanismes transductors de senyals.

Per últim, i donat que darrerament s'han descrit l'existència de polimorfismes en els gens que codifiquen diverses molècules de membrana, relacionat-ho sovint amb una major o menor relació amb la susceptibilitat a determinades malalties, ens plantejarem analitzar l'existència de polimorfismes en el gen del CD50 humà, com a eina per un possible estudi posterior de la seva repercussió clínica.

OBJECTIUS

III. OBJECTIUS.

L'objectiu general, de definir l'estructura i funció del CD50, es va concretar amb els següents quatre objectius específics:

1.- Anàlisi de la seqüència genètica i proteica del CD50.

1.a.- Definició de la seqüència aminoacídica de la glicoproteïna, a través de la seqüenciació nucleotídica del cDNA del CD50.

1.b.- Determinació d'homologies en aquestes seqüències per a permetre suggerir una possible implicació funcional del CD50.

2.- Anàlisi de la participació del CD50 en les funcions adhesives cel·lulars.

2.a.- Estudi de la participació cel·lular del CD50 en els mecanismes de contacte limfòcit-endoteli.

2.b.- Anàlisi del paper de l'estimulació del CD50 en els mecanismes de contacte interlimfocitari.

3.- Estudi de possibles vies de transducció de senyals intracel·lulars que medien la co-estimulació cel·lular a través del CD50.

3.a.- Anàlisi en una línia cel·lular T limfoblastoide, la línia Jurkat, dels mecanismes de transducció de senyals.

3.b.- Determinació de la relació de la co-estimulació cel·lular del CD50 amb la inducció d'efectes cel·lulars que evidenciiïn activació.

4.- Anàlisi del gen del CD50 humà, per tal de determinar l'existència de possibles polimorfismes.

RESULTATS

CAPÍTOL I

4.1.- CLONACIÓ I CARACTERITZACIÓ DEL cDNA DEL CDw50.

4.1.1.- RESUM.

La confirmació de que el CDw50, reconeixia una nova molècula d'adhesió, de la qual coneixíem que s'expressava panleucocitàriament com una glicoproteïna de 110-130 kD amb una participació cabdal en l'al·loreconeixement, es plantejà a través de l'anàlisi de la seqüència proteica obtinguda en el procés de clonació del cDNA i posterior comparació amb un banc de seqüències proteiques i nucleotídiques. La caracterització de les condicions per a la purificació per cromatografia d'afinitat i preparació proteica per la consegüent microseqüenciació directa dels pèptids produïts mitjançant l'escissió específica amb CNBr (Bromur de Cianògen), portaren a l'obtenció de seqüències aminoacídiques parcials de 3 pèptids que revelaren l'homologia del CDw50 amb un grup de molècules d'adhesió, els ICAMs, especialment amb l'ICAM-1, una molècula amb 5 dominis immunoglobulínics. Utilitzant oligonucleòtids d'elecció (*guessmers*), sintetitzats a partir de les seqüències obtingudes i basant-se en les taules de màxim ús dels codons, va ser possible obtenir, per PCR, uns fragments majors (271 i 425 bp) que confirmaren l'homologia amb l'ICAM-1 i que varen poder ser utilitzats com a sondes per a aïllar el cDNA del CD50 en un posterior crivellament d'una genoteca de cDNA en λ gt10. Seqüenciada la clona més llarga de les obtingudes, les seves 1717 bases evidenciaren que es tractava del, llavors recentment clonat, ICAM-3, una molècula de la IgSF.

4.1.2.- INTRODUCCIÓ.

La determinació per anàlisi bioquímica i distribució d'expressió cel·lular de que dos AcMos produïts al nostre laboratori i classificats en el grup de diferenciació 50, o CDw50 [1], reconeixien una nova molècula, una proteïna de membrana altament glicosilada amb un paper clarament important en la resposta de l'autoconeixement [2], ens va portar a intentar caracteritzar-la més profundament a través de l'anàlisi que la comparació de la seqüència d'un cDNA, amb una base o banc de seqüències, permet fer. De fet, el cada vegada major nombre de seqüències proteiques i aminoacídiques que s'acumulen (i en el moment de dur a terme aquesta estratègia ja era força important), fa d'aquesta línia de treball, una de les més vàlides per tal d'acotar el camp d'estudi funcional de la molècula d'interès.

Entre les diverses estratègies possibles per assolir la clonació del cDNA (llibreria de substracció, crivellament d'una llibreria d'expressió de procariotes, crivellament d'una llibreria per l'expressió transitòria en cèl·lules eucariotes, ...) del CD50, llavors encara anomenat CDw50, vàrem optar per la via més clàssica i que més resultats positius ha donat, la microseqüenciació parcial de la proteïna purificada [3]. Així, començarem per determinar les condicions de purificació, optant per la cromatografia d'afinitat, donat que teníem els AcMos que definien el CDw50, l'obtenció de fragments peptídics per escissió específica amb CNBr (Bromur de Cianògen) de la molècula aïllada en nitrocel·lulosa per SDS-PAGE, i, per últim, resolució dels pèptids obtinguts de nou per SDS-PAGE i transferència a PVDF. La microseqüenciació posterior de tres dels fragments peptídics ens permeteren dissenyar diferents oligonucleòtids anomenats d'elecció (*guessmers*), sintetitzats a partir de les seqüències peptídiques obtingudes i definint les indeterminacions del codi

genètic, basant-se en les taules de màxim ús dels codons [4]. Posteriorment, mercès a la tècnica de la PCR (reacció en cadena de la polimerasa o *Polymerase Chain Reaction*), vàrem obtenir seqüències nucleotídiques majors i no degenerades, que van poder ésser emprades de manera eficient com a sondes específiques en el crivellament d'una llibreria de fags. Aquest va ser l'esquema utilitzat amb èxit, per la clonació del cDNA del CDw50, l'anàlisi del qual va permetre assegurar que ens trobàvem davant d'una nova molècula d'adhesió, que corresponia amb el, llavors acabat de clonar, ICAM-3.

4.1.3.- MATERIAL I MÈTODES.

4.1.3.1. Anticossos Monoclonals.

En el procés de purificació proteica per cromatografia d'afinitat es va emprar l'AcMo, 101-1D2 (anti-CDw50, IgG1) [1, 2]. L'estudi i caracterització de les condicions de purificació es va realitzar també amb el 101-1D2, malgrat que també es va començar l'estudi amb l'altre AcMo anti-CDw50, 140-11 (IgG2b) [1,2], i un tercer anti-CDw50 produït en aquelles dates pel Dr. Vilella, l'anomenat 152-2D11 (IgG1).

4.1.3.2. Marcatge de les proteïnes cel·lulars.

S'han emprat dos tipus de marcatge de les proteïnes de membrana cel·lulars, un marcatge en superfície amb I^{125} i un marcatge metabòlic amb S^{35} : Després del marcatge les cèl·lules es lisaren, en tots els casos, a 4°C amb tampó de lisi amb NP-40 al 0,5% (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1% NP-40, 1 mM NaF, 3 mM NaN_3 , 1 mM PMSF, 20 μ g/ml α -1-antitripsina, 1 μ g/ml chimostatina, 1 μ g/ml leupeptina i 1 μ g/ml

pepstatina).

Per a realitzar el marcatge de les cèl·lules en superfície, cèl·lules mononucleades de sang perifèrica (PBMCs) purificades per gradient de Ficoll-Hypaque, o cèl·lules Jurkat, una línia limfoblàstica T, varen ser marcades amb I^{125} usant el mètode del Iodogen (Pierce, Rockford, IL):

0- Preparació del tub de marcatge amb Iodogen:

a) Afegiu 50 μ g de Iodogen a un tub de vidre de 3 ml, per a marcar 50×10^6 de cèl·lules, és a dir, 50 μ l de una solució stock d'Iodogen (1 g/l dissolt en cloroform i conservada a -20°C).

b) Assequeu la solució, evaporant el cloroform, amb un fort raig de N_2 de manera que el iodogen s'assequi com una pel·lícula a la paret del tub fins a 0,5 cm de la base del tub (cal estar ben segur que el tub és completament sec abans de prosseguir la tècnica, doncs restes de cloroform poden destruir les cèl·lules abans del marcatge). Aquest tubs poden també conservar-se amb el iodogen sec a temperatura ambient (t.a.) durant uns mesos.

1- Renteu 50×10^6 de cèl·lules amb PBS, 3 vegades.

2- Centrifugueu les cèl·lules un darrer cop i resuspeneu-les bé amb 100 μ l (8 gotes) de tampó Borat (pH 8,2).

3- Afegiu 500 μ Ci de I^{125} (5 μ l) a les cèl·lules. Transferiu la suspensió al tub de vidre amb el iodogen.

4- Incubeu a t.a. 10 min, agitant el tub 30 segons cada 2 minuts (4 vegades).

5- Pneu la transferència de I^{125} als residus tirosina, afegint-hi 2 ml de KI 0,01 M dissolt en PBS (415 mg/250 ml). Transferir les cèl·lules marcades a tubs de 15 ml cònics. Ompliu el tub amb més KI.

6- Centrifugueu-lo a 1000 rpm. Descarteu el sobrenedant i resuspeneu les cèl·lules amb 15 ml més de KI/PBS.

7- Incubeu les cèl·lules 15 min en un bany a 37° C per a alliberar el I¹²⁵ atrapat inespecíficament per les cèl·lules.

8- Centrifugueu-ho a 1000 rpm. Descarteu el sobrenedant i renteu un cop més les cèl·lules amb 15 ml més de KI/PBS.

9- Centrifugueu-ho a 1000 rpm. Descarteu el sobrenedant i resuspeneu les cèl·lules amb 0,5 ml de PBS, agafant-hi 10 µl per a fer un control de comptes viables (els 10 µl es dissolen en 1 ml més de PBS).

10- Transferiu la suspensió cel·lular a un tub eppendorf. Liseu les cèl·lules amb 0,5 ml de tampó de lisi x2 (dos cops concentrat) a 4° C durant 20-30 min.

11- Centrifugueu-ho 15 minuts a 12000 rpm a 4° C per a recuperar el sobrenedant amb les proteïnes marcades, refusant el botó de nuclis cel·lulars.

Per a realitzar el marcatge metabòlic de les cèl·lules, cèl·lules Jurkat varen ésser incubades durant 3 h en un medi de cultiu, IMDM (*Iscove Modified Dulbecco's Medium*), sense L-metionina, ni L-cisteïna (Sigma, St. Louis, MO), al que se li afegeix metionina i cisteïna marcades amb S³⁵:

1- Renteu 50x10⁶ de cèl·lules amb medi IMDM sense L-met ni L-cys 2 vegades.

2- Incubeu les cèl·lules en el mateix medi IMDM deficient per a metionina i cisteïna, però ara suplementat amb 1 mCi S³⁵-metionina i S³⁵-cisteïna, durant 3 h, a 37°C.

3- Renteu les cèl·lules dos cops en PBS, centrifugant-les a 1000 rpm. Descarteu el sobrenedant.

4- Transferiu la suspensió cel·lular a un tub *ependorf*. Liseu les cèl·lules amb 0,5 ml de tampó de lisi x2 a 4° C durant 10 min. Centrifugueu-ho 15 minuts a 12000 rpm a 4° C per a recuperar el sobrenedant amb les proteïnes, refusant el botó de restes nuclears.

És sempre recomenable, i imprescindible per a realitzar anàlisis comparatives, portar sempre a terme el control amb TCA (àcid tricloracètic) de comptes de marcatge:

- 1- Barregeu 5 μ l de lisat amb 95 μ l de serum de conill (o de FCS).
- 2- Precipiteu les proteïnes amb 1 ml de 20% TCA (dissolt en aigua) que cal que afegiu lentament i fent vòrtex al mateix temps.
- 3- Centrifugueu-ho 20 min a 2800 rpm.
- 4- Recolliu el sobrenedant en un altre tub.
- 5- Conteiu els dos tubs (precipitat i sobrenedant) en un contador de radioactivitat. [Per a calcular les cpm/ml només cal multiplicar el resultat del precipitat per 200]

4.1.3.3. Immunoprecipitacions.

Després del marcatge de les proteïnes per un o altre mètode, els lisats cel·lulars s'immunoprecipiten (de 10 a 30 x 10⁶ cpm/ml i situació és recomenable), incubant els lisats amb l'AcMo a estudi unit a un medi sòlid (Sefarosa copulada amb l'anti-CDw50 en el nostre cas) durant més de 1 h (o tota la nit) a 4°C. Sovint, quan el senyal de fons o els inespecífics són molt importants, cal preincubar el lisat amb un AcMo del mateix isotip però no relacionat (sovint en el nostre cas, el CD50, no ha sigut necessari). Després de rentar l'immunoprecipitat de 6 a 8 vegades amb el tampó de lisi amb NP-40

0,5%, (intercalant entre el 6 i el 7 rentat si cal, segons el cas, la solució de rentat o elució que volem analitzar) s'elueix l'immunoprecipitat amb un mateix volum de tampó de càrrega reductor x2 (dos vegades concentrat). [El tampó de càrrega, o de mostra, x1, per a condicions no-reductores, està format per 10% glicerol, 0,1% blau de bromofenol, 2,3% SDS i 0,06 M Tris-HCl, pH 6,8, al qual cal afegir 10 mM 2 β -mercaptoetanol (o DTT, ditionitrotol) per obtenir un tampó de càrrega reductor]. Per fi, es desnatura la mostra escalfant-la 5 minuts a 95-100° C i s'analitza la immunoprecipitació en un gel de SDS-PAGE, junt a estàndards de pes molèculars en un altre carril. Després de tenyir el gel amb blau de Coomassie, s'asseca i s'exposa per autorradiografia (films Kodak X-Omat AR) per a poder analitzar el resultat de la immunoprecipitació.

4.1.3.4. Conjugació d'AcMo a Sefarosa-CNBr.

La unió de l'AcMo a estudi a un suport sòlid, boles de Sefarosa-CNBr (*Sepharose-CNBr*, de Pharmacia, Upsala, Suècia) en aquest cas, tant per a realitzar les immunoprecipitacions com la cromatografia d'afinitat, es realitzà segons el següent protocol:

1 - Infleu en un embut de Butchner 1 g de Sefarosa preactivada amb CNBr passant-hi 200 ml de 1mM HCl (39 μ l d'HCl al 32% en 400 ml H₂O), durant 10 min. Fer una darrera passada amb tampó de conjugació (0,1 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl, pH 8,3).

2 - Diluiu entre 10 i 15 mg del lligand, en aquest cas l'AcMo purificat resuspès en PBS a una concentració d'entre 1-2 mg/ml, com a mínim 1 a 1, en tampó de conjugació. És important que l'AcMo purificat no contigui cap resta de Tris, doncs competiria amb la unió del lligand amb els llocs actius de la Sefarosa.

3 - Comproveu la concentració proteica inicial llegint la densitat òptica (O.D.) de la dilució amb l'espectrofotòmetre a 280 nm (la concentració proteica aproximada, en mg/ml es pot mesurar multiplicant les unitats d'O.D., per 0,67).

4 - Deixeu rotant el gel de la Sefarosa inflada amb el lligand diluït en tampó de conjugació durant 2 h a t.a. (o tota la nit a 4°C).

5 - Recupereu el sobrenedant, després de centrifugar la Sefarosa dolçament (100 rpm durant 1-2 min). Comproveu la conjugació de la proteïna a la Sefarosa llegint l'O.D. del sobrenedant amb l'espectrofotòmetre a 280 nm. La concentració proteica remanent no ha de superar el 5% de la inicial.

6 - Canvieu del llit de boles de Sefarosa el sobrenedant proteic per el tampó de bloqueig (0,1 M Tris-HCl, pH 8, ó 1 M etanolamina, pH 9), bloquejant els llocs d'unió remanents de la Sefarosa mitjançant la rotació del gel de Sefarosa durant 2 h a t.a. (o tota la nit a 4°C).

7 - Renteu el llit de Sefarosa mitjançant 3 o 4 cicles alternatius (A + B x 3-4) de canvis de pH (es pot tornar a fer en l'embut de Butcher) amb els tampons A (0,1 M de tampó acetat amb 0,5 M NaCl, pH 4) i B (0,1 M de Tris-HCl amb 0,5 M NaCl, pH 8).

8 - La Sefarosa un cop conjugada amb el lligand pot guardar-se a 4°C en PBS.

4.1.3.5. Purificació de la proteïna per cromatografia d'afinitat i electroforesi en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

La proteïna CDw50 va ser purificada a partir 8×10^9 de PBMCs lisades amb 80 ml del tampó de lisi amb 0,5 % de NP-40, esmentat durant el protocol de marcatge, mitjançant una columna d'afinitat formada per 5 ml de boles de

Sefarosa copulades amb l'AcMo 101-1D2. La columna va ser rentada amb 150 ml de tampó de lisi i 15 ml d'una solució 1 M MgCl₂ (condicions de rentat per al 101-1D2). Tot seguit, la proteïna CDw50 va ser eluïda selectivament amb una solució de 4 M MgCl₂. Després de la seva concentració, i la desalació del tampó diluent per ultrafiltració (Centricon 30, Amicon, Beverly, MA), vàrem sotmetre la proteïna a alquilació (en atmòsfera de N₂) mitjançant la incubació dels 100 µl de la suspensió proteica amb 2 µl de l'agent alquilant 4-Vinilpiridina (4-VP) a 37°C tota la nit. Aquest pas és obviat, però resulta recomenat per tal d'assolir una microseqüenciació més senzilla dels residus alquilables, com la cisteïna, que d'altra manera s'autooxida de forma variable produint-hi un senyal pot clar en el cromatograma de seqüenciació. Posteriorment la proteïna, un cop desnaturalitzada, per escalfament durant 5 minuts a 90-100° C, en presència de 30 µl de tampó de càrrega reductor x5 (cinc vegades concentrat), va ser analitzada en un gel del 8 % de poliacrilamida per la tècnica de SDS-PAGE, en condicions reductores, i electrotransferida en semisec (4 mA/cm²) amb un tampó de transferència amb Tricina (39 mM Tricina, 48mM Tris-base, 1.3 mM SDS i 20% metanol). En un primer intent la mostra va ser transferida directament a PVDF i tenyida amb blau de Coomassie (0,1% de blau de Coomassie R-250 en 40% metanol i 1% d'àcid acètic) per intentar la microseqüenciació directa de l'extrem amino-terminal (N-terminal). Donat que la seqüència va resultar infructuosa (N-terminal bloquejat), la següent electrotransferència es va realitzar a nitrocel·lulosa, i després de tenyir-la amb el colorant Ponceau S (0,2% de Ponceau S en 1% d'àcid acètic), per tal d'aïllar la banda corresponent al CDw50, es va procedir a l'escissió específica de la proteïna amb CNBr (Bromur de Cianògen), per tal d'abordar la posterior microseqüenciació dels fragments.

4.1.3.6. Purificació i microseqüenciació dels pèptids de CDw50 produïts per escissió específica amb CNBr.

Una vegada aïllada la banda corresponent al CDw50 de la membrana de nitrocel·lulosa, es va procedir directament a l'escissió específica amb CNBr de la proteïna continguda en el fragment del filtre. L'escissió (de vegades mal anomenada digestió) es va realitzar incubant en un tub *ependorf* la banda de nitrocel·lulosa en presència d'1 ml d'una solució de CNBr diluït en 66% d'àcid fòrmic (60 mg/ml de CNBr), en absència de llum i en una atmòsfera de N₂, durant 4 h a t. a. Després de liofilitzar, la solució que contenia els fragments peptídics de la digestió, el precipitat va ser resuspès i els pèptids resolts en un gel del 19% de poliacrilamida. Després d'electro-transferir-los en semi-sec a PVDF (PVDF-ProBlott, Applied Biosystems, Forster City, CA) amb tampó de tricina, els fragments varen ser visualitzats mitjançant la tinció de Negre Amido (0,1% de Negre Amido en 40% metanol i 1% d'àcid acètic). Tres dels fragments visualitzats van ésser sotmessos amb èxit a microseqüenciació directa sobre el PVDF, mitjançant el procés de degradació amino-acídica controlada conegut com a mètode Edman [5] de degradació, en un microsequenciador automàtic (Applied Biosystems 470A Microsequencer).

4.1.3.7. Digestió de DNA amb endonucleases de restricció.

Aquesta és una tècnica bàsica emprada al llarg d'aquest capítol tant per subclonar fragments, com per analitzar els patrons de restricció.

Cada enzim de restricció té la seva temperatura (i de vegades altres condicions especials) i unes condicions de salinitat i pH, però de manera general les digestions es fan afegint-hi 4 U d'enzim per μ g de DNA que volem digerir (quatre vegades més que el que defineix 1 U d'enzim) i incubant durant

2 h, el doble del temps necessari. D'aquesta manera s'assegura la digestió total de la mostra.

4.1.3.8. PCR interpeptídica amb oligonucleòtids d'elecció.

A partir de la seqüència peptídica parcial obtinguda, es dissenyaren varis oligonucleòtids anomenats d'elecció (*guessmers*), sintetitzats a partir de les seqüències obtingudes i obviant les indeterminacions del codi genètic basant-se en les taules de màxim ús dels codons [4], per tal d'assolir, a través d'una PCR de cDNA que produís un fragment interpeptídic, una sonda major i menys indeterminada (en comparació als oligonucleòtids degenerats que es poden dissenyar a partir de les seqüències proteiques). Els oligonucleòtids d'elecció utilitzats amb èxit (només dos parelles, de més de 10 oligonucleòtids sintetitzats ens permeteren obtenir fragments d'amplificació clars), els anomenats P2 (procedent del pèptid 2), iP1 (procedent del pèptid 1, però dissenyat segons la seqüència complementària) i iP3 (procedent del pèptid 3, però dissenyat segons la seqüència complementària) permeteren l'amplificació de dos fragments de cDNA que definien les seqüències de les regions nucleotídiques situades entre els pèptid 2 i el pèptid 3, i entre els pèptids 2 i 1. La seqüència dels oligonucleòtids emprats va ser:

P2: 5' CTG TTT GTG AAC ACC TCA GCC CC 3'

iP1: 5' ACC TGC ACC CGG GCT CCA GCC AT 3'

iP3: 5' ACA ATC TCG CGG GCA CCC TCC TG 3'

El cDNA es va obtenir per retrotranscripció de RNA poliA⁺ de cèl·lules Jurkat. Després es va realitzar la PCR a partir de 100 ng de cDNA (quantitat del mRNA retranscrit), 100 pmols dels encebadors, 0,2 mM de dNTPs, 1,5 i 1 U de la Taq polimerasa (Perkin Elmer), en presència de 1,5 mM de MgCl₂ (i

50 mM KCl + 10 mM Tris-HCl, pH 8,5). Les condicions de temperatura i temps dels 40 cicles d'amplificació emprats varen ser:

Desnaturalització: 94°C durant 30 s.

Anellament: 55°C durant 1 min.

Elongació: 72°C durant 1 min.

amb una extensió final a 72°C durant 10 min, fetes amb un termociclador.

4.1.3.9. Crivellament d'una genoteca de cDNA en fag λ gt10.

Vàrem partir d'una genoteca comercial de cDNA de limfòcits (CLONTECH) en fag λ gt10, amb una mida mitja ponderada de 2 kb i una mida màxima de 4 kb. El sistema emprat va ser el crivellament per hibridització, amb el producte de la PCR de 425 bp marcat radioactivament amb $[P^{32}]dCTP$ pel mètode de *random priming* (basat en la còpia de les cadenes pel fragment Klenow de la DNA-polimerasa a partir de l'encebament a l'atzar dels hexadesoxirribonucleòtids a l'atzar), de rèpliques de les clapes obtingudes per lisi bacteriana (soca LE-392) al infectar-se pels fags de la genoteca. A partir de solucions de fags resuspesos en el tampó d'emmagatzement SM (5,8 g NaCl + 2 g $MgSO_4 + 7H_2O + 50$ ml Tris-Cl 1M pH 7,5 + H_2O fins 1 litre) de la zona amb positivitat a la hibridació, tres crivellaments succesius de la genoteca permeteren obtenir varies clones individuals positives per a la sonda emprada.

En el procès de crivellament vàrem utilitzar els següents protocols:

A. TITULACIÓ DE LA GENOTECA DE cDNA. Per aconseguir una genoteca prou representativa, amb un nombre de clons o recombinants suficientment gran per garantir la presència del cDNA que ens interessa (o en

posterior crivellaments una quantitat de clapes adients), abans és necessari determinar la concentració real de fags de la genoteca amplificada de cDNA. Així s'aconseguirà determinar les proporcions adequades entre cèl·lules i fags per fer una infecció posterior. La titulació es realitza sobre plaques d'agar (10 g Bacto-triptona + 5 g extracte de llevat + 5 g NaCl + 10 ml SO₄Mg 1M + 12 g Bacto-Agar + H₂O fins 1l, pH 7,3-7,4) seguint el següent protocol:

1 - S'agafa 100 µl (si les plaques són petites) o 400 µl (plaques grans) de bacteris LE-392 i s'infecten amb diferents dilucions del *stock* de fags (5 a 50µl, en plaques petites o grans respectivament) afegint-hi MgCl₂ 10mM fins igualar el volum agafat de cèl·lules i es deixa 15 minuts a 37°C.

2 - Junteu-ho a 3 ml (plaques petites) o 8 ml (plaques grans) de *top agarosa* (10 g Bacto-triptona + 5 g extracte de llevat + 5 g Na Cl + 10 ml SO₄Mg + 6,5 g Bacto-Agarosa + H₂O fins 1l, pH 7,3-7,4) liquat i mantingut en un bany a 46°C.

3 - S'extén uniformement sobre les plaques, prèviament atemperades a 37°C.

4 - S'han de mantenir les plaques cap per amunt fins que el *top agar* es solidifiqui i després es deixa a 37°C durant 12-13 hores cap per avall.

5 - Es conten les clapes aparegudes, i es calcula la quantitat de fags adequada segons les plaques que es tinguin i la mida de la genoteca que es vol sembrar.

Es realitzen les infeccions definitives seguint els mateixos passos fets en les proves.

B. MÈTODE BENTON & DAVIS D'OBTENCIÓ DE RÈPLIQUES [6].

1 - Agafeu una placa infectada amb fags i col·loqueu-hi un filtre de nylon que s'adapti convenientment damunt del *top agarosa*. Es posa el filtre

ben estirat, sense cap arruga. Es deixa en contacte amb les clapes durant 30 segons mentre es transfereix. Amb una agulla amb tinta es fan unes punxades en el filtre que serviran de referència per a poder orientar posteriorment el filtre respecte la placa i, per tant, localitzar la clapa que interessarà.

2 - S'aixeca el filtre sense malmetre el *top agarosa*, i es posa sobre un plec de papers de filtre, mullats amb solució desnaturalitzant (0,5M NaOH + 0,5M NaCl), durant 1 min.

3 - S'agafa el filtre i es submergeix en una cubeta amb solució desnaturalitzant durant 1 minut.

4 - Es treu el filtre escorregent-lo en la vora de la cubeta i s'extén sobre un conjunt de papers de filtre, aquest cop mullats amb solució neutralitzant (1,5M NaCl + 0,5M Tris ClH, pH 8,0), durant 1 min.

5 - S'aixeca el filtre i es submergeix en una cubeta amb solució neutralitzant durant 4 minuts.

6 - Es treu el filtre, s'escorre i es submergeix durant 5 o 10 minuts en una cubeta amb 2XSSPE. Es manté amb agitació. Es va canviant el líquid a mida que vagi variant el pH.

7 - Es col·loca el filtre de nitrocel·lulosa entre papers de filtre i es fixa el DNA durant 2 hores a una temperatura de 80°C al buit. Aquest filtre està en condicions de guardar-se fins que es necessiti.

10 - Abans d'utilitzar el filtre s'ha de rentar amb la solució de rentat (3XSSC + 0,1%SDS).

El SSC s'utilitza a tot el llarg del treball en diferents concentracions (20XSSC, 5XSSC, 2XSSC, 0,1XSSC).

20XSSC està format per 175,3 g NaCl+ 88,2 g de Citrat Sòdic / 1 l d'H₂O , pH 7,0.

C. PREHIBRIDACIÓ DE LES RÈPLIQUES.

La prehibridació de les rèpliques obtingudes es realitza introduint els filtres dins d'una bossa amb el líquid de prehibridació (5XSSC + 1% SDS + 1xDenhardt's + 50% Formamida + 100 µg/ml ssDNA) i mantenint-ho a la temperatura de 42°C, de 2 hores fins a tota una nit.

D. HIBRIDACIÓ DE LES RÈPLIQUES.

A la hibridació es buida el líquid de prehibridació de la bossa i es substitueix pel líquid d'hibridació (5XSSC + 1% SDS + 1xDenhardt's + 50% Formamida + 10% Dextrà sulfat + 100 µg/ml ssDNA). Després s'introdueix 10⁶ cpm/ml de la sonda marcada i desnaturalitzada dins la bossa i es deixa de 14 a 48 hores en un bany amb agitació a la temperatura d'hibridació 42°C.

E. RENTATS.

1 - Elimineu com a residu radioactiu el líquid d'hibridació amb la sonda.

2 - Treieu els filtres de dins la bossa i col·loqueu-los dins d'una cubeta amb el líquid de rentat (2XSSC, 0,1% SDS). Es fan tres rentats de 10 minuts cadascun, amb aquesta mateixa solució, en un volum de 400 ml a t.a. Es manté en agitació.

3 - Es tornen a rentar els filtres amb la mateixa solució de rentat per aquest cop durant 30 min a 50°C.

4 - Es tornen a rentar els filtres amb la una nova solució de rentat més astringent (0,1XSSC, 0,1% SDS) durant 30 min més a 50°C.

5 - S'extenen els filtres de nylon sobre un suport rígid, i es posen a exposar amb films d'autoradiografia (films Kodak X-Omat AR) i amb pantalla intensificadora.

F. CRIVELLAMENTS.

En revelar els films exposats corresponents al 1^{er} crivellament, i després

de marcar els punts de tinta xina dels filtres en els films per possibilitar l'orientació amb les plaques, s'observaran tot un conjunt de senyals que coincideixen amb clapes de la llibreria que s'hauran hibridat amb la sonda, possibles clons amb un fragment del cDNA similar a la sonda utilitzada. Amb una pipeta Pasteur s'aïllaran les clapes i s'incubaran amb 1 ml SM i 50 μ l de CH_3Cl , per obtenir nou fag. Per aconseguir aïllar i assegurar-nos que hi ha complementarietat amb la nostra sonda cal fer un total de tres crivellatges (cada cop amb menys clapes per unitat de superfície), destriant i isolant finalment per separat cada una de les clapes positives.

4.1.3.10 Minipreparacions de fag. (Mètode LPB/PrK).

A partir de les clapes positives en la tercera etapa del crivellament, es necessari obtenir DNA dels fags per a poder-los caracteritzar. Entre les diverses opcions a seguir vàrem escollir el mètode LPB/PrK, que es realitza segons el següent protocol:

1 - Infecteu en un tub *ependorf* 100 μ l de cèl·lules LE-392 amb 10 μ l de cadascun dels diferents fags el·luïts en 1 ml de SM i incubeu-ho 15 minuts a 37°C.

3 - Afegiu el volum de cèl·lules infectades a un tub de vidre amb 4 ml de NZY-LB i deixeu-les de 13 a 16 hores a 37°C en agitació contínua a 250 r.p.m.

4 - Afegiu 20 μ l de Cl_3CH i manteniu-ho en agitació 15 minuts més a 37°C. Afegiu-li 4 μ l de DNasaI (10mg/ml) i 4 μ l de RNasaA (10mg/ml). S'incuba 30 minuts a 37°C.

5 - Es reparteixen els 4 ml en tres tubs i es centrifuguen 5 minuts en una microcentrífuga.

6 - Es reparteix el sobrenedant a 4 tubs nous (1 ml/tub) i s'afegeix a cada tub 240 μ l LPB fresc (2,5% SDS, 0,25M EDTA i 0,5M Tris-ClH pH 8,0) + 6 μ l Proteïnassa-K (10 mg/ml).

7 - Deixeu-ho 30 minuts a 65°C en agitació suau i afegiu-hi a cada tub 300 μ l d'acetat potàssic 8M. S'incuba 20 minuts més a 88°C.

8 - Es mantenen els tubs 10 minuts (o més) en gel.

9 - Centrifugueu 15 minuts a 4°C. El sobrenedant es traspassa a tubs nous i s'hi afegeixen 600 μ l d'isopropanol. Es remena per inversió i es deixa 15 minuts a t.a.

10- Centrifugueu-ho 30 minuts a t.a. i rebutgeu el sobrenedant. Després d'un pols de centrifuga s'extreuen les restes d'isopropanol.

11- Resuspeneu el precipitat en 100 μ l de TE pH 7,6 i deixeu-ho 10 minuts a 65°C.

12- Ajunteu les fraccions (4) en un sol tub i afegiu-hi 1 volum de fenol/ Cl_3CH remenant amb vòrtex. Centrifugueu 5 minuts a una microcentrífuga.

13- La fase aquosa superior es posa en un tub nou i s'afegeix 1 volum de Cl_3CH /isoamílic(24/1). S'agita amb vòrtex i es centrifuga 5 minuts.

14- Es traspassa la fase superior a un tub nou i s'hi afegeix 40 μ l d'acetat sòdic 3M pH 5,2 + 800 μ l etanol absolut. Deixeu 30 minuts a -70°C (o més de 2 hores a -20°C).

15- Centrifugueu 30 minuts a t.a. i rebutgeu el sobrenedant.

16- Es renta el precipitat amb etanol 70% i es centrifuga 5 minuts. Es rebutja de nou el sobrenedant i s'asseca el precipitat a la bomba de buit.

17- Resuspeneu el precipitat amb 25 μ l de TE pH 7,6 i deixeu-lo 10 minuts a 65°C (el DNA resuspès es pot guardar a 4°C).

4.1.3.11 Subclonació dels fragments de PCR o del DNA del fag per lligació a vector bacterià.

Els productes de la PCR obtinguts varen ser subclonats en un vector plasmídic recombinant liniaritzat i manipulat anomenat pCRII™, que forma part del kit de subclonació comercial anomenat *TA cloning* (Invitrogen). El vector pCRII™ presenta en els extrems 3' unes timidines protuents que es complementen amb les adenines que durant el període d'elongació de la PCR l'enzim Taq-polimerasa afegeix als extrems 3' dels productes de l'amplificació. Això, permet la recircularització del vector + insert (pCRII™ + producte de la PCR) mitjançant una lligació d'extrems protuents complementaris gràcies a una reacció vehiculada per la T₄-lligassa.

L'insert de cDNA més llarg dels fags clonats, alliberat per digestió amb EcoRI del producte d'una preparació de DNA de fag, i purificat per electroforesi en un gel horitzontal d'agarosa, va ser subclonat en el vector plasmídic BlueScript SK⁺, també digerit amb EcoRI i defosforilat per evitar la seva recircularització.

Al fer la unió de vector i insert cal tenir en compte les següents consideracions:

1. La lligació es realitza afegint: Insert + Plasmidi + Tampó de lligació X10 + T4 DNA ligasa (Boehringer-Mannheim) + H₂O. En una lligació cal valorar quatre paràmetres:

- a. La relació plasmidi vector/DNA insert cal que sigui aproximadament equimolar.
- b. La concentració total de DNA en la reacció de lligació ha de ser al voltant de 10 ng de DNA total/ μ l de reacció.
- c. El volum final idoni és de 10 μ l.

d. La relació enzim/DNA és de 0,5-2 unitats de T4 DNA ligasa per 5 pmols de DNA.

2. Per a dur a terme la lligació s'incuba el tub a 14°C, durant tota la nit.

Els vectors així recircularitzats poden transformar bacteris, que a través del seu creixement amplificaran la quantitat del DNA obtingut vector + insert.

4.1.3.12 Transformació bacteriana per electroporació.

Per tal d'obtenir grans quantitats d'una seqüència nucleotídica, la lligació del fragment de DNA amb un vector plasmídic recombinant, i la posterior inclusió d'aquest conjunt dins d'una bactèria (transformació bacteriana), és una de les tècniques més eficients. Per a transformar bacteries amb els vectors plasmídics + inserts, tant pel que fa al pCRIITM + producte de la PCR, com a la subclonació final de la clona de CDw50 obtinguda en el crivellament de la genoteca, vàrem emprar el següent protocol d'electroporació:

Dia 1- Feu créixer una colònia bacteriana (soca d'E. Coli, DH5 α) en 5 ml de LB (37°C, agitació, tota la nit).

Dia 2- Expandiu el resultat del creixement dels 5ml en 100 ml de LB. Prepareu dos flascons a 37°C en agitació, aproximadament unes 3 hores.

1 - Controleu el creixement fins arribar a una densitat òptica de 0,5-0,7 (OD₆₀₀). *La concentració és important pel rendiment de la transformació.*

2 - Coloqueu les bacteries en aigua + gel durant 10-15 min i transferiu-les a 4 tubs de 50 ml estèrils pre-refredats.

3 - Centrifugueu-les 20 min a 2500 rpm en Centrifuga IEC Centra a 4°C.

4 - Decanteu el sobrenedant i resuspeneu cada tub amb 0,5 ml d'aigua

bidestil·lada molt freda (2-4°C).

5 - Afegiu 50 ml d'aigua molt freda a cada tub. Barrejeu-ho bé voltant el tub varis cops (3-4).

6 - Centrifugueu-ho 20 min a 2500 rpm a 2°C. Decanteu el sobrenedant. Resuspeneu en 0,5 ml de agua + 10% glicerol, reomplint-ho després amb 50 ml. Centrifugueu 20 min a 2500 rpm a 2°C.

7 - Poseu a refredar mentre tant les cubetes i els tubs *ependorf*, i prepareu l'electroporador.

8 - Decanteu el sobrenedant i resuspeneu suaument amb vòrtex.

9 - Recolliu 200 μ l de la suspensió i passeu-los a tubs *ependorf* prèviament refredats en gel.

10 - Centrifugueu-los a 4000 rpm a 2°C durant 2-3 min.

11 - Descarteu el sobrenedant (retireu 110 μ l). Cal que quedi un sediment de 90 μ l.

12 - Poseu l'aparell d'electroporació a 1,8 KV, 25 μ F. Poseu el controlador de pulsació a 200-400 ohm.

13 - Afegiu 0,1, 10 i 100 ng de plàsmid a transformar en 1 μ l en cada un dels tubs anteriors (bacteris competents).

14 - Barregeu donant lleugers cops. En menys de mig minut transferiu la mescla de bacteris/DNA a una cubeta prèviament refredada, poseu-la a la càmera i doneu el pols elèctric.

15 - Cal treure la cubeta de la càmera i afegir 1 ml de SOC, ràpidament.

16 - Transferiu-ho a un tub de 2 ml i incubeu les bactèries transformades 60 min en rotació lenta a 37°C.

18 - Si es volen fer dilucions, cal preparar tubs *ependorf* amb 1 ml de LB per a fer-les (1/100, 1/10.000)

19 - Sembreu les bactèries en plaques de cultiu amb medi selectiu segons el vector (Ampicilina). Incubeu a 37°C T/N.

Una vegada introduït el plasmidi dins la bactèria, s'ha d'obtenir el DNA plasmídic per a analitzar si conté l'insert i, en cas afirmatiu, caracteritzar-lo.

4.1.3.13 Preparació de DNA plasmídic.

Per tal d'obtenir DNA plasmídic per emprar-lo com a sonda o per seqüenciar-lo, vàrem utilitzar el següent protocol basat en la preparació a petita escala (minipreparació) de DNA plasmídic procedent d'una única colònia:

1 - Creixeu un minicultiu [4 ml de medi LB suplementat amb ampicilina o l'antibiòtic corresponent (50 µg/ml)] de cadascuna de les diferents colònies a analitzar.

2 - Incubeu a 37°C durant 12-16 hores amb agitació (A partir del cultiu crescut cal guardar un *stock* representatiu del cultiu per poder obtenir més plasmidi sempre que es vulgui: En un tub de 2 ml de rosca s'afegeixen: 800µl de cultiu + 200µl de glicerol. Després de barrejar fent vòrtex, es guarda a -20°C. Per recuperar el cultiu, s'inocula un minicultiu amb una nansa o pipeta a partir del *stock* congelat. El *stock* cal anar-lo renovant periòdicament ja que les bactèries congelades perden viabilitat).

3 - Centrifugueu en un tub *ependorf* 1,5 ml del cultiu, durant 1 minut i 30 segons en microfuga.

4 - Decanteu el sobrenedant.

5 - Amb el vòrtex es desenganxa el precipitat per facilitar la resuspensió posterior.

6 - Es resuspèn el precipitat amb 0,25 ml de solució A afegint en el mateix moment de la utilització 2mg/ml de lisozima (Solució A: 50mM Tris HCl

pH 8,0 + 50mM EDTA pH 8,0 + 15% sucrosa). Incubeu-ho 10 minuts a t.a.

7 - Afegiu-hi 0,25 ml de solució B + 2 μ l de DEPC (25% DEPC en etanol absolut) (Solució B: 50mM Tris HCl pH 8,0 + 50mM EDTA pH 8,0 + 0,1% Tritó-X100).

8 - Agiteu-ho suaument per inversió i deixeu-ho 20 minuts a 70°C.

9 - Manteniu-ho 30 minuts o més en gel.

9 - Centrifugueu durant 15-20 minuts a 4°C a una microcentrífuga.

10- Es treu el moc bacterià format amb un escuradents estèril (en aquest punt es pot carregar de 5 a 10 μ l de sobrenedant en un gel d'agarosa per determinar si s'ha clonat l'insert).

11- Afegiu 2 volums d'etanol absolut a t. a. (Si estigués fred, la sucrosa precipitaria).

12 - Centrifugueu-ho 15 minuts a t.a., descartant el sobrenedant.

13 - Renteu el precipitat amb etanol al 70%. Es descarta el sobrenedant, se n'extreuen les restes i s'asseca el precipitat a la bomba de buit.

14 - El precipitat es resuspèn en 50 μ l de TE pH 7,6 i es deixa 10 minuts a 65°C, amb 1 μ l de RNAssaA (10 μ g/ml).

4.1.3.14 Seqüenciació nucleotídica.

Un vegada que els plàsmids amb els inserts han estat crescuts, és possible la determinació de les seqüències nucleotídiques d'aquests inserts, a partir de les seqüències de les zones adjacents al punt de subclonació del vector, que s'empren com a encebadors de seqüenciació doncs evidentment són conegudes (zones anomenades T3, T7 o SP6). Cal escollir correctament els encebadors de seqüenciació que s'utilitzaran segons la zona de l'insert que

es vol seqüenciar. Així mitjançant el mètode de dideoxi de Sanger va ser possible determinar la seqüència del fragment amplificat i la clona de CDw50 obtinguda a partir de la llibreria de cDNA. Es va seguir el següent protocol:

1 - A partir del producte d'una minipreparació plasmídica (2-10 μg de DNA), augmenteu el seu volum fins a 100 μl amb TE i adicioneu-hi un volum de fenol/ Cl_3CH . S'agita amb vòrtex i es centrifuga 5 minuts.

2 - Traspasseu la fase superior a un tub nou i afegiu-hi un volum de Cl_3CH /isoamílic (24/1). S'agita per vòrtex i es centrifuga 5 minuts.

3 - Passeu el sobrenedant a tub nou i precipiteu-lo, afegint-hi: 10 μl d'acetat sòdic 3M pH 5,2 + 200 μl d'etanol absolut

4 - Es deixa 30 minuts a -70°C (o més de 2 hores a -20°C) i es centrifuga 20 minuts a t.a.

5 - Feu un rentat amb etanol al 70%, extreient el sobrenedant. Després de donar un cop de centrífuga, es treuen les restes de líquid i s'asseca a la bomba de buit.

6 - El precipitat es resuspèn en 10 μl d'una solució formada per NaOH 0,4M + EDTA 2mM.

7 - Feu un cop de centrífuga, agiteu amb vòrtex i de nou feu un cop de centrífuga.

8 - Deixeu-ho 10 minuts a t.a. i precipiteu-ho amb 5 μl d'acetat sòdic 1M. pH 4,5 + 40 μl d'etanol absolut (depositeu les sals en la paret del tub per a que l'etanol les arrossegui i així la precipitació del DNA és immediata, evitant la possible renaturalització del DNA pel pH). Deixeu-ho 30 min més a -70°C (o més de 2 hores a -20°C), i centrifugueu-ho 20 minuts.

9 - Renteu el precipitat amb etanol al 70%, extreient el sobrenedant i assecant-ho a la bomba de buit.

10- Resuspeneu-ho 7 μ l de la solució A de seqüència [1 μ l tampó d'anellament (Pharmacia) + 5 μ l H₂O + 1 μ l encebador].

11- Feu un cop de centrífuga, i agiteu-ho amb vòrtex. Després torneu a fer un cop de centrífuga de nou i incubeu 10 minuts a 65°C.

12- Incubeu-lo seguidament 20 minuts a 37°C.

13- Després es pot deixar més de 10 minuts a t.a.

14- Tot seguit s'afegeixen 3 μ l de la solució B de seqüència [1 μ l amb 1,5 unitats de T7 DNA polimerasa més tampó de dilució (Pharmacia) + 0,75 μ l H₂O + 1 μ l barreja de marcatge-dATP (Pharmacia) + 0,25 μ l ³⁵S-dATP (1000 Ci/mmol, 10 mCi/ml)].

15- Incubeu-ho 1 minut a t.a. i després passeu-ho a gel.

16- Repartiu el volum de cada reacció en 4 tubs (2,25 μ l/tub) on prèviament hom ha posat 1,25 μ l de ddA, ddT, ddC i ddG respectivament (Es pot utilitzar la barreja de dideoxinucleòtids corresponent a la Read Short mix o a la Read Long mix, segons si es vol una lectura curta o llarga de bases).

17- Feu un cop de centrífuga i incubeu-ho de 10-15 minuts a 37°C.

18- Atureu la reacció amb 2,5 μ l de solució *STOP* (Pharmacia).

19- Escalfeu-ho a 75°C durant 3-5 minuts (aquí es pot guardar els tubs a -70°C).

20- Carregueu les reaccions en un gel en gradient del 6% poliacrilamida-7,5M urea, que com a mínim s'haurà polimeritzat durant 2 h i precorregut de 15-30 min més a 60 W de potència.

21- Correu el gel durant aproximadament 2 hores 30 minuts a 60 W de potència.

22- Treieu el gel sobre un paper Watman 3 MM i deixeu-lo assecar en un secador de gel durant 2 hores a 80°C i amb buit.

23- Autorradiografie-u-lo.

4.1.3.15 . Northern i Southern blot. Hibridacions de les membranes.

Per l'anàlisi de l'expressió del CDw50, s'hibridaren amb la clona de CDw50 marcada radioactivament, pel mètode de *random priming*, vàries membranes de Nylon amb 10 µg de RNA per carril extrets de diverses línies limfoblastoides (extracció segons el mètode de Chirgwin) transferides, a partir d'un gel d'electroforesi en agarosa al 1%, per *Northern blotting*.

Per l'anàlisi gènic, s'hibridaren amb la clona de CDw50 marcada radioactivament, pel mètode de *random priming*, vàries membranes també de Nylon, amb 10 µg de DNA digerit amb diversos enzims de restricció, transferides, a partir d'un gel d'electroforesi en agarosa al 0,8%, per *Southern blotting*.

Les dues tècniques són de transferència passiva per capilaritat, i són molt similars en la realització. La única diferència resideix en el tractament previ del gel d'electroforesi, en el cas del *Southern blot*, amb HCl 0,25 M, per tal de fragmentar els fragments de DNA més grans i permetre que es transfereixin.

A. TRANSFERÈNCIA PASSIVA.

En una cubeta es monta un sistema de *sandwich* que permeti el pas de líquid (20XSSC) en direcció ascendent, arrastrant-hi per capilaritat (a dalt es situa un absorbent) la mostra des del gel (part inferior) a la membrana de nylon (part superior). Es deixa tota la nit transferint-lo.

B. PREHIBRIDACIÓ DE LES MEMBRANES.

La prehibridació de les membranes de Nylon es realitza introduint els filtres dins d'una bossa amb el líquid de prehibridació (5XSSC + 1% SDS +

1xDenhart's + 50% Formamida + 100 µg/ml ssDNA) i mantenint-ho a la temperatura de 42°C, 2 hores (o tota una nit).

C. HIBRIDACIÓ DE LES MEMBRANES.

A la hibridació es buida el líquid de prehibridació de la bossa i es substitueix pel líquid d'hibridació (5XSSC + 1% SDS + 1xDenhart's + 50% Formamida + 10% Dextrà sulfat + 100 µg/ml ssDNA). Després s'introdueix $0,5-1 \times 10^6$ cpm/ml de la sonda marcada desnaturalitzada dins la bossa i es deixa de 14 a 48 hores en un bany amb agitació a la temperatura d'hibridació, 42°C.

D. RENTATS.

- 1 - Elimineu com a residu radioactiu el líquid d'hibridació amb la sonda.
- 2 - Treieu els filtres de dins la bossa i col·loqueu-los dins d'una cubeta amb el líquid de rentat (2XSSC, 0,1% SDS). Es fan tres rentats de 10 minuts cadascun, amb aquesta solució en un volum de 400 ml a t.a. Es manté en agitació.
- 3 - Es tornen a rentar els filtres amb la mateixa solució de rentat per aquest cop durant 30 min a 55°C.
- 4 - Es tornen a rentar els filtres amb la una nova solució de rentat més astringent (0,1XSSC, 0,1% SDS) durant 30 min més a 55°C.
- 5 - S'extenen els filtres de nylon sobre un suport, i es posen a exposar amb films d'autoradiografia (films Kodak X-Omat AR) i amb pantalla intensificadora.

4.1.4.- RESULTATS.

4.1.4.1. Anàlisi de les condicions d'elució i rentat per a la purificació del CDw50.

El marcatge cel·lular de superfície amb I^{125} i metabòlic amb S^{35} , va mostrar que els AcMos anti-CDw50, eren capaços de co-immunoprecipitar, junt a la molècula de 120-130 kD que corresponia al CDw50 de membrana, vàries molècules citoplàsmiques (que es poden marcar amb S^{35} , però no amb I^{125}) (Figura 1). L'estudi de les condicions de rentat i l'elució que permetessin la posterior purificació de la molècula del CDw50 per cromatografia d'afinitat, definiren una condició de 1 M $MgCl_2$ per al rentat de la columna i de 4 M $MgCl_2$ per a l'elució de la mostra.

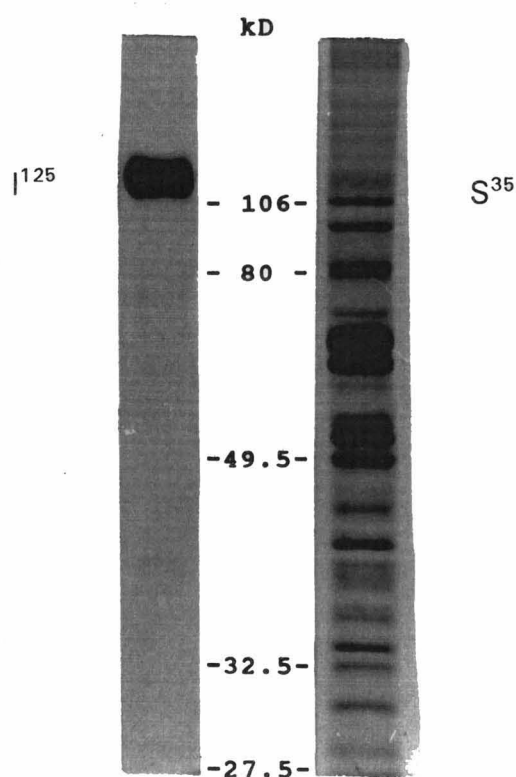
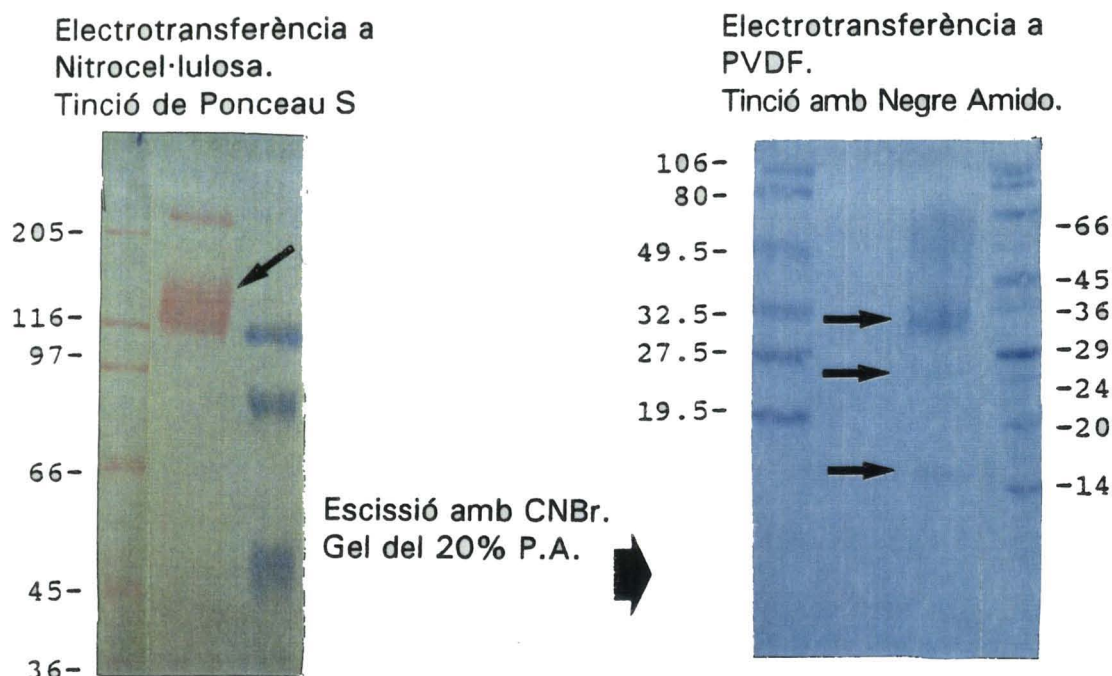


Figura 1. Immunoprecipitacions amb 101-1D2 de lisats de cèl·lules Jurkat marcats amb I^{125} i S^{35} , respectivament.

4.1.4.2. Purificació del CDw50 i microseqüenciació proteica.

El procés de purificació, escissió específica amb CNBr i microseqüenciació peptídica (resumit a la figura 2) segons el mètode detallat al material i mètodes (4.1.3.6. Purificació i microseqüenciació dels pèptids de CDw50 produïts per escissió específica amb CNBr) va permetre l'obtenció de



MICROSEQÜENCIACIÓ DELS PÈPTIDS DE 30 kD (PÈPTID 1), 15,5 kD (PÈPTID 2) i 25 kD (PÈPTID 3).

Figura 2. Procés de purificació i escissió amb CNBr del CDw50.

les següents seqüències parcials:

PÈPTID 1: A G A T/R V Q V T L D G V P A A A P G Q P A Q L N A T

PÈPTID 2: Q P Q G L G L F V N T S A P R Q L R T F V

PÈPTID 3: N X G D T L T A T A T A T A X A X Q E G A R E I V

L'anàlisi per ordinador de les seqüències per comparació amb una base de seqüències proteòmiques (Swissprot), va determinar que la màxima homologia

per als tres pèptids es presentava amb l'ICAM-1:

PÈPTID 2: 75% homologia amb zona intermèdia del domini 2 i 3 de l'ICAM-1

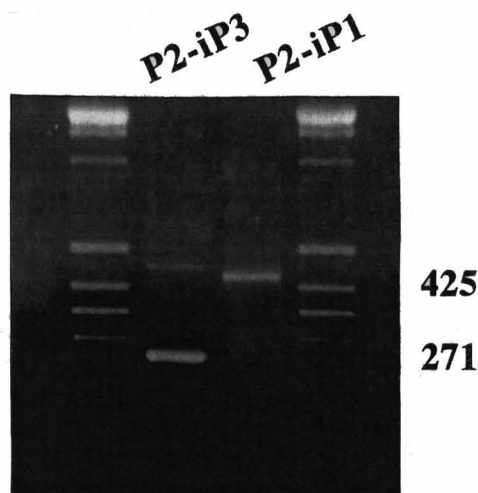
PÈPTID 3: 35% d'homologia amb el domini 3 de l'ICAM-1.

PÈPTID 1: 50% d'homologia amb el domini 3 de l'ICAM-1.

4.1.4.3. Amplificació del cDNA a partir d'oligonucleòtids d'elecció (*guessmers*).

Seguint les seqüències obtingudes i obviant les degeneracions del codi genètic emprant el *codon usage* es dissenyaren varis oligonucleòtids d'elecció, també anomenats *guessmers*. Partint d'un cDNA de Jurkat, només la PCR amb tres d'ells (dels més de 10 oligonucleòtids sintetitzats) ens permeteren obtenir fragments d'amplificació clars, els anomenats P2 (procedent del pèptid 2), iP1 (procedent del pèptid 1, però dissenyat segons la seqüència complementària) i iP3 (procedent del pèptid 3, però dissenyat segons la seqüència complementària). Així s'amplificaren dos fragments de cDNA de 271 bp i de 425 bp, els quals definien les seqüències de les regions nucleotídiques situades entre el pèptid 2 i el pèptid 3, i entre el pèptid 2 i el pèptid 1, respectivament (Figura 3).

Figura 3. Amplificació del cDNA de Jurkat a partir dels *guessmers* indicats de dos fragments del cDNA de CDw50.



L'anàlisi de les seqüències obtingudes ens va permetre assegurar que el pèptid 3 es trobava entre els pèptids 2 i 3, en consonància amb l'estructura prevista per l'homologia amb l'ICAM-3 (Figura 4).

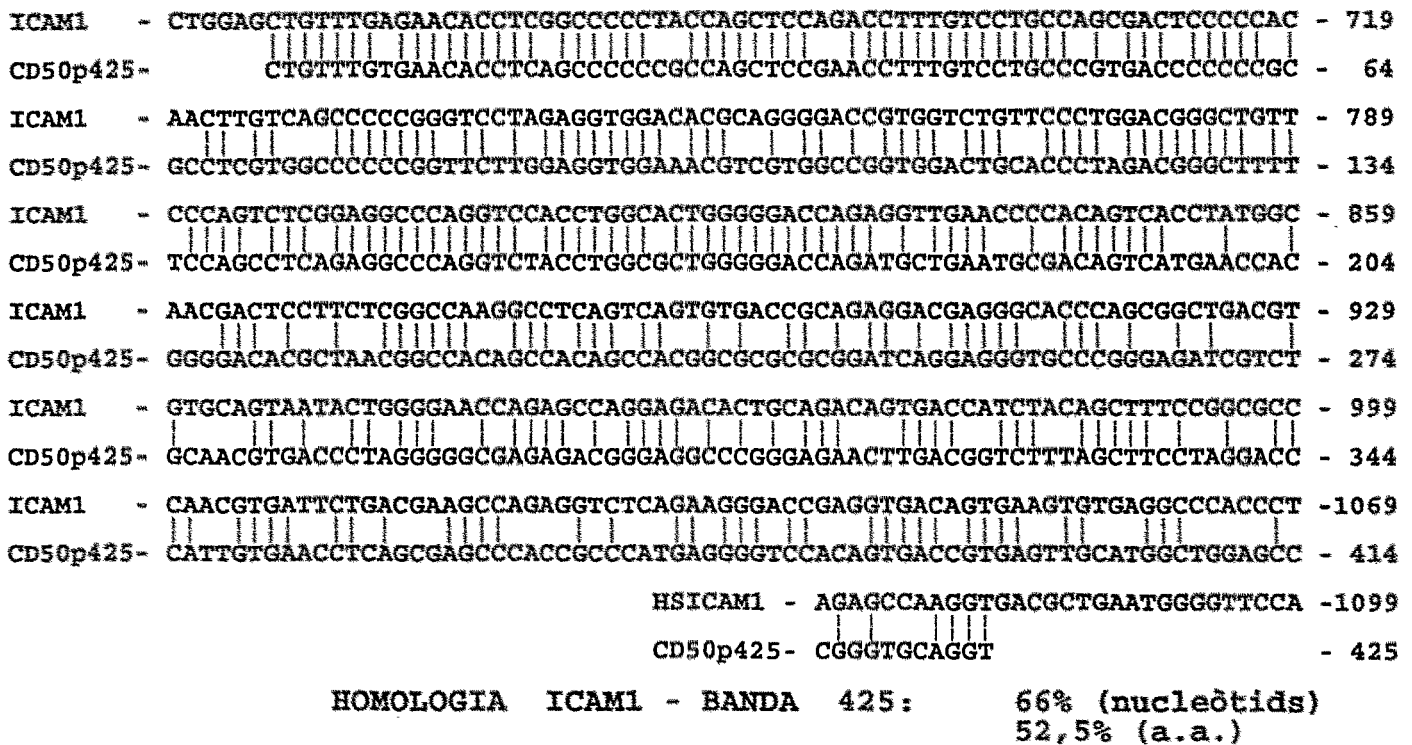


Figura 4. Homologia entre la seqüència del fragment de 425 bp i una zona entre els dominis 2 i 4 de l'ICAM-1.

4.1.4.4. Clonació del cDNA del CDw50, mapa de restricció i seqüència.

Utilitzant el fragment de 425 bp com a sonda per al crivellament d'una llibreria de cDNA en fag λ gt10, s'obtingué una clona de 1'7 kb amb el següent mapa de restricció:

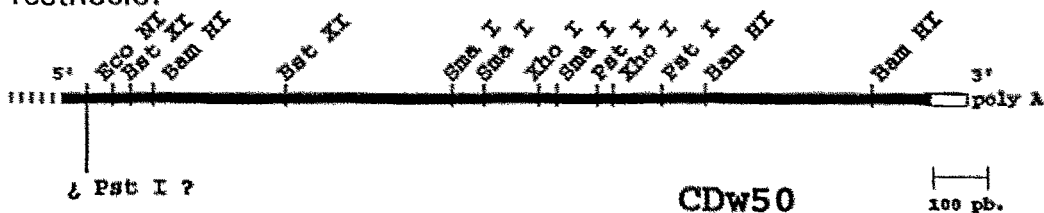


Figura 5. Esquema del mapa de restricció bàsic del CDw50.

La seqüenciació de la clona desvelà la següent seqüència nucleotídica:

```

GCCTGCTGGACTCTGCTGGTCTGCTGTCTGCTGACCCCAGGTGTCCAGGGG | DOMINI 1 CAGGAGTTCCTTTGCGGGTG 72
A C W T L L V C C L L T P G V Q G Q | Q E F L L R V 24
GAGCCCCAGAACCTGTGCTCTCTGCTGGAGGGTCCCTGTTTGTGAACTGCGGTACTGATTGTCCCAGCTCT 144
E P Q N P V L S A G G S L F V N C G T D C P S S 48
GAGAAATCGCCTTGGAGACGTCCCTATCAAAGGAGCTGGTGGCCAGTGGCATGGGCTGGGCAGCCTTCAAT 216
E K I A L E T S L S K E L V A S G M G W A A F N 72
CTCAGCAACGTGACTGGCAACAGTCCGATCCTCTGCTCAGTGTACTGCAATGGCTCTCAGATAACAGGCTCC 288
L S N V T G N S R I L C S V Y C N G S Q I T G S 96
TCTAACATCACCGTGTACAGGCTCCCGGAGCGT | DOMINI 2 GTGGAGCTGGCACCCCTGCCTCCTTGGCAGCCGGTGGGC 360
S N I T V Y R L P E R V E L A P L P P W Q P V G 120
CAGAACTCACCCCTGCGCTGCCAAGTGGAGGATGGGTGCGCCCCGACCAGCCTCACGGTGGTGTGCTTCCGC 432
Q N F T L R C Q V E D G S P R T S L T V V L L R 144
TGGGAGGAGGAGCTGAGCCGGCAGCCCGCAGTGGAGGAGCCAGCGGAGGTCAGTCCACTGTGCTGGCCAGC 504
W E E E L S R Q P A V E E P A E V T A T V L A S 168
AGAGACGACCACGGAGCCCTTTCTCATGCCGCACAGAAGTGGACATGCAGCCCCAGGGGCTGGGACTGTTT 576
R D D H G A P F S C R T E L D M Q P Q G L G L F 192
GTGAACACCTCAGCCCCCGCAGCTCCGAACCTTT | DOMINI 3 GTCCTGCCGTGACCCCCCGCCTCGTGGCCCCC 648
V N T S A P R Q L R T F V L P V T P P R L V A P 216
CGGTTCTTGGAGGTGAAACGTCGTGGCCGGTGGACTGCACCCTAGACGGGCTTTTTCCAGCCTCAGAGGCC 720
R F L E V E T S W P V D C T L D G L F P A S E A 240
CAGGTCTACCTGGCGCTGGGGGACCAGATGCTGAATGCGACAGTCATGAACCACGGGGACACGCTAACGGCC 792
Q V Y L A L G D Q M L N A T V M N H G D T L T A 264
ACAGCCACAGCCACGGCGCGCGGGATCAGGAGGTGCCCGGGAGATCGTCTGCAACGTGACCTAGGGGGC 864
T A T A T A R A D Q E G A R E I V C N V T L G G 288
GAGAGACGGGAGGCCCGGGAAGTACCGTCTTTAGCTTC | DOMINI 4 CTAGGACCCATTGTGAACCTCAGCGAGCCC 936
E R R E A R E N L T V F S F L G P I V N L S E P 312
ACCGCCATGAGGGGTCCACAGTGACCGTGAAGTTCATGGCTGGGGCTCGAGTCCAGGTACGCTGGACGGA 1008
T A H E G S T V T V S C M A G A R V Q V T L D G 336
GTTCCGGCCCGCGGCCCGGGGAGCCAGCTCAACTCAGCTAAATGCTACCGAGAGTGACGACGGACGCAGC 1080
V P A A A P G Q P A Q L Q L N A T E S D D G R S 360
TTCTTCTGAGTGCCTCTCGAGGTGGACGGCGAGTCTTTCACAGGAACAGTATCGTCCAGCTGCGAGTC 1152
F F C S A T L E V D G E F L H R N S I V Q L R V 384
CTGTATGGTCCCAAAATTGACCGAGCCACATGCCCCAGCACTTGAAATGGAAAGATAAA | DOMINI 5 ACGAGACACGTC1124
L Y G P K I D R A T C P Q H L K W K D K T R H V 408
CTGCAGTGCCAAGCCAGGGGCAACCCGTACCCCGAGCTGCGGTGTTTGAAGGAAGGCTCCAGCCGGGAGGTG 1296
L Q C Q A R G N P Y P E L R C L K E G S S R E V 432
CCGGTGGGGATCCCGTCTTCGTCAACGTAACACATAATGGTACTTATCAGTGCCAAGCGTCCAGCTCACGA 1368
P V G I P F F V N V T H N G T Y Q C O A S S R 456
GGCAAATACACCCTGGTCTGTTGATGGACATTGAGGCTGGGAGCTCCAC | TRANSMBRANA TTGTCCCGTCTTCGTGGCG1440
G K Y T L V V V M D I E A G S S H F V P V F V A 480
GTGTTACTGACCTTGGGCGTGGTACTATCGTACTGGCCTTAATGTACGTCTTC | CITOPLASNATIC AGGGAGACCAACGGAGC1512
V L L T L G V V T I V L A L M Y V F R E H Q R S 504
GGCAGTTACCATGTTAGGGAGGAGACACCTATCTGCCCTCACGTCTATGCAGCCGACAGAAGCAATGGGG 1584
G S Y H V R E E S T Y L P L T S M Q P T E A M G 528
GAAGAACCGTCCAGAGCTGAGTGACGCTGGGATCCGGATCAAAGTTGGCGGGGCTTGGCTGTGCCCTCAG 1656
E E P S R A E - 535
ATTCCGCACCAATAAAGCCTTCAAACCTCCCTAAAAA 1717

```

Figura 6. Seqüència nucleotídica del CDw50.

Aquesta seqüència coincidí, amb només 6 nucleòtids diferents amb la de la molècula d'adhesió ICAM-3, recentment clonada per tres grups simultàniament [7, 8, 9]. Aquesta dada havia estat ja confirmada per mètodes bioquímics i cel·lulars en l'estudi comparatiu dels AcMos anti-ICAM-3 i anti-CDw50, que constitueix el capítol II de resultats d'aquesta tesi. Respecte a la seqüència publicada de l'ICAM-3 només els 6 nucleòtids esmentats eren diferents (un d'ells generava un patró de restricció amb PstI diferent, al perdre's el punt de tall), la qual cosa podia generar 4 diferències aminoacídiques (2 nucleòtids suposaven variacions silents).

La seqüència nucleotídica per sí sola, desvela que ens trobem davant d'una molècula transmembrana de tipus I (extrem N-terminal extracitoplàsmic i un únic pas a través de la membrana) amb cinc dominis de la IgSF, i una alta homologia amb l'ICAM-1 (53,6% a nivell de nucleòtids, 45,4% a nivell d'a.a.). L'homologia dels dos dominis més externs amb l'ICAM-2 és menor (30,5% a nivell de nucleòtids, 28,8% a nivell d'a.a.) que amb l'ICAM-1. L'homologia entre els dominis es representa a la figura 7.

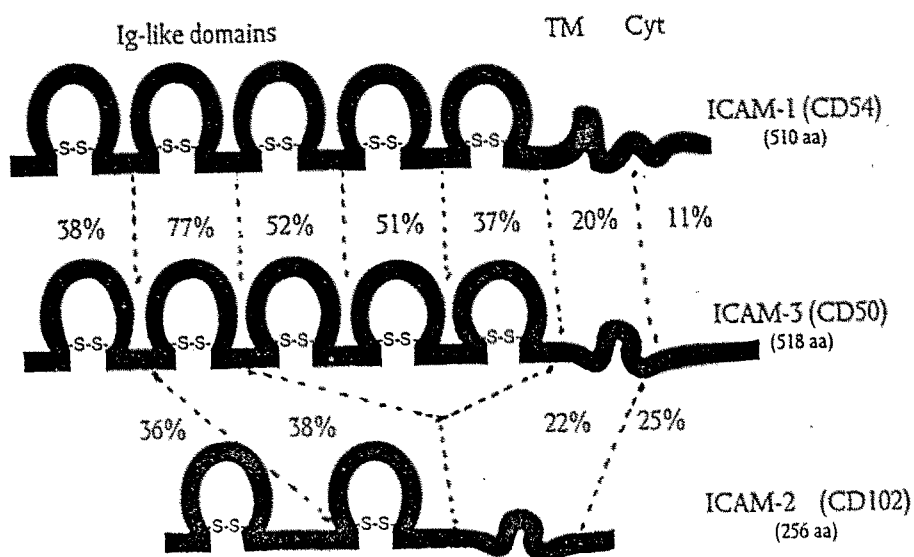


Figura 7. Homologia entre els diferents dominis del CD50, l'ICAM-1 i l'ICAM-2.

La seqüència dels dominis extracitoplàsmics va revelar 13 punts de possible N-glicosilació (sub-raiats a la figura 6), que poden explicar l'alt grau de glicosilació de la molècula *in vivo*, i 12 cisteïnes que formant ponts disulfur entre elles podien estabilitzar el plegament immunoglobulínic dels cinc dominis. És de destacar la baixa homologia de la zona citoplàsmica respecte a les zones citoplàsmiques de l'ICAM-1 i l'ICAM-2, que com a característica destacable conté cinc serines que poden esdevenir fosforilables (encara que només es va detectar, per anàlisi informàtica, un motiu consensu de fosforilació a la darrera serina, per a la Caseïn-kinasa II).

4.1.4.5. Anàlisi genètica per Southern blot i estudi de l'expressió del mRNA en línies cel·lulars per Northern blot del CDw50.

Els Southern blots hibridats amb el cDNA del CDw50 suggereixen l'existència d'un sol gen, al detectar-se una única banda en les digestions amb diverses endonucleases de restricció (XbaI, Hind III, ...).

La hibridització dels Northern blots demostren l'existència d'un transcrit de 1,7 kb, amb nivells d'intensitat de senyal que es correlacionen amb la intensitat relativa d'expressió en membrana del CDw50 en aquestes línies cel·lulars.

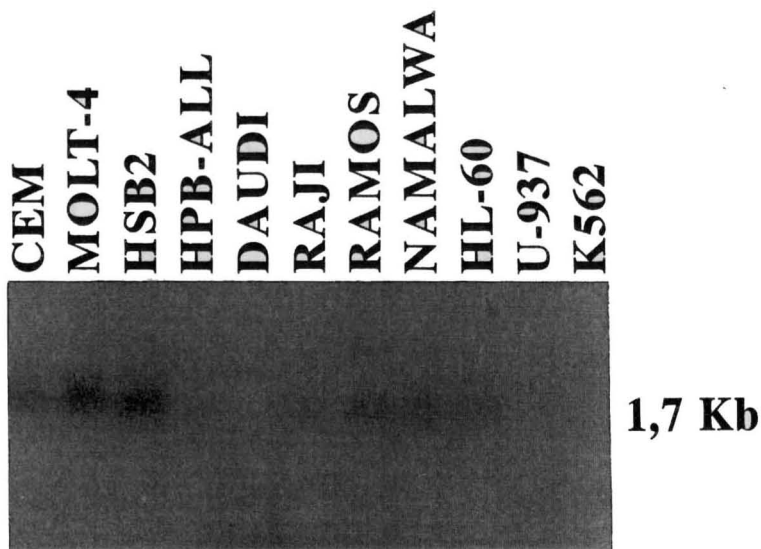


Figura 8. Northern blot de línies cel·lulars.

4.1.5.- DISCUSSIÓ.

Els resultats demostren l'èxit de l'estratègia de clonació del c-DNA, a partir de les seqüències de CDw50 obtingudes per microseqüenciació de fragments peptídics sobre PVDF. La caracterització de la molècula permet afirmar que ens trobem davant d'una glicoproteïna de membrana tipus I (extrem N-terminal extracitoplàsmic i un únic pas a través de la membrana) amb cinc dominis pertanyents a la IgSF. Els plegaments immunoglobulínics dels cinc dominis es poden estabilitzar mercès a les 12 cisteïnes detectades. L'alta homologia amb els membres de la família ICAM de molècules d'adhesió i la seva identitat amb el cDNA de l'ICAM-3, clonat gairebé simultàniament per altres tres grups [7,8,9], fa que puguem afirmar que ens trobem davant d'una molècula d'adhesió amb característiques estructurals molt interessants. Entre elles cal destacar el domini citoplàsmic (37 a.a.) lleugerament més llarg que els d'ICAM-1 (27 a.a.) i ICAM-2 (27 a.a.), i que és la zona menys homòloga entre els ICAMs. Això fàcilment fa sospitar una distinta funció citoplàsmica per al CDw50, en la que podria jugar un paper important regulador la fosforilació per estimulació de la PKC, que ja havia estat descrita prèviament [10]. De fet el CDw50 presenta cinc residus serínics (dels quals l'últim presenta el domini consensus de fosforilació per la Caseïn-kinasa II), residus que no es troben tampoc en cap dels altres ICAMs. Amb la identitat descrita amb l'ICAM-3, comprovada en el posterior treball dels resultats (Capítol II), el CDw50 esdevé una molècula clau en les interaccions limfocitàries que es produeixen en les primeres fases de la resposta immunitària. La seva interacció amb el LFA-1 explica gran part dels processos previament descrits [11, 12] a on l'ICAM-1 i l'ICAM-2 no eren suficients per definir els contactes vehiculitzats pel LFA-1. Així, de la conjunció de totes les dades procedents de

l'ICAM-3 i del propi CDw50, s'obre una visió molt més clara i precisa de la funció d'aquesta nova molècula d'adhesió.

4.1.6.- BIBLIOGRAFIA.

- 1 - Hadam M.R. (1989) *In*: Knapp W., Dörken B., Gilks W.R., Rieber E.P., Schimdt R.E., Stein H. and von dem Borne A.E.G.Kr., eds. *Leucocyte Typing IV*. Oxford: Oxford University Press : 667-670.
- 2 - Vilella, R., J. Mila, F. Lozano, J. Alberola-Illa, L. Places, and J. Vives (1990). *Tissue Antigens* 36:203-210.
- 3 - Barclay, A.N., M.L. Birkeland, M.H. Brown, A.D. Beyers, S.J. Davis, C. Somoza, and A.F. Williams (1993). *In FactsBook Series*. Academic Press, London.
- 4 - Ausubel , F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, and K. Struuhl. 1994. *In Current Protocol in Molecular Biology*. Wiley Interscience. Vol. 2. Taula A.1.4.
- 5 - Edman, P., and G. Bergg (1967). *Eur. J. Biochem.* 1:80-91.
- 6 - Benton, W.D., and R.W. Davis. 1987. *Science.* 196:180.
- 7 - Fawcett J., C.L.L. Holness, L.A. Needham, H. Turley, K.C. Gatter, D.Y. Mason, and D.L.Simmons. 1992. *Nature* 360:481.
- 8 - Vazeux R., P.A. Hoffman, J.K. Tomita, E.S. Dickinson, R.L. Jasman, T. St. John, and W.M. Gallatin. 1992. *Nature* 360:485.
- 9 - de Fougerolles A.R., L.B. Klickstein, and T.A. Springer. 1993. *J. Exp. Med.* 177:1187.
- 10 - Lozano F., J. Alberola-Illa, L. Places, and J. Vives. 1992. *Eur. J. Biochem.* 203:321-326.

- 11 - de Fougerolles, A.R., S.A. Stacker, R. Schwarting, and T.A. Springer. 1991. *J. Exp. Med.* 174(1):253-267.
- 12 - de Fougerolles A.R., and T.A. Springer. 1992. *J. Exp. Med.* 175(1):185-190.

CAPÍTOL II

4.2.- CDw50 I ICAM-3: DOS NOMS PER A UNA MATEIXA MOLÈCULA.

4.2.1.- RESUM.

Paral·lelament als treballs de clonació del gen del CDw50, i partint de l'homologia detectada per a les seqüències peptídiques parcials dels fragments generats amb CNBr, respecte a la seqüència total proteica de l'ICAM-1, vàrem realitzar els treballs que s'exposen en aquest capítol de resultats. L'homologia amb l'ICAM-1 ens va fer pensar en la possibilitat que el CDw50 tingués alguna relació amb la molècula ICAM-3, llavors acabada de descriure a nivell d'un Anticòs Monoclonal (AcMo o *mAb*). Per la qual cosa iniciarem els treballs col·laboratius de comparació funcional entre els AcMos que definien una i altra molècula, i que tot seguit es presenten.

L'antigen de diferenciació CDw50 és una molècula àmpliament expressada en les cèl·lules hematopoietiques, però no en altres tipus cel·lulars. Experiments previs van demostrar que els AcMos anti-CDw50 eren capaços d'inhibir el cultiu mixt limfocitari (MLC). Per comprendre millor la funció del CD50, vàrem purificar-lo per tal d'obtenir una seqüència peptídica parcial. Com ja hem dit, la molècula d'adhesió intercel·lular (ICAM)-3, havia estat descrita com el tercer lligand del LFA-1. Després es va obtenir també la definició estructural de l'ICAM-3 a través de la clonació del seu cDNA. Aquest

treball constitueix un estudi comparatiu entre els AcMos que definien una i altra molècula. Així, es va realitzar mitjançant:

a) la comparació de la distribució de reactivitats cel·lulars dels anti-CDw50 i els anti-ICAM-3 per citometria de flux.

b) el bloqueig de reactivitat entre uns i altres AcMos que permeten definir la reactivitat epitòpica.

c) les immunoprecipitacions seqüencials que exclouen la precipitació proteica si els AcMos reconeixen la mateixa molècula.

d) el reconeixement pels AcMos de la molècula ICAM-3 expressada en la membrana de cèl·lules L transfectades amb el cDNA de l'ICAM-3.

e) l'estudi funcional de la capacitat bloquejant dels diferents AcMos respecte a cèl·lules L transfectades amb el cDNA d'ICAM-3 i LFA-1 purificat i enganxat a placa.

f) comparació entre la seqüència peptídica del CDw50 obtinguda per microseqüenciació i la seqüència proteica deduïda a partir del cDNA.

Amb tots aquests estudis es va poder demostrar que l'ICAM-3 i el CDw50 són la mateixa glicoproteïna, una molècula de superfície de 120 kD de pes molecular amb, presumiblement, un paper molt important en la resposta immunitària.

4.2.2.- ARTICLE.

1508 M. Juan, R. Vilella, J. Mila et al.

Eur. J. Immunol. 1993, 23: 1508-1512

Manel Juan[▲],
 Ramon Vilella[▲],
 Jordi Mila[▲],
 Jordi Yagüe[▲],
 Agusti Miralles[▲],
 Kerry S. Campbell[◇],
 R. Joachim Friedrich[◇],
 John Cambier[◇],
 Jordi Vives[▲],
 Antonin R. De Fougères[■] and
 Timothy A. Springer[■]

Servei d'Immunologia[▲], Hospital
 Clínic, Barcelona, Division of Basic
 Sciences[◇], Department of
 Pediatrics, National Jewish Center
 for Immunology and Respiratory
 Medicine, Denver and Committee
 on Immunology[■], Department of
 Pathology, Harvard Medical School
 and Center for Blood Research,
 Boston

CDw50 and ICAM-3: Two names for the same molecule*

CDw50 differentiation antigen is a molecule broadly expressed on hematopoietic cells but not on other cells. Previous experiments showed that CDw50 monoclonal antibodies (mAb) inhibited primary mixed lymphocyte culture (MLC). To understand the function of CDw50 better, we purified it and obtained peptide sequence. At the same time, intercellular adhesion molecule (ICAM)-3, the third ligand of lymphocyte function-associated molecule 1, was described by mAb and subsequent cDNA cloning. Immunochemical, functional, and protein sequencing studies show that ICAM-3 and CDw50 are the same glycoprotein, a 120-kDa surface molecule with presumably an important role in the immune responses.

1 Introduction

CDw50 was one of the 23 new clusters of differentiation (CD) assigned during the Fourth International Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens [1]. CDw50 was originally defined by two mAb, 101-1D2 and 140-11, both produced and characterized in one of our laboratories. The ability of the CDw50 mAb to inhibit allorecognition [2] identifies CDw50 as a relevant molecule involved in leukocyte interactions.

At the same time, the study of the lymphocyte function-associated molecule 1 (LFA-1), an integrin that mediates a wide range of leukocyte interactions with other cells in immune and inflammatory responses, led to the discovery of its ligands, intercellular adhesion molecule (ICAM)-1, -2 and -3 [3-6]. Anti-ICAM-3 mAb have been raised [6], and recently the molecule has been cloned [7-9]. ICAM-3 was found to be a member of the immunoglobulin (Ig)-like supergene family, containing five Ig-like domains that are highly homologous to those found in ICAM-1 and ICAM-2. The pattern of reactivity of the CDw50 and ICAM-3 mAb seemed to be strikingly similar with a few differences. Both studies [2, 5] indicated that CDw50 and ICAM-3 may be restricted to hematopoietic cells and that both molecules have a similar molecular mass (M_r) of approximately 120-130 kDa.

We now report that ICAM-3 and CDw50 are the same glycoprotein. This is demonstrated by a comparison of cell distribution, sequential immunoprecipitations, transfection assays with ICAM-3 cDNA, and finally comparison between the cDNA sequence of ICAM-3 and peptide sequences of CDw50 purified by affinity chromatography. The identity of ICAM-3 as CDw50 allows for a more detailed understanding of its role in immune responses.

2 Materials and methods

2.1 Monoclonal antibodies

The following murine mAb to human antigens were used: CBR-IC3/1 (anti-ICAM-3, IgG1) [6], CBR-IC3/2 (anti-ICAM-3, IgG2a) [9], 101-1D2 (anti-CDw50, IgG1) [2], 140-11 (anti-CDw50, IgG2b) [2], 152-2D11 (anti-CDw50, IgG1), Cris-1 (anti-CD5, IgG2a) [10] and 134-2C2 (IgM, CD26) [11], W6/32 (anti-HLA-A, B, C, IgG2a) [12], TS1/22 (anti-CD11 α , IgG1) [13], NS1 and nonbinding control mAb X63 (IgG1).

2.2 Immunofluorescence assay (IF)

PBMC and cell lines (10⁶/0.1 ml) were washed with IF buffer (PBS containing 0.02 mM NaN₃ and 1% BSA) and incubated with mAb at saturating concentration for 30 min at 4 °C, washed twice with IF buffer, and then incubated with FITC-conjugated goat anti-mouse Ig (Sigma, St. Louis, MO) for 30 min at 4 °C. Cells were analyzed on a FACStar-plus (Becton Dickinson, Mountain View, CA). In the cross-blocking experiment with CDw50 and ICAM-3 mAb, PHA-stimulated PBMC were first incubated with saturating concentrations of each antibody, washed twice with IF buffer, and then stained with fluorescein-conjugated CDw50 mAb. The Cris-1 (a CD5 mAb) and NS1 ascites were utilized as controls. The positive cell percen-

[I 11533]

* This work was supported by "Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social" grant 91/0166.

Correspondence: Manel Juan, Servei d'Immunologia, Hospital Clínic, E-08036 Barcelona, Spain

Key words: CDw50 / ICAM-3 / LFA-1

tages were established by marker positioning so that negative control gives less than 2% positive cells. Immunofluorescence FCM of L cell transfectants was performed on an EPICS V analyzer (Coulter Diagnostics, Hialeah, FL) as previously described [5].

2.3 Immunoprecipitation analysis

For radiolabeling with ^{125}I , PBMC were surface labeled with ^{125}I using Iodogen (Pierce, Rockford, IL) [14]. After labeling, 2.5×10^7 cells were lysed in 1 ml lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% NP40, 1 mM NaF, 3 mM NaN_3 , 1 mM benzamide HCl, 10 mM iodoacetate, 1 mM PMSF, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ egg white trypsin inhibitor, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ chymostatin, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin and 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pepstatin) for 45 min on ice. Nuclei insoluble debris were removed by centrifugation at $14000 \times g$ for 10 min and lysates precleared with normal rabbit serum, plus an unrelated mAb and protein A-Sepharose (Pharmacia). All preclearing reagents were prewashed in lysis buffer. Immunoprecipitation was performed with the indicated mAb (Fig. 1) for 1 h at 4°C and immune complexes fixed on rabbit anti-mouse immunoglobulins (Dako, Denmark) pre-coupled to protein A-Sepharose, washed five times with washing buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 8.0, 0.05% NP40 and 0.05% SDS) and eluted with $2 \times$ SDS sample buffer and then analyzed on 8% polyacrylamide slab gels [15]. For sequential immunoprecipitation studies ^{125}I -labeled PBMC lysates were precleared six times with one of either 101-1D2, CBR-IC3/1, CBR-IC3/2 or 134-2C2 mAb and

immunoprecipitated with each of the other three remaining mAb. The immune complexes were fixed on rabbit anti-mouse immunoglobulins (Dako) pre-coupled to protein A-Sepharose, washed, eluted with SDS sample buffer and analyzed on 10% polyacrylamide gels, as mentioned above. SDS-PAGE molecular weight standards (Bio-Rad, Richmond, CA) were used. Gels were stained with Coomassie blue, dried and exposed to Kodak X-Omat AR films with Dupont intensifying screens at -80°C .

2.4 L cell stable transfectants

ICAM-3 $^+$ L cell stable transfectants were generated as described [16, 17]. Briefly, murine L cells were transfected by calcium phosphate with ICAM-3 cDNA in Ap r M9 [9] (pCDIC-3; 8 μg) and pneo plasmid containing the G418 selection marker (100 ng). Transfectants were selected and maintained in a selection media that consists of 10% FBS/DMEM containing 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ G418 (Geneticin, Gibco Laboratories, Grand Island, NY). Untransfected L cells are maintained in DMEM without G418. L cells were detached with 10 mM EDTA/HBSS, washed three times in 10% FBS/DMEM, and then used for either flow cytometric analysis or binding to LFA-1-coated plates.

2.5 Adhesion assay

Adherence of L cell transfectants to purified LFA-1 adsorbed onto 96-well polystyrene microtiter plate was as previously described [5, 17]. Briefly, fluoresceinated L cells were resuspended in PBS, 2 mM MgCl_2 , 5% FBS (assay media) at a concentration of 10^6 cells/ml. Cells were pretreated with 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of purified mAb for 30 min at room temperature, and 5×10^4 cells were transferred to each well. Some wells were pretreated for 30 min at room temperature with 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of purified TS1/22 (anti-LFA-1a mAb). Cells were allowed to settle and adhere to the solid-phase LFA-1 for 1 h at 37°C . Unbound cells were washed with four aspirations through a 25-gauge needle followed by two aspirations through a 23-gauge needle. Bound cells were quantitated in the 96-well plates using a Pandex fluorescence concentration analyzer (IDEXX Corp., Westbrook, ME). The number of LFA-1 sites/microtiter well was determined using saturating amounts of ^{125}I -labeled TS1/22 mAb [18]. Assuming monovalent binding of the mAb [18], the density was 700 sites/ μm^2 .

2.6 Peptide sequence of CDw50

CDw50 protein purification was based on a method previously described with some modifications [19]. Briefly, CDw50 was affinity purified from 8×10^9 PBMC lysed with 80 ml of 0.5% NP40 lysis buffer (with protease inhibitors) on a 101-1D2 mAb-coupled immunoaffinity column. The column was washed with 150 ml of lysis buffer and 15 ml of 1 M MgCl_2 . CDw50 protein was selectively eluted with 4 M MgCl_2 . After concentration (Centricon 30, Amicon, Beverly, MA) the sample was submitted to SDS-PAGE on an 8% gel, under reducing conditions, and semi-dry electroblotted ($4 \text{ mA}/\text{cm}^2$) with tricine transfer buffer (39 mM tricine, 48 mM Tris-base, 1.3 mM SDS and 20% methanol) to nitrocellulose, the band was visualized by Ponceau S, and

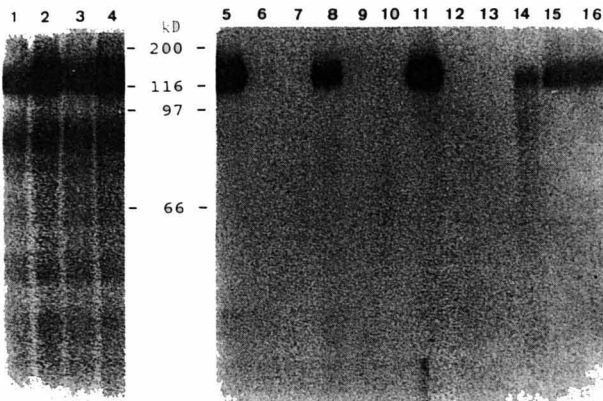


Figure 1. Sequential immunoprecipitation analysis. Lysates from ^{125}I -labeled PBMC were precleared six times with one of either 101-1D2 (anti-CDw50), CBR-IC3/1 (anti-ICAM-3), CBR-IC3/2 (anti-ICAM-3) or 134-2C2 (anti-CD26) mAb, and immunoprecipitated with each of the other three remaining mAb. Lanes 1–4: immunoprecipitates with 134-2C2, 101-1D2, CBR-IC3/1 and CBR-IC3/2 mAb, respectively. Lanes 5–7: immunoprecipitates with 101-1D2 mAb after preclearing with 134-2C2, CBR-IC3/1 or CBR-IC3/2 mAb, respectively. Lanes 8–10: immunoprecipitates with CBR-IC3/1 mAb after preclearing with 134-2C2, 101-1D2 or CBR-IC3/2 mAb, respectively. Lanes 11–13: immunoprecipitates with 134-2C2 mAb after preclearing with 101-1D2, CBR-IC3/1 or CBR-IC3/2 mAb, respectively. Lanes 14–16: immunoprecipitates with 101-1D2 mAb after preclearing with 134-2C2, CBR-IC3/1 or CBR-IC3/2 mAb, respectively. All immunoprecipitates were analyzed by 10% SDS-PAGE and subjected to autoradiography. Molecular mass of standards are shown between lanes 4 and 5.

cut out. The excised nitrocellulose membrane was digested with cyanogen bromide in formic acid. After drying and redissolving, peptides were separated by 20% SDS-PAGE and semidry electroblotted as above to polyvinylidene difluoride (PVDF). The PVDF membrane (PVDF-Problott, Applied Biosystems, Foster City, CA) was stained with amido black and peptide bands were cut out and microsequenced directly from PVDF on an Applied Biosystems 470A Microsequencer.

3 Results and discussion

CDw50 and ICAM-3 mAb showed similar reactivities on all cell lines tested (Table 1). Both molecules are leukocyte restricted in their expression, and are negative on nonlymphoid cell lines U937, K562 and HeLa. Some differences between this collaborative analysis and previous data of each group were observed: the HPB-ALL T cell line and the B cell lines Daudi, Raji, and Nalm-6 were positive (Table 1). These differences can be accounted by variations in these cell lines.

In the CD Guide of the Fourth International Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens, CDw50 was described as a heterodimer of 140/108 kDa which was potentially phosphatidylinositol (PI)-linked [20]. As ICAM-3 is a single-chain molecule of M_r 124 000 and is not PI linked, it was not immediately recognized to be identical to CDw50. Immunoprecipitates of ICAM-3 and CDw50 were carried out and revealed a protein of M_r 124 000 (Fig. 1, lanes 2-4). Sequential immunoprecipitation were

performed to determine whether the mAb identified the same protein (Fig. 1). Two ICAM-3 mAb (CRB-IC3/1 and CBR-IC3/2), one CDw50 mAb (101-1D2) and a control CD26 mAb (134-2C2) were utilized. The anti-CDw50 mAb, 101-1D2, was able to completely preclear all the ICAM-3 antigen (Fig. 1, lanes 9 and 12) and both anti-ICAM-3 mAb were able to preclear all the CDw50 antigen (Fig. 1, lanes 6 and 7). We concluded that anti-CDw50 and anti-ICAM-3 mAb recognize the same molecule.

Cross-blocking studies were then performed with CDw50 and ICAM-3 mAb to determine if similar epitopes on the molecule were recognized (Table 2). PHA-stimulated PBMC were incubated with an unlabeled blocking antibody, followed by a fluoresceinated test antibody and immunofluorescence FCM. In all cases, staining by the fluoresceinated mAb was inhibited after pretreatment with the same unfluoresceinated mAb. The ability of the CBR-IC3/2 mAb to diminish staining of the fluoresceinated 101-1D2 mAb shows that these two mAbs recognize similar epitopes on the same molecule. The epitopes recognized by mAb 140-11, 152-2D11, and CBR-IC3/1 seem to be different.

To demonstrate further that CDw50 and ICAM-3 are the same molecule, immunofluorescence FCM was performed on mouse L cells stably transfected with the ICAM-3 cDNA (Fig. 2). The ICAM-3⁺ L cells reacted specifically with both anti-ICAM-3 (CBR-IC3/1) and anti-CDw50 (101-1D2) mAb. The transfectant also reacted with five other anti-ICAM-3 mAb, including CBR-IC3/2, as well as with the CDw50 mAb, 140-11 and 152-2D11 (data not shown). The ICAM-3⁺ L cells were then tested for binding to purified LFA-1 and for the ability of anti-ICAM-3 and anti-CDw50 mAbs to inhibit this adhesion (Fig. 3). L cell transfectants expressing ICAM-3 bound efficiently to purified LFA-1 on plastic, while untransfected L cells bound poorly, showing equivalent binding to substrates bearing LFA-1 and BSA (Fig. 3). Binding of ICAM-3⁺ L cells to LFA-1 was blocked by LFA-1 mAb, and to varying degrees by anti-ICAM-3 and anti-CDw50 mAbs (Fig. 3). In agreement with the finding that CBR-IC3/2 and 101-1D2 mAb recognize the same epitope, both molecule are inefficient at inhibiting interaction to LFA-1. The other CDw50 mAb and CBR-IC3/1 each partially block adhesion to LFA-1. This demonstrates that

Table 1. Comparison of CDw50 and ICAM-3 cell distribution

Cell type	Percent positive cells ^{a)}			
	101-1D2	140-11	CBR-IC3/1	CBR-IC3/2
T cell lines				
CEM	+++	+++	+++	+++
MOLT-4	+++	+++	+++	+++
JURKAT	+++	++	++	+++
HSB2	+++	+++	+++	+++
HPB-ALL	++	++	++	++
B cell lines				
DAUDI	+++	+++	+++	+++
RAJI	+	+	+	+
RPMI-8226	+++	+++	+++	+++
NALM-6	+	++	+	++
KM3	+	+	+	+
RAMOS	+	+	+	+
Non lymphoid cell lines				
HL-60	++	++	++	++
U-937	0	0	0	0
K-562	0	0	0	0
HELA	0	0	0	0

a) Membrane expression determined by indirect immunofluorescence FCM with CDw50 (101-1D2, 140-11) and ICAM-3 (CBR-IC3/1 and CBR-IC3/2) mAb. +++ = >90%, ++ = 50-90%, + = 20-50%, 0 = <20%. Positive cell percentages were established by histogram subtraction on a FACStar-plus (Becton Dickinson).

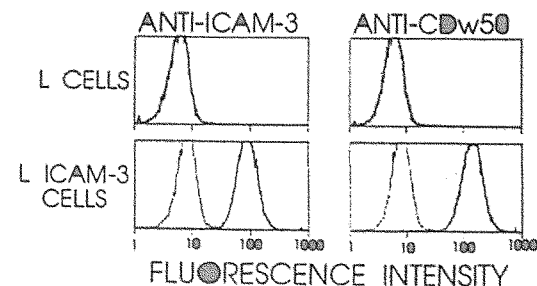


Figure 2. ICAM-3 cDNA transfectants are recognized by anti-CDw50 and anti-ICAM-3 mAb. L cells stably transfected with ICAM-3 cDNA or untransfected L cells labeled with saturating amounts of control mAb x 63 (thin line) or mAb 101-1D2 (anti-CDw50) or mAb CBR-IC3/1 (anti-ICAM-3) followed by FITC-anti-mouse Ig. Cells were subjected to immunofluorescent FCM.

Table 2. Cross-competition of CDw50 and ICAM-3 mAb^{a)}

Second incubation	First incubation (ascites fluid or purified mAb)							a) PHA-stimulated PBMC were first incubated with saturating concentrations of each antibody and the second incubation performed with affinity-purified fluorescein-conjugated mAb.
	Cris-1	101-1D2	140-11	152-2D11	CBR-IC3/1	CBR-IC3/2	NS1	
Cris-1	30	92	90	90	90	92	92	
101-1D2	99	20	99	99	99	10	99	
152-2D11	99	99	99	50	99	99	99	

Cris-1 (a CD5 mAb) and NS1 mAb-containing ascites fluid were utilized as controls. The positive cell percentages were established by marker positioning so that negative background gives less than 2% positive cells on a FACStar-plus (Becton Dickinson).

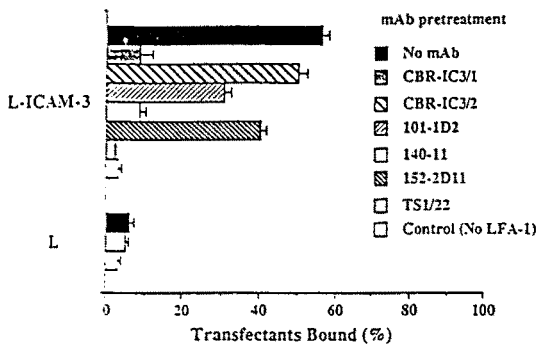


Figure 3. Adhesion of ICAM-3 transfected cells to purified LFA-1. Murine L-cells either stably transfected with ICAM-3 cDNA or untransfected were allowed to bind to LFA-1-coated microtiter wells for 60 min at 37 °C and washed four times by aspiration through a 25-gauge needle followed by two aspirations through a 23-gauge needle. Control wells lacked LFA-1. Cells were pretreated with saturating concentrations of one of the following mAb: W6/32 (anti-HLA. A. B. C), CBR-IC3/1 (anti-ICAM-3), CBR-IC3/2 (anti-ICAM-3), 101-1D2 (anti-CDw50), 140-11 (anti-CDw50), or 152-2D11 (anti-CDw50). Alternatively, the absorbed purified LFA-1 was pretreated with mAb TS1/22 (anti-LFA-1 α). One of four representative experiments is shown and errors bars indicate one standard deviation.

CDw50 mAb recognize the expressed ICAM-3 cDNA and are capable of inhibiting LFA-1:ICAM-3 interactions.

Lastly, comparison between the deduced amino acid sequence derived from the ICAM-3 cDNA and the sequence of three peptides obtained through microsequencing of purified CDw50 reveal them to be identical (Fig. 4).

```

ICAM-3 (167-188)  N Q P Q G L G L F V N T S A P R Q L R T F V
CDW50 (PEPTIDE 2) Q P Q G L G L F V X T S A P R Q L R T F V

ICAM-3 (239-255) N N H G D T L T A T A T A T A R A D Q E G A R E I V
CDW50 (PEPTIDE 3) N X G D T L T A I A T A T A X A X Q E G A R E I V

ICAM-3 (308-325) M A G A R V Q V T L D G V P A A A F G Q P A Q L Q L N A T
CDW50 (PEPTIDE 1) A G A T V Q V T L D G V P A A A F G Q P A Q L Q L N A T
    
```

Figure 4. Identity between deduced ICAM-3 protein sequence from the cDNA and CDw50 partial peptide sequence. Numbering of ICAM-3 amino acid positions are from de Fougerolles et al. [9]. Assignment of X in the CDw50 peptide sequence represent non-identifiable signal in the sequence analysis.

4 Concluding remarks

Immunochemical, functional, and protein sequencing studies confirm that ICAM-3 and CDw50 are indeed the same molecule. An important role for ICAM-3 in the initiation of immune responses is implied by the finding that adhesion of resting T lymphocytes to purified LFA-1 occurs primarily via ICAM-3, combined with the fact that ICAM-3 is much better expressed than other LFA-1 ligands on resting monocytes and lymphocytes [6]. In support of this hypothesis is the finding that anti-CDw50 mAb are capable of partially inhibiting primary allogeneic responses [2]. Also of interest is the finding that upon stimulation with PMA or a physiologic stimuli, such as T cell receptor cross-linking, CDw50 becomes rapidly and transiently phosphorylated on serine residues [21]. The functional significance of this phosphorylation is unknown, but interestingly, although all ICAM are very homologous to each other in their extracellular domains, their cytoplasmic domains are poorly conserved. Indeed, neither mouse nor human ICAM-1 or -2 contain any serine residues in their cytoplasmic region, whereas human ICAM-3 contains five such residues. By gaining information about ICAM-3 and CDw50, a clearer picture should emerge of the role of ICAM-3 in immune responses.

We thank J. Freed (National Jewish Center, Denver, CO) for peptide sequencing from PVDF.

Received February 4, 1993; in revised form March 25, 1993.

5 References

- 1 Hadam, M. R., in Knapp, W., Dörken, B., Gilks, W. R., Rieber, E. P., Schmidt, R. E., Stein, H. and von dem Borne, A. E. G. Kr. (Eds.), *Leukocyte Typing IV*. Oxford University Press, Oxford 1989, p. 667.
- 2 Vilella, R., Mila, J., Lozano, F., Alberola-Ila, J., Places, L. and Vives, J., *Tissue Antigens* 1990. 36: 203.
- 3 Springer, T. A., *Nature* 1990. 346: 425.
- 4 Dustin, M. L. and Springer, T. A., *Annu. Rev. Immunol.* 1991. 9: 27.
- 5 De Fougerolles, A. R., Stacker, S. A., Schwarting, R. and Springer, T. A., *J. Exp. Med.* 1991. 174: 253.
- 6 De Fougerolles, A. R. and Springer, T. A., *J. Exp. Med.* 1992. 175: 185.
- 7 Fawcett, J., Holness, C. L. L., Needham, L. A., Turley, H., Gatter, K. C., Mason, D. Y. and Simmons, D. L., *Nature* 1992. 360: 481.
- 8 Vazeux, R., Hoffman, P. A., Tomita, J. K., Dickinson, E. S., Jasman, R. L., St. John, T. and Gallatin, W. M., *Nature* 1992. 360: 485.

- 9 De Fougerolles, A. R., Klickstein, L. B. and Springer, T. A., *J. Exp. Med.* 1993, 177: 1187.
- 10 Bernard, A., Boumsell, L. and Hill, C. in Bernard, A., Boumsell, L., Dausset, J., Milstein, C. and Schlossman, S. F. (Eds.), *Leucocyte Typing I*. Springer-Verlag, Berlin 1984, p. 25.
- 11 Stein, H., Schwarting, R. and Niedobitek, G., in Knapp, W., Dörken, B., Gilks, W. R., Rieber, E. P., Schmidt, R. E., Stein, H. and von dem Borne, A. E. G. Kr., (Eds.), *Leukocyte Typing IV*. Oxford University Press, Oxford 1989, p. 412.
- 12 Barnstable, C. J., Bodmer, W. F., Brown, G., Galfre, G., Milstein, C., Williams, A. F. and Ziegler, A., *Cell* 1978, 14: 9.
- 13 Sanchez-Madrid, F., Krensky, A. M., Ware, C. F., Robbins, E., Strominger, J. L., Burakoff, S. J. and Springer, T. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1982, 79: 7489.
- 14 Markwell, M. A. K. and Fox, C. F., *Biochem.* 1978, 17: 4807.
- 15 Laemmli, U. K., *Nature* 1970, 227: 680.
- 16 Chen, C. and Okayama, H., *Mol. Cell. Biol.* 1987, 7: 2745.
- 17 Diamond, M. S., Staunton, D. E., De Fougerolles, A. R., Stacker, S. A., Garcia-Aguilar, J., Hibbs, M. L. and Springer, T. A., *J. Cell Biol.* 1990, 111: 3129.
- 18 Kürzinger, K. and Springer, T. A., *J. Biol. Chem.* 1982, 257: 12412.
- 19 Campbell, K. S., Hager, E. J., Friedrich, R. J. and Cambier, J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991, 88: 3982.
- 20 Knapp, W., Dörken, B., Gilks, W. R., Rieber, E. P., Schmidt, R. E., Stein, H. and von dem Borne, A. E. G. Kr., *Leukocyte Typing IV*. Oxford University Press, Oxford 1989.
- 21 Lozano, F., Alberola-Ila, J., Places, L. and Vives, J., *Eur. J. Biochem.* 1992, 203: 321.

CAPÍTOL III

4.3.-

PAPER DEL CD50

EN LES FUNCIONS ADHESIVES CEL·LULARS:

LA SENYALITZACIÓ A TRAVÉS DEL CD50 (ICAM-3)
ESTIMULA LA UNIÓ DELS LIMFÒCITS T
A LES CÈL·LULES ENDOTELIALS
DE VENA UMBILICAL HUMANA I
A LES PROTEÏNES DE LA MÀTRIU EXTRACEL·LULAR
VIA UN INCREMENT DE LA FUNCIÓ INTEGRINA $\beta 1$ I $\beta 2$.

4.3.1.- RESUM.

Un cop identificat el CD50 (a partir del *V International Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens*, al novembre de 1993, aquest és el nom acceptat pel grup de diferenciació 50) com la molècula d'adhesió ICAM-3, ens plantejarem estudiar el paper d'aquesta molècula d'adhesió en diferents funcions adhesives cel·lulars: l'interacció limfòcit-cèl·lula endotelial, la unió dels limfòcits a la Matriu Extracel·lular (M.E.) i el model d'interaccions interlimfocitàries que és l'agregació homotípica. Com a model de cel·lula endotelial hem utilitzat les Cèl·lules Endotelials de Vena Umbilical Humana (HUVECs).

La regulació de l'adhesió dels limfòcits T a les cèl·lules presentadores d'antigen, a les cèl·lules endotelials i a les proteïnes que configuren la M.E., és un procés crucial en l'activació d'aquests limfòcits i llur migració als llocs de lesió tisular. En aquest estudi, demostrarem que els tres anticossos monoclonals (AcMos o *mAb*) que reconeixen tres diferents epítops de la

molècula CD50 (ICAM-3), són capaços d'augmentar l'adhesió dels limfòcits T a HUVECs estimulades amb Factor de Necrosi Tumoral α (TNF- α) i a diverses proteïnes de la M.E. Aquest fenomen es veu mitjançat per un augment de l'avidesa de les integrines β_1 i β_2 . Aquesta afirmació es basa en els següents fets:

a) L'adhesió dels limfòcits T a les HUVECs induïda per l'estimulació del CD50 és abrogada pel bloqueig simultani, amb AcMos, de l'adhesió mitjançada per les integrines β_1 i β_2 , però només parcialment inhibida davant del bloqueig individual de qualsevol de les dues vies.

b) Els AcMos anti-CD50 augmenten les adhesions, vehiculitzades per les integrines β_1 , dels limfòcits T a la M.E. i a pèptids sintètics derivats de la fibronectina (seqüències de les zones d'unió).

c) Els AcMos anti-CD50 augmenten l'adhesió dels limfòcits T a cèl·lules COS-7 (línia fibroblàstica de primat) transfectades amb ICAM-1.

d) Els AcMos anti-CD50 augmenten l'agregació homotípica dels limfòcits T.

e) L'estimulació dels limfòcits T no modifica els patrons d'expressió de les integrines β_1 i β_2 , en llurs membranes cel·lulars.

Aquests resultats suggereixen que la molècula CD50 (ICAM-3) possiblement juga un paper central en la iniciació de la cascada de processos adhesius que pot resultar crucial per l'activació immunitària i per al desenvolupament de les lesions inflamatòries.

4.3.2.- ARTICLE.

Eur. J. Immunol. 1994. 24: 1377-1382

CD50 (ICAM-3) increases lymphocyte integrin function 1377

Maria C. Cid[•],
 Jordi Esparza[•],
 Manel Juan,
 Agustí Miralles,
 Jaume Ordi[♦],
 Ramón Vilella,
 Alvaro Urbano-Márquez[•],
 Antoni Gayà,
 Jordi Vives and
 Jordi Yagüe

Departments of Immunology,
 Internal Medicine[•], and
 Pathology[♦] Hospital Clínic i
 Provincial, Barcelona

Signaling through CD50 (ICAM-3) stimulates T lymphocyte binding to human umbilical vein endothelial cells and extracellular matrix proteins via an increase in $\beta 1$ and $\beta 2$ integrin function*

Regulated adhesion of T lymphocytes to antigen-presenting cells, endothelial cells and extracellular matrix proteins is crucial in T lymphocyte activation and migration to the sites of injury. In this study, we show that three monoclonal antibodies (mAb) recognizing different epitopes on the CD50 (ICAM-3) molecule increase T lymphocyte adhesion to tumor necrosis factor (TNF)-stimulated human umbilical vein endothelial cells and extracellular matrix proteins. These phenomena are mediated by an increase in $\beta 1$ and $\beta 2$ integrin avidity since (a) CD50-induced adhesion to endothelial cells was abrogated by simultaneous blocking of $\beta 1$ - and $\beta 2$ -mediated adhesion pathways but not by interfering with either one individually, (b) CD50 mAb increased $\beta 1$ integrin-mediated adhesion to extracellular matrix proteins and to fibronectin-derived synthetic peptides, (c) CD50 mAb enhanced T lymphocyte binding to ICAM-1 transfectants, and (d) CD50 mAb did not modify surface expression patterns of $\beta 1$ or $\beta 2$ integrins on T lymphocytes. Our data suggest that constitutively expressed CD50 (ICAM-3) can play a pivotal role in initiating a cascade of adhesion events which may be crucial in immune activation and in the development of inflammatory lesions.

1 Introduction

Cell-cell interactions are critical at key points of immune and inflammatory responses such as antigen recognition, lymphocyte traffic between lymphoid organs and the bloodstream and lymphocyte migration to sites of injury (reviewed in [1-3]). Among the complex array of adhesion receptors on the lymphocyte surface, lymphocyte integrins play a major role in mediating both cell-cell and cell-extracellular matrix interactions [3-5].

Integrin-mediated adhesion between lymphocytes and other cell types include interactions between members of the $\beta 2$ integrin family such as LFA-1 and integrins of the $\beta 1$ family such as VLA-4 and their counter-receptors on adjoining cells, intercellular adhesion molecules (ICAM), and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), respectively [2, 3]. Lymphocyte interactions with extracellular matrix proteins, such as fibronectin, laminin and collagens, occur mainly through $\beta 1$ integrins, the VLA family of extracellular matrix receptors [3-5].

Beside mediating adhesion, most of these interactions have been demonstrated to be co-stimulatory and to have a major role in amplifying lymphocyte activation triggered by stimuli mimicking specific antigen recognition [6-10]. On the other hand, biological activity of lymphocyte integrins is mainly functionally regulated. Affinity of integrins for their ligands is relatively low on resting lymphocytes. However, mAb cross-linking of the CD3/TCR complex as well as of several accessory molecules on lymphocyte surface results in stimulation of integrin function [5, 11-13]. A dramatic increase in integrin affinity also results from lymphocyte treatment with either phorbol esters [3, 11] or calcium ionophores [14].

LFA-1-mediated adhesion and co-stimulatory functions occur through interactions with three counter-receptors: ICAM-1, ICAM-2, and the recently cloned ICAM-3 [3, 15-19]. Among them, ICAM-3 has some very distinct characteristics: unlike its homologues ICAM-1 and ICAM-2, it is not expressed on human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and it is expressed at high levels on resting lymphocytes [16-19]. Furthermore, *in vitro*, resting lymphocytes preferentially use ICAM-3 to bind purified LFA-1 [16]. Based on these observations, a pivotal role for ICAM-3 in the initial interactions of immune recognition and lymphocyte activation has been postulated [17, 18].

Recently, we have demonstrated that ICAM-3 is identical to CD50, a leukocyte surface antigen originally defined by two mAb (101-1D2 and 140-11) produced and characterized in our laboratory [20, 21]. The ability of CD50 mAb (101-1D2) to inhibit proliferation in primary mixed lymphocyte culture [22] further supports a crucial role for CD50 (ICAM-3) in immune recognition.

We now demonstrate that signaling triggered by several CD50 mAb stimulates $\beta 1$ and $\beta 2$ integrin function on T lymphocytes. This observation supports the importance

[I 12816]

* Supported by grants from Fondo de Investigación Sanitaria (FIS 93.0603 and 94/0944).

Correspondence: Manel Juan, Servei d'Immunologia, Hospital Clínic i Provincial, Villarroel 170, E-08036-Barcelona, Spain (Fax: 34-3-4518038)

Abbreviations: ICAM: Intercellular adhesion molecule VCAM-1: Vascular cell adhesion molecule 1 HUVEC: Human umbilical vein endothelial cells ECM: Extracellular matrix

Key words: CD50 (ICAM-3) / Integrins / Endothelial cell

of constitutively expressed CD50 (ICAM-3) in potentiating a cascade of adhesive events essential for lymphocyte activation and tissue infiltration.

2 Materials and methods

2.1 Antibodies and other reagents

mAb RM3.A5 (CD54, ICAM-1, IgG1), 101-1D2 (CD50, ICAM-3, IgG1), 140-11 (CD50, ICAM-3, IgG2b), 152-2D11 (CD50, ICAM-3, IgG1), and 68-5A5 (CD18, LFA-1 β 2 chain) were produced and characterized in our laboratory [20–23]. Leu 16 (CD20, IgG1) and Leu 4 (CD3) were purchased from Becton Dickinson, Mountain View, CA. HP 2/1 (CD49d, α -chain of VLA-4 integrin), K20 (CD29, VLA integrin β 1 chain, IgG2a), and SAM1 (CD49e, α 5 chain of VLA-5 integrin) were purchased from Immunotech (Marseille, France).

Mouse laminin was kindly provided by Dr. H. K. Kleinman (National Institute of Dental Research, Bethesda MD). Human fibronectin purified from human plasma was purchased from Sigma Chemical Company (St Louis, MO). Collagen I and collagen IV were obtained from Collaborative Research (Bedford, MA). Fibronectin-derived synthetic peptides EILDVPST and GRGDSPC were purchased from Peninsula Laboratories (Belmont, CA).

2.2 Cell culture

HUVEC were obtained from freshly delivered umbilical cords as previously described [24]. Cells were grown at 37°C in an humidified 5% CO₂ atmosphere in medium M199 (Gibco Laboratories, Grand Island, NY) with 20% iron-supplemented calf serum (Hyclone Laboratories, Logan UT), 200 μ g/ml endothelial cell growth supplement (ECGS) (Collaborative Research), 100 U/ml penicillin-streptomycin, 50 μ g/ml gentamycin, 2 mM glutamine, 2.5 μ g/ml amphotericin B (Gibco Laboratories), and 50 U/ml sodium heparin (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ).

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained by Ficoll-Pielograf gradient centrifugation, and enriched T cell populations were prepared by nylon wool adherence. An additional 30-min incubation on 150 \times 25 mm tissue culture dishes at 37°C was performed in order to remove potential remaining monocytes. This procedure yielded 97% CD3⁺ cells and < 1% monocytes (CD14⁺ cells) as assessed by flow cytometry. PBMC, T lymphocytes, and MOLT-4 and CEM T-derived cell lines were maintained in RPMI 1640 (Gibco) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and antibiotics as above.

2.3 Attachment assays

HUVEC (passage 4–7) were plated on gelatin-coated 96-well plates and grown for 48 h until confluence. Prior to attachment assays, HUVEC were stimulated with 200 U/ml TNF- α (Genzyme, Boston, MA) for 6 h. T lymphocytes or T lymphoblastoid cell lines were incubated with mAb for 30 min at 4°C. Hybridoma supernatants were used at a 1:2 dilution and commercial affinity-purified mAb

were used at 10 μ g/ml. Cells were washed in RPMI 1640 medium with 5% fetal calf serum and resuspended at 1 \times 10⁶ cells/ml.

Lymphocytes (2 \times 10⁵/well) were incubated with HUVEC monolayers for 30 min at 37°C. Nonadherent cells were removed by aspiration and the wells were washed once with warm medium with 5% fetal calf serum. The adherent cells were fixed and stained with Diff-Quik (Baxter Healthcare Corporation, McGaw Park, IL). The area occupied by adherent cells was measured using a computerized digital analyzer (Microm Image Processing IMCO, Kontron Elektronik, Munich, Germany) and expressed as percentage of the area covered by the input cells. The experiments were done in triplicate wells and four to six representative fields for each condition were measured.

Extracellular matrix (ECM) proteins were diluted in PBS and 96-well plates were coated with laminin, fibronectin, collagen I or collagen IV at 10 μ g/well. In other experiments, wells were coated with fibronectin-derived synthetic peptides at various concentrations (10–40 ng/well). After an overnight incubation at 4°C, the remaining fluid was aspirated. Lymphocytes, prepared as above, were allowed to settle down on ECM proteins for 30 min at 4°C and incubated at 37°C for 10 min. Washing, staining and measuring were performed as described above. All experiments were done at least three times and one representative experiment is shown.

2.4 Flow cytometry analysis of cell surface receptors

Adherent cells were released with Versene (Gibco). Cells were suspended in wash buffer (2% FCS, 0.1% NaN₃ in PBS) and 100 μ l of a 10⁶ cells/ml suspension was incubated for 30 min at 4°C with a 1:2 dilution of mAb-containing hybridoma supernatants or a 1:100 dilution of affinity-purified mAb. After two washes, cells were incubated with FITC-conjugated goat anti-mouse Ig (Sigma) at 1:50 dilution for 30 min at 4°C, rinsed twice, and subjected to flow cytometry (FACStar plus, Becton Dickinson Immunocytometry systems, San Jose, CA). Simultaneous detection of CD18 and CD29 antigens on lymphocytes after stimulation with CD50 mAb was done in a single step using FITC-conjugated anti-CD18 (68.5A5) and phycoerythrin-conjugated anti-CD29 (4B4-RDI) (Coulter Immunology, Hialeah, FL).

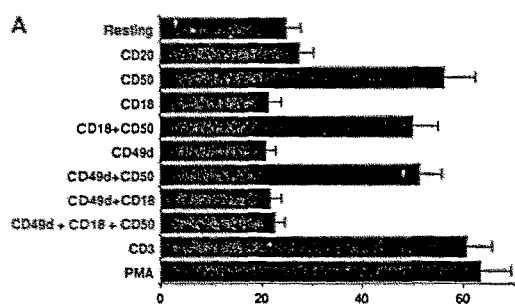
2.5 CD54 (ICAM-1) transient transfection of COS-7 cells

COS-7 cells (American Type Culture Collection, Rockville, MD) were transiently transfected with the expression vector pCDM8 containing the CD54 (ICAM-1) full-length cDNA (kindly provided by Dr. D. L. Simmons, ICRF Laboratories, Oxford, GB). Plasmids were transfected into 60–80% confluent COS-7 cells using DOTAP liposomes (Boehringer-Mannheim, Mannheim, Germany). After 48 h cells were trypsinized and plated on gelatin-coated 96-well plates and grown for 24 h until confluence. Lymphocyte adhesion assays to CD54 (ICAM-1) transfectans were performed as described for HUVEC. Prior to attachment assay, transfection efficiency was evaluated by

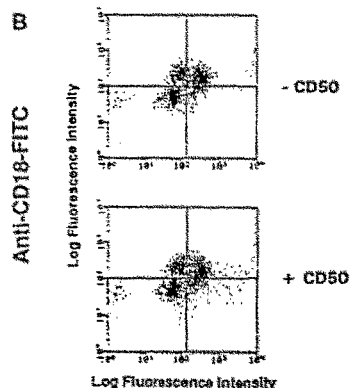
flow cytometry using the CD54 (ICAM-1) mAb RM3.A5.

2.6 Homotypic aggregation

PBMC or T lymphocytes were placed in flat-bottom 96-well plates at 2×10^5 cells/well and incubated at 37°C up to 7 days with either plain medium, CD3 mAb at 10 µg/ml, PMA (Sigma) at 10 ng/ml or CD50 mAb (1:2 hybridoma fluid dilution). CD50 mAb were tested alone or with the simultaneous presence of blocking CD18, CD54, CD29 or CD49d mAb. The effect of CD50 mAb was also evaluated in the presence of suboptimal PMA concentrations (1 ng/ml). Aggregation was estimated visually with an inverted microscope with phase contrast optics (Olympus, OM system CK2) and semi-quantitatively expressed using a previously defined scoring system ranging from 0 to 5+ [15].



T Lymphocyte Adhesion to TNF-Stimulated HUVEC (%)



Anti-CD29-Phycoerythrin

Figure 1. (A) CD50 (152-2D11) mAb increases T lymphocyte adhesion to TNF-stimulated HUVEC. T lymphocytes were incubated with various mAb and allowed to adhere to TNF-stimulated HUVEC. CD3 mAb and PMA (10 ng/ml) were used as positive and CD20 mAb as negative controls. Bars represent mean \pm SE. (B) Identical patterns of CD18 and CD29 expression on T lymphocytes are found before (upper graph) and after (lower graph) exposure to CD50 (152-2D11) mAb for 30 min at 4°C followed by a 10-min incubation at 37°C. Resting or CD50-bound T lymphocytes were incubated with a FITC-conjugated CD18 and a phycoerythrin-conjugated CD29 mAb. Simultaneous detection of CD18 and CD29 surface expression was assessed by flow cytometry as described in the Sect. 2.4. After a 30-min incubation at 37°C, a similar configuration was obtained (data not shown).

3 Results and discussion

3.1 CD50 mAb increase T lymphocyte adhesion to TNF-stimulated HUVEC

Resting T lymphocytes adhered poorly to TNF-stimulated HUVEC. CD50 mAb treatment of T lymphocytes induced a twofold increase in adhesion to TNF-stimulated HUVEC. The increment in binding promoted by CD50 mAb was similar to that induced by CD3 mAb and lesser than that induced by PMA (Fig. 1A). Among the CD50 mAb tested, 152-2D11 was the most active in this system. T-derived cell lines MOLT-4 and CEM expressing high levels of CD50 (ICAM-3) [21, 22] exhibited a much higher level of baseline adhesion than resting T lymphocytes but that was also increased 1.5–2-fold by CD50 mAb (data not shown).

Although CD50 (ICAM-3) can be expressed on some endothelium [12], it was not expressed on HUVEC under the stimulatory conditions of our experiments (TNF α for 6 h) as assessed by flow cytometry (data not shown) and in agreement with previously published data [16, 19]. No known ligand for CD50 (ICAM-3) exists on HUVEC and no counter-receptor other than leukocyte integrin LFA-1 has been identified so far. Therefore, it seems unlikely that increased adhesion results from a direct effect of CD50 mAb on the CD50 (ICAM-3) molecule by modulating its affinity.

CD50 (ICAM-3)-induced adhesion persisted when LFA-1/ICAM-1 and VLA-4/VCAM-1 adhesion pathways were separately inhibited by the presence of blocking CD18 or CD49d mAb, respectively (Fig. 1A). CD50 (ICAM-3)-stimulated adhesion was no longer apparent when both adhesion pathways were simultaneously blocked (Fig. 1A). Based on these observations, the hypothesis that CD50 (ICAM-3)-induced adhesion could be indirectly mediated by an increase in integrin expression and/or function was raised. As shown in Fig. 1B, exposure to CD50 mAb under the same conditions established for the adhesion assays to HUVEC and ECM proteins or peptides, did not modify surface expression of total lymphocyte β 1 or β 2 integrins.

3.2 CD50 mAb increase T lymphocyte adhesion to fibronectin and functionally active fibronectin-derived synthetic peptides

We next evaluated β 1 integrin function by testing the effect of CD50 mAb on T lymphocyte binding to extracellular matrix proteins. CD50 mAb stimulated adhesion to fibronectin approximately two-fold (Fig. 2). Binding to laminin, collagen IV, and collagen I was also increased by CD50 (ICAM-3) mAb but to a lesser extent (data not shown). The CD50 (ICAM-3)-stimulated increase in adhesion was always less intense than that promoted by PMA (Fig. 2). Unlike adhesion induced through other immunoglobulin-like surface molecules such as CD31 [25], CD50 (ICAM-3)-induced binding was not transient and persisted up to 30, 60, 120 min and 24 h (data not shown). CD50 (ICAM-3)-induced adhesion was mainly VLA-4 and VLA-5 mediated since CD50 mAb were unable to reverse simultaneous blocking of these integrins (Fig. 2). CD50 (ICAM-3) was also unable to induce adhesion when integrins of the

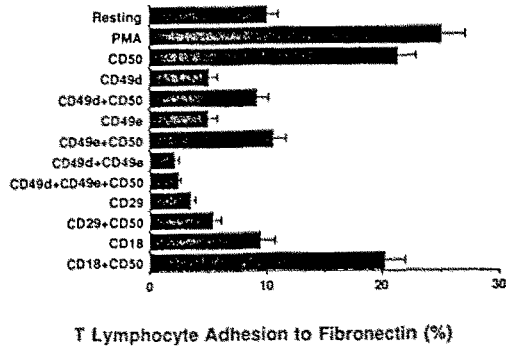


Figure 2. CD50 (152-2D11) mAb enhances T lymphocyte adhesion to fibronectin. T lymphocytes were incubated with the indicated mAb and adhesion to fibronectin was subsequently tested. Values are means \pm SE.

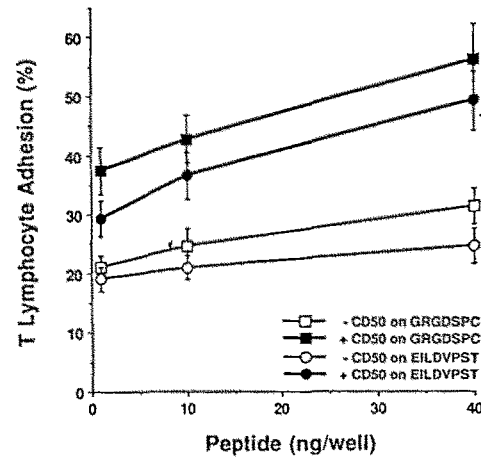


Figure 3. T lymphocyte adhesion to fibronectin-derived synthetic peptides GRGDSPC (squares) and EILDVPST (circles) in the presence (filled symbols) or in the absence (open symbols) of CD50 (152-2D11) mAb. All points represent mean \pm SE.

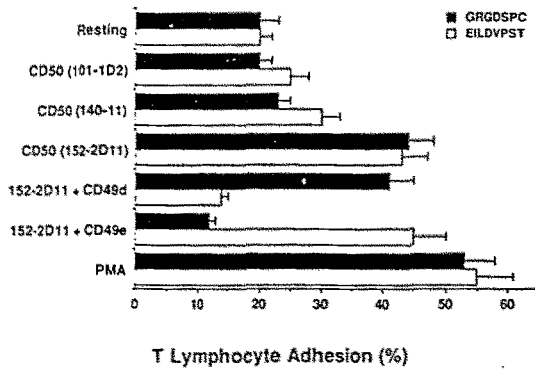


Figure 4. Comparative effect of CD50 mAb 101-1D2, 140-11, and 152-2D11 on T lymphocyte binding to fibronectin-derived synthetic peptides EILDVPST and GRGDSPC at 30 ng/well. Specificity of binding is shown by inhibition with blocking CD49d and CD49e mAb, respectively.

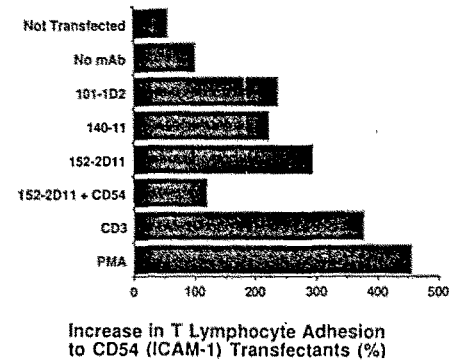


Figure 5. CD50 (101-1D2, 140-11 and 152-2D11) mAb-stimulated binding of T lymphocytes to CD54-ICAM-1 transfectants. Adhesion of resting and CD50-stimulated lymphocytes to not transfected cells was similar. Bars represent means of duplicate wells.

β 1 family were interfered with a CD29 antibody blocking the common β 1 chain (Fig. 2). However, CD50 mAb partially reversed the inhibition achieved by either anti- α 4 or anti- α 5 separately. As expected, CD50-induced adhesion to fibronectin was not reduced by blocking β 2 integrins with a CD18 antibody (Fig. 2).

The effect of CD50 (ICAM-3) on VLA-4 and VLA-5 integrin function was individually studied by testing adhesion to fibronectin-derived synthetic peptides. EILDVPST peptide from the CS-1 region of the alternatively spliced connecting segment of fibronectin and containing the minimum LDV (Leu-Asp-Val) sequence required for cell adhesion [5, 26, 27], was used to test VLA-4 function. GRGDSPC peptide with the RGD (Arg-Gly-Asp) cell-binding sequence [4, 5, 27] was employed to analyze VLA-5 activity. CD50 (ICAM-3) induced adhesion to both peptides (Fig. 3). The specificity of binding was confirmed by inhibiting adhesion with anti- α 4 and anti- α 5 blocking antibodies, respectively. Among the three CD50 mAb tested, 152-2D11 exhibited the highest stimulatory activity (Fig. 4).

3.3 CD50 (ICAM-3) increases T lymphocyte adhesion to ICAM-1⁺ COS-7 transient transfectants

Since our adhesion experiments to HUVEC suggested that CD50 mAb increase β 2 integrin function on resting T lymphocytes, we tested the ability of CD50 mAb to induce adhesion of T lymphocytes to ICAM-1. As shown in Fig. 5, CD50 mAb stimulated adhesion of T lymphocytes to COS-7 cells transiently transfected with CD54 (ICAM-1) cDNA. The specificity of this interaction was confirmed by the low level of baseline adhesion of resting or CD50-stimulated lymphocytes to non-transfected COS-7 and by blocking adhesion to transfected cells with a CD54 (ICAM-1) mAb. Recently, other investigators have shown that another CD50 mAb (HP2/19) is able to induce T lymphoblast adhesion to immunoaffinity purified ICAM-1 [28]. Our results support that β 2 integrin function is also stimulated by CD50 mAb in resting T lymphocytes.

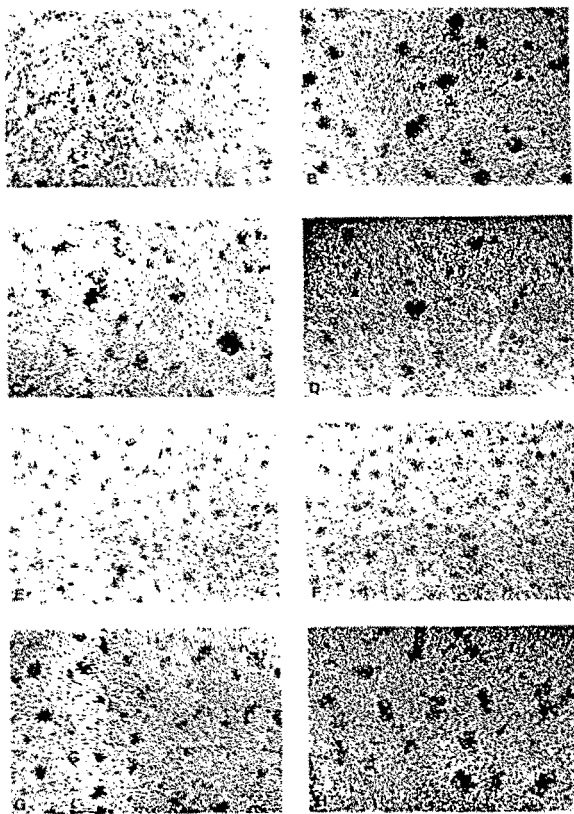


Figure 6. Homotypic aggregation induced by CD50 mAb. PBMC were incubated in flat-bottom 96-well plates in the absence or in the presence of mAb as described in the Sect. 2.6. Pictures were taken at 4 days. (A) Resting PBMC, (B) aggregation obtained with 152-2D11 mAb, (C) clustering induced by 140-11 mAb, (D) aggregation achieved by 101-1D2 mAb, (E) inhibition of 152-2D11-induced aggregation by CD18 and (F) CD54 mAb. Absence of inhibition of 152-2D11-induced clustering by CD29 (G) or CD49d (H) mAb.

3.4 CD50 mAb promote lymphocyte homotypic aggregation

We next tested the integrin-stimulatory effect of CD50 mAb on homotypic adhesion, another model of cell-cell

interaction. Incubation of PBMC or enriched T cell populations with CD50 resulted in homotypic aggregation (Fig. 6B-D). Clustering began to be slightly apparent within hours, was fully developed 3-4 days later and persisted for up to 7 days. Table 1 shows the intensity in aggregation achieved by various antibodies in different experiments evaluated on day 4. Variability in response to CD50 mAb among different donors was observed throughout this study and this fact was particularly evident in the homotypic adhesion studies. CD50 (ICAM-3) alone was able to induce aggregation in two out of three experiments performed with resting T lymphocytes and in three out of seven done with PBMC, all from different donors. However, CD50 (ICAM-3) invariably promoted a substantial increase in the low-level aggregation obtained with suboptimal concentrations of PMA (1 ng/ml). Other investigators have recently shown that other CD50 mAb (HP2/19 and CBR-IC3/1) rapidly induce T lymphoblast homotypic aggregation. Taken together, these data suggest that CD50 (ICAM-3) probably requires some degree of baseline activation to be functionally operative. The transmembrane and intracytoplasmic domain of CD50 (ICAM-3) is the least conserved region when compared to its homologues ICAM-1 and ICAM-2 [17-19]. It has several serine residues, and we have previously shown that CD50 undergoes phosphorylation upon activation with phorbol esters [22, 29]. Although this point deserves further investigation, the consistent ability of CD50 to increase the slight aggregation induced by suboptimal concentrations of PMA suggests that CD50 requires phosphorylation to be functionally active in homotypic aggregation.

As expected, CD50 (ICAM-3)-induced homotypic adhesion was inhibited by blocking LFA-1, its known ligand (Fig. 6E). Substantial inhibition was also achieved with a blocking CD54 (ICAM-1) mAb (Fig. 6F). These results suggest that CD50 (ICAM-3) induces aggregation by activating LFA-1 function and, therefore, by stimulating its binding to CD50 (ICAM-3) itself on the apposing cell and to other counter-receptors such as ICAM-1 or ICAM-2 (Fig. 6). The observation that CD50 mAb 140-11 also induces homotypic clustering further supports this concept since it has been shown to inhibit binding of ICAM-3 transfectants to purified LFA-1 [21]. In contrast, CD50 (ICAM-3)-induced aggregation was not inhibited by blocking CD29 and CD49d mAb, suggesting that CD50 (ICAM-3)-induced clustering is independent of the $\beta 1$ integrin-induced homotypic aggregation pathway which operates through still incompletely defined interactions [30].

Table 1. PBMC homotypic aggregation triggered by CD50 mAb

Exp. no.	1	2	3	4	5	6	7
No Ab	0	+	0	0	0	0	0
101-1D2	++	+++	0	0	0	0	0
140-11	++	+++	0	0	0	0	0
152-2D11	+++	++++	0	0	+++	0	0
CD3	+++	++++	+++	+++	+++	++	ND
PMA ^{a)}	+++	++++	+++	+++	+++++	+++	+++++
PMA ^{b)}	0/+	++	+	++	+	+	++
PMA ^{b)} - 152	++++	+++++	++	+++	++++	++	++

a) PMA: 10 ng/ml.

b) PMA: 1 ng/ml.

4 Concluding remarks

In summary, our data demonstrate that CD50 mAb are able to stimulate $\beta 1$ and $\beta 2$ integrin function on T lymphocytes. This increase in integrin avidity did not result from an increase in surface expression since flow cytometry provided identical patterns of CD18 and CD29 expression after incubation with CD50 mAb at the times tested in adhesion studies. Our findings support the idea that CD50 (ICAM-3) acts, not only as a counter-receptor for LFA-1 but it is itself a functionally relevant signaling molecule [31]. Our experiments [32] indicate that several CD50 mAb induce tyrosine phosphorylation and increase cytosolic Ca^{2+} concentration in CD50-expressing cell lines. Phosphorylation events and increase in intracellular Ca^{2+} levels have previously been demonstrated to activate lymphocyte integrin function [5, 14, 33].

A number of T lymphocyte surface molecules have been shown to increase either $\beta 1$ or $\beta 2$ integrin activity or both. These include CD3-TCR [3], CD31 [25], and a variety of co-stimulatory molecules such as CD2 [13], CD28, and CD7 [14]. CD50 (ICAM-3) is unique in that it stimulates adhesion phenomena in which it is itself involved as a counter-receptor for LFA-1 in the adjoining cell. Assuming that CD50 mAb mimic triggering of signal transduction through CD50 (ICAM-3) by its ligand, bidirectional LFA-1-ICAM-3 interactions on adherent cells may lead to positive feedback, progressively reinforcing the strength of adhesion and stimulating a cascade of adhesion events.

We are deeply indebted to Drs. H. K. Kleinman, S. K. Akiyama and K. M. Yamada (Laboratory of Developmental Biology, NIDR, Bethesda, MD) for helpful suggestions and comments. Manel Juan is a predoctoral fellowship grant recipient from Hospital Clinic i Provincial and Agusti Miralles is a recipient of a predoctoral fellowship from: "Pla de Recerca de la Generalitat de Catalunya".

Received January 4, 1994; in revised form March 10, 1994; accepted March 11, 1994.

5 References

- Butcher, E. C., *Cell* 1991, 67: 1033.
- Shimizu, Y., Newman, W., Tanaka, Y. and Shaw, S., *Immunol. Today* 1992, 13: 106.
- Springer, T. A., *Nature* 1990, 346: 425.
- Shimizu, Y. and Shaw, S., *FASEB J.* 1991, 5: 2292.
- Hynes, R. O., *Cell* 1992, 69: 11.
- Levesque, J. P., Hatzfeld, A. and Hatzfeld, J., *Immunol. Today* 1991, 12: 255.
- Shimizu, Y., van Seventer, G. A., Horgan, K. J. and Shaw, S., *J. Immunol.* 1990, 145: 59.
- de Sousa, M., Tilney, N. L. and Kupiec-Weglinski, J., *Immunol. Today* 1991, 12: 262.
- van Seventer, G. A., Shimizu, Y., Horgan, K. J. and Shaw, S., *J. Immunol.* 1990, 144: 4579.
- Van Seventer, G. A., Shimizu, Y. and Shaw, S., *Curr. Opin. Immunol.* 1991, 3: 294.
- Shimizu, Y., van Seventer, G. A., Horgan, K. J. and Shaw, S., *Nature* 1990, 345: 250.
- Hogg, N. and Clive Landis, R., *Curr. Opin. Immunol.* 1993, 5: 383.
- Pardi, R., Inverardi, L. and Bender, J. R., *Immunol. Today* 1992, 13: 224.
- Shimizu, Y., van Seventer, G. A., Ennis, E., Newman, W., Horgan, K. J. and Shaw, S., *J. Exp. Med.* 1992, 175: 577.
- de Fougerolles, A. R., Stacker, S. A., Schwarting, R. and Springer, T. A., *J. Exp. Med.* 1991, 174: 253.
- de Fougerolles, A. R. and Springer, T. A., *J. Exp. Med.* 1992, 175: 185.
- de Fougerolles, A. R., Klickstein, L. B. and Springer, T. A., *J. Exp. Med.* 1993, 177: 1187.
- Fawcett, J., Holness, C. L. L., Needham, L. A., Turley, H., Gatter, K. C., Mason, D. Y. and Simmons, D. L., *Nature* 1992, 360: 481.
- Vazeux, R., Hoffman, P., Tomita, J. K., Dickinson, E. S., Jasman, R. L., John, T. and Gallatin, W. M., *Nature* 1992, 360: 485.
- Hadam, M., In: Knapp, W., Dorken, B., Gilks, W. R., Rieber, E. P., Schmidt, R. E., Stein, H. and von dem Borne, A. E. G. Kr (Eds.) *Leukocyte Typing IV*. Oxford University Press, Oxford 1989, p. 667.
- Juan, M., Vilella, R., Millà, J., Yagüe, J., Miralles, A., Campbell, K. S., Friedrich, R. J., Cambier, J., Vives, J., de Fougerolles, A. and Springer, T., *Eur. J. Immunol.* 1993, 23: 1508.
- Vilella, R., Millà, J., Lozano, F., Alberola-Ila, J., Places, L. and Vives, J., *Tissue Antigens* 1990, 36: 203.
- Engel, P., Serra, C., Acevedo, G., Vilella, R. and Gallart, T., *Immunología* 1992, 11: 21.
- Jaffe, E. A., Nachman, R. L., Becker, C. G. and Minick, C. R., *J. Clin. Invest.* 1973, 52: 2745.
- Tanaka, Y., Albeida, S., Horgan, K. J., van Seventer, G. A., Shimizu, Y., Newman, W., Hallam, J., Newman, P. J., Buck, C. A. and Shaw, S., *J. Exp. Med.* 1992, 176: 245.
- Wayner, E. A. and Kovach, N. L., *J. Cell Biol.* 1992, 116: 489.
- Yamada, K. M., Aota, S., Akiyama, S. K. and LaFlamme, S. E., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 1992, 57: 203.
- Campanero, M. R., del Pozo, M. A., Arroyo, A. G., Sánchez-Mateos, P., Hernández-Caselles, T., Craig, A., Pulido, R. and Sánchez-Madrid, F., *J. Cell Biol.* 1993, 123: 1007.
- Lozano, F., Alberola-Ila, J., Places, L. and Vives, J., *Eur. J. Biochem.* 1992, 203: 321.
- Campanero, M. R., Pulido, R., Ursa, M. A., Rodríguez Moya, M., O. de Landáuri, M. and Sánchez-Madrid, F., *J. Cell Biol.* 1990, 110: 2157.
- Hernández-Caselles, T., Rubio, G., Campanero, M. A., del Pozo, M. A., Sánchez-Madrid, F. and Aparicio, P., *Eur. J. Immunol.* 1993, 23: 2799.
- Juan, M., Viñas, O., Pino-Ofín, M. R., Places, L., Martínez-Cáceres, E., Barceló, J. J., Miralles, A., Vilella, R., de la Fuente, M. A., Vives, J., Yagüe, J. and Gayà, A., *J. Exp. Med.* 1994, in press.
- van Kooyk, Y., Weder, Y. P., Hogervorst, F., Verhoeven, A. J., van Seventer, G. A., Velde, A. A., Borst, J., Keizer, G. D. and Figdor, C. G., *J. Cell Biol.* 1991, 112: 345.

CAPÍTOL IV

**4.4.- PAPER DEL CD50 COM A MOLÈCULA
TRANSDUCTORA DE SENYALS:**

**LA ESTIMULACIÓ A TRAVÉS DEL CD50 (ICAM-3)
INDUEIX EN LA LÍNIA JURKAT LIMFOBLASTOIDE T
LA MOBILITZACIÓ DE CALCI
I LA FOSFORILACIÓ A TRAVÉS DE
LES PROTEÏN-TIROSIN-KINASES**

p59^{fyn} I p56^{lck}.

4.4.1.- RESUM.

L'augment de l'afinitat de les integrines limfocitàries β_1 i β_2 com a conseqüència de l'estimulació del CD50, ens va assenyalar que aquesta molècula d'adhesió tenia també una capacitat estimuladora ens els limfòcits T. A partir d'aquesta idea, ens vàrem proposar estudiar les vies de transducció de senyals que emprava el CD50, el tercer lligand del LFA-1, per assolir l'estimulació cel·lular, especialment en els limfòcits T, donat que com a ICAM-3, hom havia suggerit que podia vehiculitzar les primeres fases de la resposta immunitària.

Vàrem escollir per a fer-ho el model de cèl·lula T que constitueix la línia limfoblastoide Jurkat, i vàrem analitzar els processos bioquímics que acompanyaven l'estimulació d'aquestes cèl·lules amb els diferents AcMos anti-CD50 que disposem. Així, després d'incubar les cèl·lules amb l'anti-CD50, i entrecreuar-lo amb sèrum policlonal de cabra contra immunoglobulines de ratolí (GAM), vàrem detectar un increment en la concentració de calci

intracel·lular ($[Ca^{2+}]_i$). Aquest increment és sostingut i es deu fonamentalment a l'entrada de Ca^{2+} del medi extracel·lular. A més a més, la coestimulació amb CD3 incrementa el senyal, i a la vegada, es pot dir que hi intervenen certes vies de fosforilació en tirosines. Aquestes dades junt a les obtingudes mitjançant la immunoprecipitació, després de l'estimulació del CD50, de proteïnes amb fosfotirosines, i les proves d'activitat kinasa *in vitro*, suggerien que les Protein-Tirosin-Kinases (PTKs) podien estar implicades en les vies de transducció de senyals que vehiculen l'estimulació a través del CD50. De fet, l'estudi de l'activitat kinasa *in vitro* mostrava que existeix una activitat fosforilant en tirosines de manera associada, però no intrínseca, al CD50. Per últim, mitjançant l'ús d'antisèrums específics anti-*fyn* i anti-*lck*, vàrem demostrar de manera clara que ambdues PTKs, $p56^{lck}$ i $p59^{fyn}$, eren co-immunoprecipitades amb la molècula CD50.

A l'anex, es detallen altres experiments, fets en paral·lel amb als estudis de l'article, que demostren que l'estimulació de les cèl·lules Jurkat a través del CD50 és capaç d'induir l'aparició de la cadena α del receptor de la IL-2, i, en presència de PMA, produir la síntesi de la IL-2 pròpiament dita. Així la inducció d'aquests dos ben coneguts marcadors d'activació, ens permeten afirmar que és possible produir un cert grau d'activació cel·lular a través de l'estimulació del CD50.

Totes aquestes troballes suggereixen que la interacció del CD50 amb el seu lligand natural (LFA-1), condiona un conjunt de processos estimuladors importants per a la cèl·lula T, que indueixen a pensar que el CD50 juga un paper clarament actiu en el processos d'activació que acompanyen al reconeixement antigènic.

4.4.2.- ARTICLE.

CD50 (Intercellular Adhesion Molecule 3) Stimulation Induces Calcium Mobilization and Tyrosine Phosphorylation through p59^{lck} and p56^{lck} in Jurkat T Cell Line

By Manel Juan, Odette Viñas, M. Rosa Pino-Otín, Lourdes Places, Eva Martínez-Cáceres, Juan J. Barceló, Agustí Miralles, Ramon Vilella, Miguel A. de la Fuente, Jordi Vives, Jordi Yagüe, and Antoni Gayà

From the Servei d'Immunologia, Hospital Clínic, 08036 Barcelona, Spain

Summary

The leukocyte differentiation antigen, CD50, has been recently identified as the intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3), the third counter-receptor of leukocyte function-associated antigen 1 (LFA-1). This molecule seems to be specially involved in the adhesion events of the initial phases of the immune response. To characterize the role of CD50 in leukocyte interactions, the different molecular events induced after cross-linking of CD50 on T cell-derived Jurkat cell line have been analyzed. When cells were incubated with anti-CD50 mAbs and cross-linked with polyclonal goat anti-mouse immunoglobulins, a rise in intracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) was observed. This increase in $[Ca^{2+}]_i$ was mainly due to the uptake of extracellular Ca^{2+} . This Ca^{2+} flux involved tyrosine phosphorylations and was further increased by CD3 costimulation. These data, together with those obtained by phosphotyrosine (P-Tyr) immunoprecipitation and in vitro kinase assays, suggested the involvement of protein-tyrosine kinases (PTK) in CD50 transduction pathways. By using specific antisera, the presence of p56^{lck} and p59^{lck} protein tyrosine kinases (PTK) was clearly demonstrated in the CD50 immunoprecipitates. These findings suggest that the interaction of CD50 with its natural ligand (LFA-1) may result in T lymphocyte activation events, in which CD50 could play a very active role after antigen triggering.

The immune system, composed of recirculating cells, uses a dynamic and complex group of membrane molecules involved in cell-cell interaction mechanisms that are related at different degrees to antigen-dependent proliferation (1). These intercellular interactions are also especially relevant in several steps of inflammatory and immune responses. Among these steps, functions such as lymphocyte traffic between lymphoid organs and the bloodstream, lymphocyte migration to sites of injury, and antigen recognition are to be included (2). Intercellular adhesion is mediated by many different molecules, CD50 being a molecule that plays a prominent role in cell adhesiveness. This molecule has recently been identified by us as intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)¹ (3), and it has been described as the third counter-receptor for the leukocyte integrin leukocyte function-associated antigen

1 (LFA-1) (4, 5). Moreover, CD50 seems to be a relevant molecule involved in leukocyte interactions (5, 6).

CD50 (ICAM-3) was described as a 120-kD, highly expressed, and hematopoietically restricted leukocyte surface antigen during the IV International Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens (7), being originally defined by two mAbs (101-1D2 and 140-11) that were produced and characterized in our laboratory. The initial description of CD50 mAbs inhibiting allorecognition (6) suggested that CD50 could be a relevant molecule involved in leukocyte interactions. The finding that CD50 became rapidly and transiently phosphorylated on serine residues (8) upon stimulation either by PMA or T cell receptor cross-linking suggested a biochemical regulation of its function. The analysis of CD50 cDNA clones (9-11) showed the highest homology with ICAM-1 and ICAM-2, especially in their extracellular domains. However, comparison of the intracellular regions showed a low similarity, suggesting a different function for the intracytoplasmic domain of each different ICAM molecule (9, 11). Indeed, five serine residues in CD50 cytoplasmic region are, probably, the residues that become phosphorylated

¹ Abbreviations used in this paper: $[Ca^{2+}]_i$, intracellular calcium concentration; GAM, goat anti-mouse immunoglobulins; ICAM, intercellular adhesion molecule; IP₃, D-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate; LFA-1, leukocyte-associated antigen 1; PKC, protein kinase C; PTK, protein tyrosine kinase.

in CD50 molecule after protein kinase C (PKC) stimulation induced by PMA or CD3 (8). This phosphorylation could be a way of controlling a possible CD50 function, such as the LFA-1 phosphorylation in response to phorbol ester (12). Unlike its homologous ICAM-1 and ICAM-2, this new member of the Ig gene superfamily is highly expressed on resting lymphocytes. This fact strongly suggested that CD50 is preferentially used by lymphocytes in the LFA-1-mediated binding during the initial interactions of immune recognition and lymphocyte activation (5, 9). Furthermore, its lack of expression in endothelial cells (9, 10) leads us to assume that its possible role in the leukocyte-endothelial cell is indirect.

It has been repeatedly described that, in the ICAM-1/LFA-1 interaction, the LFA-1 plays the most important role in signal transduction (13-17). This signaling pathway through LFA-1 involves calcium mobilization, phosphoinositide hydrolysis, amplification of CD3-dependent IL-2 production, and proliferation and enhancing antigen presentation in B cells. Whereas direct intracellular signaling pathways through LFA-1 have been extensively described, there are few data about transducing effects through ICAM-1 (18, 19) and ICAM-2 (20). All these data suggested that the main functional role of both ICAM-1 and ICAM-2 was their binding with LFA-1 which triggered some transduction signals that affected directly other stimulatory surface proteins, enhancing cell activation. If one considers the high homology of CD50 with ICAM-1 and ICAM-2, and the fact that little is known about the functional involvement of CD50 in cell activation it could easily be assumed that CD50, like ICAM-1 and ICAM-2, would play only a secondary role in signal transduction. However, since its first description (3), the important differences, described above (cell distribution and cell induction, intracytoplasmic domain, phosphorylation by PKC stimulation), suggested that CD50 could play a more active role in signal transduction than ICAM-1 or ICAM-2.

To analyze the role of CD50 in immune interactions, the ability of anti-CD50 mAbs to transduce signals into Jurkat cells, a T-derived cell line, was studied. In this study, direct biochemical and cellular evidences are described showing that CD50 (ICAM-3) is a molecule capable of transducing signals across the plasma membrane of these cells. More precisely, our results show a direct relationship between two protein tyrosine kinases (PTKs), p56^{lck} and p59^{lyn} (two nonreceptor PTKs of the src family), and CD50 molecule, suggesting their involvement in the CD50 signaling pathway. These data contribute to a better understanding of CD50 (ICAM-3) activation pathways and present CD50 as a new costimulatory molecule with a probable enhancing role in immune response.

Materials and Methods

Antibodies and Cell Line. The following murine mAb to human antigens were used at the indicated concentrations: 101-1D2 (anti-CD50, IgG1) (6); 140-11 (anti-CD50, IgG2b) (6); 152-2D11 (anti-CD50, IgG1) (3); 143-14 (CD27, IgG2a) (21); RM3A5 (anti-CD54, IgG2a) (22); 72-5D3 (anti-CD45, IgG1) (23); Cris-7 (anti-CD3, IgG1) (23); 124-1D1 (anti-CD7, IgG1) (24); 133-1G6 (IgM) (25); and nonbinding NS1 ascites as a control (IgG1). All antibodies were

purified by protein A affinity chromatography. Second step polyclonal goat anti-mouse Ig (GAM) (affinity purified) was purchased from Tago, Inc. (Burlingame, CA). P-Tyr (Ab-1), anti-phosphotyrosine (P-Tyr) mAb was obtained from Oncogene Science, Inc. (Manhasset, NY). Rabbit polyclonal antiserum to p56^{lck} (26) and p59^{lyn} (27) were kindly provided by Dr. R. M. Perlmutter (University of Washington, Seattle, WA). The Jurkat T-derived lymphoblastoid cell line was obtained from the European Collection of Cultured Cell Lines (Salisbury, UK) and was maintained in culture in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS.

[Ca²⁺]_i Measurements. INDO 1-AM cell labeling was performed according to a standard protocol (28). Briefly, Jurkat cells were washed twice in INDO 1 buffer A (HBSS medium with 10 mM Hepes, pH 7.0), counted, and resuspended at 5×10^6 cells/ml. The fluorescent Ca²⁺ indicator INDO 1-AM (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR) was added to cell lines to 12.5 μ M. After a 30-min incubation at 37°C, the same volume of INDO 1 buffer B (HBSS with 10 mM Hepes and 5% FCS, pH 7.4) was added and reincubated for 30 min at 37°C. Then, cells were washed twice with INDO 1 buffer C (HBSS with 10 mM Hepes, 10 μ M DNAase, and 5% FCS, pH 7.2), counted, and resuspended at 5×10^6 cells/ml at room temperature. Several minutes before the stimulation, cells were resuspended at 5×10^5 cells/ml in INDO 1 buffer C and maintained at 37°C. Cells were incubated with the different mAb for 15 min, and then washed twice. Cross-linking stimulation of mAbs was made with a second step polyclonal GAM, during the analysis. In some experiments CaCl₂ was omitted from the INDO 1 buffer C medium, and EGTA 100 μ M added instead. After the complete response without extracellular Ca²⁺, 10 μ M CaCl₂ was added to the medium. Both Genistein and Herbimycin A (both from Calbiochem, La Jolla, CA) were used as PTK inhibitors. In the experiments where Genistein was used, this inhibitor was added 30 min before the analysis at 150, 75, 25, and 7.5 μ M. In the experiments where Herbimycin A was used, cells were preincubated with this PTK inhibitor 16 h before the assay. Both inhibitors were maintained throughout the assay. Fluorescent measurements were carried out on a FACStar-plus[®] (Becton Dickinson & Co., Mountain View, CA), using an argon ion laser, focused in the UV (351-363 nm). INDO 1-AM emissions were detected at 405/22 and 485/22 nm and analyzed by Chronos software (Becton Dickinson & Co.) a software package that allows the evaluation of the mean INDO 1-AM violet/blue fluorescence ratio vs. time.

D-myo-Inositol 1,4,5 Trisphosphate (IP₃) Determination. Jurkat cells on HBSS medium (BSS + 50 mM Hepes + 5% FCS) were treated with 50 μ g/ml of anti-CD50 (152-2D11), 1 ng/ml of anti-CD3 (positive control), or GAM alone (negative control), for 20 min at 4°C. Excess antibodies were removed by centrifugation and pellets were suspended in 1 ml of HBSS medium with or without 20 μ g/ml of GAM. Incubation was carried out for the indicated time and stopped by addition of 200 μ l ice-cold perchloric acid 20%. After a 20-min incubation on ice, samples were centrifuged (2,000 g) and supernatants were titrated to pH 7.5 with 1.5 M KOH and 60 mM Hepes buffer. IP₃ levels were measured with IP₃ [³H] assay system (Amersham International, Little Chalfort, UK) by the competition between tested unlabeled IP₃ and a fixed quantity of [³H]IP₃ for a bovine adrenal binding protein with a limited number of binding sites.

³²P-Orthophosphate Radiolabeling and P-Tyr Immunoprecipitation Analysis. After washing twice in phosphate-free medium (20 mM Hepes, 10 mM dextrose, 1 mM CaCl₂, 5 mM KCl, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM MgSO₄, and 20 mM NaHCO₃, pH 7.2), 2×10^6 cells/ml were suspended in this phosphate-free medium supplemented with 10% dialyzed FCS containing 500

$\mu\text{Ci/ml}$ of [^{32}P]orthophosphate (PBS 11; Amersham International). Radiolabeling was carried out for 3 h in 6-well tissue culture plates (Costar Corp., Cambridge, MA) at 37°C in 5% CO_2 according to a standard protocol (29). Once labeled, cells were incubated for 30 min with each mAb. Excess antibodies were removed by centrifugation and pellets were resuspended in 1 ml of medium with 25 $\mu\text{g/ml}$ of GAM. Incubation was carried out for 5 min and then, cells were disrupted at 4°C for 30 min in a lysis buffer containing protease and phosphatase inhibitors (30). After four clearing cycles with an unrelated mAb plus protein A-Sepharose, supernatants were adjusted to contain identical acid-insoluble radioactivity and incubated for 1–2 h with 10 μl of P-Tyr (Ab-1) anti-P-Tyr mAb. Then, lysates were incubated for 1–2 h with 50 μl protein A-Sepharose packed beads adsorbed with a rabbit anti-mouse Ig serum (Dako, Glostrup, Denmark). The resulting immune complexes were washed, eluted, and analyzed by SDS-PAGE (31) in 10% polyacrylamide slab gels at 30 mA/gel. The gel was dried and exposed to Kodak X-Omat AR films with intensifying screens at -80°C . For assessing molecular masses, a standard ^{14}C -labeled protein mixture (Amersham International) was included in the gels.

In Vitro Kinase Assay. Solubilization and kinase reactions were performed as previously described (32), with some modifications. Briefly, cells were harvested and solubilized at 2×10^7 cells/ml in either 1% Triton X-100 lysis buffer (1% Triton X-100/150 mM NaCl with 1 mM sodium orthovanadate + 1 mM EDTA + leupeptin [10 mg/ml] + aprotinin [10 mg/ml] + 25 mM *p*-nitrophenyl-*p*-guanidinobenzoate) or in 1% digitonin lysis buffer (1% digitonin/150 mM NaCl/50 mM Hepes, pH 7.5, with the above inhibitors; digitonin was prepared as described by Oettgen et al. [33]). Soluble lysates from 10^7 cells were incubated at 4°C for 1 h with different mAb and then, immunoprecipitated for 1 h with protein A-Sepharose (Pharmacia LKB, Uppsala, Sweden). After immunoprecipitation, immune complexes were washed in lysis buffer with appropriate detergent but without EDTA. In some cases, 1 M MgCl_2 lysis buffer was used for washing out associated molecules (3). Immunocomplex kinase assays were performed by incubation at 4°C for 15 min in 50 μl kinase buffer (150 mM NaCl + 20 mM Hepes, pH 7.5, + 5 mM MnCl_2 + 5 mM MgCl_2 + 1 mM ATP + 10 mCi of γ -[^{32}P]ATP). The reaction was stopped with lysis buffer containing the appropriate detergent and 20 mM EDTA. Immunocomplexes were washed twice in lysis buffer, eluted in SDS sample buffer and analyzed by SDS-PAGE 8% (30).

Phosphoamino Acid Analysis. ^{32}P -labeled proteins were electroeluted from excised bands of polyacrylamide gels, precipitated with cold acetone/ NH_3 (5.3:0.3) and hydrolyzed in 0.2 ml 6 M HCl at 110°C for 2 h. Acid-hydrolyzed samples were dried, resuspended in 0.2 ml H_2O , and dried again. The residue was then resuspended in 10 μl in electrophoresis buffer (pyridine/acetic acid/water, 5:50:945), pH 3.5. Samples of 2–10 μl were spotted on cellulose-coated plates (E. Merck, Darmstadt, Germany), next to 1 μl of a phosphoamino acid standard solution (phosphoserine, phosphothreonine, and phosphotyrosine, milligram per milliliter each), and analyzed by one-dimensional thin-layer electrophoresis (1000 V, 45 min). Nonradioactive standards were detected with 0.25% ninhydrin in ethanol and radiolabelled phosphorylated amino acids by autoradiography.

CD50 Immunoprecipitation and PTK (Western) Blot Analysis. To control the efficiency of immunoprecipitation, we previously labeled cells with ^{125}I . For this radiolabeling, Jurkat cells were surface-labeled with ^{125}I using Iodogen (Pierce Chemical Co., Rockford, IL) (34). After labeling, 2×10^7 Jurkat cells were lysed in 1 ml lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.5% NP-40, 1 mM NaF, 1 mM PMSF,

20 $\mu\text{l/ml}$ egg white trypsin inhibitor, 1 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin, and 1 $\mu\text{g/ml}$ pepstatin) for 30 min on ice. Nuclei and insoluble debris were removed by centrifugation at 14,000 g for 10 min and lysates precleared with protein A-Sepharose (Pharmacia LKB, Uppsala, Sweden), prewashed in lysis buffer. Immunoprecipitation was performed with the indicated mAb, coupled to CNBr-activated Sepharose CL-4B (Pharmacia LKB) for 1 h at 4°C , washed six times with washing buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 8.0, 0.05% NP-40, 0.05% SDS, and with the above inhibitors) and eluted with $2 \times$ SDS reducing sample buffer. Samples were counted with a γ counter. The same quantity of cpm for each sample was loaded in each lane and samples were run on 8% SDS-PAGE (31), and transferred by electroblotting (4 mA/ cm^2) with glycine transfer buffer (39 mM glycine, 48 mM Tris-base, 1.3 mM SDS, and 20% methanol) to nitrocellulose. SDS-PAGE molecular weight standards (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA) were used. After incubating filters with blocking solution (5% ovalbumin [Sigma Chemical Co., St. Louis, MO] and 3% nonfat milk protein in PBS) overnight at 4°C , blots were incubated with anti-p56^{lck} and anti-p59^{src} diluted to 1:1,000 in blocking solution for 1 h at 20°C . After washing with 0.25% gelatin in PBS, filters were incubated with goat anti-rabbit coupled to peroxidase in blocking solution for 1 h at 20°C . Filters were washed again with 0.25% gelatin in PBS, and the Western blots were developed using Amersham's enhanced chemiluminescence (ECL) reagent (Amersham International).

Results

CD50 (ICAM-3) Cross-linking Induces a Transient Increase in Intracellular Calcium Levels of Jurkat Cells. The ability of three different anti-CD50 mAbs (101-1D2, 152-2D11, and 140-11) to induce a Ca^{2+} mobilization across the membrane of Jurkat cells was analyzed. It has been previously shown that these three mAbs recognize different epitopes of the CD50 (ICAM-3) (3). The results in Fig. 1 show clearly that two of them, namely 101-1D2 and 152-2D11, are able to induce a transient increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ by their binding and cross-linking to Jurkat cells, whereas 140-11 does not induce any change. The Ca^{2+} mobilization obtained with the 101-1D2

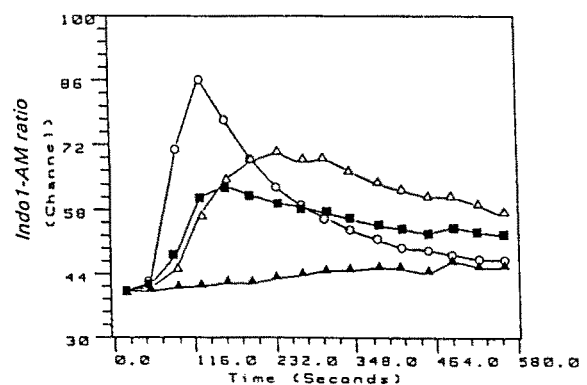


Figure 1. Ca^{2+} mobilization after CD50 cross-linking. Effect of anti-CD3: Cris 7, 1 ng/ml (O-O); and three anti-CD50s, 50 $\mu\text{g/ml}$: 152-2D11 (Δ - Δ); 101-1D2 (\blacksquare - \blacksquare); 140-11 (\blacktriangle - \blacktriangle); cross-linked at 50 s with 10 $\mu\text{g/ml}$ of GAM.

mAb has always been identical or lower than the one observed with the 152-2D11 mAb. The lack of response obtained with the 140-11 mAb, even at the highest dose tested (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), confirms that this mAb and 152-2D11 and 101-1D2 mAbs recognize different functional epitopes of CD50 molecule. As negative controls for calcium mobilization, several mAbs (RM3A5, 124-1D1, and 133-1G6) of different subtypes (IgG2a, IgG1, and IgM, respectively) recognizing different Jurkat membrane antigens have been used. Whereas the binding and cross-linking of these mAb did not induce any detectable $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase, the cross-linking of CD3 has been used as positive control for Ca^{2+} mobilization in all the tested situations (data not shown). The transient increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ obtained by CD50 cross-linking is similar to the effect observed by cross-linking very low doses of anti-CD3 mAb (1 ng/ml) (Fig. 1) (at a higher dose ≥ 10 ng/ml), anti-CD3 mAb is able to induce an increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ without cross-linking by GAM. A singular characteristic of the effect obtained with the CD50 mAb was the fact that although the maximum effect of CD50 cross-linking took longer to be reached than the one obtained by CD3 mAb, the increase of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ observed using CD50 mAbs reached a higher and more sustained plateau than the plateau obtained with CD3 mAb: CD50 effect reached its maximum level at 100–120 s after stimulation (70–100 s with CD3), but it was maintained at a high plateau (higher than CD3 stimulation) for longer than 500 s.

Dose-response experiments were performed using different concentrations of anti-CD50 mAb (Fig. 2 A) and cross-linking antibody (Fig. 2 B). The transient increase $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was shown to be proportional to the amount of anti-CD50 mAb. A minimum effect was observed with a dose as low as 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and the maximum level was reached with oversaturating amounts of mAbs (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Fig. 2 A). Regarding the cross-linking antiserum, the relative increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was proportional to the concentration used, reaching its highest level with oversaturating (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) amounts of GAM (Fig. 2 B). Taking all these data into account, the doses of 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of 152-2D11 and 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of GAM, which were shown to be clearly stimulating, were chosen as standard doses for all subsequent assays.

Simultaneous CD3 and CD50 (ICAM-3) Cross-linking: Involvement of Different Ca^{2+} Sources. When Jurkat cells were treated simultaneously with stimulating concentrations of both CD3 and CD50 mAb, plus GAM, a high increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was observed (Fig. 3 A). The increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was sharper than the one observed when CD3 or CD50 mAbs were used alone, whereas the peak of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ reached under these conditions was similar to the addition of the effects of anti-CD50 and anti-CD3 used separately. Moreover, the increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ using both mAbs simultaneously was prolonged on a level higher than the one obtained using CD3 or CD50 mAb alone. Therefore, the response to both mAb seems to be the addition of each separated response, resulting in a global improvement of the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ signaling.

To better characterize the mechanisms responsible for the effect of anti-CD50 mAb, Ca^{2+} mobilization in Jurkat cells

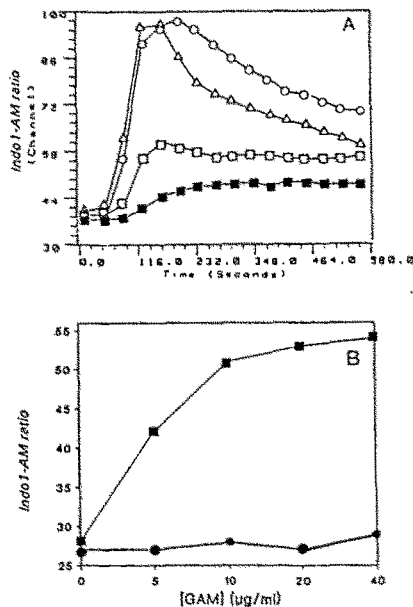


Figure 2. Dose-response analysis on Ca^{2+} mobilization after CD50 cross-linking. (A) Calcium increases at different concentrations of 152-2D11: 100 (O-O), 50 (Δ - Δ), 10 (\square - \square), and 2 (\blacksquare - \blacksquare) $\mu\text{g}/\text{ml}$, cross-linked at 50 s with 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of GAM. (B) INDO 1-AM levels after stimulation with 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of 152-2D11 with different doses of GAM, at 0 s (\bullet - \bullet) and 120 s (\blacksquare - \blacksquare) after cross-linking.

was analyzed in Ca^{2+} -free, EGTA-containing medium before and after the CaCl_2 addition (Fig. 3 B). Under Ca^{2+} -free conditions, a rapid increase could be observed as a result of Ca^{2+} redistribution from intracellular stores; however, this effect was shorter and smaller than the increase observed in medium with Ca^{2+} . The characteristic sustained plateau that is observed stimulating with CD50 mAb and which is higher than the level obtained upon CD3 stimulation, disappeared using Ca^{2+} -free conditions. Subsequent addition (Fig. 3 B, arrow) of Ca^{2+} to the medium (10 μM CaCl_2) induced a further $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase, as a result of the uptake of extracellular Ca^{2+} . This increase achieved a plateau as high as the one obtained using the medium with Ca^{2+} . All these data suggest that the increase in Ca^{2+} obtained by anti-CD50 stimulation is mainly due to the uptake of extracellular Ca^{2+} . This extracellular Ca^{2+} would be responsible for the characteristic prolongation of the increase, whereby the Ca^{2+} from the internal stores would be responsible only for the initial increase, and even in this case in a minor way.

To analyze the role of inositol phospholipid hydrolysis in CD50 Ca^{2+} mobilization, the IP_3 levels on stimulated Jurkat cells were evaluated. After CD50 stimulation with 152-2D11 cross-linking, a slight but clear increase of IP_3 at 15 s (Table 1) was detected; IP_3 increase induced by CD50 mAb was lower than the increase induced by CD3 mAb used as positive control. No IP_3 increase was observed by using GAM

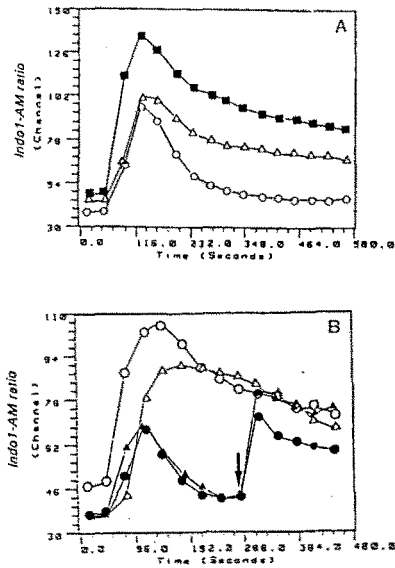


Figure 3. Ca²⁺ mobilization after CD3 and CD50 co-cross-linking, and after CD50 and CD3 individual cross-linking, in absence of extracellular Ca²⁺. (A) Additional effect of the costimulation with anti-CD3 (Cris-7) and anti-CD50 on Jurkat cell line. Cris-7 (O-O), 1 ng/ml; 152-2D11 (Δ-Δ), 50 μg/ml; and 152-2D11 + Cris-7 (■-■), 50 μg/ml + 1 ng/ml; cross-linked at 50 s with 10 μg/ml of GAM. (B) Jurkat cells were stimulated by cross-linking CD3 and CD50 at 50 s in an INDO-1 buffer C with 100 mM EGTA and without CaCl₂ and or with 10 μM CaCl₂ was added at 300 s (arrow). Stimulations in presence of extracellular Ca²⁺ are also presented. Cris-7, 1 ng/ml, with (O-O) and without (●-●) extracellular Ca²⁺, and 152-2D11, 50 μg/ml, with (Δ-Δ) and without (▲-▲) extracellular Ca²⁺, cross-linked at 50 s with 10 μg/ml of GAM.

alone (negative control). Thus, the effect of CD50 stimulation on IP₃ levels correlated perfectly with the initial induction of Ca²⁺ mobilization. This correlation could probably explain the intracellular component of Ca²⁺ increase.

Ca²⁺ Mobilization Induced by CD50 (ICAM-3) Cross-linking Is Mediated by Tyrosine Phosphorylation. To further analyze the signal transduction pathway responsible for the effect of CD50 mAb, the role of tyrosine phosphorylation on the increase in [Ca²⁺]_i (Fig. 4) was studied. Pretreatment of Jurkat

cells for 30 min and throughout the assay with 7.5, 25, 75, and 150 μM of Genistein showed an inhibitory effect on Ca²⁺ mobilization. This inhibition was partial at 7.5, 25, and 75 μM and almost total at 150 μM (Fig. 4 A). Instead, the stimulatory effect of CD3 was only partially inhibited by Genistein (data not shown), blunting the Ca²⁺ increase, as previously described (35). Furthermore, pretreatment of Jurkat cells for 16 h with Herbimycin A at 1 μM also completely prevented the increase in [Ca²⁺]_i induced by CD50 mAbs (Fig. 4 B). As previously described (36), Herbimycin A also totally inhibited CD3 Ca²⁺ mobilization, although an increase in [Ca²⁺]_i induced by A23187 ionophore was completely resistant to both Genistein and Herbimycin A (data not shown).

For a better understanding of the role of PTK in Ca²⁺ mobilization induced by CD50 mAb, the effect of CD45 on this effect was analyzed. A mAb against CD45, which is a molecule with phosphatase activity (37), was incubated simultaneously with CD50 mAb. A total inhibition on the CD50 Ca²⁺ increase was observed with the co-cross-linking of CD50 and CD45 mAb (Fig. 4 C). These data are in agreement with similar observations where phosphatase activity of CD45 was shown to inhibit analogous Ca²⁺ mobilizations dependent on kinase activity (38, 39).

CD50 (ICAM-3) Cross-linking Induces Tyrosine-Phosphorylation of 33- and 40-kD-specific Substrates. The effects of both, PTK inhibitors and CD45 on CD50 induced Ca²⁺ mobilization made us analyze the pattern of tyrosine phosphorylation after CD50 cross-linking. P³²-labeled Jurkat cells (Fig. 5) were treated with CD50 mAb (152-2D11) and cross-linked with GAM for 5 min. After immunoprecipitation with an anti-P-Tyr mAb of the lysates, a remarkable increase in the tyrosine phosphorylation pattern was observed. Especially relevant was the effect on a 33-kD molecule that appeared phosphorylated after CD3 and CD50 stimulation and was absent in the negative control. In addition, a significant increase in the phosphorylation of a 40-kD protein after CD50 cross-linking was also detected.

CD50 (ICAM-3) mAb Coimmunoprecipitates an Associated Tyrosine Kinase Activity: both p56^{lck} and p59^{fyn} PTK Are Detected in Association with CD50. The immunoprecipitate obtained with the three CD50 mAb were tested in an in vitro kinase assay. Fig. 6 A shows the pattern of phosphorylation

Table 1. IP₃ Mobilization after Cross-linking of CD50 Stimulation (pmols/10⁶ Cells)

	0 s	15 s	30 s	1 min	2 min	5 min	10 min	15 min
GAM	0.39	0.23	0.42	0.22	0.20	0.45	0.42	0.19
CD50	0.23	1.00	0.57	0.50	0.62	0.42	0.40	0.22
CD3	0.40	1.20	0.75	0.58	0.50	0.45	0.39	0.41

Jurkat cells were incubated on HBSS medium with 50 μg/ml of anti-CD50 (152-2D11), 1 ng/ml of anti-CD3 (positive control), and GAM alone (negative control), for 20 min at 4°C. Excess antibodies were removed and cells were cross-linked in 1 ml of HBSS medium with 25 μg/ml of GAM. Incubation was carried out for the indicated times and stopped by addition of 200 μl ice-cold perchloric acid 20%. Samples were centrifuged and IP₃ levels of the supernatants were measured with IP₃ ³H assay system (Amersham International).

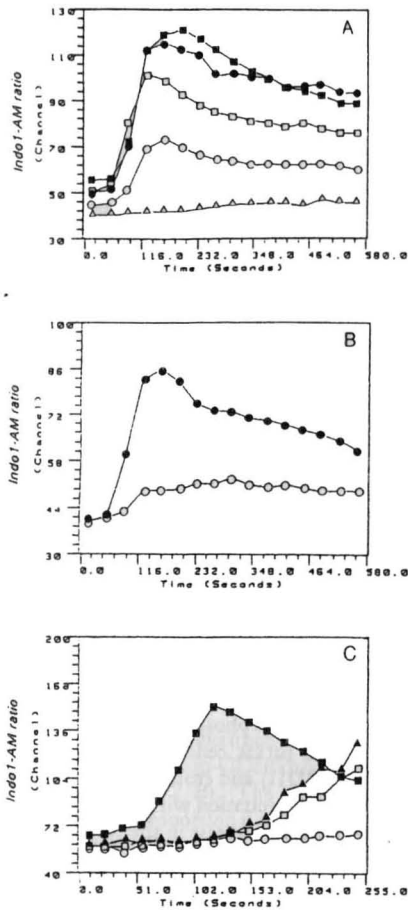


Figure 4. Ca^{2+} mobilization induced after CD50 stimulation is inhibited by Genistein and Herbimycin A treatment and after co-cross-linking of CD50 and CD45. (A) Inhibition effect of Genistein at 0 (■-■), 7.5 (●-●), 25 (□-□), 75 (○-○), and 150 (△-△) μ M in CD50 stimulation. (B) Inhibition effect of Herbimycin A at 0 (●-●) and 1 (○-○) μ M. (C) Inhibition effect of co-cross-linking with anti-CD45 (72-5D3) and anti-CD50 (152-2D11). 152-2D11 (■-■), 50 μ g/ml; 72-5D3 (□-□), 50 μ g/ml; 152-2D11 + 72-5D3 (▲-▲), 50 μ g/ml + 50 μ g/ml; cross-linked at 50 s with 10 μ g/ml of GAM and (○-○) only GAM.

obtained when 1% Triton X-100 was used as detergent. A specific phosphorylation of a 31-kD molecule was observed, confirming the presence of a kinase activity associated with the CD50 molecule, contrasting with the lack of phosphorylation after immunoprecipitating with a negative control mAb (anti-CD27). In addition, we had previously shown that washing in 1 M $MgCl_2$ is able to eliminate all the associated molecules without eluting CD50 molecule from the mAb binding (3). The results in Fig. 6 A show that the kinase activity was eluted by using 1 M $MgCl_2$ washing buffer, suggesting that this kinase activity was not intrinsically due to the CD50 molecule. To assess the type of phosphorylation, the 31-kD phosphorylated protein was hydrolyzed and

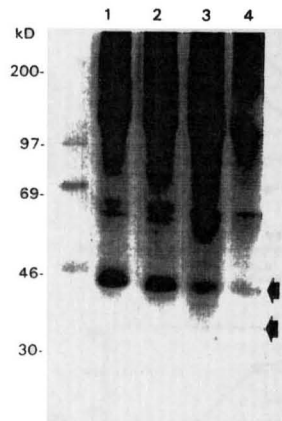


Figure 5. Immunoprecipitation of Jurkat cells lysates stimulated by CD50, with anti-P-Tyr. Jurkat cells were incubated with [^{32}P]orthophosphate for 3 h and stimulated by 152-2D11, CD50 (lane 1), Cris-7, CD3 (lane 2) and PMA (lane 3). Lane 4 shows basal phosphorylation without stimulation. CD50 cross-linking induces tyrosine-phosphorylation of 33- and 40-kD-specific substrates (arrows).

subjected to phosphoamino acid analysis which showed a phosphorylation on tyrosine residues (Fig. 6 B). To further confirm these results, an in vitro kinase assay with 1% digitonin buffer was performed. This procedure produced a stronger and more complex pattern of phosphorylation, which also included the 31-kD molecule. The kinase activity was also washed out by using 1 M $MgCl_2$ solution (Fig. 6 C), thus confirming the previous observation. Negative controls with mAb against unrelated Jurkat molecules (CD7 and CD27) did not show any kinase activity. Among the phosphorylated proteins there were two phosphorylated molecules whose molecular masses suggested that they could correspond to the previously described PTK, p56^{lck}, and p59^{fyn}. Generally both PTK become autophosphorylated (32, 40) in in vitro kinase assays, and those labeled bands on the digitonin pattern could correspond to them. To better characterize the tyrosine kinase-associated activity and to confirm the presence of lck and/or fyn PTK, the immunoprecipitates were tested by Western blotting analysis with anti-lck and anti-fyn rabbit antisera. Fig. 7 shows that CD50 mAb coimmunoprecipitated both a 56-kD lck protein and a 59-kD fyn PTK.

Discussion

Identified as ICAM-3, an adhesion molecule involved in the initiation of immune responses, the role of CD50 seems restricted to being a new counter-receptor of LFA-1, a main molecule in leukocyte interactions (1, 2). In spite of the resemblances to the other ICAMs, important CD50 differences (cell distribution, cell inductions, intracytoplasmic domain, phosphorylation by PKC stimulation) lead us to suggest a different role for this molecule, probably through its intracytoplasmic domain.

In this paper, data are presented showing that an ICAM molecule, CD50 (ICAM-3), is able to transduce signals in a T cell line. One of the most outstanding characteristics of this signal transduction is the Ca^{2+} mobilization. Assays using CD50 and CD3 mAb cross-linking (Fig. 1) allowed

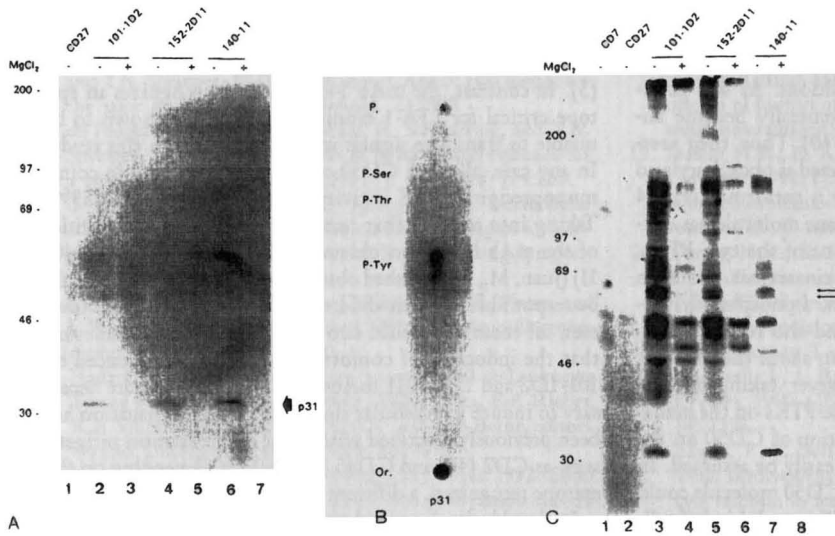


Figure 6. Kinase activity associated with immunoprecipitates of CD50. (A) In vitro kinase assay of immunoprecipitates from Triton X-100 lysates: 143-14 (CD27; negative control, lane 1); 101-1D2 (CD50, lane 2); 152-2D11 (CD50, lane 4); and 140-11 (CD50, lane 6). CD50 immunoprecipitates were also analyzed after washing out with 1 M MgCl₂: 101-1D2 (lane 3); 152-2D11 (lane 5); and 140-11 (lane 7). Arrow shows a 31-kD phosphorylated molecule. (B) Phosphoamino acid analysis of a 31-kD molecule (p31). (C) In vitro kinase assay of CD50 immunoprecipitates from digitonin lysates: 124-1D1 and 143-14 (CD7 and CD27 respectively; negative controls, lanes 1 and 2); 101-1D2 (CD50, lane 3); 152-2D11 (CD50, lane 5); and 140-11 (CD50, lane 7). CD50 immunoprecipitates were also analyzed after washing out with 1 M MgCl₂: 101-1D2 (lane 4); 152-2D11 (lane 6); and 140-11 (lane 8). Arrows show two phosphorylated molecules, probably corresponding to autophosphorylation of lck and fyn PTK.

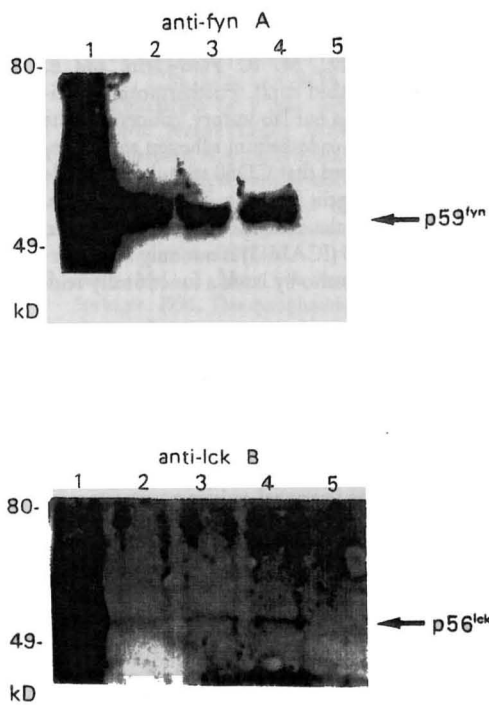


Figure 7. Western blot analysis of CD50 immunoprecipitates with rabbit polyclonal antiserum to p59^{fyn} (A) and p56^{lck} (B). Total lysate of Jurkat (lane 1); immunoprecipitates of 101-1D2 (CD50, lane 2), 152-2D11 (CD50, lane 3), 140-11 (CD50, lane 4), and 143-14 (CD27, lane 5, negative control).

us to compare both signaling pathways. The most striking difference is that the CD50 mAb produces a slower, blunter, and steadier increase of Ca²⁺ than the CD3 mAb. From the data shown in Fig. 3 B, it comes out that both CD3 and CD50 mAb mobilize Ca²⁺ from both sources, that is, internal stores and extracellular input; however, it seems that the extracellular Ca²⁺ mobilization, through CD50 mAb stimulation, is more intense and prolonged than the release of intracellular stores. Moreover, the effect of simultaneous stimulation with CD3 and CD50 mAbs (Fig. 3 A) showed an increase of [Ca²⁺]_i that was more complex than the simple addition of each individual stimulation. These two sets of data, analysis of the Ca²⁺ sources and costimulation with CD3 and CD50 mAb, suggest that both stimulating molecules involve both, a common as well as a different signal transduction pathway.

Regarding the factors that regulate Ca²⁺ mobilization, from the results presented in this paper, it appears that both IP₃ metabolism and phosphorylation are playing a role. Taking into consideration both, the IP₃ increase and the Ca²⁺ mobilization from the internal stores, it appears that the low participation of the intracellular stores could be associated with the low levels of IP₃ observed after CD50 cross-linking. Furthermore, the complete blockade of Ca²⁺ uptake in the presence of PTK inhibitors (Herbimycin A and Genistein), suggests that a PTK activity could be associated with CD50. In addition, in vitro kinase assays of CD50 immunoprecipitates showed the presence of a kinase activity associated with CD50 rather than inherent in the CD50 molecule. Moreover, a PTK stimulation was also responsible for

a very important increase of the tyrosine phosphorylation of several substrates including a 33- and a 40-kD proteins. This 40-kD protein could be the equivalent to the substrate observed after CD2 and CD3 stimulation (41). Finally, the Western blot analysis with specific antisera against two well-characterized PTKs, p56^{lck}, and p59^{fyn}, suggest that both kinases could be involved in CD50 signaling processes. This double association could explain two phosphorylated bands present in the phosphorylation pattern of *in vitro* kinase assays developed in digitonin detergent conditions. As was previously described, *fyn* and *lck* PTKs generally become autophosphorylated upon activation (32, 40). Thus, their presence, on an immunoprecipitation, is detected as phosphorylated molecules when a *in vitro* kinase assay is performed (Fig. 4 C, arrows). Although a defined membrane molecule has usually been associated exclusively with one of the two PTKs, the simultaneous association of both kinases has also been described with TCR-CD3 (42), CD55, a phosphatidylinositol linked membrane protein (43), and also recently with CD2 (44). These data raise the question about the different roles played by p56^{lck} and p59^{fyn}. However, taking into account the differential expression of these PTKs on the hematopoietic cells, a different PTK association of CD50 on the different hematopoietic lineages could easily be assumed. In this context, the broad distribution of CD50 molecule could imply a different functional role of CD50 in each kind of cell.

How CD50 interacts with both PTKs is one of the most interesting aspects to be analyzed. In the absence of experimental data, we could assume that the intracytoplasmic domain is responsible for CD50 binding with both PTKs. The interaction between CD50 and the different PTKs could be regulated through CD50 serine phosphorylations, in a similar way as the one that has been described for CD4 molecule. CD4, like CD50, presents three phosphorylated serine residues when T cells are activated by antigen or phorbol esters (45). These serines are placed next to the p56^{lck} recognition site in the CD4 molecule (46). However, the characteristic cysteine motif (46) of *lck*-CD4/CD8 interaction is not present in CD50. Likewise, an indirect association of CD50 with a multimolecular complex formed by the antigen receptor, CD4 or CD8, HLA, CD2, and CD5 (47) could not be ruled out. Moreover, we have observed that when CD50

mAb are co-cross-linked with CD45 mAb, the functional effects of CD50 are abrogated (Fig. 4 C). That means that the function of the CD50-associated PTKs seems to be regulated by CD45 phosphatase.

It is important to point out that the CD50 signal transduction capacity, described in this paper (Ca²⁺ mobilization or PTK activity induction), is clearly observed by using both 101-1D2 and 152-2D11 mAbs. These two mAbs recognize two different CD50 epitopes not related to LFA-1 binding (3). In contrast, the mAb 140-11, which recognizes an epitope critical for LFA-1 binding (3), has been shown to be unable to transduce signals in the assays used in this study. In any case, all three CD50 mAbs used were able to coimmunoprecipitate PTK activity as well as p56^{lck} and p59^{fyn}. Taking into account that certain differences in the affinities of the mAb have been observed (152-2D11 > 101-1D2 > 140-11) (Juan, M., unpublished observation), these differences could be responsible for their different activation capability. However, all these data could also be interpreted by considering that the induction of conformational changes produced by 101-1D2 and 152-2D11 mAbs on CD50 molecule are necessary to induce intracellular signaling. A similar situation has been previously described with other differentiation antigens such as CD2 (48) and CD45 (49), where, depending on the epitope recognized, a different functional effect was observed.

It should also be noted that the transduction of signals could be a bidirectional process, where the binding of CD50 to its counter-receptor, LFA-1, would trigger both molecules to send intracellular signals that would help in the cell activation process. It has also been observed that CD50 cross-linking induced CD25 expression and IL-2 production after PMA stimulation (Juan, M., M. R. Pino-Otín, and E. Martínez-Cáceres, unpublished data). Furthermore, experiments carried out recently in our laboratory, concerning the role of CD50 in lymphocyte-endothelium adhesion and homotypic aggregation (50) showed that CD50 stimulation is able to enhance β 1 and β 2 integrin function in T lymphocytes. These data, together with the data described in this paper, strongly suggest that CD50 (ICAM-3) is not only a counter-receptor for LFA-1, but it is also by itself a functionally relevant signaling molecule.

We would like to thank Drs. K. Campbell, P. André, and J. Cambier (National Jewish Center, Denver, CO) for their help in the INDO 1-AM cell labeling; Dr. R. M. Perlmutter and Dr. J. Alberola-Ila for kindly providing anti-*lck* and anti-*fyn* antibodies; Dr. M. Cid and Dr. F. Lozano for critical reading of the manuscript and suggestions; and M. Bayo and C. Moreno for secretarial assistance.

This work was supported by "Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social" grants 91/0166, 93/0716, and 94/0944, and by "Dirección General de Investigación Científica y Técnica" grant PM92-0190. M. R. Pino-Otín and A. Miralles are recipients of a predoctoral fellowship from "Pla de Recerca de la Generalitat de Catalunya." M. Juan and E. Martínez-Cáceres are recipients of a predoctoral fellowship from "Hospital Clínic i Provincial."

Address correspondence to Dr. Manel Juan, Servei d'Immunologia, c/Villarroel 170, Hospital Clínic, 08036 Barcelona, Spain.

Received for publication 8 September 1993 and in revised form 15 February 1994.

1754 Signal Transduction through CD50 (ICAM-3)

References

1. Springer, T.A. 1990. Adhesion receptors of the immune system. *Nature (Lond.)* 346:425.
2. Kishimoto, T.K., R.S. Larson, A.L. Corbí, M.L. Dustin, D.E. Stauton, and T.A. Springer. 1989. The leucocyte integrins: LFA-1, Mac-1 and p150,95. *Adv Immunol.* 46:149.
3. Juan, M., R. Vilella, J. Milà, J. Yagüe, A. Miralles, K.S. Campbell, R.J. Friedrich, J. Cambier, J. Vives, A.R. De Fougerolles, and T.A. Springer. 1993. CD50 and ICAM-3: two names for the same molecule. *Eur. J. Immunol.* 23:1508.
4. de Fougerolles, A.R., S.A. Stacker, R. Schwarting, and T.A. Springer. 1991. Characterization of ICAM-2 and evidence for a third counter-receptor for LFA-1. *J. Exp. Med.* 174:253.
5. de Fougerolles, A.R., and T.A. Springer. 1992. Intercellular adhesion molecule 3, a third adhesion counter-receptor for lymphocyte function-associated molecule 1 on resting lymphocytes. *J. Exp. Med.* 175:185.
6. Vilella, R., J. Milà, F. Lozano, J. Alberola-Ila, L. Places, and J. Vives. 1990. Involvement of the CD50 molecule in allorecognition. *Tissue Antigens.* 36:203.
7. Hadam, M.R. 1989. N11 Cluster report: CD50. In *Leukocyte Typing IV*. W. Knapp, B. Dörken, W.R. Gilks, E.P. Rieber, R.E. Schmidt, H. Stein, and A.E.G.K. von dem Borne, editors. Oxford University Press, Oxford. 667-670.
8. Lozano, F., J. Alberola-Ila, L. Places, and J. Vives. 1992. Effect of protein kinase C activators on the phosphorylation and the surface expression of the CD50 leukocyte antigen. *Eur. J. Biochem.* 203:321.
9. Fawcett, J., C.L.L. Holness, L.A. Needham, H. Turley, K.C. Gatter, D.Y. Mason, and D.L. Simmons. 1992. Molecular cloning of ICAM-3, a third ligand for LFA-1, constitutively expressed on resting leukocytes. *Nature (Lond.)* 360:481.
10. Vazeux, R., P.A. Hoffman, J.K. Tomita, E.S. Dickinson, R.L. Jasnian, T. St. John, and W.M. Gallatin. 1992. Cloning and characterization of a new intercellular adhesion molecule ICAM-R. *Nature (Lond.)* 360:485.
11. de Fougerolles, A.R., L.B. Klickstein, and T.A. Springer. 1993. Cloning and expression of intercellular adhesion molecule 3 reveals strong homology to other immunoglobulin family counter-receptors for lymphocyte function-associated antigen 1. *J. Exp. Med.* 177:1187.
12. Hibbs, M.L., S. Jakes, S.A. Stacker, R.W. Wallace, and T.A. Springer. 1991. The cytoplasmic domain of the integrin lymphocyte function-associated antigen 1 β subunit: sites required for binding to intercellular adhesion molecule 1 and the phorbol ester-stimulated phosphorylation site. *J. Exp. Med.* 174:1227.
13. Pardi, R., J.R. Bender, C. Dettori, E. Giannazza, and E.G. Engleman. 1989. Heterogeneous distribution and transmembrane signaling properties of lymphocyte function-associated antigen (LFA-1) in human lymphocyte subsets. *J. Immunol.* 143:3157.
14. Wacholtz, M.C., S.S. Patel, and P.E. Lipsky. 1989. Leukocyte function-associated antigen 1 is an activation molecule for human T cells. *J. Exp. Med.* 170:431.
15. van Seventer, G.A., E. Bonvini, H. Yamada, A. Conti, S. Stringfellow, C.H. June, and S. Shaw. 1992. Costimulation of T cell receptor/CD3-mediated activation of resting human CD4⁺ T cells by leukocyte function-associated antigen-1 ligand intercellular cell adhesion molecule-1 involves prolonged inositol phospholipid hydrolysis and sustained increase of intracellular Ca²⁺ levels. *J. Immunol.* 149:3872.
16. Moy, V.T., and A.A. Brian. 1992. Signaling by lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1) in B cells: enhanced antigen presentation after stimulation through LFA-1. *J. Exp. Med.* 175:1.
17. Kuhlman, P., V.T. Moy, B.A. Lollo, and A.A. Brian. 1991. The accessory function of murine intercellular adhesion molecule-1 in T lymphocyte activation. *J. Immunol.* 146:1773.
18. Fischer, H., A. Gjørloff, G. Hedlund, H. Hedman, E. Lundgren, T. Kalland, H.O. Sjögren, and M. Dohlsten. 1992. Stimulation of human naive and memory T helper cells with bacterial superantigen. *J. Immunol.* 148:1993.
19. Damle, N.K., K. Klussman, P.S. Linsley, A. Aruffo, and J.A. Ledbetter. 1992. Differential regulatory effects of intercellular adhesion molecule-1 on costimulation by the CD28 counter-receptor B7. *J. Immunol.* 149:2541.
20. Damle, N.K., K. Klussman, and A. Aruffo. 1992. Intercellular adhesion molecule-2, a second counter-receptor for CD11a/CD18 (leukocyte function-associated antigen-1), provides a costimulatory signal for T-cell receptor-initiated activation of human T cells. *J. Immunol.* 148:665.
21. Martorell, J., I. Rojo, A. Vilella, E. Martínez-Cáceres, and J. Vives. 1990. CD27 induction on thymocytes. *J. Immunol.* 145:1356.
22. Engels, P., C. Serra, G. Acevedo, R. Vilella, and T. Gallart. 1992. Involvement of CD18 and CD54 in the mixed lymphocyte reaction to leukemic CD5⁺ B lymphocytes. *Inmunología.* 11:21.
23. Martorell, J., R. Vilella, L. Borche, I. Rojo, and J. Vives. 1987. A second signal for T cell mitogenesis provided by monoclonal antibodies CD45 (T200). *Eur. J. Immunol.* 17:1447.
24. Reiter, C. 1989. Cluster report: CD7. In *Leukocyte Typing IV*. W. Knapp, B. Dörken, W.R. Gilks, E.P. Rieber, R.E. Schmidt, H. Stein, and A.E.G.K. von dem Borne, editors. Oxford University Press, Oxford. 341-342.
25. Cuvreur, B., A.M. Ravoet, D. Latinne, M. de Bruyère, J. Ninane, and G. Sokal. 1989. Activation antigens precipitated by the fourth workshop mAb: new and previously defined clusters. In *Leukocyte Type IV*. W. Knapp, B. Dörken, W.R. Gilks, E.P. Rieber, R.E. Schmidt, H. Stein, and A.E.G. K. von dem Borne, editors. Oxford University Press, Oxford. 667-670.
26. Marth, J.D., D.B. Lewis, C.B. Wilson, M.E. Gearn, E.G. Krebs, and R.M. Perlmutter. 1987. Regulation of pp56^{lck} during T-cell activation: functional implications for the src-like protein tyrosine kinases. *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J.* 6:2727.
27. Cooke, M.P., and R.M. Perlmutter. 1989. Expression of a novel form of the *fyn* proto-oncogene in hematopoietic cells. *New Biol.* 1:66.
28. Justement, L.B., J. Wienands, J. Hombach, M. Reth, and J.C. Cambier. 1990. Membrane IgM and IgD molecules fail to transduce Ca²⁺ mobilizing signals when expressed on differentiated B lineage cells. *J. Immunol.* 144:3272.
29. Alberola-Ila, J., L. Places, F. Lozano, and J. Vives. 1993. Association of an activation inducible serine kinase activity with CD5. *J. Immunol.* 151:4423.
30. Lozano, F., J. Alberola-Ila, L. Places, T. Gallart, and J. Vives. 1990. Phosphorylation-mediated changes in the electrophoretic mobility of CD5 molecules. *Eur. J. Biochem.* 193:469.
31. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature (Lond.)* 227:680.
32. Samelson, L.E., A.F. Phillips, E.T. Luong, and R.D. Klausner. 1991. Association of the *fyn* protein-tyrosine kinase with the

- T-cell receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:4358.
33. Oettingen, H.C., C.L. Pettey, W.L. Maloy, and C. Terhorst. 1986. A T3-like protein associated with the antigen receptor on murine T cells. *Nature (Lond.)* 320:272.
 34. Markwell, M.A.K., and C.F. Fox. 1978. Surface-specific iodination of membrane proteins of viruses and eucaryotic cells using 1,3,4,6-tetrachloro-3 α ,6 α -diphenylglycoluril. *Biochemistry* 17:4807.
 35. Trevillyan, J.M., Y. Lu, D. Atluru, C.A. Phillips, and J.M. Bjorn Dahl. 1990. Differential inhibition of T cell receptor signal transduction and early activation events by a selective inhibitor of protein-tyrosine kinase. *J. Immunol.* 145:3223.
 36. June, C.H., M.C. Fletcher, J.A. Ledbetter, G.L. Schieven, J.N. Siegel, A.F. Phillips, and L.E. Samelson. 1990. Inhibition of tyrosine phosphorylation prevents T-cell receptor-mediated signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:7722.
 37. Tonks, N.K., H. Charbonneau, C.D. Diltz, E.H. Fischer, and K.A. Walsh. 1988. Demonstration that the leukocyte common antigen CD45 is a protein tyrosine phosphatase. *Biochemistry* 27:8695.
 38. Samelson, L.E., M.C. Fletcher, J.A. Ledbetter, and C.H. June. 1990. Activation of tyrosine phosphorylation in human T cells via the CD2 pathway. Regulation by the CD45 tyrosine phosphatase. *J. Immunol.* 145:2448.
 39. Ledbetter, J.A., G.L. Schieven, F.M. Uckun, and J.B. Imboden. 1991. CD45 cross-linking regulates phospholipase C activation and tyrosine phosphorylation of specific substrates in CD3/Ti-stimulated T cells. *J. Immunol.* 146:577.
 40. Veillette, A., M.A. Bookman, E.M. Horak, and J.B. Bolen. 1988. The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56^{lck}. *Cell.* 55:301.
 41. Ley, S.C., A.A. Davies, B. Druker, and M.J. Crumpton. 1991. The T-cell receptor/CD3 complex and CD2 stimulate the tyrosine phosphorylation of indistinguishable patterns of polypeptides in the human T leukemic cell line Jurkat. *Eur. J. Immunol.* 21:2203.
 42. Malissen, B., and A.M. Schmitt-Verhulst. 1993. Transmembrane signalling through the T-cell-receptor-CD3 complex. *Curr. Opin. Immunol.* 5:324.
 43. Shenoy-Scaria, A.M., J. Kwong, T. Fujita, M.W. Olszowy, A.S. Shaw, and D.M. Lublin. 1992. Signal transduction through decay-accelerating factor: interaction of glycosyl-phosphatidylinositol anchor and protein tyrosine kinases p56^{lck} and p59^{lyn}. *J. Immunol.* 149:3535.
 44. Carmo, A.M., D.W. Mason, and A.D. Beyers. 1993. Physical association of the cytoplasmic domain of CD2 with the tyrosine kinases p56^{lck} and p59^{lyn}. *Eur. J. Immunol.* 23:2196.
 45. Shin, J., C. Doyle, Z. Yang, D. Kappes, and J.L. Strominger. 1990. Structural features of the cytoplasmic region of CD4 required for internalization. *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J.* 9:425.
 46. Turner, J.M., M.H. Brodsky, B.A. Irving, S.D. Levin, R.M. Perlmutter, and D.R. Littman. 1990. Interaction of the unique n-terminal region of Tyrosine Kinase p56^{lck} with cytoplasmic domains of CD4 and CD8 is mediated by cysteine motifs. *Cell.* 60:755.
 47. Beyers, A.D., L.L. Spruyt, and A.F. Williams. 1992. Molecular associations between the T-lymphocyte antigen receptor complex and the surface antigens CD2, CD4 or CD8 and CD5. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:2945.
 48. Friedrich, B., D.A. Cantrell, and M. Gullberg. 1989. Evidences for protein kinase C. Activation in T lymphocytes by stimulation of either the CD2 or CD3 antigens. *Eur. J. Immunol.* 19:17.
 49. Alsinet, E., J. Inglés-Esteve, R. Vilella, F. Lozano, J. Milà, I. Rojo, J. Martorell, J. Vives, and A. Gayà. 1990. Differential effects of anti-CD45 monoclonal antibody on human B cell proliferation: a monoclonal antibody recognizing a neuraminidase-sensitive epitope of the T200 molecule enhances anti-immunoglobulin-induced proliferation. *Eur. J. Immunol.* 20:2801.
 50. Cid, M.C., J. Esparza, M. Juan, A. Miralles, J. Ordi, R. Vilella, A. Urbano-Márquez, A. Gayà, J. Vives, and J. Yagüe. 1994. Signaling through CD50 (ICAM-3) stimulates T lymphocyte binding to human umbilical vein endothelial cells and extracellular matrix proteins via an increase in β 1 and β 2 integrin function. *Eur. J. Immunol.* In press.

4.4.3.- ANEX: RELACIÓ DE L'ESTIMULACIÓ CEL·LULAR DEL CD50 AMB LA INDUCCIÓ D'EFFECTES CEL·LULARS QUE EVIDENCIÏN ACTIVACIÓ.

4.4.3.1.- INTRODUCCIÓ:

En paral·lel a les dades presentades en aquest article, vàrem analitzar l'efecte que l'estimulació amb CD50 produïa a nivell de certs marcadors cel·lulars d'activació. Així, emprant la mateixa línia cel·lular T (Jurkat), vàrem mesurar l'efecte activador de l'entrecreuament del CD50 emprant dos ben documentats marcadors d'activació cel·lular T, la producció d'IL-2 i la inducció de la cadena α del receptor de la IL-2, també anomenada CD25.

4.4.3.2.- MATERIAL I MÈTODES:

4.4.3.2.1 Immunofluorescència (IF). 1 milió de cèl·lules Jurkat varen ésser incubades durant 20 min a 4° C amb 50 μ g/ml dels diversos AcMos anti-CD50 (152-2D11, 101-1D2 i 140-11), 100 ng/ml d'anti-CD3 (Cris-7) [23], o sense cap AcMo. L'excès d'anticòs va ser rentat per centrifugació i els *pellets* cel·lulars van ser resuspendos amb 1 ml de medi de cultiu amb 10% FCS amb o sense 10 μ g/ml de GAM. Es varen incubar les cèl·lules així tractades durant 72 h. L'expressió en superfície del CD25 s'analitzà per IF directa: després d'un rentat amb tampó d'IF (PBS + 2% FCS + 0,1% NaN₂), les cèl·lules varen ser tractades primer amb concentracions saturants de sèrum de ratolí (per a bloquejar les interaccions amb els llocs d'unió romanents del GAM unit) durant 15 min a 4°C, re-incubades per 30 min més amb anti-CD25^{PE}, rentades dos cops més, amb tampó d'IF i analitzades amb el citofluorímetre FACStar-plus (Becton Dickinson, Mountain View, CA).

4.4.3.2.1 Producció d'IL-2. 1 milió de cèl·lules Jurkat varen ésser incubades amb 50 μ g/ml dels diversos AcMos anti-CD50 (152-2D11, 101-1D2 i 140-11) o 100 ng/ml d'anti-CD3 (Cris-7), durant 20 min a 4°C. L'excès d'anticòs va

ser rentat per centrifugació i els *pellets* cel·lulars van ser resuspesos amb 1 ml de medi de cultiu amb 10% FCS amb o sense 10 µg/ml de GAM, i en absència o presència de 10 ng/ml de PMA (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO). Es varen incubar les cèl·lules així tractades durant 24 h i es va mesurar la producció d'IL-2 utilitzant un *kit* d'enzim-immunoassaig (Immunotech, Marseille, France) seguint les especificacions del fabricant. Les dades s'expressen amb pg/ml.

4.4.3.3.- RESULTATS:

L'entrecreuament dels anti-CD50 amb GAM sobre cèl·lules Jurkat va demostrar, després de 72 h d'incubació, que l'estimulació amb CD50 és capaç d'induir l'expressió en membrana de la cadena α del receptor de la IL-2, el CD25 (Figura 1). Per altre banda l'anàlisi de la secreció d'IL-2 produïda per

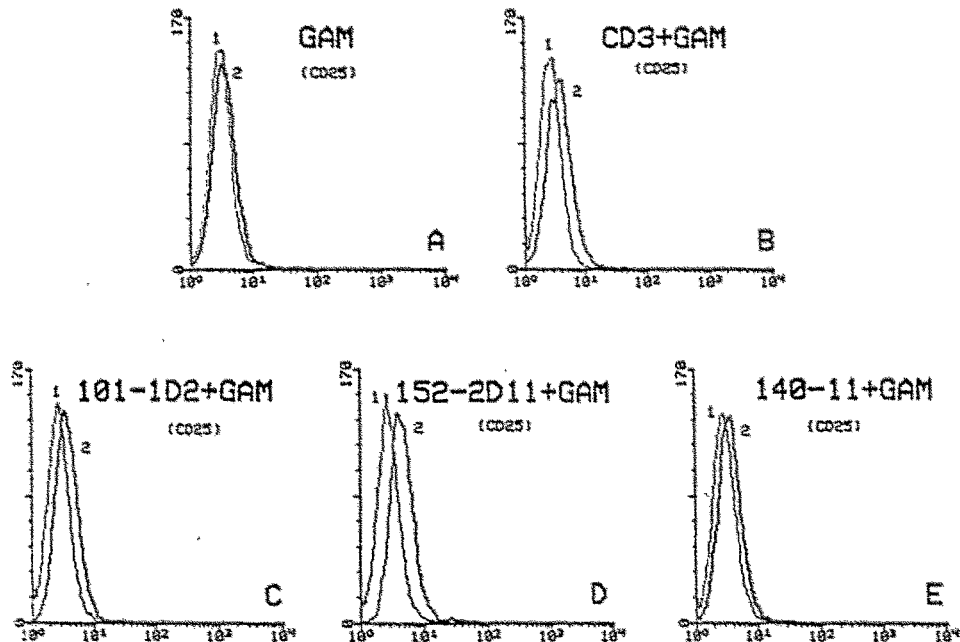


Figura 1. Inducció de l'expressió de CD25 per l'estimulació de l'entrecreuament ⁽²⁾ de: (A) GAM, (B) Cris-7 (CD3), (C) 101-1D2 (CD50), (D) 152-2D11 (CD50) and (E) 140-11 (CD50) respecte a la fluorescència basal de cèl·lules no-estimulades⁽¹⁾.

l'entrecreuament del CD50, va demostrà la capacitat d'aquesta molècula per induir la producció d'IL-2 (Figura 2). Així l'estimulació amb qualsevol dels dos anti-CD50 (10 µg/ml) estimuladors, 101-1D2 i 152-2D11, especialment en presència de PMA, indueix una clara producció de la citocina IL-2. Per contra, l'AcMo 140-11 s'ha mostrat sempre incapaç d'induir cap efecte activador, en consonància amb la incapacitat d'aquest AcMo per a induir la mobilització de Ca²⁺.

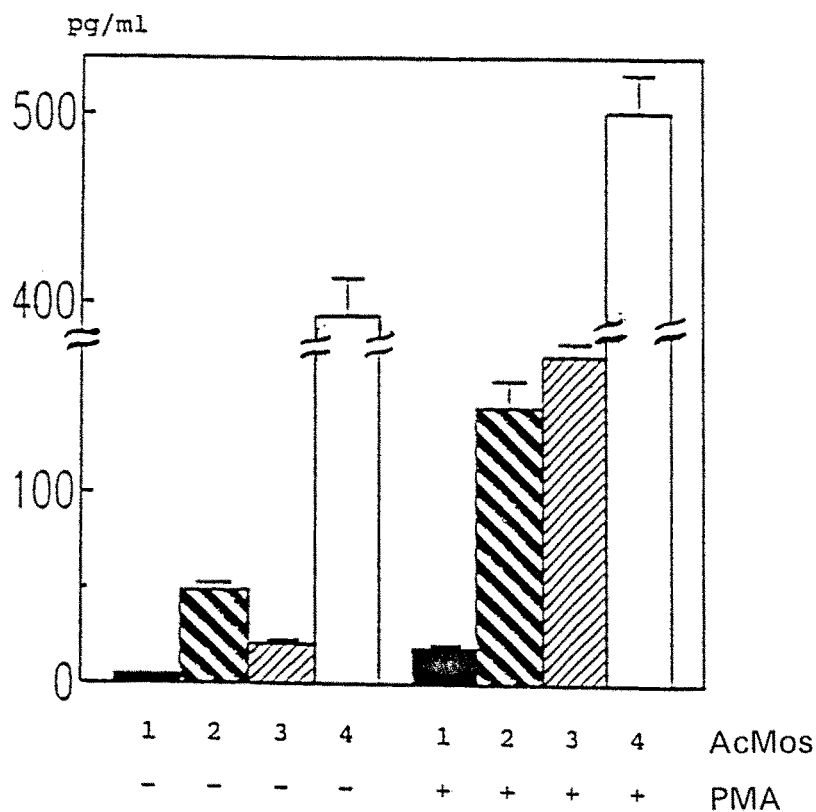


Figura 2. Inducció de la producció d'IL-2, per l'estimulació amb anti-CD50 [140-11 (1), 152-2D11 (2), 101-1D2 (3)] i anti-CD3 [Cris-7 (4)] en presència (+) o absència (-) de PMA. La producció d'IL-2 va ser mesurada mitjançant un assaig enzimàtic comercial (Immunotech). Les dades s'expressen en pg/ml.

4.4.3.3.- DISCUSSIÓ:

En aquest anex demostrem que l'estimulació a través del CD50 és capaç d'induir l'expressió de CD25 en membrana i la producció d'IL-2, dos ben coneguts marcadors d'activació dels limfòcits T. Aquestes dades, en plena consonància amb les de l'article de l'estudi bioquímic de les vies de transducció de senyals, junt als resultats de l'article previ sobre la capacitat inductora de la funció integrina (Capítol III), recolzen la hipòtesi que dibuixa el CD50, no només com el tercer contra-receptor del LFA-1, sinó també com una molècula transductora de senyals per sí mateixa. Així a través del CD50, la cèl·lula podrà rebre un senyal que col·labori en l'activació necessària per a assolir l'activació efectiva de les cèl·lules T.

CAPÍTOL V

4.5.- ANÀLISI DEL GEN DEL CD50 HUMÀ POLIMORFISMES GENÒMICS DEL CD50 (RFLP).

4.5.1.- RESUM.

Per tal de poder fer una primera determinació del mapa genètic del CD50, optarem per analitzar-ho mitjançant l'estudi del Polimorfisme en la Longitud dels Fragments de Restricció (RFLP). D'aquesta manera, detectarem l'existència de dos al·lelismes en les digestions enzimàtiques amb les endonucleases de restricció PstI i BamHI.

Aquestes dades obren una metodologia de fàcil accés per a detectar en els individus heterozigots (més d'un 50% dels casos si es tenen en compte els dos polimorfismes) els dos al·lels. Així no només seria possible detectar deleccions d'aquest gen (processos tumorals, immunodeficiències, ...), sinó també estudiar si existeix alguna relació amb certes patologies.

4.5.2.- INTRODUCCIÓ.

La mutació puntual nucleotídica dona lloc a l'existència de polimorfismes genètics poblacionals, de vegades detectables per l'aparició de Polimorfismes en la Longitud dels Fragments de Restricció (RFLPs), patrons electroforètics dels fragments de DNA productes de la digestió selectiva amb endonucleases de restricció. La descripció de polimorfismes genètics, en alguns casos, ha demostrat ésser de gran valor en el diagnòstic i pronòstic de determinades patologies, o al contrari en la resistència a certes malalties [1,2]. Així, les mutacions puntuals en el gen que codifica per al lligand del CD40 (CD40L) s'han demostrat responsables de l'aparició de la immunodeficiència primària amb hiper-IgM [3,4].

Seguint les pases d'altres polimorfismes descrits en el nostre laboratori, al respecte d'altres molècules de membrana limfocitària, com el polimorfisme per a RsaI del gen del CD27 [5], vàrem analitzar els patrons de restricció genòmics del gen del CD50. Els resultats presentats demostren la presència de dos polimorfismes, un per a l'enzim PstI i un altre per a BamHI.

4.5.3.- MATERIAL I MÈTODES.

4.5.3.3. Purificació de DNA eucariòtic.

Es vàren utilitzar DNAs purificats per extracció fenòlica, a partir de la lisi cel·lular i extracció del DNA [solució d'extracció de DNA: 0,1 M EDTA, 1 % de Sarcosil sòdic + 200 µg/ml de Proteinasa K (Boehringer Mannheim) afegit en fresc] de PBLs procedents de 100 individus sans.

4.5.3.2. Digestió dels DNA amb endonucleases de restricció.

Cada enzim de restricció té la seva temperatura (i de vegades altres condicions especials) i unes condicions de salinitat i pH, però per als casos dels enzims que ens ocupen, PstI i BamHI, les digestions es vàren fer afegint-hi 40 U d'enzim per als 12 µg de DNA que digerírem (quatre vegades més que el que defineix 1 U d'enzim), i incubant-ho a 37°C durant 2 h, el doble del temps necessari. D'aquesta manera s'assegura la digestió total de la mostra. Després comprovàrem la qualitat de les digestions corrent en un gel d'agarosa 2 µg del DNA digerit. També es feren digestions amb EcoRI, HindIII, RsaI, BstXI, BglII, Sall i XhoI.

4.5.3.3 Southern blot. Hibridacions de les membranes.

Després de córrer, en un gel d'agarosa al 0,8%, els 10 µg de DNA

digerit, vàrem procedir a la transferència passiva per capil·laritat (*Southern blotting*), a una membrana de nylon (*Hybond-N*, Amersham). Per això cal tractar previament el gel d'electroforesi amb HCl 0,25 M, per tal de fragmentar els fragments de DNA més grans i permetre que es transfereixin. Després es bloqueja el pH àcid amb rentats amb solució bàsica (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl, pH 11,5) i neutralitzant (1,5M NaCl, 1 M Tris-base, pH 8).

A. TRANSFERÈNCIA PASSIVA.

En una cubeta es monta un sistema de *sandwich* que permeti el pas de líquid (20XSSC) en direcció ascendent, arrastrant-hi per capil·laritat (a dalt es situa un absorbent) la mostra des del gel (part inferior) a la membrana de nylon (part superior). Es deixa tota la nit transferint.

B. PREHIBRIDACIÓ DE LES MEMBRANES.

La prehibridació de les membranes de Nylon es realitza introduint els filtres dins d'una bossa amb el líquid de prehibridació (5XSSC + 1% SDS + 1xDenhardt's + 50% Formamida + 100 µg/ml ssDNA) i mantenint-ho a la temperatura de 42°C, 2 hores (o tota una nit).

C. HIBRIDACIÓ DE LES MEMBRANES.

A la hibridació es buida el líquid de prehibridació de la bossa i es substitueix pel líquid d'hibridació (5XSSC + 1% SDS + 1xDenhardt's + 50% Formamida + 10% Dextrà sulfat + 100 µg/ml ssDNA). Després s'introdueix en el líquid d'hibridació 0,5-1x10⁶ cpm/ml de la sonda desnaturalitzada i marcada pel mètode de *random priming* dins la bossa i es deixa de 14 a 48 hores en un bany amb agitació a la temperatura d'hibridació, 42°C.

D. RENTATS.

S'elimina com a residu radioactiu el líquid d'hibridació amb la sonda. Es treuen els filtres de dins la bossa i es col·loquen dins d'una cubeta amb el

líquid de rentat (2XSSC, 0,1% SDS). Es fan tres rentats de 10 min cadascun, amb aquesta solució en un volum de 400 ml a temperatura ambient. Es manté en agitació. Es tornen a rentar els filtres amb la mateixa solució de rentat per aquest cop durant 30 min a 55°C. De nou, es tornen a rentar els filtres amb una nova solució de rentat més astringent (0,1XSSC, 0,1% SDS) durant 30 min més a 55°C. Per últim, s'extenen els filtres de nylon sobre un suport i es posen a exposar amb films d'autoradiografia (films Kodak X-Omat AR) i amb pantalla intensificadora.

4.5.4.- RESULTATS.

Es detectàren dos polimorfismes bial·lèlics amb els enzims BamHI i PstI, que es va demostrar que presentaven una segregació familiar mendeliana. També es van fer digestions amb EcoRI, HindIII, RsaI, BstXI, BglII, Sall i XhoI que no resultaren polimòrfiques.

El polimorfisme de BamHI es detecta en dos fragments de 4,9 (Al·lel A) i 4,5 (Al·lel B) kb (Figura 1):

BamHI

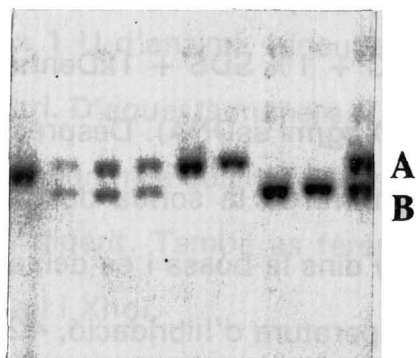


Figura 2. Polimorfisme del gen del CD50 per a BamHI.

El polimorfisme de PstI es detecta en dos fragments de 4,4 (Al·lel A) i 4,2 (Al·lel B) kb (Figura 1), mentre que es manté constant un fragment inferior de 2 kb:

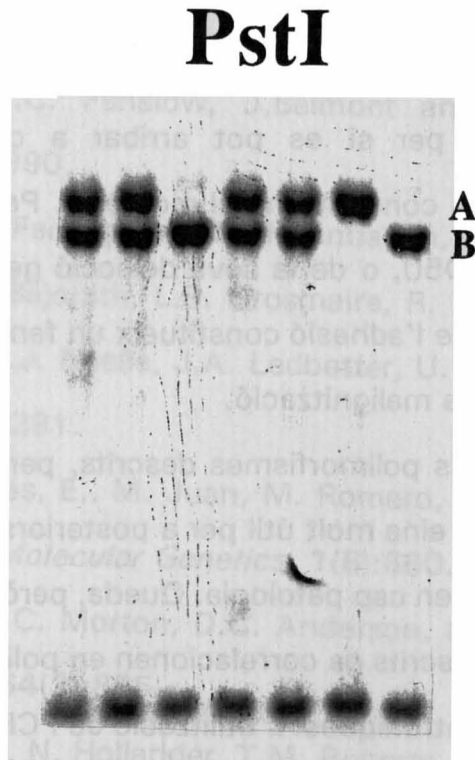


Figura 1. Polimorfisme del gen del CD50 per a PstI.

Mentre que la freqüència al·lèlica del polimorfisme per a PstI és del 19% per a l'al·lel A (4,4 kb) i 81 % per a l'al·lel B (4,2 kb), la freqüència al·lèlica del polimorfisme per a BamHI és del 22% per a l'al·lel A (4,9 kb) i 78% per a l'al·lel B (4,5 kb). Així, el nivell d'heterozigòsia és del 30,7% per al polimorfisme de PstI i del 34% per al polimorfisme de BamHI. La manca de relació entre un i altre polimorfisme fa que la informació de l'heterozigotat en el gen del CD50 superi el 50%.

4.5.5.- DISCUSSIÓ.

L'estudi del polimorfisme genètic pot esdevir una eina important en el seguiment dels gens. És clara la implicació d'alguns d'ells en determinades patologies [1-4]. L'estudi del genoma del CD50 es presentava interessant un cop definida la importància d'aquesta molècula de superfície com a molècula d'adhesió costimuladora. Així a l'igual com passa amb la deficiència de les β_2 integrines, que produeix la síndrome LAD-1 [6], és interessant estudiar genèticament el CD50, per si es pot arribar a correlacionar en cap immunodeficiència (fet no conegut fins al moment). Per altra banda, no cal descartar un paper del CD50, o de la seva delecció genètica, en processos tumorals, a on la pèrdua de l'adhesió constitueix un fenomen molt important que es correlaciona amb la malignització.

La determinació dels polimorfismes descrits, per a PstI i BamHI, pot esdevenir en un futur una eina molt útil per a posteriors estudis que intentin implicar aquesta molècula en cap patologia. Queda, però, per demostrar si els polimorfismes genètics descrits es correlacionen en polimorfismes proteïcs, i no són només variacions intròniques. L'utilització de PCR inversa per analitzar el mRNA, és la tècnica d'elecció per a fer-ho. Fins al moment, només podem dir que el polimorfisme genètic de PstI, no es correspon amb un possible polimorfisme a nivell del punt de tall descrit per al cDNA, en la base 271 de la seqüència de l'ICAM-3 [9-11], i que el nostre cDNA del CD50 no presenta. Queden per analitzar encara la relació amb un altre punt de tall per a PstI i dos per a BamHI descrits en la seqüència del cDNA del CD50. De totes maneres, el que no s'arribi a demostrar que els polimorfismes descrits tenen repercussió proteica no treu validesa a aquesta anàlisi que permet el seguiment dels dos al·lels del CD50, davant de, per exemple, deleccions genòmiques.

4.5.6.- BIBLIOGRAFIA.

- 1 - Jacob, C.O., and McDevitt, H.O. 1988. *Nature*. 331:56.
- 2 - Messer, G., U. Spengler, M.C. Jung, G. Honold, K. Blomer, G.R. Pape, G. Riethmuller, and E.H. Weiss. 1991. *J. Exp. Med.* 173:209.
- 3 - Allen, R.C., R.J. Armitage, M.E. Conley, H.R Tosenblatt, N.A. Jenkins, N.G. Copeland, M.A. Bedell, S. Edelhoff, C.M. Disteché, D.K. Simoneaux, W.C. Fanslow, J.Belmont and M.K. Spriggs. 1993. *Science*. 259: 990.
- 4 - Aruffo, A, M. Farrington, M. Hollenbaugh, X. Li, A. Milatovich, S. Nonoyama, J. Bajorath, L.S. Grosmaire, R. Stenkamp, M. Neubauer, R.L. Roberts, R.J. Noelle, J.A. Ledbetter, U. Francke, and H.D. Ochs. 1993. *Cell*. 72:291.
- 5 - Martínez-Cáceres, E., M. Juan, M. Romero, I. Rojo, and J. Martorell. 1992. *Human Molecular Genetics*. 1(8):660.
- 6 - Marlin, S.D., C.C. Morton, D.C. Anderson, and T.A. Springer. 1986. *J. Exp. Med.* 164(3):855.
- 7 - Kishimoto, T.K., N. Hollander, T.M. Roberts, D.C. Anderson, and T.A. Springer. 1987. *Cell*. 50: 193.
- 8 - Anderson, D.C., and T.A. Springer. 1987. *Annu. Rev. Med.* 38:175.
- 9 - Fawcett J., C.L.L. Holness, L.A. Needham, H. Turley, K.C. Gatter, D.Y. Mason, and D.L.Simmons. 1992. *Nature* 360:481.
- 10 - Vazeux R., P.A. Hoffman, J.K. Tomita, E.S. Dickinson, R.L. Jasman, T. St. John, and W.M. Gallatin. 1992. *Nature* 360:485.
- 11 - de Fougerolles A.R., L.B. Klickstein, and T.A. Springer. 1993. *J. Exp. Med.* 177:1187.

DISCUSSIÓ GENERAL

5.- DISCUSSIÓ GENERAL.

Tots els resultats presentats fins al moment permeten definir un paper clau del CD50 en la resposta immunitària. Per un costat, mitjançant la seva seqüència, l'hem definit com una molècula de la superfamília de les immunoglobulines (IgSF), que formaria part, per la seva alta homologia estructural, de la família dels ICAMs, un grup de molècules d'adhesió. Aquesta molècula de membrana de tipus I es presenta amb un alt nivell de glicosilació (tretze punts de possible N-glicosilació són els responsables de gairebé el 50% del pes molecular), cinc dominis immunoglobulínics, una regió transmembrana de 25 a.a. hidrofòbics i una zona citoplàsmica de 37 a.a. força diferent a les dels altres ICAMs. Mitjançant estudis bioquímics, funcionals i de comparació de seqüències proteiques, el CD50 va ser identificat amb el tercer lligand de la β_2 integrina LFA-1, ja anomenat ICAM-3. Aquests estudis van ésser fets en paral·lel als treballs de clonació que confirmaren aquesta identitat (Figura 1).

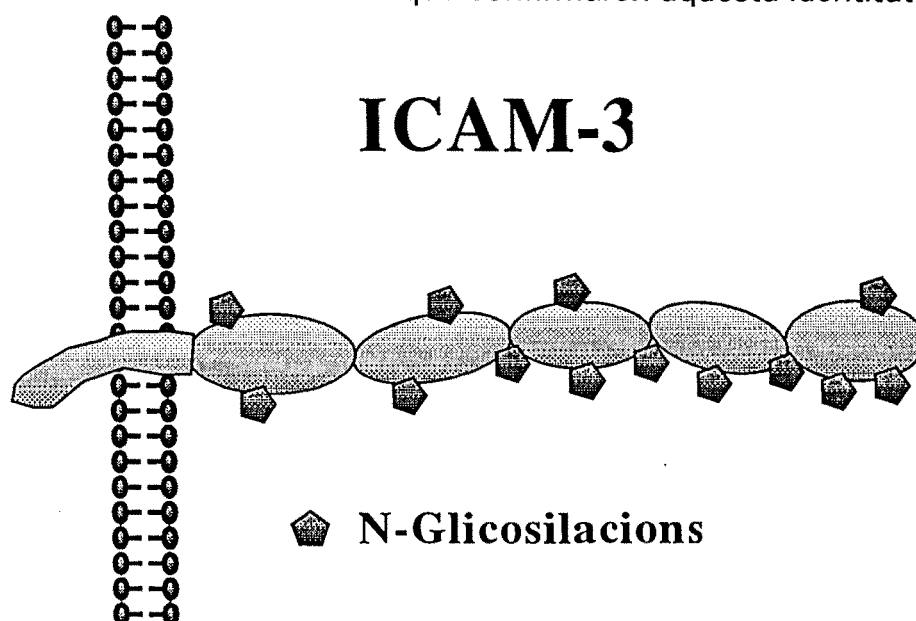


Figura 1 Estructura en cinc dominis de la IgSF predita a partir de la seqüència del CD50.

La determinació d'aquesta identitat del CD50 i l'ICAM-3 va permetre una major definició funcional de les dues molècules, per simple sumació de les dades que aleshores es tenien via una i altra nomenclatura. D'aquesta manera es perfilava l'ICAM-3 com el principal lligand del LFA-1 en les primeres fases del reconeixement antigènic [Vilella et al, 1990; de Fougerolles et al, 1991, de Fougerolles & Springer, 1992]. Els treballs de clonació del CD50 [Fawcett et al, 1992; Vazeux et al, 1992; de Fougerolles et al, 1993] ratificaren tots aquests conceptes i obriren nous camps amb la possibilitat d'utilitzar els cDNAs clonats com a sondes per a detectar nivells d'expressió de mRNA, o realitzar construccions moleculars per a analitzar diferents aspectes de la funció del CD50 (síntesi de forma soluble, transfeccions en cèl·lules CD50 negatives, ...). Dades més recents sobre certs aspectes de la distribució cel·lular, emprant tècniques histològiques, [Acevedo et al, 1993; Doussis-Anagnostopoulou et al, 1993; Cordell et al, 1994] confirmen també els treballs previs sobre l'expressió leucocitària gairebé exclusiva, assenyalant però nous aspectes interessants. Així en un d'ells [Acevedo et al, 1993], es ressalta la manca d'expressió trobada a nivell de les cèl·lules B centrefol·liculars, destacant-hi la troballa de l'expressió en cèl·lules de Langerhans a nivell epidèrmic, un tipus de cèl·lula presentadora d'antigen que no expressa en canvi ni ICAM-1 ni ICAM-2. Aquest aspecte és especialment interessant, doncs suggereix la participació exclusiva del CD50 en els mecanismes de presentació antigènica a nivell epidèrmic, en els quals les cèl·lules de Langerhans juguen un paper fonamental com a APCs. En l'altre treball [Doussis-Anagnostopoulou et al, 1993] es fa un estudi de l'expressió del CD50 en diversos limfomes, però la seva dada més destacable és la descripció per primera vegada de l'expressió extraleucocitària de CD50,

concretament en les cèl·lules endotelials microvasculars de certs limfomes. Aquesta inducció del CD50 en endoteli microvascular en zones paralimfomatoses, descrita també per altres autors [Dommann et al, 1994 (Abst.); M.J. Terol & E. Campo, comunicació personal], suggereix que de manera anàloga a l'ICAM-1 i l'ICAM-2, el CD50 es pot induir en les cèl·lules endotelials, probablement per un mecanisme, depenent de citocines associades als processos tumorals, encara no identificat.

Aquest panorama de dades perfila al CD50 com a una molècula clau en les primeres fases de la resposta immunitària. L'anàlisi de la participació del CD50 en les interaccions interlimfocitàries de l'agregació homotípica i en l'adhesió limfòcit-endoteli i limfòcit-M.E., va demostrar una nova vessant funcional d'aquesta molècula, la capacitat transductora de senyals. En aquest sentit, els resultats del capítol III d'aquesta tesi, presenten al CD50 com una molècula que a més a més de presentar funcions adhesives és capaç d'estimular les β_1 i β_2 integrines, activant la seva funció adherent. D'aquesta manera el CD50 potencia la capacitat adhesiva d'altres molècules. Aquesta estimulació per part del CD50, es va analitzar també a nivell bioquímic (capítol IV de resultats), demostrant que l'activació del CD50 indueix una entrada de calci a nivell intracel·lular, en un mecanisme dependent de tirosin-kinases (PTKs). Així doncs, el CD50 que es troba associat a dues PTKs, la p56^{lck} i la p59^{lyn}, d'alguna manera les activaria, i a través d'elles desencadenaria un cadena de fosforilacions en tirosines que portarien d'una manera més o menys directa a la mobilització de Ca²⁺ a nivell intracel·lular. Les dades suggereixen que, si bé la via de transducció de senyals del CD50 podria ser paral·lela a la que emprava el complex TcR/CD3, presenta components ben diferenciables. Tots aquests processos estarien en la base dels mecanismes d'activació

cel·lulars descrits, induint-se a més a més l'expressió del CD25 i la producció de l'IL-2 (en presència concomitant de PMA), tal com demostren els resultats de l'annex del capítol IV. Aquests resultats van ser obtinguts amb la línia cel·lular Jurkat, però sembla que també actuen de manera similar en els limfòcits circulants. Així, junt a la inducció de la funció integrina que es va realitzar en limfòcits de donants sans, el nostre grup ha demostrat darrerament la capacitat de mobilitzar Ca^{2+} en limfòcits T de sang perifèrica [Pino-Otín et al, enviat a publicar]. Existeixen també dades d'altres grups que confirmen aquesta capacitat transductora demostrant els seus efectes en limfòcits circulants [Campanero et al, 1993; Hernández-Caselles et al, 1993]. En aquests treballs el CD50 funciona com a molècula co-estimuladora, incrementant l'adhesió homotípica de limfòcits via LFA-1 [Campanero et al, 1993], o induint-hi un augment en la proliferació produïda per anti-CD3 i l'expressió de CD69, junt a la de CD25 [Hernández-Caselles et al, 1993]. Totes aquestes dades, demostren clarament que el CD50 es una molècula estimuladora dels limfòcits T. Queda per demostrar el paper co-estimulador que pugui tenir el CD50 en altres cèl·lules que com els limfòcits B, els monòcits i els neutròfils presenten una molt alta expressió d'aquest antigen [Shaw, 1993; Pino-Otín et al, enviat a publicar].

A un altre nivell, els resultats sobre els polimorfismes genètics del CD50 poden esdevenir una eina molt útil si es descriuen alteracions d'aquesta molècula a nivell genètic. Per un costat es poden fer servir directament, si d'alguna manera algun dels al·lels definits en aquests polimorfismes genètics arriba a correlacionar-se amb polimorfismes proteínics que presentin algun tipus de repercussió sobre la resposta immunitària. Per altra banda, la funció del CD50 com a molècula amb clares característiques adhesives, a través d'un

mecanisme d'absència-presència, podria trobar aplicabilitat clínica si es demostrés la participació del CD50 en certs mecanismes tumorals (per exemple en la disseminació tumoral) o en relació amb determinades immunodeficiències. Així seria possible detectar deleccions dels gens tant en processos tumorals, a on la pèrdua de l'adhesió pot esdevenir un mecanisme patogenètic en relació amb la malignitat del tumor, o en una possible immunodeficiència relacionada amb la pèrdua de tot o part del gen. L'elevada heterozigositat obtenible a través de l'utilització dels dos polimorfismes ens permet detectar els dos al·lels en més d'un 50% dels casos. La resta de casos no-informatius per la seva homozigositat necessitaria d'aproximacions més quantitatives per determinar les deleccions. Sigui com sigui, però, la definició d'aquest polimorfisme, malgrat ser la primera aproximació de la que tenim notícia per a acostar-nos a l'estructura genòmica del CD50, queda a l'espera de més resultats que l'omplin de contingut i aplicació.

Totes aquestes dades donen lloc al que podria considerar-se un esquema general (més enllà de consideracions específiques de cada grup de resultats que ja s'han fet en les discussions pertinents de cada capítol) que ens aproxima a la funció adhesiva i co-estimuladora del CD50 leucocitari. Centrant-nos en el paper del CD50 en les interaccions limfòcit-cèl·lula presentadora d'antigen (APC) podríem postular que la unió del CD50 i del LFA-1 té una doble funcionalitat. Per un costat, contribuiria a estabilitzar el reconeixement específic del TcR, que per sí sol presenta poca afinitat intrínseca pel seu lligand, el complex antigen-MHC, necessitant per a ser efectiu de les interaccions en paral·lel de les molècules d'adhesió. Per una altra banda, actuaria col·laborant en la co-estimulació cel·lular, reforçant el senyal transmès pel TcR que per sí sol no és suficient per assolir una activació

eficient del limfòcit T. Aquest concepte co-estimulador no és nou amb les molècules d'adhesió, doncs s'ha descrit en altres casos, com el mateix LFA-1 [Walcholtz et al, 1989; van Seventer et al, 1989], però és una capacitat absolutament novedosa pel que fa als altres dos membres de la família ICAM. Aquesta capacitat transductora de senyals del CD50, no seria intrínseca a la molècula, com en la majoria de les proteïnes de membrana, sinó que es deuria a l'activitat d'altres molècules citoplàsmiques associades. Aquestes molècules transductores associades, en el cas del CD50, serien, al menys, les PTKs $p56^{lck}$ i $p59^{fyn}$. Definir com es transmet el reconeixement del CD50 i el LFA-1 des dels dos dominis més externs (lloc de la unió) de la zona extracel·lular fins a la cua citoplàsmica és encara un problema pendent de resolució, com passa en la majoria de glicoproteïnes de superfície cel·lular. Sigui com sigui, a través d'algun tipus de canvi en la seva associació a les PTKs, el CD50 co-estimularia directament la cèl·lula, però alhora també augmentaria la funció integrina β_2 , comportant un augment en la capacitat adhesiva d'ambdues cèl·lules. D'aquesta manera es reforça la interacció global entre l'APC i el limfòcit T, produint-se un efecte d'amplificació sobre la capacitat adhesiva cel·lular, que, com ja hem dit, resulta necessària per estabilitzar el reconeixement antigènic de manera que resulti eficaç. Així, mitjançant l'efecte estimulador del CD50 s'incrementaria la funció integrina β_2 determinant d'aquesta manera un augment de les seves interaccions amb el CD50 de l'altra cèl·lula (Figura 2). S'establiria, així un cicle de co-estimulació i augment de l'adhesió que cal regular d'alguna manera. És possible que aquesta regulació vingui pel fre que el TcR/CD3 produiria mitjançant la fosforilació en serines del CD50 [Lozano et al., 1992a], que potser reguli aquesta funció estimulador. Podem hipotetitzar que la fosforilació en serines del CD50 condiciona la pèrdua de la capacitat

estimulant de la molècula, a través del desacoblament de les PTKs associades, però també és possible la situació oposada, en el que la fosforilació induiria l'engalament de les PTKs a la zona citoplàsmica del CD50. La primera hipòtesi sembla més coherent donat que el que és més freqüent és que la funció de les molècules de membrana disminueixi quan es fosforilen en serines o treonines [Alberola-Illa & Lozano, 1991]. És clar però que només les dades experimentals de futurs estudis decidiran entre una i altra possibilitat.

En la base d'aquest model radica la disjuntiva de si les molècules d'adhesió interaccionen primerament determinant de manera inicial el reconeixement posterior del TcR, o si bé al contrari, és el TcR el que en una primera etapa reconeix l'antigen activant les molècules d'adhesió que estableixen i fan definitivament eficient el reconeixement. Les nostres dades permeten les dues interpretacions [Vives, 1994], si bé la primera hipòtesi s'ajustaria millor a una activitat desacopladora de les fosforilacions seríniques a través de l'estimulació del TcR.

Pel que fa al paper del CD50 en les interaccions leucòcit-endoteli i leucòcit-matriu extracel·lular, la manca d'expressió endotelial del seu lligand, el LFA-1, i del mateix CD50 (que només s'ha trobat expressat en certs endotelis microvasculars de certs limfomes [Doussis-Anagnostopoulou et al, 1993]) suggeria que el CD50 no participaria en aquests contactes. Els nostres resultats, però, indiquen el contrari suggerint un esquema de funcionament en el que el CD50 intervindria reforçant l'adhesió limfocitària a l'endoteli i a la matriu extracel·lular (Figura 3). D'aquesta manera, podríem dir que el CD50 actuaria sobre la fase de reforçament (*tethering*) incrementant la funció integrina β_1 i β_2 , central en aquesta fase, en les que les interaccions VLA-4/VCAM-1 i LFA-1/ICAM-1, -2 són definitives per aturar el rodolament,

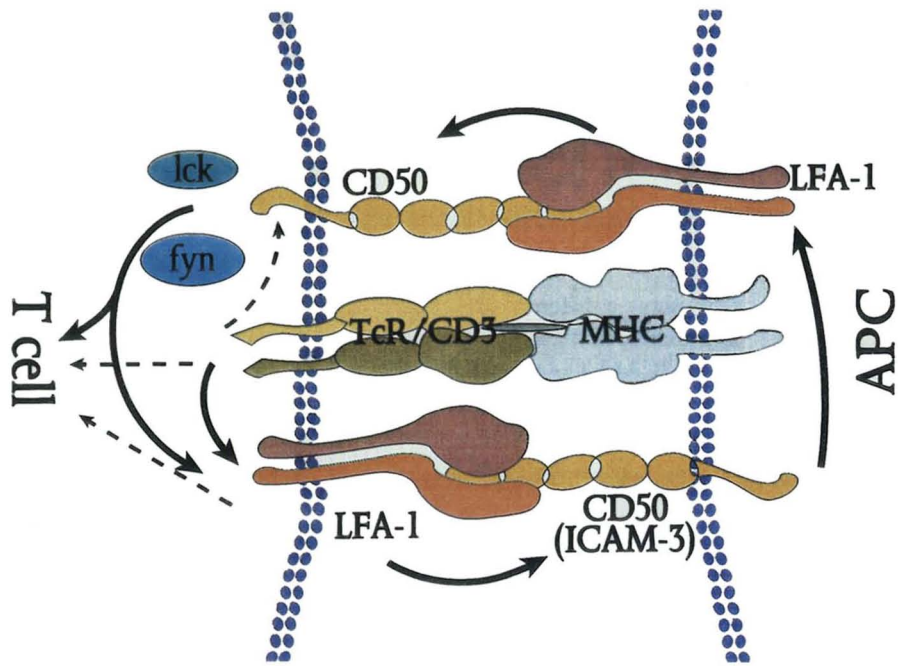


Figura 2. Model de funció del CD50 en una interacció entre limfòcit T i cèl·lula presentadora d'antigen (APC), a on s'estableix un cicle d'amplificació de l'adhesió i co-estimulació cel·lular.

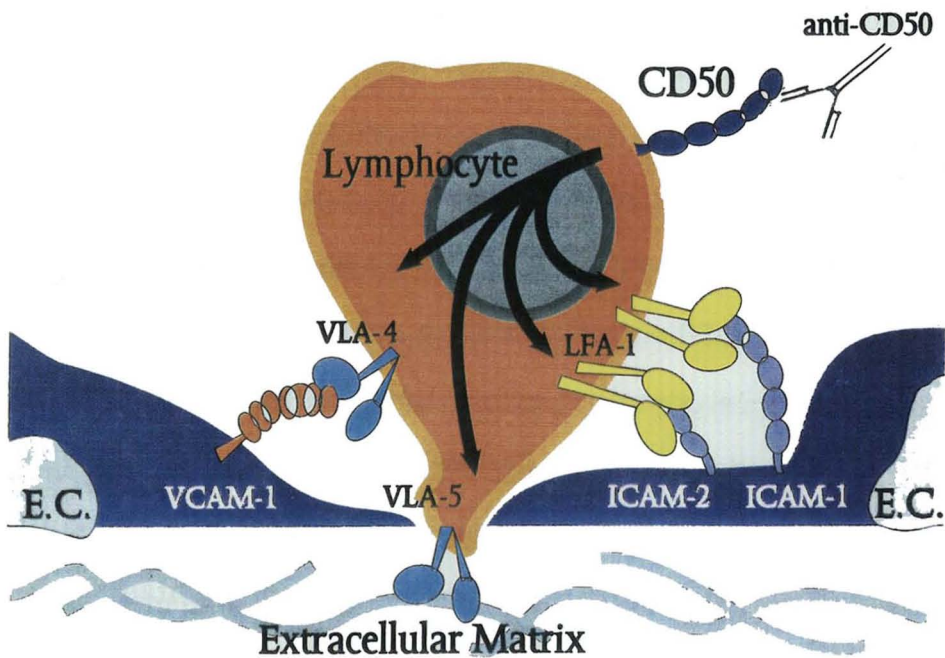


Figura 3. Esquema de l'efecte de l'estimulació del CD50 en l'adhesió limfocitària a les cèl·lules endotelials (E.C.) i a la matriu extracel·lular (*Extracellular Matrix*).

detenint la circulació. Després a través d'aquesta mateixa via d'activació, especialment per l'efecte sobre les integrines β_1 que vehiculen gran part de les interaccions dels limfòcits amb la matriu extracel·lular, el CD50 afavoriria també la migració transendotelial. En aquest mecanisme de transmigració limfocitària, la síntesi i secreció d'enzims destructors de la xarxa de la M.E. (col·lagenases) [Werb et al, 1991], és un mecanisme també important. Estudis recents en el nostre laboratori [Esparza & Cid, comunicació personal], confirmen que l'estimulació a través d'AcMos anti-CD50 és capaç d'induir en cèl·lules Jurkat la secreció d'aquests enzims, la qual cosa suposa una implicació superior del CD50 en els mecanismes de migració limfocitària que acompanyen la inflamació. Malgrat aquest esquema força clar i suggerent, el CD50 ni s'expressa normalment en l'endoteli (amb l'excepció esmentada dels endotelis paralimfomatosos), ni l'endoteli presenta el seu contra-receptor, el LFA-1. Així que només caben dos possibilitats per a que s'activi el CD50: o existeix un segon receptor (aquest amb expressió endotelial), o s'activa mercès al LFA-1 d'altres leucòcits. De fet, durant la inflamació es produeix un fenomen d'arribada massiva de leucòcits i no seria estrany que durant aquest reclutament els limfòcits contactessin entre ells estimulants-se el CD50 i amb ell reforçant-se l'adhesió endotelial. A favor d'aquesta possibilitat existeixen dades de microscòpia confocal [Sánchez-Madrid, comunicació personal], que demostren la localització del CD50, durant l'adhesió a endoteli, polaritzat en prolongacions anomenades uròpods de manera oposada al lloc de contacte del limfòcit amb l'endoteli. Així, el CD50 es situaria en la llum del vas afavorint el reclutament dels leucòcits a la zona inflamada i a través d'aquest reconeixement es reforçaria la funció integrina. Un cop en la zona inflamada,

el contacte amb altres leucòcits (neutròfils o monòcits), que sí presenten LFA-1, incrementaria encara més si cal l'estimulació de la funció integrina, principalment β_1 , que reforçaria l'adhesió a la matriu extracel·lular, induint una localització eficient del limfòcit en aquell entorn tisular inflammat.

És assumible que aquest model d'activació de la capacitat adhesiva via el CD50 sigui aplicable a d'altres subpoblacions leucocitàries (limfòcits B, monòcits, neutròfils,...) que també recirculen i que en molts casos presenten nivells majors de CD50 [Pino-Otín et al, enviat a publicar, 1994], encara que resta també pendent de la seva comprovació experimental.

En resum, podem dir que els treballs presentats en aquesta tesi formen un cos de resultats que permeten construir un model de la funció del CD50. Aquest model funcional explica en gran part el funcionament d'aquesta molècula, però alhora obre també nombrosos interrogants que només trobaran resposta en posteriors estudis experimentals. El que sí podem dir hores d'ara, és que el CD50 s'ha constituït en una molècula d'adhesió que per la seva bifuncionalitat co-estimuladora i adhesiva, intervé de manera decisiva en molts aspectes de la resposta immunitària.

CONCLUSIONS

5.- CONCLUSIONS.

- 1.- El CD50 és una molècula de membrana formada per un cos proteic de tipus I amb cinc dominis extracitoplàsmics de la superfamília de les immunoglobulines (IgSF), sobre el qual s'afegeix una molt important glicosilació responsable de gairebé el 50 % del seu pes molecular.
- 2.- El CD50 és idèntic a una molècula d'adhesió de la família dels ICAMs, l'anomenat ICAM-3. Així doncs, ambdós termes es poden utilitzar indistintament per tal de referir-nos a aquesta glicoproteïna.
- 3.- El CD50 intervé en les interaccions dels limfòcits T a l'endoteli i a diverses proteïnes de la matriu extracel·lular, cooperant en el reforçament de l'adhesió, a través de l'activació de la funció de les integrines β_1 i β_2 . Aquesta activació de l'adhesió es fa evident també per l'inducció de l'agregació homotípica mitjançant els anticossos monoclonals anti-ICAM-3.
- 4.- Els mecanismes bioquímics implicats en la senyalització intracel·lular del CD50, en les cèl·lules de la línia T limfoblastoide Jurkat, impliquen la fosforilació en tirosines de vàries proteïnes intracel·lulars i l'augment en els nivells intracel·lulars de calci.

- 5.- L'associació del CD50 amb les Protein-tirosin-kinases (PTKs) p56^{lck} i p59^{lyn}, assenyalen aquestes PTKs com les més probables candidates a iniciar la via de transducció de senyals quan s'activa el CD50.
- 6.- Els mecanismes estimuladors del CD50 són capaços d'assolir l'activació cel·lular mesurada per la inducció de l'expressió de CD25 i la producció d'IL-2 al co-estimar les cèl·lules amb CD50 i PMA.
- 7.- Existeix un doble polimorfisme bial·lèlic, per a les endonucleases de restricció PstI i BamHI, en el gen del CD50 humà.

BIBLIOGRAFIA GENERAL

7. BIBLIOGRAFIA.

- Acevedo, A., M.A. del Pozo, A. G. Arroyo, P. Sánchez-Mateos, R. González-Amaro, and F. Sánchez-Madrid (1993). Distribution of ICAM-3-bearing cells in normal human tissues. Expression of a novel counter-receptor for LFA-1 in epidermal Langerhans cells. *Am. J. Pathol.* **143**:774-783.
- Adams, D.H., and S. Shaw (1994). Leukocyte-endothelial interactions and regulation of leucocyte migration. *Lancet.* **343**: 831-836
- Airas, L., M. Salmi, and S. Jalkanen (1993). Lymphocyte-Vascular Adhesion Protein-2 is a novel 70-kDa molecule involved in lymphocyte adhesion to vascular endothelium. *J. Immunol.* **151**(8):4228-4238.
- Albelda, S.M., and C.A. Buck (1990). Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J.* **4**:2868-2880.
- Alberola-Illa, J., and F. Lozano (1990). Fosforilación y regulación de la activación linfocitaria. *Inmunología.* **9**(1): 1-9.
- Anderson, D.C., and T.A. Springer (1987). Leukocyte adhesion deficiency: an inherited defect in the Mac-1, LFA-1, and p150,95 glycoproteins. *Annu. Rev. Med.* **38**:175-194.
- Axelsson, B., R. Youseffi-Etemad, S. Hammarström and P. Perlmann (1988). Induction of aggregation and enhancement of proliferation and IL-2 secretion in human T cells by antibodies to CD43. *J. Immunol.* **141**:2656-2660.
- Azuma, M., D. Ito, H. Yagita, K. Okumura, J.H. Phillips, L.L. Lanier, and C. Somoza (1993). B70 is a second ligand for CTLA-4 and CD28. *Nature.* **366**:76-79.

- Barclay, A.N., M.L. Birkeland, M.H. Brown, A.D. Beyers, S.J. Davis, C. Somoza, and A.F. Williams (1993). The leucocyte antigen. In *FactsBook Series*. Academic Press, London.
- Baumhueter, S., M.S. Singer, W. Henzel, S. Hemmerich, M. Renz, S.D. Rosen and L.A. Lasky (1993). Binding of L-Selectin to the vascular sialomucin, CD34. *Science*. **262**:436-438.
- Bednarczyk, J.L., and B.W. McIntyre (1990). A monoclonal antibody to VLA-4 alpha chain (CD49d) induces homotypic lymphocyte aggregation. *J. Immunol.* **144**: 777-784.
- Behrens, J., M.M. Mareel, F.M. van Roy and W. Birchmeier (1989). Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion. *J. Cell Biol.* **108**(6): 2435-2447.
- Berendt, A.R., D.L. Simmons, J. Tansey, C.L. Newbold and K. Marsh (1989). Intercellular adhesion molecule-1 is an endothelial cell adhesion receptor for Plasmodium falciparum. *Nature*. **341**:57-59.
- Berendt, A.R., A. McDowall, A.G. Craig, P.A. Bates, M.J. Sternberg, K. Marsh, C.L. Newbold and N. Hogg (1992). The binding site on ICAM-1 for Plasmodium falciparum-infected Erythrocytes overlaps, but is distinct from, the LFA-1-binding site. *Cell*. **68**(1):71-81.
- Berg, E.L., L.M. McEvoy, C. Berlin, R.F. Bargatze, and E.C. Butcher (1993). L-Selectin-mediated lymphocyte rolling on MAdCAM-1, *Nature*. **366**: 695-698.
- Berlin C., E.L. Berg, M.J. Briskin, D.P. Andrew, P.J. Kilshaw, B. Holzmann, I.L. Weissman, A. Hamann and E.C. Butcher (1993). $\alpha 4\beta 7$ integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1. *Cell*. **74**: 185-195.

- Bevilacqua, M.P. (1989). Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Circulation* 80: II-1 (Abstr.).
- Bevilacqua, M.P. (1993). Endothelial-leukocyte adhesion molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 11:767-804.
- Bierer, B.E., A. Peterson, J.C. Gorga, S.H. Herrmann, and S.J. Burakoff (1988). Synergistic T cell activation via the physiological ligands for CD2 and the T cell receptor. *J. Exp. Med.* 168: 1145-1156.
- Binnerts, M.E., Y. van Kooyk and C.G. Figdor (1994). Distinct T lymphocyte adhesion to ICAM-1, -2 and -3 upon activation of LFA-1. *12th Eur. Immunol. meeting.* W23/12 (Abstr.).
- Bockenstedt, L.K., M.A. Goldsmith, M. Dustin, D. Olive, T.A. Springer and A. Weiss (1988). The CD2 ligand LFA-3 activates T cells but depends on the expression and function of the antigen receptor. *J. Immunol.* 141:1904-1911.
- Briskin, M.J., L.M. McEvoy, and E.C. Butcher (1993). MAdCAM-1 has homology to immunoglobulin and mucin like adhesion receptors and to IgA1. *Nature.* 363:461-464.
- Calvete, J.J., A. Henschen and J. González-Rodríguez (1991). Assignment of disulphide bonds in human platelet GPIIb. A disulphide pattern for the beta-subunits of the integrin family. *Biochem. J.* 274: 63-71.
- Campanero, M.R., M.A. del Pozo, A.G. Arroyo, P. Sánchez-Mateos, T. Hernández-Caselles, A. Craig, R. Pulido, and F. Sánchez-Madrid (1993). ICAM-3 interacts with LFA-1 and regulates the LFA-1/ICAM-1 cell adhesion pathways. *J. Cell Biol.* 123(4):1007-1016.
- Carrell, N.A., L.A. Fitzgerald, B. Steiner, H.P. Erickson and D.R. Phillips (1985). Structure of human platelet membrane glycoproteins IIb and IIa as

- determined by electron microscopy. *J. Biol. Chem.* **260**: 1743-1749.
- Chan, B.M.C., M.J. Elices, E. Murphy and M.E. Hemler (1992). Adhesion to vascular cell adhesion molecule 1 and fibronectin: comparison of $\alpha^4\beta_1$ (VLA-4) and $\alpha^4\beta_7$ on the human B cell line JY. *J. Biol. Chem.* **267**:8366-8370
 - Chatilla, T.A., R.S. Geha, and M.A. Arnaout (1989). Constitutive and stimulus-induced phosphorylation of CD11/CD18 leukocyte adhesion molecules. *J. Cell Biol.* **109**: 3435-3444.
 - Chisholm, P.L., C.A. Williams, and R.R. Lobb (1993). Monoclonal antibodies to the integrin α -4 subunit inhibit the murine contact hypersensitivity response. *Eur. J. Immunol.* **23**:682-688.
 - Cid, M.C., and J. Esparza (1993). Endotelio e inflamación. *MTA-Medicina Interna.* **11**(2):51-81.
 - Clark, E.A., and J.E. Ledbetter (1993). How B and T cells talk to each other. *Nature.* **367**:425-428
 - Corbí, A.L., R.S. Larson, T.K. Kishimoto, T.A. Springer, and C.C. Morton (1988). Chromosomal location of the genes encoding the leukocyte adhesion receptors LFA-1, Mac-1 and p150,95. *J. Exp. Med.* **167**(5):1597-1607.
 - Cordell, J.L., K. Pulford, H. Turley, M. Jones, K. Micklem, I.A. Doussis, X. Tyler, K. Mayne, K.C. Gatter, and D.Y. Mason (1994). Cellular distribution of human leukocyte adhesion molecule ICAM-3. *J. Clin. Pathol.* **47**:143-147.
 - Damle, N.K., K. Klussman, and A. Aruffo (1992a). Intercellular adhesion molecule-2, a second counter-receptor for CD11a/CD18 (leukocyte function-associated antigen-1), provides a costimulatory signal for T-cell receptor-initiated activation of human T cells. *J. Immunol.* **148**:665-671.
 - Damle N.K., K. Klussman, P.S. Linsley, A. Aruffo, and J.A. Ledbetter (1992b) Differential regulatory effects of intercellular adhesion molecule-1 on costimulation by the CD28 counter-receptor B7. *J. Immunol.* **149**:2541-

2548.

- Dayhoff, M.O., W.C. Barker and L.T. Hunt (1983). Establishing homologies in protein sequences. *Methods Enzymol.* 91: 524-545.
- de Fougères, A.R., S.A. Stacker, R. Schwarting, and T.A. Springer (1991). Characterization of ICAM-2 and evidence for a third counter-receptor for LFA-1. *J. Exp. Med.* 174(1):253-267.
- de Fougères A.R., and T.A. Springer (1992). Intercellular adhesion molecule 3, a third adhesion counter receptor for lymphocyte function-associated molecule 1 on resting lymphocytes. *J. Exp. Med.* 175(1):185-190.
- de Fougères A.R., L.B. Klickstein, and T.A. Springer (1993). Cloning and expression of ICAM-3 reveals strong homology to other Ig family counter-receptors for LFA-1. *J. Exp. Med.* 177:1187-1192.
- de Fougères A.R., X. Qin, and T.A. Springer (1994). Characterization of the function of Intercellular Adhesion Molecule (ICAM)-3 and comparison with ICAM-1 and ICAM-2 in human responses. *J. Exp. Med.* 179(2):619-629.
- Denning, S.M., P.T. Le, K.H. Singer, and B.F. Haynes (1990). Antibodies against the CD4 p80, lymphocyte homing receptor molecule augment human peripheral blood T cell activation. *J. Immunol.* 144:7-15.
- Diamond, M.S., D.E. Stauton, A.R. de Fougères, S.A. Stacker, J. García-Aguilar, M.L. Hibbs, and T.A. Springer (1991). ICAM-1(CD54): a counter-receptor for Mac-1 (CD11b/CD18). *J. Cell Biol.* 111:3129-3139.
- Dommann, S.N.W., T. Ziegler, C.C. Dommann-Scherrer, J. Meyer, and G. Burg (1994). Homing of lymphocytes in cutaneous and nodal lymphomas. *Modern trends in cutaneous lymphomas. Ann. meeting of the EORTC cutaneous lymphoma project group.* Barcelona. 21. (Abstract).

- Doussis-Anagnostopoulou, I., L. Kaklamanis, J. Cordell, M. Jones, H. Turley, K. Pulford, D. Simmons, D. Mason and K. Gatter (1993). ICAM-3 expression on endothelium in lymphoid malignancy. *Am. J. Pathol.* **143**(4):1040-1043.
- Dustin, M.L., R. Rothlein, A.K. Bhan, C.A. Dinarello, and T.A. Springer (1986). Induction by IL-1 and interferon- γ : tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J. Immunol.* **137**:245-254.
- Dustin, M.L. and T.A. Springer (1988). Lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) interaction with intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is one of the at least three mechanisms for lymphocyte adhesion to cultured endothelial cells. *J. Cell Biol.* **107**: 321-331.
- Dustin, M.L. and T.A. Springer (1989). T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. *Nature.* **346**: 619-624.
- Dustin, M.L. and T.A. Springer (1991). Role of lymphocyte adhesion receptors in transient interactions and cell locomotion. *Annu. Rev. Immunol.* **9**:27-66.
- Engel, J. (1991). Common structural motifs in proteins of the extracellular matrix. *Curr. Opin Cell Biol.* **3**:779-785.
- Fawcett J., C.L.L. Holness, L.A. Needham, H. Turley, K.C. Gatter, D.Y. Mason, and D.L. Simmons (1992). Molecular cloning of ICAM-3, a third ligand for LFA-1, constitutively expressed on resting leukocytes. *Nature* **360**:481-484.
- Fidgdor, C.G., Y. van Kooyk and G.D. Keizer (1990) On the mode of action of LFA-1. *Immunol. Today* **11**(8): 277-280.
- Fischer H., A. Gjörlöf, G. Hedlund, H. Hedman, E. Lundgren, T. Kalland, H.O. Sjögren, and M. Dohlsten (1992). Stimulation of human naive and memory T helper cells with bacterial superantigen. Naive CD4⁺45RA⁺ T

cells require a costimulatory signal mediated through the LFA-1/ICAM-1 pathway *J. Immunol.* 148(7):1993-1998.

- Freeman, G.J., J.G. Gribben, V.A. Boussiotis, J.W. Ng, V.A. Restivo, L.A. Lombard, G.S. Gray, and L.M. Nadler (1993). Cloning of B7-2: a CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation. *Science.* 262:909-911.
- Greve, J.M., G. Davis, A.M. Meyer, C.P. Forte, S.C. Yost, C.W. Marlor, M.E. Kamarck and A. McClelland (1989). The major Rhinovirus receptor is ICAM-1. *Cell.* 56(6):839-847.
- Goldstein, L.A., D.F.H. Zhou, L.J. Picker, C.N. Minty, R.F. Bargatze, J.F. Ding, and E.C. Butcher (1989). A human lymphocyte homing receptor, the hermes antigen, is related to cartilage proteoglycan core and link proteins. *Cell.* 56(6):1063-1072.
- Hadam M.R. (1989). N11 Cluster report: CDw50. *In*: Knapp W., Dörken B., Gilks W.R., Rieber E.P., Schmidt R.E., Stein H. and von dem Borne A.E.G .Kr., eds. *Leucocyte Typing IV*. Oxford: Oxford University Press.667-670.
- Hara, T., and S.M. Fu (1986). Phosphorylation of α,β subunits of 180/100 Kd polypeptides (LFA-1) and related antigens. *In Leucocyte Typing II*. Vol.3. E.L. Reinherz, editor. Springer Verlag, New York. 77-84.
- Harding, F.A., J.G. McArthur, J.A. Gross, D.H. Raulet, and J.P. Allison (1992). CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature.* 335:607-609.
- Harper, K., C. Balzano, E. Rouvier, M.G. Mattel, M.F. Luciani, and P. Goldstein (1991). CTLA-4 and CD28 activated lymphocyte molecules are closely related in both mouse and human as to sequence, message expression, gene structure, and chromosomal organization. *J. Immunol.* 147: 1037-1044.

- Hart, D.N.J., and T.C.R. Prickett (1993). Intercellular Adhesion Molecule-2 (ICAM-2) expression on human dendritic cells. *Cell. Immunol.* **148**:447-454.
- Hernández-Caselles, T., G. Rubio, M.R. Campanero, M.A. del Pozo, M. Muro, F. Sánchez-Madrid, and P. Aparicio (1993). *Eur. J. Immunol.* **23**:2799-2806.
- Hibbs, M.L., S. Jakes, S.A. Stacker, R.W. Wallace, and T.A. Springer (1991). The cytoplasmic domain of the integrin Lymphocyte Function-associated Antigen 1 β subunit: Sites required for binding to Intercellular Adhesion Molecule 1 and the phorbol ester-induced phosphorylation site. *J. Exp. Med.* **174**:1227-1238.
- Holter, W., O. Fischer, H. Majdic, H. Stockinger, and W. Knapp (1986). T cell stimulation via the erythrocyte receptor. Synergism between monoclonal antibodies and phorbol myristate acetate without changes of free Ca^{++} levels. *J. Exp. Med.* **163**: 654-664.
- Horvath, A.R., M.A. Elmore, and S. Kellie (1990). Differential tyrosine-specific phosphorylation of integrin in Rous sarcoma virus transformed cells with differing transformed phenotypes. *Oncogene.* **5**:1349-1357
- Hu, M.C-T., D.T. Crowe, I.L. Weissman, and B. Holzmann (1992). Cloning and expression of mouse integrin $\beta 7$; a functional role in Peyer's patch-specific lymphocyte homing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**:8254-8258.
- Huet, S., H. Groux, B. Caillou, H. Valentin, A.M. Prieur, and A. Bernard (1989). CD44 contributes to T cell activation. *J. Immunol.* **143**:798-801.
- Hunkapiller, T., and L. Hood (1989). Diversity of the Immunoglobulin Gene Superfamily. *Adv. Immunol.* **44**:1-63.
- Hynes, R.O. (1987). Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell.* **48**: 549-554.

- Hynes, R.O. (1992). Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*. 69:11-25
- Ingber, D.E., D. Prusty, J.V. Frangioni, E.J. Cragoe, C. Lechene and M.A. Schwartz. (1990). Control of intracellular pH and growth by fibronectin in capillary endothelial cells. *J. Cell Biol.* 110:1803-1811.
- Ingber, D. (1991). Integrins as mechanochemical transducers. *Current Op. Cell Biol.* 3:841-848.
- Izerda, R.L., W.G. Carter, C. Nottenburg, E.A. Wayner, W.M. Gallatin, and T.S. John (1989). Isolation and DNA sequence of cDNA clone encoding a lymphocyte adhesion receptor for high endothelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:4659-4663.
- Jalkanen, S, and M. Jalkanen (1992). Lymphocyte CD44 binds the COOH-terminal heparin-binding domain. *J. Cell Biol.* 116:817-825.
- Janeway, C.A. and K. Bottomly (1994). Signals and signs for lymphocyte responses. *Cell.* 76:263-274.
- June, C.H. (1991). Signal transduction in T cells. *Current Op. Immunol.* 3:287-293.
- Kansas, G.S., O. Spertini, L.M. Stoolman and T.F. Tedder (1991). Molecular mapping of functional domains of the leukocyte receptor for endothelium, LAM-1. *J. Cell. Biol.* 144 (2): 351-358.
- Kishimoto, T.K., N. Hollander, T.M. Roberts, D.C. Anderson, and T.A. Springer (1987). Heterogenous mutations in the β subunit common to the LFA-1, Mac-1 and p150,95 glycoproteins cause leukocyte adhesion deficiency. *Cell.* 50: 193-202.
- Kishimoto, T.K., R.S. Larson, A.L. Corbí, M.L. Dustin, D.E. Stauton, and T.A. Springer (1989). The leucocyte integrins: LFA-1, Mac-1 and p150,95. *Adv. Immunol.* 46:149-182.

- Kohler, G. and C. Milstein (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. **256**: 495-497.
- Kolanus, W., C. Romeo, and B. Seed (1993). T cell activation by clustered tyrosine kinases. *Cell*. **74**:171-183.
- Kornberg, L.L., S.H. Earp, C.E. Turner, C. Prockop, and R.L. Juliano (1991). Signal Transduction by integrins: increased protein tyrosine phosphorylation caused by clustering of beta 1 integrins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **88**:8392-8396.
- Krensky, A.M., S.J. Mentzer, C. Clayberger, D.C. Anderson, F.C. Schmalstieg, S.J. Burakoff, and T.A. Springer (1985). Heritable lymphocyte function-associated antigen-1 deficiency: Abnormalities of cytotoxicity and proliferation associated with abnormal expression of LFA-1. *J. Immunol*. **135**:3102-3108.
- Kurzinger, K., T. Reynolds, R.N. Germain, D. Davignon, E. Martz and T.A. Springer (1981). A novel lymphocyte function-associated antigen (LFA-1): cellular distribution, quantitative expression, and structure. *J. Immunol*. **127**:596-602.
- Kurzinger, K., and T.A. Springer (1982). Purification and structural characterization of LFA-1, a lymphocyte function associated antigen and Mac-1, a related macrophage differentiation antigen. *J. Biol. Chem*. **257**:12412-12418.
- Lawrence, M.B and T.A. Springer (1991). Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell* **65**: 859-873.
- Landis, R.C., R.I. Bennett and N. Hogg (1993). A novel LFA-1 activation epitope maps to the I Domain. *J. Cell Biol.* **120**(6):1519-1527

-
- Larson, R.S. and T.A. Springer (1990). Structure and function of leukocyte integrins. *Immunol. Rev.* **114**:181-217.
 - Lasky, L.A. (1992). Selectines: interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation. *Science.* **258**:964-969.
 - Lasky, L.A., M.S. Singer, D. Dowbenko, Y. Imai, W.J. Henzel, C. Grimley, C. Ferrie, N. Gillet, S.R. Watson, and S.D. Rosen (1992). An endothelial ligand for L-selectin is a novel mucin-like molecule. *Cell.* **69**(6):927-938.
 - Ley, K., P. Gaehtgens, C. Fennie, M.S. Singer, L.A. Lasky and S.D. Rosen (1991). Lectin-like cell adhesion molecule-1 mediates leukocyte rolling in mesenteric venules in vivo. *Blood* **77**: 2553-2555.
 - Lindstein, T., C.H. June, J.A. Ledbetter, G. Stella, and C.B. Thompson (1989). Regulation of lymphokine messenger RNA stability by a surface-mediated T-cell activation pathway. *Science.* **244**:339-343.
 - Lozano, F., J. Alberola-Ila, L. Places, and J. Vives (1992a). Effect of protein kinase C activators on the phosphorylation and the surface expression of the CDw50 leukocyte antigen. *Eur. J. Biochem.* **203**:321-326.
 - Lozano, F., L. Places, J. Alberola-Ila, M. Milà, N. Villamor, J.J. Barceló, V. Fabregat, and J. Vives (1992b). Isolation and characterisation of a CDw50 negative Jurkat T-cell line variant (PPL.1). *Leuk. Res.* **17**(1):9-16.
 - Mackay, C.R. (1992). Migration pathways and immunologic memory among T lymphocytes. *Sem. Immunol.* **4**:51-58.
 - Mackay, C.R., W. Marston, and L. Dudler (1992). Altered patterns of T cell migration through lymph nodes and skin following antigen challenge. *Eur. J. Immunol.* **22**:2205-2210.
 - Mayadas, T.N., R.C. Johnson, H. Rayburn, R.O. Hynes and D.D. Wagner (1993). Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P-selectin-deficient mice. *Cell* **74**: 541-554.

- Mahoney, P.A., U. Weber, P. Onofrechuk, H. Biessmann, P.J. Bryant, and C.S. Goodman (1991). The *fat* tumor supressor gene in Drophila encodes a novel member of the Cadherin Gene Superfamily. *Cell* 67: 853-868.
- Marlin, S.D., C.C. Morton, D.C. Anderson, and T.A. Springer (1986). LFA-1 immunodeficiency disease. Definition of the genetic defect and chromosomal mapping of α and β subunits of the lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1) by complementation in hybrid cells. *J. Exp. Med.* 164(3):855-867.
- Marlin, S.D. and T.A. Springer (1987). Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1). *Cell.* 51: 813-819.
- Martz, E. (1980). Immune T lymphocyte to tumor cell adhesion magnesium sufficient, calcium insufficient. *J. Cell. Biol.* 84: 584-598.
- Martz, E. (1987). LFA-1 and other accessory molecules functioning in adhesions of T and B lymphocytes. *Hum. Immunol.* 18: 3-7.
- Meuer, S.C., R.E. Hussey, M. Fabbi, D. Fox, O. Acuto, K.A. Fitzgerald, J.C. Hodgdon, J.P. Protentis, S.F. Schlossman, and E.L. Reinherz (1984). An alternative pathway of T-cell activation: a fuctional role for the 50 kd T11 sheep erythrocyte receptor protein. *Cell.* 36:897-906.
- Moore, K.L., N.L. Stults, S. Díaz, D.F. Smith, R.D. Cummings, A. Varki and R.P. McEver (1992). Identification of a specific glycoprotein ligand for P-Selectin (CD62) on myeloid cells. *J. Cell. Biol.* 118:445-456.
- Moretta, A., G. Pantaleo, M. López-Botet, and L. Moretta (1985). Involvement of T44 molecules in an antigen-independent pathway of T cell activation. Analysis of the correlations to the T cell antigen-receptor complex. *J. Exp. Med.* 162:823-838.
- Mosher, D.F. (1991). How do integrins integrate ? *Current Biology.* 1(6):394-396.

- Moy V.T., and A.A. Brian (1992). Signaling by Lymphocyte Function-associated Antigen 1 (LFA-1) in B cells: enhanced antigen presentation after stimulation through LFA-1. *J. Exp. Med.* **175**:1-7.
- Nermut, M.V., N.M. Green, P. Eason, S.S. Yamada and K.M. Yamada (1988). Electron microscopy and structural model of human fibronectin receptor. *EMBO J.* **7**:4093-4099.
- Nose, A., A. Nagafuchi and M. Takeichi. (1988). Expressed recombinant cadherins mediate cell sorting in model systems. *Cell* **54**: 993-1001.
- Nose, A., K. Tsuji, and M. Takeichi (1990). Localization of specificity determining sites in Cadherin cell adhesion molecules. *Cell* **61**: 147-155.
- Ockenhouse, C.F., R. Betageri, T.A. Springer, and D.E. Stauton (1992). Plasmodium falciparum-infected erythrocytes bind ICAM-1 at a site distinct from LFA-1, Mac-1 and human rhinovirus. *Cell.* **68**(1): 63-69.
- Oppenheimer-Marks, N., L. Davis, T. Bogue, J. Ramberg and P. Lipsky (1991). Differential utilization of ICAM-1 and VCAM-1 during the adhesion and transendothelial migration of human T lymphocytes. *J. Immunol.* **147**: 2913-2921.
- Oppenheimer-Marks, N., and P. Lipsky (1994). Transendothelial migration of T cells in chronic inflammation. *The Immunologist.* **2**(2):58-64.
- Osborn, L. (1990). Leukocyte adhesion to endothelium in inflammation. *Cell.* **62**:3-6.
- Otey, C.A., F.M. Pavalko, and K. Burridge (1990). An interaction between α -actinin and the β_1 integrin subunit in vitro. *J. Cell. Biol.* **111**: 721-729.
- Ozawa, M., M. Ringwald and R. Kemler (1990). Uvomorulin-catenin complex formation is regulated by a specific domain in the cytoplasmic region of the adhesion molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 4246-4250.

- Pardi, R., J.R. Bender, C. Dettori, E. Giannazza, and E.G. Engleman (1989). Heterogeneous distribution and transmembrane signaling properties of lymphocyte function-associated antigen (LFA-1) in human lymphocyte subsets. *J. Immunol.* **143**:3157-3166.
- Perlmutter, R.M., S.D. Levin, M.W. Appleby, S.J. Anderson, and J. Alberola-Ila (1993). Regulation of lymphocyte function by protein phosphorylation. *Annu. Rev. Immunol.* **11**: 451-499.
- Picker, L., R. Warnock, A. Burns, C. Doerschok, E. Berg and E. Butcher (1991a). The neutrophil selectin LECAM-1 presents carbohydrate ligands to the vascular selectins ELAM-1 and GMP-140. *Cell.* **66**:921-933.
- Picker, L., T. Kishimoto, C. Smith, R. Warnock and E. Butcher (1991b). ELAM-1 is an adhesion molecule for skin-homing T cells. *Nature.* **349**:796-802.
- Picker, L., and E. Butcher (1992). Physiological and molecular mechanisms of lymphocyte homing. *Annu. Rev. Immunol.* **10**: 561-591.
- Pino-Otín, R., M. Juan, M.A. de la Fuente, O. Viñas, E. Martínez-Cáceres, M.D. Fernández, R. Vilella, J. Yagüe, J Vives, and A. Gayà (1994). CD50 (ICAM-3) is expressed at higher levels on memory than on naive human T cells, but induces a similar calcium mobilization on both subsets. (enviat a publicar).
- Pigott, R., and C. Power (1993). The adhesion Molecule. In *FactsBook Series.* Academic Press, London.
- Pober, J.S., M.A. Gimbrone, L.A. LaPierre, D.L. Mendrick, W. Fiers, R. Rothlein, and T.A. Springer (1986). Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin 1, tumor necrosis factor, and immune interferon. *J. Immunol.* **137**:1893-1896.

- Rice, G.E., J.M. Munro, C. Corless, and M.P. Bevilacqua (1991). Vascular and nonvascular expression of INCAM-110. A target for mononuclear leukocyte adhesion in normal and inflamed human tissues. *Am. J. Pathol.* **138**:385-393.
- Roberts, K., W.M. Yokoyama, P.J. Kehn and E.M. Shevach (1991). The vitronectin receptor serves as an accessory molecule for the activation of a subset of gamma/delta T cells. *J. Exp. Med.* **173**:231-240.
- Rosenstein, Y., J.H. Park, W.C. Hahn, F.S. Rosen, B.E. Bierer, and S.J. Burakoff (1991). CD43, a molecule defective in Wiskott-Aldrich syndrome, binds ICAM-1. *Nature.* **354**:233-235.
- Rothlein, R., and T.A. Springer (1986a). The requirement for lymphocyte function-associated antigen 1 in homotypic leukocyte adhesion stimulated by phorbol ester. *J. Exp. Med.* **163**:1132-1149.
- Rothlein, R., M.L. Dustin, S.D. Marlin, and T.A. Springer (1986b). A human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1. *J. Immunol.* **137**:1270-1274.
- Rothlein, R., E.A. Mainolfi, M. Czajkowski, and S.D. Marlin (1986b). A form of circulating ICAM-1 in human serum. *J. Immunol.* **147**:3788-3793.
- Rüegg, C., A.A. Postigo, E.E. Sikorski, E.C. Butcher, R. Pytela, and D.J. Erle (1992). Role of integrin $\alpha^4\beta_7/\alpha^4\beta_p$ in lymphocyte adherence to fibronectin and VCAM-1 and in homotypic cell clustering. *J. Cell Biol.* **117**:179-189.
- Ruoslahti, E. (1991). Integrins. *J. Clin. Invest.* **87**:1-5.
- Sako, D., X.-J. Chang, K.M. Barone, G. Vachino, H.M. White, G. Shaw, G.M. Veldman, K.M. Bean, T.J. Ahern, B. Furie, D.A. Cumming and G.R. Larsen (1993). Expression cloning of a functional glycoprotein ligand for P-Selectin. *Cell* **75**: 1179-1186.

- Salmi, M., and S. Jalkanen (1992). A 90-kilodalton endothelial cell molecule mediating lymphocyte binding in humans. *Science*. **257**:1407-1409.
- Salmi, M., K. Kalimo, and S. Jalkanen (1992). Induction and function of Vascular Adhesion Protein-1 at sites of inflammation. *J. Exp. Med.* **178**:2255-2260.
- Sánchez-Madrid, F., A.M. Krensky, C.F. Ware, J.L. Strominger, and T.A. Springer (1982). Three distinct antigens associated with human T-lymphocyte-mediated cytotoxicity: LFA-1, LFA-2, and LFA-3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **76**: 7489-7493.
- Schall, T.J., K. Bacon, K.J. Toy, and D.V. Goeddel (1990). Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature*. **347**:669-671.
- Scheynius, A., R.L. Camp, and E. Puré (1993). Reduced contact sensitivity reactions in mice treated with monoclonal antibodies to leukocyte function-associated molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1. *J. Immunol.* **150**:655-663.
- Schleimer, R.P., S.A. Sterbinsky, J. Kaiser, C.A. Bickel, D.A. Klunk, K. Tomioka, W. Newman, F.W. Luscinskas, M.A. Grimbrone, B.W. McIntyre, and B.S. Bochner (1992). IL-4 induces adherence of human eosinophils and basophils but not neutrophils to endothelium. *J. Immunol.* **148**: 1086-1092.
- Schlossman, S.F., L. Boumsell, W. Gilks, J.M. Harlan, T. Kishimoto, C. Morimoto, J. Ritz, S. Shaw, R.L. Silverstein, T.A. Springer, T.F. Tedder, and R.F. Todd, eds. (1994). In *Leucocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens*. Oxford University Press, Oxford.
- Seigelman, M.H., I.C. Cheng, I.L. Weissman, and E.K. Wakeland (1990). The mouse lymph node homing receptor is identical with the lymphocyte cell surface marker Ly-22: role of the EGF domain in endothelial binding. *Cell*.

61: 611-622.

- Selvaraj, P., M.L. Dustin, R. Mitnacht, T. Hünig, T.A. Springer, and M.L. Plunkett (1987). Rosetting of human T-lymphocytes with sheep and human erythrocytes. Comparison of human and sheep ligand binding using purified E receptor. *J. Immunol.* **139**:2690-2695.
- Shaw, S., G.E.G. Luce, R. Quinones, R.E. Gress, T.A. Springer, and M.E. Sanders (1986). Two antigen-independent adhesion pathways used by human cytotoxic T cell clones. *Nature.* **323**:262-264.
- Shaw, S. (1993) Leukocyte Differentiation Antigen Database [database]. Version 1.01 (International Workshop on Leukocyte Differentiation Antigens. Available from Stephen Shaw, National Institutes of Health, on disk; NIH ftp site (balrog.nci.nih.gov), Bethesda, 1993).
- Shimizu Y., G. van Seventer, K.J. Horgan and S. Shaw (1990). Regulated expression and binding of the three VLA (β_1) integrin receptors on T cells. *Nature.* **345**:250-253.
- Shimizu Y., W. Newman, Y. Tanaka and S. Shaw (1992a). Lymphocyte interactions with endothelial cells. *Immunol. Today.* **13**:106-112.
- Shimizu Y., G.A. van Seventer, E. Ennis, W. Newman, K.J. Horgan and S. Shaw (1992b). Crosslinking of the T cell-specific accessory molecules CD7 and CD28 modulates T cell adhesion. *J. Exp. Med.* **175**:577-582.
- Shortman, K., H. von Boehmer, J. Lipp, and K. Hopper (1975). Subpopulations of T-lymphocytes: physical separation, functional specialization and differentiation pathways of sub-sets of thymocytes and thymus-dependent peripheral lymphocytes. *Transplant. Rev.* **25**:163-210.
- Simmons, D. M.W. Makgoba, and B. Seed (1988). ICAM, an adhesion ligand of LFA-1, is homologous to the neural cell adhesion molecule NCAM. *Nature.* **331**:624-627.

- Spitz, H, W. van Schooten, H. Keizer, G. van Seventer, M. van Rijn, C. Terhorst and J.E. de Vries (1986). Alloantigen recognition is preceded by nonspecific adhesion of cytotoxic T cells and target cells. *Science*. 232:403-405
- Springer, T.A., M.L. Dustin, T.K. Kishimoto, and S.D. Marlin (1987). The lymphocyte function associated LFA-1, CD2, and LFA-3 molecules: cell adhesion receptors of the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 5:223-252.
- Springer, T.A. (1990a) Adhesion receptors of the immune system. *Nature*. 346:425-434.
- Springer, T.A. (1990b). The sensation and regulation of interactions with the extracellular environment: the cell biology of lymphocyte adhesion receptors. *Annu. Rev. Cell Biol.* 6:359-402.
- Springer, T.A, and L.A. Lasky. (1991). Sticky sugars for selectins *Nature*. 349: 196-197.
- Springer, T.A (1994). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: The multistep paradigm. *Cell*. 76:301-314.
- Staunton, D.E., S.D. Marlin, C. Stratowa, M.L. Dustin, and T.A. Springer (1988). Primary structure of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) demonstrates interaction between members of the immunoglobulin and integrin supergene families. *Cell*. 52:925-933.
- Staunton, D.E., M.L. Dustin, and T.A. Springer (1989a). Functional cloning of ICAM-2, a cell adhesion ligand for LFA-1 homologous to ICAM-1. *Nature*. 339:61-64.
- Staunton, D.E., V.J. Merluzzi, R. Rothlein, R. Barton, S.D. Marlin, and T.A. Springer (1989b). A cell adhesion molecule, ICAM-1 is the major surface receptor for Rhinoviruses. *Cell*. 56(6):849-853.

- Stanley, P., P.A. Bates, J. Harvey, R.I. Bennett and Nancy Hogg (1994). Integrin LFA-1 α subunit contains an ICAM-1 binding site in domains V and VI. *EMBO J.* 13(8):1790-1798.
- Suzuki, S, K. Sano and H. Tanihara. (1991). Diversity of the cadherin family: evidence for eight new cadherins in the nervous tissue. *Cell Regul.* 2: 261-270.
- Sy, M.S., Y.J. Guo, and I. Stamenkovic (1991). Distinct effects of two CD44 isoforms on tumor growth *in vivo*. *J. Exp. Med.* 174:859-866.
- Takada, Y. M.J. Elice, C. Crouse and M.E. Hemler (1989). The primary structure of alpha-4 subunit of VLA-4: homology to other integrins and possible cell-cell adhesion function. *EMBO J.* 8: 1361-1368.
- Takeichi, M. (1988). The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development* 102: 639-655.
- Takeichi, M. (1990). Cadherins: a molecular family important in cell-cell adhesion. *Annu. Rev. Biochem.* 59: 237-252.
- Tamkun, J.W, D.W. DeSimone, D. Fonda, R.S. Patel, C. Buck, A.F. Horwitz and R.O. Hynes (1986). Structure of Integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin. *Cell.* 46: 271-282.
- Tanaka, Y., D.H. Adams, S. Hubscher, H. Hirano, U. Siebenlist, and S. Shaw (1993). T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1 β . *Nature.* 361:79-82.
- Tapley, P., A.F. Horwitz, C.A. Buck, K. Burridge, K. Duggan, R. Hirst and L. Rohrschneider (1989). Analysis of the avian fibronectin receptor (integrin) as a direct substrate for pp60^{v-src}. *Oncogene.* 4: 325-333.
- Tomassini, J.E., D. Graham, C.M. DeWitt, D.W. Lineberger, J.A. Rodkey, and R.J. Colonno (1989). cDNA cloning reveals that the major group rhinovirus receptor on HeLa cells is intercellular adhesion molecule 1. *Proc.*

Natl. Acad. Sci. USA 86:4907-4911.

- Townes, P.L. and J. Holtfreter (1955). Directed movements and selective adhesion of embryonic amphibian cells. *J. Exp. Zool.* 128: 53-120.
- Ushiyama, S., T.M. Laue, K.L. Moore, H.P. Erickson and R.P. McEver (1993). Structural and functional characterization of monomeric soluble P-selectin and comparison with membrane P-selectin. *J. Biol. Chem.* 268: 15229-15237.
- Valmu, L., M. Autero, P. Siljander, M. Patarroyo, and C.G. Gahmberg (1991). Phosphorylation of the β -subunit of CD11/CD18 integrins by protein kinase C correlates with leukocyte adhesion. *Eur. J. Immunol.* 21:2857-2862.
- van de Velde, H., I. von Hoegen, W. Luo, J.R. Parnes, and K. Thielemans (1991). The B-cell surface protein CD72/Lyb-2 is the ligand for CD5. *Nature.* 351: 662-665.
- van Kooyk, Y., P. Weder, F. Hogervorst, A.J. Verhoeven, G. van Seventer, A.A. te Velde, J. Borst, G.D. Keizer, and C.G. Figdor (1991). Activation of LFA-1 through a Ca^{2+} -dependent epitope stimulates lymphocyte adhesion. *J. Cell Biol.* 112(2):345-354.
- van Noesel, C., F. Miedema, M. Brouwer, M.A. de Rie, L.A. Aarden, and R.A.W. van Lier (1988). Regulatory properties of LFA-1 α and β chains in human T-lymphocyte activation. *Nature.* 333:850-852.
- van Seventer, G.A., E. Bonvini, H. Yamada, A. Conti, S. Stringfellow, C.H. June, and S. Shaw (1992). Costimulation of T cell receptor/CD3-mediated activation of resting human $CD4^+$ T cells by leukocyte function-associated antigen-1 ligand intercellular cell adhesion molecule-1 involves prolonged inositol phospholipid hydrolysis and sustained increase of intracellular Ca^{2+} levels. *J. Immunol.* 149(12): 3872-3880.

- Vazeux R., P.A. Hoffman, J.K. Tomita, E.S. Dickinson, R.L. Jasman, T. St. John, and W.M. Gallatin (1992). Cloning and characterization of a new intercellular adhesion molecule ICAM-R. *Nature*. **360**:485-488.
- Vilella, R., J. Milà, F. Lozano, J. Alberola-Ila, L. Places, and J. Vives (1990). Involvement of the CDw50 molecule in allorecognition. *Tissue Antigens* **36**:203-210.
- Vilella, R., J. Milà, A. Pi, J. Barceló, O. Viñas, M. Juan and J. Vives (1993). Epitopic and functional analyses of CDw50. *Tissue Antigens* **42**(4):282 (Abstract AS102).
- Vives, J. (1994) CD50 is the "Signal Transducer" ICAM. *The Immunologist*. **2**(3):93-96.
- von Andrian, U.H, E.M. Berger, L. Ramezani, J.D. Chambers, H.D. Ochs, J.M. Harlan, J.C. Paulson, A. Etzioni, and K.-E. Arfors (1993). *In vivo* behaviour of neutrophils from two patients with distinct inherited leukocyte adhesion deficiency syndromes. *J. Clin. Invest.* **91**:2893-2897.
- Voraberger, G., R. Schäfer, and C. Stratowa (1991). Cloning of the human gene for intercellular adhesion molecule 1 and analysis of its 5'-regulatory region *J. Immunol.* **147**(8): 2777-2786.
- Wacholtz, M.C, S.S. Patel, and P.E. Lipsky (1989). Leukocyte Function-associated Antigen 1 is an activation molecule for human T cells. *J. Exp. Med.* **170**:431-448.
- Weiss, A. and D.R. Littman (1994). Signal Transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell*. **76**:263-274.
- Wellicome, S.M., M.H. Thornhill, C. Pitzalis, D.S. Thomas, J.S.S. Lanchbury, G.S. Panayi, and D.O. Haskard (1990). A monoclonal antibody that detects a novel antigen on endothelial cells that is induced by tumor necrosis factor IL-1, TNF or lipopolysaccharide. *J. Immunol.* **144**:2558-2565.

- Werb, Z. P. tremble, O. Behrendtsen, E. Crowley, and C. Damsky (1990). Signal transduction through the fibronectin receptor induces collagenase and stromelysin gene expression. *J. Cell Biol.* **109**:877-889.
- Wilkins, J.A., D. Stupack, S. Stewart, and S. Caixia (1991). β_1 integrin-mediated lymphocyte adherence to extracellular matrix is enhanced by phorbol ester treatment. *Eur. J. Immunol.* **21**: 517-522.
- Williams, A.F. (1982). Surface molecules and cell interactions. *J. Theoret. Biol.* **98**:221-231
- Williams, A.F. (1987). A year in the life of the immunoglobulin superfamily. *Immunol. Today.* **8**(10):298-303.
- Yamada, A. T. Nikaido, Y. Nojima, S.F. Schlossman and C. Morimoto (1991). Activation of human CD4 T lymphocytes. Interaction of fibronectin with VLA-5 receptor on CD4 cells induces the AP-1 transcription factor. *J. Immunol.* **146**:53-56.