

Estudi de les vies del TNF/TNFR2 i del CD200/CD200R en el rebuig xenogènic

Mireia Uribe Herranz

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.tesisenxarxa.net) 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.tesisenred.net) 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.tesisenxarxa.net) 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.

Tesi adscrita al Departament Fisiologia de la Facultat de Biologia

Programa de Doctorat d'Immunologia.

Bienni 2005/2007

Estudi de les vies del TNF/TNFR2 i del CD200/CD200R en el rebuig xenogènic

Memòria presentada per Mireia Uribe Herranz per optar al
grau de Doctor per la Universitat de Barcelona

Directora de la Tesi:

Tutor de la Tesi :

Dra. Cristina Costa Vallès

Dr. Enric Espel Masferrer

Juliol 2010

Als meus pares i al Sergi

Al Jordi

Agraïments

La recerca és com l'exploració. Primerament necessites estar ben preparat, tenir una formació prou sòlida que et permeti començar a investigar el desconegut. Sense més armes que les ganes d'aprendre i els pocs coneixements previs has de començar a avançar per un camí inexplorat. Els investigadors, s'han d'arriscar a equivocar-se i a aprendre dels errors, han de persistir on altres defalleixen, sempre pensant i aplicant coneixements. Compartir amb els altres viatgers el coneixement, l'experiència i també els error, és bàsic per obrir camí.

El món de la ciència és meravellós però no ha estat un camí fàcil. Durant els últims 5 anys de recerca biomèdica he tingut la immensa sort de comptar amb el suport de grans viatgers que m'han ensenyat i aconsellat. A tots i cadascun d'ells els hi vull agrair el seu suport, sense ells aquesta tesi no hagués estat possible.

Primer de tot voldria agrair a la Dra. Costa haver dipositat la seva confiança en mi ara fa 5 anys i permetre'm entrar en el món de la ciència i la immunologia.

Voldria tenir unes paraules pels primers companys de viatge que vaig tenir en el món de la ciència, a tot el grup de Biologia molecular de l'IBB, moltes gràcies per acollir-me i ensenyar-me. Vau ser uns grans mestres.

M'agradaria agrair moltíssim el suport incondicional i la inestimable ajuda que he rebut dels meus companys l'IDIBELL. Voldria començar amb l'Esther que ha estat per a mi una autèntica guia, un referent. Agrair també a la Patty i la Laia la seva ajuda. A les tres, que sempre han tingut temps per mi i mai han tingut un no com a resposta, gràcies.

També voldria agrair el suport dels companys passats i presents del COM, l'Antònia, l'Olga, la Rebeca, la M^aÀngels, la Doro, l'Anna Roig, l'Ana Garcia, la Naiara ... i molts més. Hem estat companys de viatge i ens hem recolzat sempre.

Tampoc voldria oblidar-me dels professionals del servei científico-tècnic de l'UB, sobretot de l'Esther i el Benja de Bellvitge i la Marta del Biacore. Gràcies a tots pel vostre suport i consells en els experiments.

El meu agraïment a les noies del PEBC4, l'Anna, l'Helena, la Pali i la Irene, per acollir-me i ajudar-me...i per la vostra alegria! També voldria mostrar el meu agraïment a l'Àlex, un científic brillant.

Al Conrad per ser un amic dins i fora del lab, a l'Eder una extraordinària persona i una gran científica, tinc la convicció que la ciència necessita gent com tu per avançar.

A l'Alfredo un científic revolucionari que m'ha ensenyat que la bona ciència i la vida no tenen perquè estar renyides. A la Silvia, un exemple de superació personal que sobretot en els últims temps m'ha ajudat a seguir endavant.

Voldria agrair també a la gent que en algun moment ha passat pel grup, als alumnes de pràctiques, a la Zully amb qui vaig començar aquest viatge i especialment a la Rosa. Al Jaume, que amb el seu bon rotllo ens encomanava a tots l'alegria de viure. Al Magdiel per compartir els anys en el lab, les alegries i les decepcions, sempre disposat a escoltar i a donar un cop de mà.

Finalment, hi ha dues persones a les quals voldria agrair la seva ajuda, la seva ajuda incondicional. A la Laia, una persona extraordinària amb qui he tingut la sort de coincidir a la vida. Gran científica, treballadora, intel·ligent i altruista ...perquè hi ha coses que uneixen i el Biacore és una d'elles, moltes gràcies!.

A la Roberta, la Brava Roberta, companya inseparable d'aquest viatge. Hem treballat colze amb colze, hem rigut, hem plorat, hem viscut aquesta aventura plegades. Tot un referent a nivell científic i personal.

Perquè hem crescut en el món de la ciència juntes.. ja som com germanes!

Perquè tu m'has ensenyat a viure una mica més la vida.... grazie mille.

Si bé no han col·laborat físicament en la realització d'aquesta tesi, hi ha moltes persones que si ho han fet des del punt de vista emocional. Voldria agrair a les meves amigues, la Martina, la Mar, la Sònia i la Vero tot el seu suport, els ànims i els bons moments durant aquests anys.

A la meva família, als meus pares i al Sergi, sense ells m'hagués perdut fa molt de temps, ells van ser el meu far quan la nit era més fosca...aquesta tesi també és vostra.

I finalment al Jordi, que sempre m'ha recolzat i animat a seguir investigant, la persona més meravellosa que he conegut mai. Tu ets el meu nord, el meu sud, l'est i l'oest...

“ I la superació alguna vegada, potser sovint, es tradueix en optimisme i en ganes de ser i de fer, de viure i de riure”

“Turning darkness into light”

The Book of Kells

Contingut

Agraïments	vii
Contingut.....	xi
Abreviatures	xvii
Introducció.....	1
1 Xenotrasplantament.....	3
1.1 Rebuig immunològic del xenoempelt	6
1.2 Immunitat innata i xenotrasplantament	10
2 Via TNF/TNFR.....	14
2.1 Lligands de la superfamília TNF	16
2.2 Receptors de la superfamília TNFR.....	18
2.3 Via del TNF	21
2.3.1 Factor de Necrosis Tumoral (TNF α).....	21
2.3.2 Receptors de TNF	23
2.3.3 Algunes particularitats del TNFR2.....	27
2.3.4 TNFR en processos patològics	30
2.3.5 TNFR2 en teràpies clíniques.....	31
2.3.6 TNFR en el trasplantament	33
2.3.7 La via del TNF/TNFR al sistema xenogènic	34
3 Via CD200/CD200R.....	38
3.1 El CD200.....	38
3.2 Receptor de CD200	40

3.3	Mecanismes immunoreguladors de la via del CD200/CD200R.	44
3.4	Implicació de l'eix CD200-CD200R en processos patològics.....	46
3.4.1	Càncer.....	46
3.4.2	Autoimmunitat	47
3.4.3	Malalties neurodegeneratives.....	48
3.4.4	Al·lèrgia	48
3.4.5	Avortament	49
3.5	Implicació de l'eix CD200-CD200R en el rebuig del trasplantament	50
	Objectius i Resultats.....	38
1	Objectiu general	55
2	PART I: Estudi de la via del TNFR2 porcí.....	55
2.1	Hipòtesi.....	55
2.2	Objectius.....	55
2.3	Resultats.....	57
2.3.1	Obtenció i anàlisi de les 4 isoformes del TNFR2.....	57
2.3.1.1	Amplificació del cDNA de les isoformes del pTNFR2.	57
2.3.1.2	Anàlisi bioinformàtica de les proteïnes.....	62
2.3.2	Estudis d'expressió dels missatgers de les isoformes de pTNFR2.....	66
2.3.3	Estudis de localització subcel·lular i FRET de les isoformes de membrana del pTNFR2.	70
2.3.4	Estudis d'afinitat de les isoformes del pTNFR2 pel TNF α	81
2.3.5	Assaig de <i>Pull</i> down i competició de formes solubles del pTNFR2.....	85
3	PART II: Estudi de la via del CD200 porcí.....	90

3.1	Hipòtesi.....	90
3.2	Objectius.....	90
3.3	Resultats.....	91
3.3.1	Obtenció i anàlisi del CD200 porcí i de 3 isoformes del seu receptor.	91
3.3.1.1	Amplificació del cDNA de les isoformes del pCD200.....	91
3.3.1.2	Amplificació dels cDNA i anàlisi bioinformàtica del CD200R porcí.	95
3.3.2	Determinació de l'expressió de mRNA del pCD200.	98
3.3.3	Generació de reactius per detectar les molècules porcines.	99
3.3.4	Estudi d'afinitat entre el CD200 i CD200R en el sistema xenogènic.	106
	Discussió.....	111
1	Via del TNF/TNFR2	113
2	Via del CD200/CD200R.....	122
	Conclusions.....	122
1	Estudi de la via TNF/TNFR2.....	131
2	Estudi de la via CD200/CD200R	132
	Materials i Mètodes	133
1	Obtenció de teixits i cèl·lules.	135
1.1	Materials	135
1.1.1	Obtenció del material.....	135
1.2	Mètodes	135
1.2.1	Aïllament de cèl·lules mononuclears de sang perifèrica.....	135
1.2.2	Aïllament de monòcits/macròfags i limfòcits sanguinis.....	136

1.2.3	Extracció de RNA total	136
2	Clonatges	137
2.1	Materials	137
2.1.1	Soques Bacterianes	137
2.1.2	Plasmidis	137
2.1.3	Medis	137
2.1.4	Encebadors	138
2.2	Mètodes	139
2.2.1	Retrotranscripció de RNA.....	139
2.2.2	Amplificació per PCR dels gens d'interès.....	140
2.2.3	Amplificació per SMART RACE.....	142
2.2.4	Clonació	143
2.2.4.1	Sistema topoisomerasa	143
2.2.4.2	Manipulació enzimàtica.....	143
2.2.5	Seqüenciació del DNA.....	146
3	Anàlisi bioinformàtica.....	147
3.1	Mètodes	147
4	Northern Blot	148
4.1	Materials	148
4.1.1	Cèl·lules.....	148
4.1.2	Sondes	149
4.2	Mètodes	149
5	RT- PCR quantitativa.....	150
5.1	Materials	150
5.1.1	RNA i cDNA.....	150

5.1.2	Encebadors i sondes taqMan	150
5.2	Mètodes	151
6	Expressió, anàlisi i purificació de proteïnes recombinants.....	152
6.1	Materials	152
6.1.1	Plasmidis	152
6.1.2	Línies cel·lulars.....	153
6.1.3	Medis de cultiu	154
6.2	Mètodes	154
6.2.1	Transfecció.....	154
6.2.2	Infecció de PAEC i PCC.....	155
6.2.3	Purificació de proteïnes recombinants solubles	155
6.2.4	Electroforesi de proteïnes i Western Blot	156
6.2.5	Citometria de flux	157
6.2.6	Estudis de crosreactivitat d'anticossos anti-CD200 comercials	158
6.2.7	Producció d' anticossos anti-pCD200 i anti-pCD200R	159
7	Localització subcel·lular i FRET.....	160
7.1	Materials	160
7.1.1	Plasmidis	160
7.1.2	Línies cel·lulars i medis de cultius	161
7.2	Mètodes	161
7.2.1	Localització subcel·lular i Immunofluorescència.....	161
7.2.2	FRET (<i>Förster resonance energy transfer</i>).....	162
8	Ressonància de plasmó de superfície.....	164
8.1	Materials	164
8.1.1	Plasmidis	164

8.1.2	Línies cel·lulars i medis de cultiu	164
8.2	Mètodes	164
8.2.1	Transfecció	164
8.2.2	BIAcore	165
9	Assaig de <i>Pull down</i>	168
9.1	Materials	168
9.1.1	Plasmidis	168
9.1.2	Línies cel·lulars i medis de cultius	169
9.2	Mètodes	169
9.2.1	Transfecció	169
10	Estudis funcionals	170
10.1	Materials	170
10.1.1	Línies cel·lulars	170
10.1.2	Medis de cultius	171
10.1.3	Plasmidis	171
10.1.4	Proteïnes purificades	171
10.2	Mètodes	171
10.2.1	Estudi funcional del pTNFR2 i pTNFR2 Δ E4 solubles	171
	Bibliografia	173

Abreviatures

A

ACXR	<i>Acute cellular Xenograft Rejection</i>
ALPS	<i>Autoimmune LymphoProliferative Syndrome</i>
AS	<i>AntiSèrum</i>
ASK1	<i>Apoptosis Signal-regulating Kinase 1</i>
AXHR	<i>Acute Humoral Xenograft Rejection</i>

B

BAFF	<i>B cell activating factor</i>
BCMA	<i>B cell maturation antigen</i>

C

CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CRD	<i>Cystein Rich Domain</i>
CD200RL	<i>CD200 receptor like</i>
CFP	<i>cyan fluorescent protein</i>
CHO	<i>Chinese Hamster Ovarian</i>
CIA	<i>Collagen Induced Arthritis</i>
ciAP	<i>cellular inhibitor of apoptosis protein</i>
CVF	<i>cobra venom factor</i>
C1-INH	<i>complement 1 inhibitor</i>
sCR1	<i>soluble complement receptor 1</i>

D

DAF	<i>Decay-accelerating factor</i>
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DD	<i>Death Domain</i>
DISC	<i>Death Inducing Signalling Complex</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DC	<i>Dendritic Cells</i>

E

EAE	<i>Experimental Autoimmune Encephalomyelitis</i>
EAU	<i>Experimental Autoimmune Uveoretinitis</i>
EDA	<i>Anhidrotic ectodermal dysplasia</i>
EDAR	<i>Ectodysplasin (EDA) receptor</i>
ERK	<i>Extracellular signal-Regulated Kinases</i>

F

FADD	<i>Fas-associated death domain</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
Fc	<i>Fragment crystallizable</i>
FEO	<i>Familial Expansile Osteolysis</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FRET	<i>Föster Resonance Energy Transfer</i>

G

GAD	<i>Graft Arterial Disease</i>
Gal	<i>Gal α 1,3-Gal / Galactosa aplha 1, 3 Galactosa</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
GST	<i>Glutathione S-Transferase</i>
GVHD	<i>Graft Versus Host Disease</i>

H

HAR	<i>HyperAcute Rejection</i>
HBS-N	<i>HEPES buffered saline-NaCl</i>
HBS-EP	<i>HEPES-buffered saline-EDTA Surfactane P20</i>
hCD200	CD200 humà
hCD200Rd	CD200 receptor humà variant d
hCD200Ra	CD200 receptor humà variant a
HHV	<i>Human Herpes Virus</i>
His	Histidines
HT	H-transferasa / α 1,2-fucosiltransferasa
hTNFR2	TNFR 2 humà

I

ICAM-1	<i>Inter-Cellular Adhesion Molecule 1</i>
IgC	Regió Constant d'Immunoglobulina
IgG	Immunoglobulina tipus G
IgM	Immunoglobulina tipus M
IgSF	<i>Immunoglobulin SuperFamily</i>
IgV	Regió Variable d'Immunoglobulina

Estudi de les vies del TNF/TNFR2 i del CD200/CD200R en el rebuig xenogènic

IL Interleuquina

J

JNK c- Jun N-terminal Kinases

K

ka constant d'associació

kb Kilobase

kd constant de dissociació

KD constant d'afinitat

kDa KiloDalton

KO *Knock Out*

L

LPS lipopolisacàrids

LP α limfotoxina α

M

MAPK *Mitogen Activated Protein Kinase*

mCD200 CD200 murí

MHC *Major Histocompatibility Complex*

MMP *matrix metalloprotease*

mRNA RNA missatger

N

NK *Natural Killer*

NIK	<i>NF-κB-inducing kinase</i>
NF- κ B	<i>Nuclear Factor kappa B</i>
NOD	<i>Non-obese diabetic</i>

O

ORF	<i>Open Reading Frame</i>
-----	---------------------------

P

PAC	<i>Porcine Articular Chondrocytes</i>
PAEC	<i>Porcine Aortic Endothelial Cells</i>
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCC	<i>Porcine Costal Chondrocytes</i>
pCD200	CD200 porcí
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PERV	<i>porcine endogenous retrovirus</i>
PI3K	<i>Phospoinositide 3-Kinase</i>
PLAD	<i>Preligand assembly domain</i>
pTNFR2	TNFR2 porcí

R

RANKL	<i>Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
ROI	<i>Region of Interest</i>
RIP	<i>receptor-interacting protein</i>
RU	<i>response unit</i>

S

sCR1	<i>soluble complement receptor 1</i>
SDS	dodecil sulfat sòdic
SIRP- α	<i>signal regulatory protein –α</i>
SLA I	<i>Swine Leukocyte Antigen 1</i>
SMART RACE	<i>Switching Mechanism At 5' end of RNA Transcript Rapid Amplification cDNA Ends</i>
SODD	<i>silencer of death domains</i>

T

TAC1	<i>Transmembrane Activator and CAML-Interactor</i>
TCR	<i>T cell receptor</i>
THD	<i>TNF homology domain</i>
TIM	<i>TRAF interacting motif</i>
TNF α	<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>
TNFR2	<i>Tumor Necrosis Factor Receptor 2</i>
TRADD	<i>TNFR-associated death domain</i>
TRAF	<i>TNF Receptor Associated Factor</i>
TRAIL-R	<i>TNF Related Apoptosis Inducing Ligand Receptor</i>
TRAMP	<i>TNF-like receptor Apoptosis Mediating Protein</i>
TRAPS	<i>TNF Receptor Associated Periodic Syndrome</i>

V

VCAM-1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule 1</i>
VIH	virus de la immunodeficiència humana

X

XEDAR X-linked EDAR

Y

YFP *yellow fluorescent protein*

Alfabet grec i Símbols

α 1,3-GT α 1,3-galactosiltransferasa
 Δ E7-10 exons 7 al 10 delecionats
 Δ E4 exó 4 delecionat
 Δ E4 Δ E7-10 exons 4 i del 7 al 10 delecionats
% percentatge
M Molar
mA mil·liAmpers
ml mil·lilitre
mm mil·limetre
 μ g micrograms
ng nanogram
pmp per milió de persones
rpm revolucions per minut
s segons
v/v volum/volum
3' UTR *3' Untranslated Region*

Introducció

1 Xenotrasplantament

El desenvolupament durant la segona meitat del segle XX de la immunologia, els immunosupressors i les tècniques quirúrgiques va fer que el trasplantament d'òrgans fóra un tractament viable (per exemple en casos com la insuficiència renal). Tanmateix, des del primer moment es va fer evident que el camp s'havia d'enfrontar a un fort dèficit de donadors d'òrgans. Actualment, Catalunya és líder mundial en donacions i trasplantaments. Des del 1971 al 2009 més de 15500 trasplantaments s'han realitzat en hospitals catalans. En concret, durant el 2009 es van realitzar el 21% dels trasplantaments de l'estat espanyol. Segons dades de l'Organització Catalana de Trasplantaments al 2009 la taxa de donacions a Catalunya era de 35,4 pmp i del 34,3 pmp a Espanya, bastant més alta que la dels següents països de la llista (EUA, Portugal, Bèlgica o França) que estan al voltant de 26 donacions pmp. Tot i aquests bons números, les llistes d'espera a Catalunya són llargues. L'any passat, hi havia fins a 1100 persones esperant per un trasplantament renal, 107 per un hepàtic i fins a un total de 1283 persones esperant per algun tipus de trasplantament d'òrgan sòlid. A la gran demanda i la limitada disponibilitat d'òrgans, s'hi ha de sumar la supervivència funcional dels òrgans. La supervivència dels pacients trasplantats a Catalunya oscil·la entre el 97,5% en pàncrees i el 70% en pulmó durant el primer any i entre el 96,8% en pàncrees i el 40% en pulmó al cinquè any. Entremig tenim els òrgans trasplantats més comuns, com ronyó, fetge i cor amb supervivències al cinquè any del 89%, 76% i 76%, respectivament. Per tant, els avantatges de trobar una nova font de donació per cobrir les necessitats d'òrgans són evidents.

La recerca orientada al xenotrasplantament intenta solucionar la gran falta de cèl·lules, teixits i òrgans pel trasplantament. El prefix *xeno-* en grec significa extern i així doncs, podem definir el xenotrasplantament com qualsevol tipus de trasplantament que empra cèl·lules, teixits o òrgans d'un donador d'espècie diferent a la del receptor. A principis del segle XX es van realitzar algunes temptatives de xenotrasplantament de ronyó a França [Princeteau G et al. 1905], Alemanya [Unger E et al. 1910] i més tard als EUA [Neuhof H et al. 1923] amb

donadors no primats o primats no humans per a receptors humans, tots ells sense èxit. No va ser fins al començament de la dècada dels 60 que Keith Reemtsma va utilitzar ximpanzés com a donadors de ronyons amb cert èxit, tot i que cap pacient o empelt va sobreviure més d'un any [Reemsta et al. 1964]. Aquests primers intents de trasplantar òrgans no humans van deixar entreveure que la resposta immunològica era molt més forta que la generada per l'al·lostrasplantament, que es va consolidar com a tractament clínic.

L'èxit del xenotrasplantament no només suposaria una provisió quasi il·limitada de cèl·lules, teixits i d'òrgans, sinó que el xenotrasplantament també presenta alguns clars avantatges enfront l'al·lostrasplantament. Per exemple, el donant pot ser manipulat genèticament per adaptar-lo al receptor, pot ser produït en unes condicions de qualitat i control molt elevades i pot reduir costos a tot el procés. A més a més, també permetria el desenvolupament de noves teràpies. Inicialment es van considerar dues opcions com a fonts de donació d'òrgans a humans: els primats no humans i el porc. L'ús dels primers no millorava massa el problema de disponibilitat d'òrgans perquè és difícil criar-los en captivitat. A més a més, com som espècies filogenèticament properes, el risc de transmissió d'infeccions seria molt elevat. Per aquesta mateixa raó, també hi hauria un component ètic molt important a tenir en compte. Els avantatges de l'ús de porcs com a donants serien, la seva similitud a nivell fisiològic, l'alta taxa de reproducció, la disponibilitat de tecnologia per modificar-los genèticament, i el menor risc de zoonosi. Encara que els retrovirus endògens porcins (PERVs) poden infectar cèl·lules humanes *in vitro* [Bach et al. 1998], no hi ha evidències que el teixit porcí trasplantat pugui infectar cèl·lules humanes *in vivo* [Fishman et al. 2004]. A més, s'ha descrit un tipus de porc que mostra una especial dificultat per transmetre PERVs a cèl·lules humanes [Oldmixon et al. 2002] i s'estan desenvolupant modificacions genètiques per tal d'inactivar-los [Ramsoondar et al. 2009]. Per totes aquestes raons s'ha triat el porc com a donador pel xenotrasplantament a humans [Edge et al. 1998][Auchincloss et al. 1998].

Les aplicacions xenogèniques podrien anar des del xenotrasplantament d'òrgans sòlids com cor, ronyó o pulmó, a l'empelt de teixits o cèl·lules com illots

pancreàtics, hepatòcits, condrocits, pell i cèl·lules nervioses [Edge et al. 1998][Auchincloss et al. 1998][Costa et al. 2003]. El principal obstacle per a la seva aplicació clínica és la forta resposta immunitària generada pel xenoempelt, mediada tant per mecanismes cel·lulars com humorals [Auchincloss et al. 1998][Costa et al. 2003].

Durant les dues últimes dècades, s'han fet progressos importants en el camp del xenotrasplantament, especialment en la immunobiologia del trasplantament de porc a primat. Això ha permès que s'estiguin organitzant assajos clínics per aplicacions específiques com el xenotrasplantament d'illots pancreàtics. Recentment, tres grups diferents han obtingut temps de supervivència de fins a 6 mesos en models de trasplantament d'illots pancreàtics de porcs adults o neonats a primats no humans [Cardona et al. 2006][Hering et al. 2006][Dufrane et al. 2006]. Aquests treballs han desenvolupat estratègies de supressió immunològica (sirolimus i everolimus) o d'encapsulació que han servit de base per encetar nous assajos clínics de trasplantaments d'illots pancreàtics porcins a pacients humans diabètics. Una altra estratègia desenvolupada amb èxit és la modificació genètica del porc donant, que és especialment interessant de cara a disminuir o evitar el tractament del receptor. El seu objectiu és fer les cèl·lules, teixits i òrgans porcins més compatibles amb el receptor humà per tal d'evitar el rebuig. Primer es van introduir via transgènesi molècules reguladores del complement humà per combatre el rebuig hiperagut [Fodor et al. 1994][Cozzi et al. 1995]. Posteriorment, es van desenvolupar tècniques que permetien eliminar molècules porcines per recombinació homòloga i transferència nuclear com l'antigen carbohidrat Galactosa α 1,3-Galactosa o Gal α 1,3-Gal (Gal), produït àmpliament en porcs però no en humans i implicat en el rebuig [Lai et al. 2002][Phelps et al. 2003]. Per tal d'aconseguir la tolerància del xenoempelt també s'estan desenvolupant estratègies de quimerisme. Tot i que el quimerisme hematopoètic a llarg termini és difícil d'aconseguir, s'ha demostrat en estudis d'alloempelts humans que una expressió transitòria en el donador és suficient per permetre la supervivència a llarg termini de l'empelt [Fudaba et al. 2006]. Per últim, una estratègia relacionada ha estat el co-trasplantament de ronyó porcí

amb teixit tímic provinent del donador. Aquest segon teixit trasplantat genera una tolerància específica en cèl·lules T humanes i murines envers el donador porcí [Lee et al. 1994][Nikolic et al. 1999][Zhao et al. 1996]. Aquesta metodologia ha permès una supervivència de fins a 83 dies de ronyons deficients en l'antigen Gal [Yamada et al. 2005].

1.1 Rebuig immunològic del xenoempelt

Hi ha tres tipus de rebuig associat al xenotrasplantament d'òrgans sòlids: l'hiperagut, l'agut que es divideix en cel·lular i humoral, i per últim el crònic.

El rebuig hiperagut (HAR) és el procés de rebuig més ràpid, i esdevé entre minuts i unes poques hores després de realitzar el trasplantament. S'inicia a partir de la resposta humoral immune amb els anticossos xenoreactius naturals preexistents en l'hoste. Aquests anticossos estan dirigits principalment a l'antigen carbohidrat Gal, que es sintetitza per la α 1,3-galactosiltransferasa (α 1,3-GT). Aquest enzim està àmpliament expressat en teixits porcins però que no és funcional ni en humans ni primats del vell món a causa d'un canvi en el marc de lectura i mutacions en l'estructura del gen [Galili et al. 1993][Sandrin et al. 1993][Larsen et al. 1990]. Els anticossos xenoreactius naturals es dipositen damunt l'endoteli de l'òrgan trasplantat causant l'activació del complement, hemorràgies, trombosi, isquèmia i necrosi [Auchincloss et al. 1998][Dalmaso et al. 1992]. L'activació del complement, que es produeix principalment a través de la deposició de IgM, és el mecanisme essencial del HAR en el xenotrasplantament de porc a humà, i més en concret la formació del complex C5b-9 que produeix la citòlisi [Dalmaso et al. 1992]. Durant els anys, s'han anat desenvolupant una sèrie d'estratègies per tal d'evitar l'activació del complement. Aquest mecanisme es pot inhibir sistemàticament amb l'administració del factor de verí de cobra (CVF), l'inhibidor de complement 1 (C1-INH) o el receptor de complement 1 soluble (sCR1), tots tres capaços d'evitar el rebuig hiperagut [Auchincloss et al. 1998]. Tanmateix, aquests tractaments comprometen la capacitat de combatre infeccions del sistema immune de l'hoste. En canvi, un

tractament com l'anticòs monoclonal anti-C5, que preserva la cascada de complement a nivell de C3, no té aquest efecte perjudicial i també és capaç de prolongar la supervivència dels còrps de rata i porc perfusionats *ex vivo* amb sèrum humà [Rollins et al. 1995]. En qualsevol cas, gràcies a la l'enginyeria genètica es va dirigir la recerca cap a la inhibició de l'activació del complement a nivell local a través de l'expressió de proteïnes reguladores de complement humanes en porcs transgènics. La funció de les proteïnes reguladores del complement és bastant específica d'espècie i per tant es va hipotetitzar que les proteïnes reguladores porcines no serien capaces de regular eficaçment l'activació del complement humà [Auchincloss et al. 1998]. Primer, es va aconseguir l'expressió transgènica del CD59 humà, una glicoproteïna de membrana que regula la formació del complex d'atac de membrana del complement [Fodor et al. 1994]. Un altre exemple és la glicoproteïna CD55, també coneguda com a DAF, que un cop unida a les proteïnes del complement a nivell de convertases C3 i C5 talla la cascada del complement i evita el dany en les cèl·lules de l'hoste. Emprant aquesta estratègia, es va aconseguir una supervivència major dels xenoempelt en diferents models de trasplantament de porc a humà [Sun et al. 2005]. Però com la protecció contra el rebuig humoral no era total, es van assajar altres estratègies enfocades a disminuir la antigenicitat del donador. Es van testar diferents enzims, entre ells la α 1,2-fucosiltransferasa o H-transferasa (HT), que competeix amb la α 1,3-GT i causa la disminució de l'epítot Gal. Amb aquesta aproximació es va reduir la reactivitat dels anticòssos naturals i la citòlisi mediada pel sèrum humà [Sandrin et al. 1995][Sharma et al. 1996][Costa et al. 1999a]. El proper pas fou la combinació de les dues estratègies, es va comprovar que la combinació de l'expressió de hCD59 i HT augmentava l'efecte protector que tenien per separat [Costa et al. 1999b][Costa et al. 2002a]. Finalment l'antigen Gal va ser eliminat per recombinació homòloga del gen de la α 1,3-GT i transferència nuclear [Lai et al. 2002][Phelps et al. 2003]. Gràcies a aquest *Knockout* (Gal KO), els ronyons de porc trasplantats en babuïns es van mostrar resistents al HAR [Chen et al. 2005].

El rebuig agut del xenotrasplantament té un component cel·lular i un component humoral. El cel·lular (ACXR) apareix als pocs dies d'haver-se dut a terme el trasplantament i s'observa tant als xenoempelts vasculars com als avasculars. El rebuig cel·lular del xenoempelt és més intens que el que provoca l'aloempelt [Brouard et al. 1999][Porter et al. 2005] i hi intervenen limfòcits T CD4+ i CD8+ [Ashton-Chess et al. 2003][Davila et al. 2006]. Es coneix millor el component cel·lular en el rebuig de cèl·lules i teixits xenogènics perquè és el predominant. En estudis on s'injectaven illots pancreàtics porcins en el fetge de babuïns no immunodeprimits (via vena porta), el rebuig apareixia als pocs dies amb un patró histològic caracteritzat per un infiltrat cel·lular amb macròfags i limfòcits T. Quan es bloquejava l'activació dels limfòcits T, s'aconseguia una llarga supervivència dels illots porcins [Cardona et al. 2006][Hering et al. 2006]. Resultats similars s'han obtingut en un model de xenotrasplantament de cartílag porcí a ratolí [Costa et al. 2003]. Depenent del tipus cel·lular del donant implicat en el trasplantament pot haver variacions en els mecanismes de rebuig. S'han realitzat diversos estudis per trobar el mecanisme concret pel qual els òrgans vascularitzats provoquen un rebuig cel·lular. Aquests estudis es basen en cocultius de cèl·lules endotelials (PAEC) amb cèl·lules humanes mononucleades de sang perifèrica o limfòcits purificats. Els resultats mostren com la major part d'interaccions moleculars del reconeixement immune mediat per limfòcits T estan preservades. Aquest és el cas dels SLA I i II (antigens majors d'histocompatibilitat porcins), que tenen capacitat per activar directament els limfòcits T humans a través del TCR [Auchincloss et al. 1998][Murray et al. 1994][Rollins et al. 1994]. En relació als senyals de coestimulació, el CD28 humà s'uneix al CD86 porcí i esdevé un dels principals mecanismes coestimuladors emprats per l'endoteli per tal d'activar els limfòcits T humans [Murray et al. 1994]. En canvi, la via CD40-CD154 sembla menys essencial [Lee et al. 2000], si bé no es coneix tan bé com participa. Malauradament, la immunosupressió a través d'inhibidors de la calcineurina no és efectiva per la via del CD28 [June et al. 1987]. S'han desenvolupat algunes combinacions terapèutiques amb molècules implicades en aquest procés, com el CD152lg i bloquejant el CD154, però només aconseguen retardar el rebuig del cor trasplantat en un model concordant de

rata a ratolí [Lehnert et al. 2001]. En canvi, en xenoempelts avasculars com els illots pancreàtics, es pot aconseguir una supervivència indefinida bloquejant el CD28 i el CD40 [Lehnert et al. 2001]. També s'ha considerat la generació de limfòcits T reguladors, ja que estudis recents mostren com els limfòcits T humans CD4⁺ CD25⁺ poden suprimir la resposta cel·lular xenogènica, inhibint la proliferació de limfòcits T CD4⁺ CD25⁻, la producció de citoquines i l'activitat citolítica [Porter et al. 2005]. Tanmateix l'administració d'una forta immunosupressió és capaç d'evitar l'infiltrat cel·lular en l'òrgan trasplantat, i perllongar la supervivència del xenoempelt, però no pot evitar el rebuig humoral [Tseng et al. 2005][Ashton-Chess et al. 2003].

El rebuig agut humoral (AXHR) sorgeix en un període que va des de dies fins a mesos després de l'operació de trasplantament. Es caracteritza per un infiltrat de macròfags i cèl·lules NK, i una activació de l'endoteli de tipus II que promou hemorràgies i trombosi intravascular [Auchincloss et al. 1998]. Fins al moment, el rebuig agut humoral és el més complicat d'evitar. La majoria de dades recopilades sobre aquest tipus de rebuig s'han obtingut gràcies a estudis de trasplantament d'òrgans sòlids de porcs donadors transgènics que expressaven el CD55 humà i babuins o micos cynomolgus com a receptors. Aquesta modificació, combinada o no amb l'expressió de CD59 humà, a part d'evitar el HAR també ajuda davant el rebuig agut humoral [Bühler et al. 2001]. El complement segurament participa a diferents nivells en aquest tipus de rebuig ja que es coneix que els seus components tenen múltiples funcions en el curs de la resposta inflamatòria [Dunkelberger et al. 2010]. S'ha vist també que els anticossos anti-Gal participen en aquest tipus de rebuig [Lin et al. 2000][Kozłowski et al. 1999], tot i que el seu grau de participació no està clar encara. El trasplantament heretotòpic de cor Gal KO, combinat amb una immunosupressió forta, mostra un temps de supervivència relativament llarg entre 2 i 6 mesos en babuins trasplantats, tot i així els òrgans acaben sent rebutjats. En aquest escenari de rebuig, s'han detectat altres tipus d'anticossos presents [Tseng et al. 2005]. De fet, s'ha observat que el sèrum humà té certa reactivitat enfront cèl·lules porcines Gal KO, suggerint la presència d'anticossos

naturals amb especificitat diferent a Gal [Hara et al. 2006]. Per tant, els anticossos anti-carbohidrat no Gal són també objecte d'estudi per aconseguir una supervivència més prolongada [Tseng et al. 2005][Chen et al. 2005][Doménech et al. 2003].

En condicions *in vitro*, les cèl·lules porcines tendeixen a coagular la sang humana degut a una incompatibilitat parcial entre els reguladors de la coagulació porcins i les proteïnes humanes o de primats no humans [Cowan et al. 2007][Shrivastava et al. 2007][Robson et al. 2000][Siegel et al. 1997]. En un estudi de Kuwaki et al. [Kuwaki et al. 2005] amb cors Gal KO es va aconseguir un temps de supervivència llarg, però al final, l'empelt deixava de ser funcional a causa de microangiopaties trombòtiques. Contrarestar les incompatibilitats del sistema de coagulació podria beneficiar a la funció del xenoempelt. De fet, l'expressió transgènica de molècules reguladores de la trombosi, com el CD39 humà, s'ha mostrat eficaç protegint contra la trombosi els illots murins perfusionats amb sang humana [Dwyer et al. 2004][Dwyer et al. 2006]. En aquest moment s'estan desenvolupant estratègies d'enginyeria genètica per determinar el seu efecte en el xenotrasplantament d'òrgans sòlids.

Per últim, lesions compatibles amb un rebuig crònic només s'han observat en uns pocs òrgans després de llargs temps de supervivència i els mecanismes involucrats encara no estan clars [Kuwaki et al. 2005].

1.2 Immunitat innata i xenotrasplantament

Diversos estudis han mostrat una relació directa entre la resposta immunitària innata i el rebuig del xenoempelt. En models de xenotrasplantament discordant de porc a rata, les cèl·lules NK i els macròfags contribueixen activament al rebuig agut humoral [Xia et al. 2000]. En un escenari de xenotrasplantament de porc a primat no humà, el rebuig agut no es pot controlar amb una immunosupressió anti-limfòcits T [Chen et al. 2005]. De fet, l'òrgan rebutjat presenta un infiltrat cel·lular format majoritàriament per macròfags i en menor mesura per cèl·lules NK [Kobayashi et al. 1997].

Les cèl·lules NK humanes maten les cèl·lules porcines per mecanismes dependents i independents d'anticòs [Artrip et al. 1999]. En concret, s'han involucrat els receptors de cèl·lules NK humanes NKG2D i NKp44 en la citotoxicitat enfront cèl·lules endotelials porcines [Forte et al. 2005]. També s'ha descrit que el CD86 porcí activa les cèl·lules NK humanes a través d'una variant del CD28 [Costa et al. 2002b]. Una de les aproximacions dissenyades per evitar aquesta citotoxicitat fou l'expressió de la molècula quimèrica hCD152-hCD59 en cèl·lules porcines [Costa et al. 2002b]. Aquesta es va correlacionar amb una reducció de l'accessibilitat al CD86 porcí i de la susceptibilitat a la lisi mediada per cèl·lules NK humanes en absència de sèrum. A més, la coexpressió d'aquesta molècula quimèrica amb HT condueix a una protecció quasi completa enfront aquest tipus de citotoxicitat [Costa et al. 2002b].

Els monòcits/macròfags estan presents des dels primers estadis del rebuig del xenoempelt [Goodman et al. 1997][Davila et al. 2006][Ashton-Chess et al. 2003][Goddard et al. 2002]. La primera vegada que es va descriure la seva implicació en el rebuig xenogènic va ser gràcies a estudis d'empelts cardíacs de hámsters a rates i seguidament a models de trasplantament de porc a babuí [Hancock et al. 1993][Candinas et al. 1996][Lin et al. 1997a][Itescu et al. 1998]. Tots dos models mostraven que la població majoritària de l'infiltrat cel·lular són els macròfags, com també s'observava en el rebuig d'illots pancreàtics porcins [Wallgren et al. 1995]. La seva participació directa en el rebuig dels illots es va confirmar en el model de ratolí NOD mitjançant un tractament amb clodronat [Fox et al. 1998]. En el cas del xenotrasplantament d'òrgans, també hi ha evidències de la seva contribució ja que la depleció dels macròfags en el pulmó donador porcí augmenta 6 cops el temps de supervivència [Cantu et al. 2006]. Tanmateix, els mecanismes pels quals els macròfags reconeixen i destrueixen el xenoempelt encara no estan del tot clars. Els treballs fets fins ara indiquen que la infiltració de cèl·lules del sistema immunitari innat precedeix la infiltració de limfòcits T. Per tant, en resposta a cèl·lules diana xenogèniques, els macròfags construeixen una primera resposta local innata que atrau limfòcits T i amb la seva ajuda destrueixen el xenoempelt [Yi et al. 2003][Fox et al. 1998][Fox et al. 2001]. Els

macròfags poden ser activats per mecanismes de rebuig del xenoempelt dependents d'anticossos i de complement a través dels receptors específics. A més a més, els macròfags humans poden reconèixer directament cèl·lules porcines. Estudis *in vitro* mostren com els monòcits humans i les cèl·lules dendrítiques (DC) s'uneixen a l'endoteli porcí i l'activen [Goodman et al. 1997][Kwiatkowski et al. 1999]. A més a més, el contacte de l'endoteli porcí amb els monòcits humans fa que aquests també s'activin [Manna et al. 2002] [Greenwald et al. 2009]. En el cas de les DC, després del reconeixement mostren un increment de CD40, CD54, CD80 i CD86 a la superfície cel·lular, i una producció de IL-12p70 i TNF α [Manna et al. 2001]. Els lligands i receptors implicats en aquest procés no estan molt clars, si bé hi ha molècules d'adhesió com VCAM-1 i ICAM-1 que participen en la unió a la cèl·lula [Manna et al. 2001]. La via principal d'activació però, podria ser el reconeixement de carbohidrats, com a través de la galectina-3. Aquesta lectina, produïda pels monòcits humans, activaria tant l'endoteli porcí com els monòcits humans mitjançant la seva unió amb l'antigen Gal [Jin et al. 2006][Greenwald et al. 2009]. A més, s'ha descrit que la molècula SIRP- α humana, expressada pels macròfags i que interacciona amb CD47, no és compatible amb el lligand porcí [Ide et al. 2007][Wang et al. 2007a]. Normalment aquesta interacció evita la fagocitosi de cèl·lules autòlogues i quan manca provoca que no esdevingui la senyal inhibidora de fagocitosi. Per aquesta raó, es va expressar el CD47 humà en cèl·lules porcines, atenuant la fagocitosi provocada per macròfags humans [Ide et al. 2007][Wang et al. 2007a].

Les citoquines i quemoquines també estan implicades en el rebuig, ja que moltes d'elles funcionen en l'escenari d'un trasplantament de porc a home. La més rellevant de totes és el TNF α , produïda principalment per cèl·lules NK i macròfags. Mitjançant estudis de trasplantament en petits animals s'ha provat la implicació del TNF α en el AHXR [Lin et al. 1997b][Costa et al. 2004]. Tant el TNF α humà com el porcí, poden activar l'endoteli porcí elevat l'expressió de molècules d'adhesió com VCAM-1, ICAM-1 i E-selectina, o els SLA I i II i en conseqüència amplificar el rebuig mediat per cèl·lules [Costa et al. 2004].

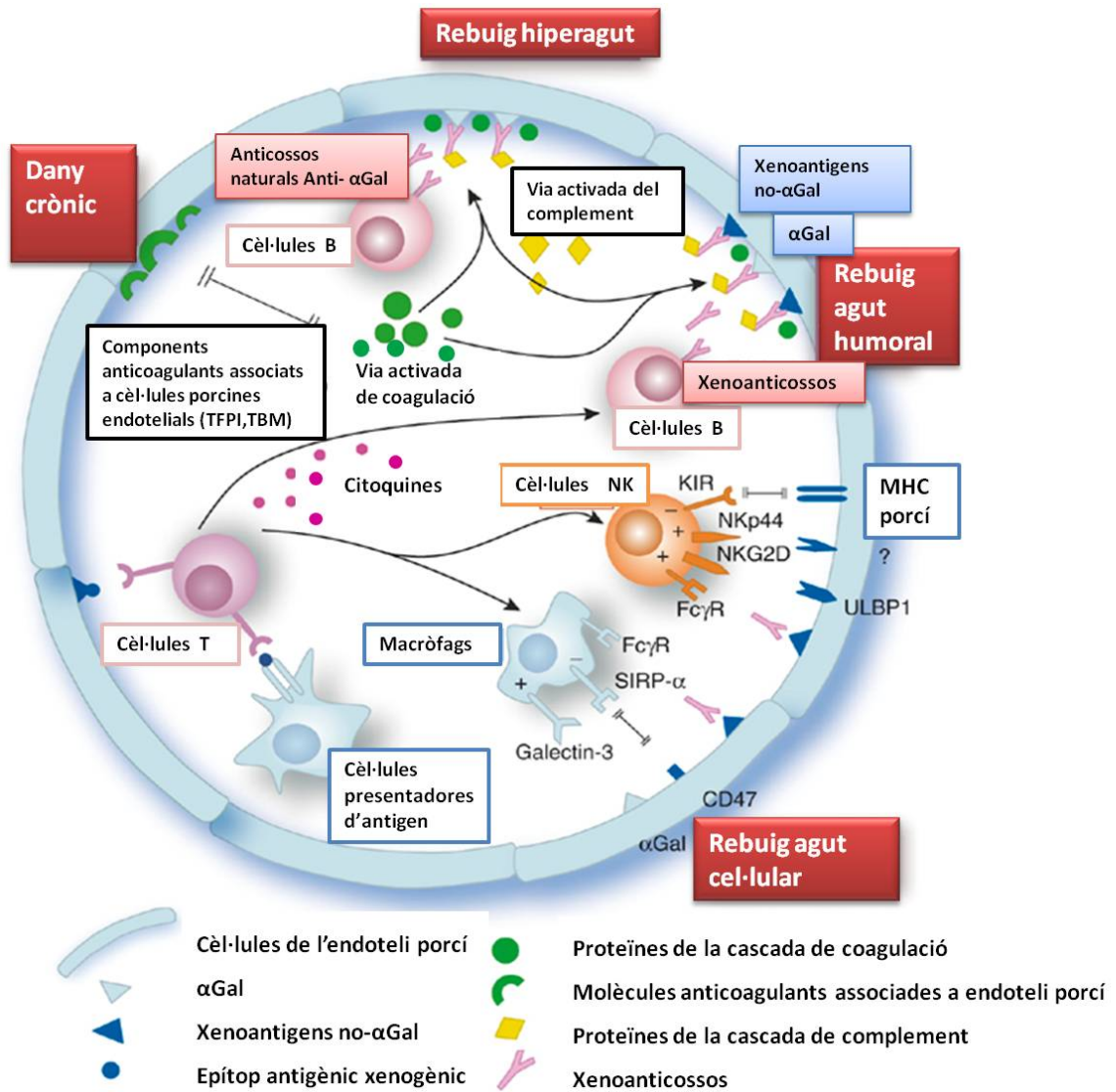


Figura esquema I. Diagrama sumari dels principals mecanismes involucrats en el rebuig de xenoempelts porcins a primats no humans. Adaptada [Sprangers et al. 2008]

2 Via TNF/TNFR

Els membres de les superfamílies del factor de necrosi tumoral (TNF) i del receptor del TNF (TNFR) estan en bona part relacionats amb el manteniment de l'homeòstasi del sistema immune i per tant s'expressen majoritàriament en cèl·lules immunitàries.

L'activació dels diferents membres de la superfamília del TNFR, a través dels seus lligands, afecta a la proliferació cel·lular, supervivència, diferenciació i apoptosi de cèl·lules responedores. Les funcions biològiques d'aquestes superfamílies són molt variades. Comparteixen efectes beneficiosos i protectors en inflamació i defensa de l'hoste i a més, tenen un paper important en organogènesi. Tanmateix, també són responsables dels efectes nocius en sèpsia, caquèxia i malalties autoimmunes.

Alguns lligands tenen múltiples receptors, com TRAIL o RANKL, mentre alguns receptors tenen múltiples lligands com els propis receptors de TNF α . Però normalment, tenen en comú que les interaccions entre lligand i receptor són molt específiques i d'alta afinitat [Locksley et al. 2001]. A més, al contrari del que pot semblar, la major part de combinacions de lligand/receptor té una funció pròpia i poc redundant [Hehlgans et al. 2005]. En humans hi ha actualment més de 40 membres descrits d'aquestes superfamílies TNF/TNFR (taula I). En la figura esquema II es presenten les combinacions més conegudes.

Taula I. Membres de les superfamílies TNF/TNFR.

TNFSF lligand	Noms comuns de lligands	TNFRSF receptor	Noms comuns dels receptors
TNFSF1	Limfotoxina α /TNF β	TNFRSF1A TNFRSF1B TNFRSF14	TNFR1 TNFR2 HVEM
TNFSF2	TNFSF2 TNF/TNF α	TNFRSF1A TNFRSF1B	TNFR1 TNFR2
TNFSF3	Limfotoxina α 1 β 2	TNFRSF3	LT β R
TNFSF4	OX40L	TNFRSF4	OX40/CD134
TNFSF5	CD40L/CD154	TNFRSF5	CD40

TNFSF6	FasL	TNFRSF6 TNFRSF6B	Fas DcR3
TNFSF7	CD27L/CD70	TNFRSF7	CD27
TNFSF8	CD30L/CD153	TNFRSF8	CD30
TNFSF9	4-1BBL	TNFRSF9	4-1BB/CD137
TNFSF10	TRAIL/Apo2-L	TNFRSF10A TNFRSF10B TNFRSF10C TNFRSF10D TNFRSF11B	TRAILR1/DR4 TRAILR2/DR5 TRAILR3 TRAILR4 OPG
TNFSF11	RANKL	TNFRSF11A TNFRSF11B	RANK OPG
TNFSF12	TWEAK	TNFRSF12A	TWEAKR/Fn14
TNFSF13	APRIL	TNFRSF13B TNFRSF17	TACI BCMA
TNFSF13B TNFSF20	BAFF/BLys	TNFRSF13B TNFRSF13C TNFRSF17	TACI BAFFR BCMA
TNFSF14	LIGHT	TNFRSF3 TNFRSF6B TNFRSF14	LTbR DcR3 HVEM
TNFSF15	VEGI/TL1A	TNFRSF6B TNFRSF12	DcR3 TRAMP/DR3
TNFSF18	GITRL/AITRL	TNFRSF18	GITR/AITR
Cap	EDA1 EDA2	Cap TNFRSF27	EDAR XEDAR
Cap	NGF(no TNFSF) proNGF (no TNFSF)	TNFRSF16	NGFR/p75NTR
Cap	Desconegut	TNFRSF19	TROY
Cap	Desconegut	TNFRSF19L	RELT
Cap	Desconegut	TNFRSF21	DR6

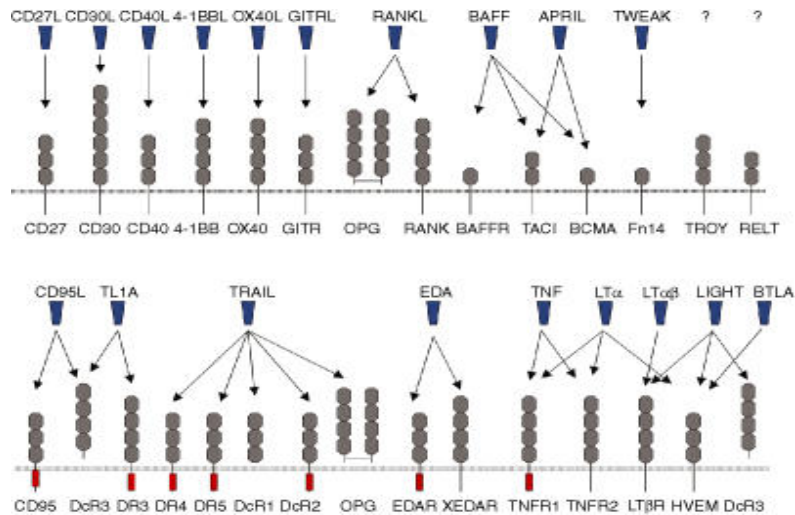


Figura esquema II. Superfamílies TNF/TNFR. Els lligands es mostren en color blau. Les fletxes indiquen interacció. La regió extracel·lular dels receptors està marcada en gris amb els corresponents CRD. Els dominis de mort es mostren amb cilindres vermells. Tots els altres receptors uneixen adaptadors de TRAF per desencadenar el senyal. [Hehlhans et al. 2005].

2.1 Lligands de la superfamília TNF

Els lligands de la superfamília del TNF són proteïnes de membrana de tipus II amb l'extrem N-terminal a la regió intracel·lular [Bodmer et al. 2002]. Els lligands són biològicament actius quan s'organitzen en forma de trímers a través d'una unió no covalent [Peschon et al. 1998a]. Aquest tipus de proteïnes tenen entre un 20 i un 30% d'homologia en el punt d'interacció responsable de l'organització de l'estructura terciària en trímers. Aquest domini conservat d'aproximadament 150 aminoàcids es localitza a l'extrem C-terminal i es denomina domini amb homologia a TNF (THD). Cada TDH està format per cadenes β , conservades entre tots els membres, i diversos *loops* amb una topologia estàndard de *jellyroll* [Jones et al. 1989][Eck et al. 1989][Eck et al. 1992][Karpusas et al. 1995][Cha et al. 1999][Mongkolsapaya et al. 1999][Hymowitz et al. 1999]. Aquests lligands, un cop trimeritzats, tenen una estructura en forma de campana invertida que en unir-se al receptor queda abraçada per les tres cares de la base formant un complex simètric 3:3 (Figura esquema III). L'estructura externa té poca homologia per poder unir-se de

forma específica a cada receptor [Eck et al. 1989][Loetscher et al. 1993][Fesik et al. 2000].

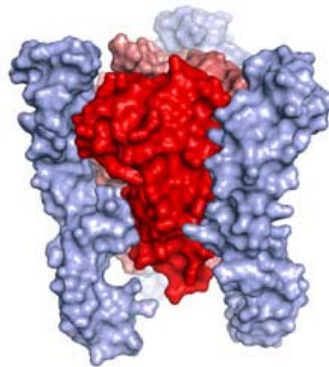


Figura esquema III. Model estructural del TNF en forma de trímers unit a un receptor trímeric. El TNF es mostra en vermell i la regió d'unió del receptor en blau.

La major part d'aquests lligands es sintetitzen com a proteïnes inserides a la membrana i són alliberats en forma soluble per proteòlisi específica. Alguns lligands, com el TNF α , són actius tant en la forma transmembrana com també en la soluble. La seva alliberació es produeix mitjançant un tall proteolític realitzat per metal·loproteases de matriu (MMP) que pot ser induït per diferents estímuls. Altres lligands perden bona part de la seva activitat quan són proteolitzats, com és el cas de FasL quan és trencat per la matrilisina (MMP-7) [Bodmer et al. 2002]. També hi ha lligands que només s'expressen de forma soluble com la Limfotoxina α . De fet, el seu extrem N-terminal s'assembla a un pèptid senyal i la seva transformació a forma soluble és extremadament eficient.

La pèrdua de regulació d'alguns lligands d'aquesta superfamília com el TNF α , el CD40L o el FasL té greus conseqüències en els processos de tolerància immunitària, com s'ha descrit àmpliament [Vassalli et al. 1992][Siegel et al. 2000][Burkly et al. 2001]. Així, alteracions en les seves vies contribueixen al desenvolupament de malalties autoimmunes i inflamatòries, com l'artritis reumatoide, el lupus eritematós sistèmic, la malaltia intestinal inflamatòria, la diabetis de tipus I, l'esclerosi múltiple, la sèpsia, etc [Mackay et al. 2002]. Un altre exemple de lligand que es troba en forma soluble o ancorat a la membrana és BAFF. La seva sobreexpressió en un model murí transgènic

produceix una hiperplàsia de cèl·lules B, una producció d'autoanticossos incrementada i una fallada del ronyons, un fenotip similar al lupus [Mackay et al. 1999][Khare et al. 2000][Gross et al. 2000]. De fet, es troba incrementat en sèrum de pacients de lupus o síndrome de Sjörger en correlació amb els nivells d'anticossos autoreactius [Cheema et al. 2001]. La desregulació de LIGHT, un altre dels lligands que té funcions de coestimulació (en aquest cas a limfòcit T), provoca la pèrdua de tolerància. Tanmateix, altres lligands com TRAIL, 4-1BBL i CD30L o el propi TNF α , tenen papers contradictoris segons el tipus cel·lular afectat. Poden induir senyals de mort per un costat o de supervivència i/o proliferació en altres situacions o promoure l'activació de limfòcits T reguladors en comptes de limfòcits efectors [Mackay et al. 2002][Hehlhans et al. 2005].

2.2 Receptors de la superfamília TNFR

Els receptors de la superfamília del TNFR són proteïnes de membrana amb una regió extracel·lular que conté dominis rics en cisteïnes (CRD). La gran majoria són proteïnes transmembrana de tipus I (extrem N-terminal extracel·lular), però alguns d'ells com BCMA, TACI o XEDAR són de tipus III (sense pèptid senyal) i fins i tot n'hi ha algun soluble (DcR3 i OPG) [Bodmer et al. 2002]. Els CRD són el tret distintiu d'aquesta superfamília i consisteixen en pseudorepeticions de 40 aminoàcids definides per 3 ponts disulfur generats per 6 residus de cisteïna altament conservats [Smith et al. 1994]. Hi ha una variació significativa en el nombre de CRD dels diferents membres de la superfamília, des del BAFFR amb un CRD parcial, passant pel TNFR1 i el TNFR2 amb quatre, fins arribar al CD30 amb sis CRD [Bodmer et al. 2002]. Els receptors tenen dos regions de contacte principals amb el lligand. La primera correspon al segon CRD que interacciona a una zona hidrofòbica amb un residu de tirosina bastant conservat als lligands (crític per la unió de TNF, LT α , FasL o TRAIL). La segona correspon a una regió més polar a cavall entre el final del segon CRD i el principi del tercer [Bodmer et al. 2002].

Alguns receptors com Fas, TNFR1 o TNFR2 es preassemblen a la superfície cel·lular abans de la unió amb el seu lligand [Chan et al. 2000]. Ho fan a través de la regió anomenada PLAD, que està situada en el primer i més extern dels CRD. Les interaccions que succeeixen a la regió PLAD són específiques i només permeten la formació d'homotrímers. Tot i així, s'ha demostrat que situar el PLAD del TNFR1 en el TNFR2 permet la formació de receptors heterotrímèrics [Chan et al. 2000]. A més a més, alguns d'ells són tallats de la superfície i/o expressats directament com isoformes solubles amb capacitat d'unir el lligand, com el TNFR2, 4-1BB i el Fas. En general, la generació de receptors solubles es correlaciona amb el nivell d'expressió del receptor de membrana. Aquest podria ser un mecanisme que serviria per antagonitzar l'estimulació del receptor induïda pel lligand [Heaney et al. 1996] [Hehlgans et al. 2002].

L'activació del receptor a través dels lligands de la família del TNF α provoca el reclutament de diferents proteïnes adaptadores que activen múltiples vies de transducció de senyal. Els receptors de la superfamília del TNF es poden classificar en tres grups basant-se en la seva seqüència intracel·lular [Dempsey et al. 2003]. El primer grup inclou Fas (CD95), TNFR1, TRAIL-R1/DR4, TRAIL-R2 /DR5, TRAIL-R4/DcR2, TRAMP/DR3 i EDAR, i contenen els dominis de mort (DD) en les seves regions citoplasmàtiques. L'activació d'aquests receptors provoca un reclutament d' adaptadors amb dominis de mort intracel·lulars com FADD o TRADD [Chinnaiyan et al. 1996][Kischkel et al. 2000]. Aquestes molècules tenen la capacitat d'activar la cascada de caspases i conseqüentment induir apoptosi. El segon grup inclou entre d'altres el TNFR2, CD27, CD30, CD40, LT β R, OX40, 4-1BB, BAFFR, BCMA i RANK. Aquests subgrup de receptors contenen en el seu domini citoplasmàtic motius d'interacció per factors TRAF que s'anomenen TIM. L'activació dels TIM provoca el reclutament de membres de la família TRAF i la conseqüent activació de vies de transducció de senyal com NF- κ B, JNK, p38, ERK i PI3K [Dempsey et al. 2003]. A la figura esquema IV es resumeixen aquests processos més comuns de funcionament d'aquestes superfamílies. El tercer

grup inclou els receptors TRAIL-R3/DcR1, DcR3 i OPG que no contenen motius senyalitzadors, però que poden competir amb els membres dels altres dos grups pels corresponents lligands [Hehlgans et al. 2005].

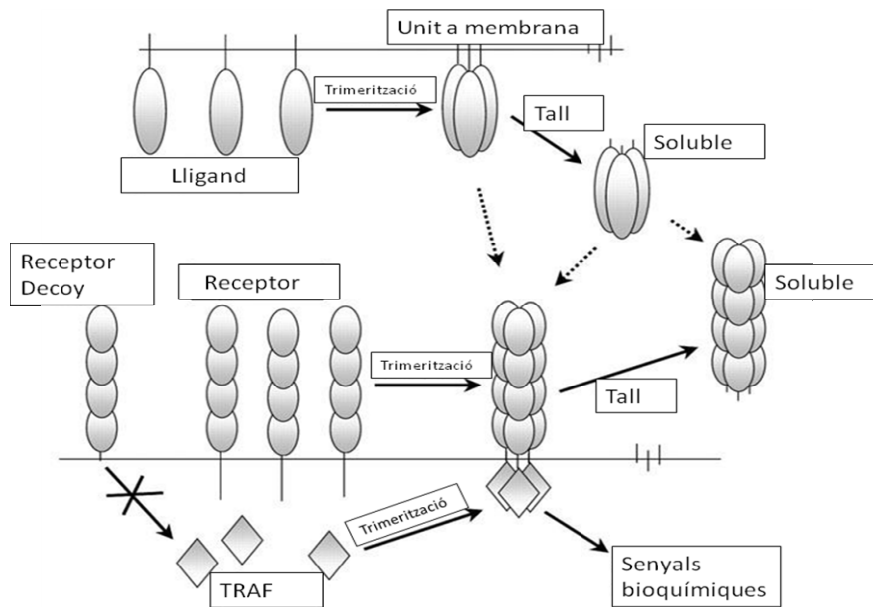


Figura esquema IV Esquema general de les interaccions entre lligands i receptors de la superfamília del TNF [MacEwan et al. 2002].

S'han descrit quatre tipus de desordres genètics que comporten l'alteració de la interacció de lligand/receptor per mutació de receptors d'aquesta superfamília [Locksley et al. 2001], i que per tant poden donar informació clau de les seves funcions. El síndrome limfoproliferatiu autoimmunitat (ALPS) està relacionat amb l'alteració de la interacció Fas-FasL. Els casos més comuns són per proteïnes Fas defectuoses que tot i unir-se a FasL, han perdut la capacitat de transmetre senyal. El resultat és l'afectació del procés d'apoptosi amb un excés d'expansió limfocitària i autoimmunitat. El síndrome periòdic associat al receptor del TNF (TRAPS) implica un processament incorrecte del TNFR1, que afecta la interacció amb el TNF i provoca un augment dels seus efectes proinflamatoris. La displàsia ectodermal anhidròtica (EDA) pot estar causada per un canvi en el lligand o en el receptor i involucra les proteïnes EDA-EDAR. Per últim la osteòlisis familiar expansiva (FEO) es relaciona amb un canvi en el pèptid

senyal de RANK que provoca lesions lítiques en els ossos [Locksley et al. 2001].

2.3 Via del TNF

2.3.1 Factor de Necrosis Tumoral (TNF α)

El TNF α va ser identificat per primera vegada com a producte de limfòcits i macròfags amb capacitat per lliurar certs tipus de cèl·lules, especialment les tumorals [Granger et al. 1969][Carswell et al. 1975]. Uns anys després, es va clonar el cDNA humà [Gray et al.][Pennica et al.]. El gen humà es va localitzar en el braç curt del cromosoma 6, 6p23-6q12, a prop del locus HLA-B [Nedwin et al. 1985]. Té una llargària de 3,6 kb i conté 4 exons, l'últim dels quals codifica per més del 80% de la proteïna soluble. El transcrit primari té una mida de 2762 nucleòtids i codifica per una proteïna precursora de 233 aminoàcids. El TNF α s'expressa com a proteïna transmembrana de 26 kDa, però pot ser tallada de la superfície cel·lular per metal·loproteases com TACE, que alliberen una forma soluble de 17 kDa [Idriss et al. 2000]. En tot cas, la seva forma biològicament activa és com homotrímer (52 kDa per la forma soluble). Cada monòmer conté dues làmines β plegades i cadascuna conté 8 cadenes β antiparal·leles en disposició *jellyroll* en l'extrem N-terminal (Figura esquema V).

El TNF α és una citoquina molt potent i pleiotròpica produïda majoritàriament per macròfags i monòcits activats, però també per moltes altres cèl·lules com limfòcits T i B, cèl·lules NK, mastòcits, neutròfils, micròglia, cèl·lules tumorals i fibroblasts [Matthews et al. 1981][Vassalli et al. 1992]. Entra en el torrent sanguini i pot alterar la biologia de teixits distants, o funcionar com a factor paracrí actuant localment. El rol principal del TNF α és la regulació de les cèl·lules immunitàries per combatre les infeccions bacterianes i parasitàries [Hehlhans et al. 2005]. Concordant amb el seu important paper com mediador inflamatori i de resposta a la infecció, es secreta en resposta a molts estímuls que inclouen molècules microbianes amb patrons de repetició com LPS,

peptidoglicà o DNA bacterià, i citoquines com les IL-1 o el mateix TNF α [Spriggs et al. 1992][Tracey et al. 1994]. La seva tasca antimicrobiana comprèn múltiples mecanismes. Un dels més coneguts és estimular el reclutament dels leucòcits mitjançant la inducció de quemoquines i molècules d'adhesió a l'endoteli i teixits afectats. També activa directament els neutròfils, macròfags i limfòcits per facilitar la fagocitosi, l'esclat oxidatiu i reforçar la resposta clonal del limfòcit T [Locksley et al. 2001][Hehlgans et al. 2005] [Kim et al. 2006]. En condicions concretes, el TNF indueix mort cel·lular per apoptosi i fins i tot en alguns casos per necrosi. Tanmateix, en altres condicions pot pel contrari estimular la proliferació cel·lular, diferenciació, tumorigènesi i replicació viral [Locksley et al. 2001]. Joga un paper fonamental en la iniciació de la resposta inflamatòria [Hehlgans et al. 2005]. A nivell sistèmic produeix febre, hipotensió i xoc en situacions agudes i caquèxia com a resultat d'exposició crònica. La seva potent activitat biològica explica el perill que comporta a nivell de dany tissular quan es produeix en excés. Així, està implicat en nombrosos desordres com l'artritis reumatoide, l'asma, el xoc sèptic o les febres hemorràgiques [Locksley et al. 2001]. Més endavant en aquesta secció parlem en més detall de la seva participació en alguns processos patològics i en trasplantament.

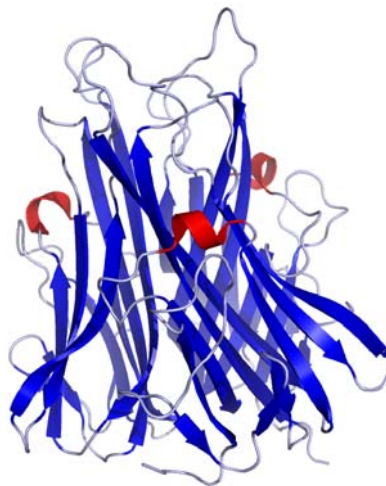


Figura esquema V Estructura cristal·litzada del TNF- α .Basada amb les dades de Eck & Sprang [Eck et al. 1989]

2.3.2 Receptors de TNF

El TNF α i la LT α (també anomenada TNF β) s'uneixen específicament a dos receptors, el TNFR1 (p55TNFR, CD120a) i el TNFR2 (p75TNFR,CD120b). Ambdós receptors són glicoproteïnes que tenen quatre dominis rics en cisteïnes en el seu domini extracel·lular i compten amb una homologia entre ells del 28%. Tots dos contenen una sola regió transmembrana i dominis intracel·lulars sense cap tipus d'homologia entre ells. La majoria de cèl·lules expressen els dos tipus de receptors, si bé tenen diferents mecanismes de regulació. L'expressió del TNFR1 és constitutiva i de baix nivell en la majoria de teixits. En canvi el TNFR2 s'expressa principalment a les cèl·lules del sistema immunitari i a l'endoteli i es regula a nivell transcripcional i post-transcripcional per estímuls externs [Thoma et al. 1990] [Brockhaus et al. 1990].

Els dos receptors poden ser activats pel TNF α de membrana, però el TNF α soluble senyalitza amb més eficàcia a través del TNFR1 [Grell et al. 1995][Grell et al. 1998a]. La constant d'afinitat del TNFR1 pel TNF α soluble és molt elevada ($K_D = 1.9 \cdot 10^{-11}$ M), mentre que la constant pel TNFR2 és una mica inferior ($K_D = 4.2 \cdot 10^{-10}$ M). Aquest ordre de magnitud de diferència és degut a l'elevada estabilitat del complex TNF α -TNFR1 en comparació amb la interacció més transitòria del TNFR2 [Grell et al. 1998a]. Diversos estudis han comprovat que la cinètica d'associació del TNFR2 és ràpida, de l'ordre de nanomolar, i que la seva cinètica de dissociació és aproximadament entre 20 i 30 cops més ràpida que la del TNFR1 [Grell et al. 1998a]. Això implica diferents cinètiques d'activació i modalitats de cooperació dels dos receptors. A baixes concentracions de TNF α soluble, el TNFR2 funciona principalment facilitant l'arribada del TNF a les cèl·lules i es transfereix al TNFR1 per senyalitzar. En canvi, en un contacte cèl·lula amb cèl·lula, el TNF α unit a la membrana té la capacitat d'induir un potent senyal fent servir els dos tipus de TNFR [Grell et al. 1995]. Els dos receptors també poden contribuir a generar senyal en una situació d'alta concentració de TNF α soluble, com és el cas de condicions experimentals de 10 ng/ml (58 nM).

Un altre aspecte a tenir en compte són els canvis que la unió del TNF α provoca en el propi receptor. A curt termini, el TNF α causa la disminució dels seus receptors en la membrana plasmàtica de forma dependent de temps i dosi. Aquesta modulació és el resultat de la disminució del nombre de receptors en membrana, sense que hi hagi un canvi en la seva afinitat. S'ha demostrat que el TNFR1 s'internalitza després de la seva unió amb el TNF α . En diverses línies cel·lulars, la internalització del TNFR1 a vesícules endocítiques és requisit per la inducció d'apoptosi, generació de ROS i activació de certes quinases, però no és necessària per l'activació de NF- κ B [Schütze et al. 2008]. Pel contrari, la incubació amb TNF α comporta la proteòlisi del TNFR2 de la superfície cel·lular gràcies a un senyal transmès pel TNFR1 [Higuchi et al. 1994]. El resultat d'aquest mecanisme és la producció de receptors solubles amb funcions neutralitzants [Wallach et al. 1991]. Per tant, la unió del TNF α als seus receptors porta a curt termini a la desensitivització de la cèl·lula al TNF per una davallada dels receptors a la membrana plasmàtica i l'alliberació de receptors solubles que poden competir pel TNF α amb els receptors romanents a la superfície [Heaney et al. 1996]. De fet, el TNFR1 també dona lloc a receptors solubles per proteòlisi, encara que per estímuls diferents. S'han identificat la histamina, seqüències CpG de DNA bacterià, la molècula de membrana ARTS-1 i els èsters de forbol com agents promotors de la seva proteòlisi [Cui et al. 2002] [Wang et al. 2003] [Jin et al. 2000].

Els mecanismes de transducció de senyal són un altre nivell de regulació de l'acció del TNF α . Els resumim a la figura esquema VI. Tot i que els dominis intracel·lulars del TNFR1 i el TNFR2 tenen poques similituds, comparteixen la funció d'activar NF- κ B. En canvi, una diferència important entre els dos TNFR és la presència d'un domini de mort DD al TNFR1 i la seva absència al TNFR2. La senyalització a través de TNFR1 inicia la majoria de les funcions biològiques del TNF α . És complexa i pot desencadenar tant la mort cel·lular com la supervivència. Un cop esdevé la unió entre lligand i receptor, hi ha canvis conformacionals que alliberen SODD (silenciador dels DD). Aquest fet permet l'agregació del receptor amb les proteïnes adaptadores i la formació de diversos complexos senyalitzadors intracel·lulars [Jiang et al. 1999][Wilson et

al. 2009]. El complex del DD amb FADD anomenat DISC es forma en el compartiment dels endosomes i inicia la cascada d'activació de caspases i l'apoptosi [Schneider-Brachert et al. 2004] [Wilson et al. 2009]. El complex I es produeix per la unió de TRADD al receptor inserit a la membrana plasmàtica i recluta la proteïna adaptadora TRAF2 amb qui interaccionen molècules com NIK, RIP1 i ASK1. Aquestes desencadenen l'activació de NF- κ B, JNK i p38 MAPK, que estimulen la transcripció de gens involucrats en senyals proinflamatoris, d'apoptosi i de supervivència [Wilson et al. 2009]. Associades a TRAF2 també es troben les proteïnes cIAP1 i 2, que tenen un paper inhibidor de l'apoptosi [Silke et al. 2010]. La localització dels complexos s'ha estudiat fent servir un TNFR1 mutat en el domini responsable de la internalització. La seva unió a TNF α condueix a l'absència de reclutament de TRADD, FADD i caspasa-8 per formar el DISC i per tant, a una reducció significativa de l'apoptosi induïda per TNF [Schneider-Brachert et al. 2004]. En aquest mateix escenari d'inhibició de la internalització de TNFR1, el reclutament de TRAF2 i RIP1 per part del DD no es veu alterat i permet l'activació de la via NF- κ B [Schneider-Brachert et al. 2004].

Al contrari del TNFR1, el mecanisme de senyalització del TNFR2 està poc definit. S'ha determinat fent servir ratolins *knockout* per TNFR1, que el TNFR2 és capaç per si mateix d'estimular la major part de vies de senyalització del TNFR1 com NF- κ B, ERK, JNK, p38MAPK i PKB amb els corresponents efectes a nivell d'expressió gènica [Rauert et al. 2010]. La unió del TNF α en forma de trímer al TNFR2 provoca un canvi conformacional dels dominis intracel·lulars necessaris per a la transducció de senyal. El TNFR2 és capaç de reclutar adaptadors de proteïnes com TRAF2 que activa directament la via d'inflamació a través de NF- κ B i AP-1 [Wallach et al. 1999][Baud et al. 2001]. Aquest complex que es forma conté les proteïnes inhibidores d'apoptosi cIAP, que poden modular la senyalització del TNFR2 en resposta al TNF [Rothe et al. 1995a][Rothe et al. 1995b]. En presència de RIP1, el TNFR2 pot activar la mort cel·lular tot i la falta del motiu DD, mentre que en absència, activa la transcripció de NF- κ B [Weiss et al. 1998][Pimentel-Muiños et al. 1999].

Tanmateix, és controvertit si el TNFR2 pot induir apoptosi sense l'ajut del TNFR1 i quins d'aquests mecanismes són fisiològicament rellevants. Un estudi recent ha demostrat que la unió del TNF α de membrana al TNFR2 activa la via alternativa de NF- κ B promovent el processat de p100 i la translocació al nucli dels NF- κ B que contenen el seu producte p52 [Rauert et al. 2010]. Aquesta troballa és interessant perquè identifica una via de senyal que no és compartida pel TNFR1 i que confereix funcions específiques al TNFR2.

En un sistema tan complex, no és estrany que s'hagin trobat interconnexions entre els dos receptors i les respectives vies de senyalització. La major part d'estudis descriuen un efecte modulador del TNFR2 per l'activació del TNFR1, el que no implica que no pugui haver efectes a l'inrevés. Abans ja hem comentat com el TNFR2 pot passar el lligand al TNFR1 quan les concentracions de TNF α són baixes i desencadenar la senyalització d'aquest receptor [Dinarello et al. 2002]. El TNFR2 també pot competir amb el TNFR1 pel reclutament del complex TRAF2-cIAP1/2 i per tant, activar la via d'apoptosi a través de TNFR1 [Weiss et al. 1998][Fotin-Mleczek et al. 2002]. De fet, la unió del TNF al TNFR2 promou, amb ajut de les cIAP, la ubiquitinació i degradació de TRAF2 al proteosoma, decantant el balanç cap al senyal d'apoptosi [Li X et al. 2002]. Un altre mecanisme indirecte pel qual el TNFR2 i altres receptors sense DD com CD40 poden promoure la citotoxicitat induïda pel TNFR1 és mitjançant l'estimulació de l'expressió del TNF de membrana a la pròpia cèl·lula [Grell et al. 1999]. Pel contrari, una alliberació de TNFR2 soluble en suficient quantitat pot inhibir l'efecte del TNF [Wallach et al. 1991]. Unes altres proteïnes adaptadores que poden actuar en les vies de mort iniciades per diferents receptors són les isoformes de c-FLIP que tenen la capacitat de competir amb la caspasa-8 per la seva unió a FADD i inhibir l'apoptosi [Wilson et al. 2009]. La seva regulació pel TNFR2 no està encara establerta. De ben segur, queden punts per esclarir en la regulació de l'acció d'una citoquina tan potent i pleiotròpica com el TNF.

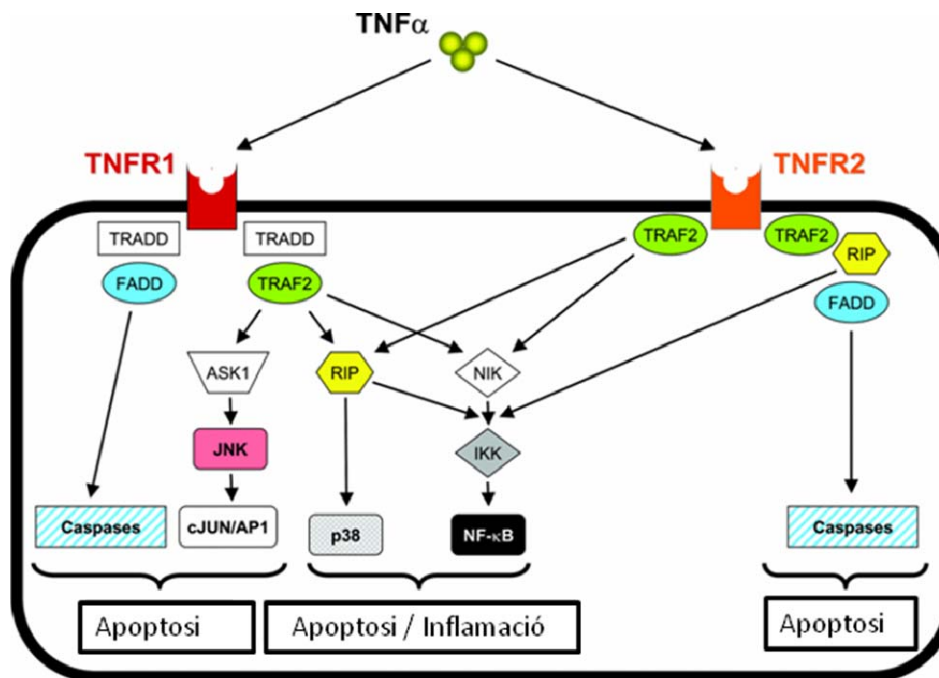


Figura esquema VI Via de senyalització del TNF α , adaptada [Russo et al. 2005].

2.3.3 Algunes particularitats del TNFR2

El gen humà del TNFR2 es localitza a la regió cromosòmica 1p36.2-p36.3. Té una mida aproximada de 43 kb i està format per 10 exons separats per 9 introns [Beltinger et al. 1996][Santee et al. 1996] (Figura esquema VII).

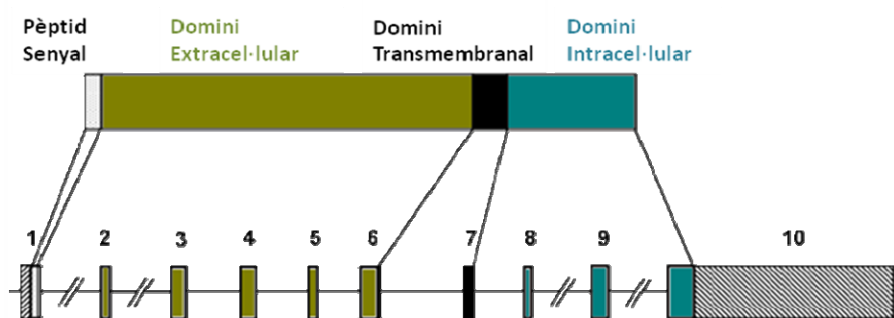


Figura esquema VII Estructura del gen del TNFR2 humà adaptada [Santee et al. 1996].

S'ha descrit una isoforma soluble del hTNFR2 anomenada DS-TNFR2(Δ 7,8), que es produeix per *splicing* alternatiu dels exons 7 i 8, corresponents a la regió

transmembrana, i un canvi d'ordre de lectura que genera un codó stop primerenc [Lainez et al. 2004]. Aquesta isoforma conserva intacte el domini extracel·lular i la capacitat d'unir TNF α , pel que se li atribueix una funció reguladora antagònica de la via del TNF.

Una altre isoforma coneguda del hTNFR2 és l'anomenada hpcp75TNFR [Seitz et al. 2001]. Es genera per l'ús d'un lloc alternatiu de transcripció que comporta la substitució de l'exó 1, on s'ubica el pèptid senyal, per un exó alternatiu. D'acord amb aquesta manca de pèptid senyal, la variant té una localització intracel·lular, però és capaç d'activar la via de NF- κ B per mecanismes dependents de TRAF2 [Seitz et al. 2001][Scherübl et al. 2005]. De fet, col·localitza amb el TNF α endogen [Scherübl et al. 2005], el que suggereix un mecanisme d'activació intracel·lular que podria induir un mecanisme anti-apoptòtic per protegir les cèl·lules productores de TNF α dels seus propis efectes citotòxics. Finalment, també s'ha descrit una isoforma semblant en el ratolí, micp75TNFR, que també té una localització intracel·lular, però no s'uneix a TNF [Hauser et al. 2007].

L'expressió de TNFR2 sembla estar modulada per diferents estímuls. Els nivells de mRNA de TNFR2 (però no de TNFR1) s'incrementen marcadament a condrocits articulars humans en resposta a citoquines inflammatòries com TNF α , IL-1 β o bFGF [Alsalameh et al. 1999]. L'augment de l'expressió de missatger en resposta a TNF α també s'ha detectat a astròcits de rata [Lung et al. 2001]. En els quals, el LPS estimula la producció de TNF α que augmenta selectivament la del TNFR2 i no la del TNFR1. En canvi, el tractament de cèl·lules RAW 264.7 (tipus macròfag) amb seqüències CpG de DNA bacterià incrementa l'expressió de tots dos TNFR [Jin et al. 2000].

Poques respostes cel·lulars poden ser atribuïdes exclusivament a la via de senyalització del TNFR2. D'aquestes, la majoria estan relacionades amb la regulació del sistema immune. La senyalització del TNFR2 promou la proliferació de cèl·lules NK [Mason et al. 1995], cèl·lules B [Erikstein et al. 1991], timòcits [Grell et al. 1998b] i cèl·lules T madures [Tartaglia et al. 1993], així com la secreció de GM-CSF dels limfòcits T [Vandenabeele et al. 1992]. En

concret, el TNFR2 s'ha descrit necessari per la diferenciació i supervivència de cèl·lules T en resposta a antigen [Kim et al. 2001][Kim et al. 2006]. L'activació de TNFR2 dona un fort senyal de coestimulació a limfòcits T CD8+ que incrementa l'augment de proteïnes anti-apoptòtiques com Bcl2 i survivina [Kim et al. 2006]. Aquest pas és un requeriment pel *priming*, proliferació i reclutament de limfòcits T específics de tumor [Calzascia et al. 2007]. Recentment, també s'ha evidenciat una funció crítica del TNFR2 en l'expansió de limfòcits T reguladors CD4+ CD25+ i s'ha identificat com un marcador dels limfòcits T reguladors amb major capacitat de supressió [Chen et al. 2010]. En relació al seu efecte en DC, també s'ha observat que confereix un senyal de supervivència que contraresta el de mort mediat per TNFR1 [Funk et al. 2000] i participa en la migració de cèl·lules de Langerhans [Takayama et al. 1999].

El TNFR2 també juga un paper important a l'endoteli i a cèl·lules epitelials. Comparant l'efecte del TNF α en cèl·lules endotelials de ratolins salvatges i *knockout* per cadascun dels receptors, s'ha demostrat que tots dos receptors intervenen en l'augment de l'expressió a superfície de molècules com ICAM-1, VCAM-1 i E-selectina [Chandrasekharan et al. 2007]. Tanmateix, el TNFR2 promou supervivència i migració de les cèl·lules endotelials, mentre el TNFR1 inhibeix la migració i porta a l'apoptosi [Luo et al. 2006]. A més, el TNFR2 provoca la migració de cèl·lules epitelials intestinals [Corredor et al. 2003], la proliferació de miofibroblasts [Theiss et al. 2005] i inicia l'angiogènesi [Pan et al. 2002].

Els efectes concrets del TNFR2 en models animals són més complexos d'elucidar ja que pot tenir efectes diferents segons els diferents tipus de cèl·lules involucrats i el temps d'exposició a TNF. En models murins de malària cerebral, s'ha observat que el TNFR2 contribueix al dany de la microvasculatura cerebral [Lucas et al. 1997][Lucas et al. 1998]. També contribueix al dany dels teixits en alguns models experimentals d'hepatitis, encara que en altres models el TNFR1 és el responsable [Hehlgans et al. 2005]. Pel contrari, els ratolins deficients en TNFR2 pateixen un quadre agreujat d'encefalomielitis experimental autoimmune (EAE) i d'inflamació

pulmonar [Peschon et al. 1998b][Hehlgans et al. 2005]. Per últim, ratolins transgènics que sobreexpressen el TNFR2 humà a nivells rellevants per malalties humanes desenvolupen un síndrome inflamatori greu que afecta al pàncrees, fetge, ronyons i pulmó [Douni et al. 1998]. Aquests presenten incrementada l'activitat de la via NF-KB.

2.3.4 TNFR en processos patològics

Tant el TNFR1 com el TNFR2 juguen un paper important en diferents tipus de patologies. Hi ha nivells elevats de TNFR2 soluble en sèrum de pacients amb càncer, VIH, sèpsia i diverses malalties autoimmunitàries [Schröder et al.].

L'augment del nivell de concentració dels receptors del TNF s'ha detectat en diferents tipus de càncer, com la leucèmia limfocítica crònica, el càncer de tracte gastrointestinal, el de mama o el de pulmó, entre d'altres [Aderka et al. 1991]. A més a més, s'ha demostrat que pacients en estadis avançats de la malaltia tenen nivells de concentració de receptors molt elevats en sèrum. La regulació d'aquests receptors en la leucèmia limfocítica crònica pot ser il·lustrativa de la complexitat del seu paper. Les cèl·lules canceroses produeixen TNF α que actua com a factor de creixement autocrí afavorint la proliferació en aquest tipus de càncer [Foa et al. 1990]. Al contrari de les cèl·lules B normals, que expressen nivells negligibles de TNFR1 i només presenten alts nivells de TNFR2 quan són activades, les cèl·lules B neoplàsiques tenen una elevada expressió dels dos tipus de TNFR en superfície (encara que més alta pel TNFR2). Una elevada concentració dels dos tipus de receptors es correlaciona amb alts nivells de receptors solubles, però la presència d'aquests també implica una neutralització del TNF α que pot contrarestar la proliferació. Així doncs, la presència de receptors del TNF de membrana i solubles pot ser la clau del balanç proliferació/anti-proliferació a la leucèmia limfocítica crònica [Waage et al. 1992].

En pacients infectats pel virus de la immunodeficiència humana també es troba una elevada concentració de TNFR2 soluble en els primers estadis de la

malaltia, reflectint l'alt grau d'activació del sistema TNF. En concret, s'ha determinat que el VIH indueix a l'alliberament de TNFR2 soluble, però no del TNFR1 proteolitzat [Rimaniol et al. 1997]. S'ha suggerit que els nivells de TNFR2 en plasma podrien ser un bon marcador de progressió de la malaltia, però només en determinats grups de pacients s'ha pogut demostrar una correlació entre el nivells de TNFR2 soluble i la càrrega vírica del VIH [Hober et al. 1999].

Al contrari del TNFR1 que té un rol més específic a nivell de teixit i inflamació, el TNFR2 podria oferir vies per un tractament de l'autoimmunitat sistèmica ja que apareix involucrat constantment en la supressió de la reactivitat autoimmune. Hi ha estudis que descriuen el TNFR2 com essencial per evitar el dany tissular del lupus perquè s'ha associat la substitució d'una arginina del receptor (M196R) amb el desenvolupament del lupus sistèmic eritematós en pacients japonesos [Morita et al. 2001]. En pacients amb malalties reumatoides, els receptors solubles del TNF estan elevats i la seva producció es localitza a les unions articulars [Cope et al. 1992]. Més recentment, s'ha detectat l'expressió de la isoforma soluble generada per *splicing* alternatiu en pacients amb artritis reumatoide, hi podria jugar un paper regulador [Lainez et al. 2004]. De fet, el fàrmac Enbrel®, compostat per una molècula híbrida TNFR2-Fc, s'ha mostrat molt eficaç en el tractament de pacients amb aquesta infermetat [Feldmann et al. 2002].

2.3.5 TNFR2 en teràpies clíniques.

En els últims anys s'han desenvolupat múltiples teràpies anti-TNF basades en molècules que el bloquegen específicament. Actualment hi ha tres bloquejadors principals (Figura esquema VIII). El adalimumab és un anticòs humà anti-TNF α humà. Un altre agent anti-TNF és l'infliximab, un anticòs monoclonal IgG1 desenvolupat com una proteïna quimera murina-humana. I per últim l'etanercept (Enbrel®), una proteïna de fusió recombinant on la porció extracel·lular del TNFR2 humà està unida a una porció Fc de IgG humana.

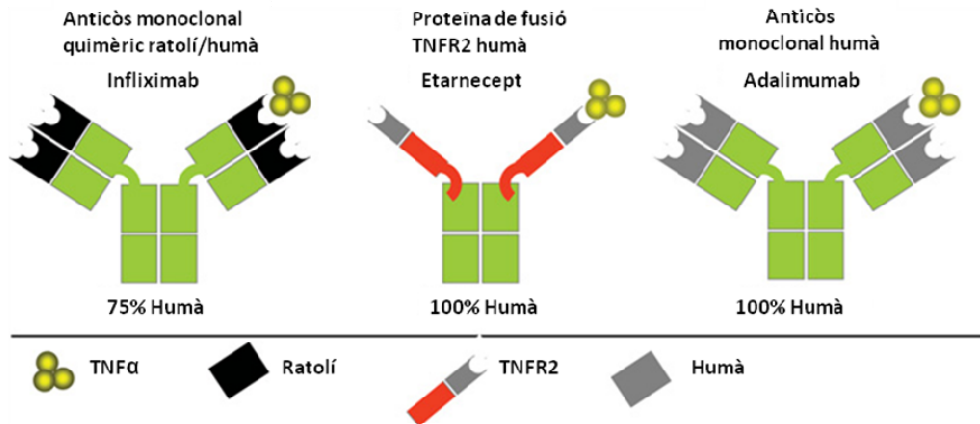


Figura esquema VIII Esquema de la composició dels bloquejadors de TNF α . Adaptada [Russo et al. 2005].

Els fàrmacs neutralitzants de TNF s'han mostrat eficaços en el tractament de diverses patologies [Suenart et al. 2002] [O'Dell et al. 1999][Mease et al. 2000], [Torre-Amione et al. 2007]. L'infliximab s'utilitza en el tractament de pacients amb malaltia intestinal inflamatòria, psoriasis, espondilitis anquilosant i artritis reumatoide. L'adalimumab s'usa per l'artritis reumatoide, l'artritis psoriàtica i l'idiopàtica, a més de la malaltia de Chron i l'espondilitis anquilosant. L'etarnecept es va dissenyar aprofitant la capacitat del TNFR2 soluble d'unir-se al TNF α competint amb els receptors de membrana i disminuint la inflamació *in vitro* i *in vivo* [Van Zee et al. 1992]. A nivell clínic, s'ha mostrat eficaç en pacients amb artritis reumatoide, artritis idiopàtica poliarticular juvenil, artritis psoriàtica i espondilitis anquilosant activa. També s'ha mostrat eficaç en estudis pre-clínic per disminuir la hiperplàsia causada per un al·lotrasplantament cardíac [Torre-Amione et al. 2007]. El seu mecanisme d'acció, juntament amb la seva aplicació per injecció subcutània, genera menys efectes adversos que altres teràpies [Dhillon et al. 2007]. Per totes aquestes característiques, és candidata a ser utilitzada per altres desordres immunològics com en la sèpsia bacteriana aguda i probablement també en el rebuig agut d'al·lotrasplantament renal [Diez-Ruiz et al. 1995][Feldmann et al. 1998].

2.3.6 TNFR en el trasplantament

Diversos treballs involucren el TNF i els seus receptors en els processos de rebuig en el trasplantament de cèl·lules i òrgans. En aquest apartat ens centrarem en aquells dedicats a l'al·lotrasplantament. En el trasplantament de medul·la òssia, els nivells en sèrum d'ambdós receptors solubles serveixen com a marcadors de complicacions en el trasplantament [Or et al. 1996]. Una de les majors complicacions del trasplantament de medul·la òssia, tant en leucèmies mieloides com en limfoides agudes, és la malaltia de l'empelt contra l'hoste (GVHD). El senyal del TNF α a través del TNFR1 és important per a l'inici de la GVHD [Speiser et al. 1997]. En relació amb el TNFR2, diversos estudis en models murins de GVHD intestinal mostren com els limfòcits T CD4+ tenen un paper patogènic important [Thiele et al. 1989][Eigenbrodt et al. 1990]. S'ha observat que les interaccions TNF-TNFR2 en els limfòcits T CD4+ són claus per a la patogènesi i generació de lesions histopatològiques de GVHD intestinal [Brown et al. 2002]. En el model de ratolí, la transferència de limfòcits T CD4+ del donador deficient en el TNFR2 va reduir significativament la gravetat de la malaltia [Brown et al. 2002]. El resultat va ser la disminució de l'activació de limfòcits T intestinals i de la resposta de citoquines Th1.

Estudis en pacients trasplantats de ronyó mostren com els nivells elevats del TNFR2 soluble en sèrum es correlacionen amb un major risc de complicacions [Diller et al. 2002]. En un ronyó normal, el TNFR1 es localitza a l'endoteli dels glomeruls i en els capil·lars peritubulars. En canvi, durant el rebuig agut de ronyó hi ha una disminució de l'expressió de TNFR1 i un augment de l'expressió de TNFR2 en cèl·lules tubulars [Al-Lamki et al. 2005]. Un patró semblant d'expressió s'observa en els trasplantaments de cor en que el TNFR2 s'expressa només a l'endoteli en condicions de repòs, però s'incrementa i s'expressa en cardiomiòcits durant el rebuig [Al-Lamki et al. 2009]. Un estudi recent de Hoffman et al. ha avaluat l'expressió del TNFR2 en el rebuig d'al·lotrasplantaments de ronyó en pacients i també en un model experimental en rates [Hoffmann et al. 2009]. En un escenari de rebuig agut del ronyó, tant en rates com en humans, es van detectar nivells elevats de TNFR2 en cèl·lules

epitelials tubulars, podòcits, cèl·lules B i monòcits/macròfags. Aquests nivells d'expressió elevats del receptor es van relacionar amb una pitjor funció renal. En canvi, els nivells de TNFR2 no eren tan alts a biòpsies amb lesions cròniques i a ronyons de rata després de 28 dies del trasplantament. Per tant, aquestes observacions indiquen que el TNFR2 està involucrat en la inducció i el grau de gravetat del rebuig agut. D'acord amb aquests resultats, l'administració d'una proteïna de fusió que bloqueja el TNF en combinació amb immunosupressió subterapeútica de ciclosporina va perllongar significativament la supervivència de ronyons trasplantats en un model de primat no humà [Eason JD et al. 1995].

La malaltia de l'empelt arterial (GAD) és una de les causes principals del rebuig de l'al·lotrasplantament d'òrgan sòlid a llarg termini. Tot i que estava descrit que tant el TNFR1 com el TNFR2 expressats en l'òrgan donador estaven implicats en el GAD de trasplantament de cor en un model murí [Suzuki et al. 2003], s'ha pogut observar com la senyalització de TNF α a través del TNFR2 redueix la hiperplàsia de la neoïntima dels empelts de venes coronaries [Zhang et al. 2008]. Aquests efectes succeeixen mitjançant múltiples mecanismes que inclouen la reducció d'expressió de molècules d'adhesió i la reducció d'apoptosi de cèl·lules endotelials. En canvi, el TNFR1 és el responsable d'inhibir la re-entotelització i augmenta la hiperplàsia de la neoïntima.

2.3.7 La via del TNF/TNFR al sistema xenogènic

El TNF α també participa en el rebuig del xenotrasplantament. Diferents estudis han demostrat la seva implicació en el rebuig agut de l'empelt xenogènic en models murins fent servir anticossos inhibidors [Lin et al. 1997b] [Lin H et al. 1997]. La producció de TNF α s'ha detectat en macròfags infiltrant un xenoempelt cardíac de porc a babuí en el moment del seu rebuig [Kobayashi et al. 1997]. A més a més, el bloqueig del TNF α també ha permès demostrar la implicació de la citoquina en el rebuig d'illots pancreàtics xenogènics en ratolins [Carel JC et al. 1993][Benda B et al. 2000]. Altres estudis que evidencien la

participació del TNF són aquells que mostren que la injecció de TNF α agreuja el rebuig de xenoempelts de pell i de cartílag [Kirkiles-Smith et al. 2000] [Jorgensen C et al. 1998]. Les conclusions que se'n treuen són que el bloqueig del TNF α per si sol té un efecte menor, però combinat amb altres tractaments contribueix a la supervivència de l'empelt. També estan d'acord amb les observades a l'estudi preclínic d'al·lotrasplantament renal en que la combinació d'etarnecept i ciclosporina comporta un benefici superior [Eason JD et al. 1995]. Aquesta mateixa mescla de tractaments va augmentar el temps de supervivència d'un xenoempelt cardíac de hámster a rata [Lin H et al. 1997]. La combinació de L-NAME (un inhibidor de la producció d'òxid nítrix) i un anticòs anti-TNF α va produir un efecte protector sinèrgic en un xenotrasplantament concordant de cor [Lin et al. 1997b]. Finalment, la combinació de diferents tractaments amb la teràpia anti-TNF també és beneficiosa en el xenotrasplantament d'illots pancreàtics. La incubació dels illots amb TGF- β abans del xenotrasplantament, conjuntament amb el tractament posterior anti-TNF α , augmenta el temps de supervivència de l'empelt [Carel JC et al. 1993]. També s'observa una millora en la supervivència d'illots fetals porcins en ratolins deficients en IFN γ quan simultàniament es tracta amb ciclosporina i s'inhibeix el TNF [Benda B et al. 2000].

En relació a les bases moleculars d'aquests efectes, és d'especial interès conèixer el sistema porcí ja que és l'espècie d'elecció pel xenotrasplantament clínic. El TNF α porcí (pTNF α) va ser clonat per primera vegada a finals dels anys 80 a partir de RNA de monòcits estimulats [Pauli et al. 1989]. Aquesta citoquina es secretada principalment per monòcits i cèl·lules dendrítiques [Summerfield et al. 2009], però també s'ha detectat a altres tipus cel·lulars d'origen epitelial i endotelial. Els gens porcins del TNF estan disposats en tàndem com els humans, de ratolí i conill [Kuhnert et al. 1991]. En concret, el locus del gen del TNF α porcí està localitzat en la regió cromosòmica 7p11-q11 [Solinas et al. 1992]. L'homologia del cDNA porcí amb el del TNF α humà (hTNF α) és del 85% [Pauli et al. 1989]. Com pel seu homòleg humà, s'han

identificat dos receptors de TNF porcins, el pTNFR1 i el pTNFR2 [Suter et al. 1995][Costa et al. 2007].

El pTNFR1 va ser clonat per primera vegada a partir de RNA de la línia cel·lular PK(15) (provinent de ronyó). El seu ORF conté 1386 nucleòtids que codifiquen per una proteïna de 461 aminoàcids. Una anàlisi comparativa va mostrar que la homologia amb el receptor humà, de ratolí i de rata era del 79%, 72% i 71% respectivament [Suter et al. 1995]. De fet, els 24 residus de cisteïnes que conté el pTNFR1 també estan conservats en la proteïna humana. Especialment d'interès pel nostre treball és el fet que el pTNFR1 pot unir-se al TNF α de diferents espècies (humana i murina per exemple, a més de la porcina) [Costa et al. 2004]. Aquest resultat explicava la potent capacitat del hTNF α a activar i matar les cèl·lules endotelials porcines. L'estudi de Costa et al. també va revelar que el bloqueig del TNF α podria ser útil per ajudar a evitar el rebuig de l'empelt xenogènic [Costa et al. 2004]. Es va demostrar que una proteïna de fusió pTNFR1-Fc podia bloquejar l'activitat pro-inflamatòria i pro-apoptòtica produïda tant pel TNF α humà com porcí. A més, l'expressió del pTNFR1-Fc per part de les mateixes cèl·lules porcines trasplantades conduïa a un menor reclutament de cèl·lules immunes al xenoempelt en un model discordant de porc a ratolí.

Les seqüències nucleotídiques dels cDNA del pTNFR2 (només regió codificant) també s'ha descrit recentment i s'han comunicat al Genbank on consten sota les referències NM_001097441.2 i EU116355.1 [Costa et al. 2007] [Cheng et al. 2007]. La regió codificant que correspon al receptor complet té una llargària de 1386 parells de bases que es tradueix en una proteïna de 461 aminoàcids [Costa et al. 2007]. Aquesta conté quatre dominis rics en cisteïnes molt conservats entre espècies. L'elevada homologia de seqüència amb els receptors humans i murins fa preveure una funció similar. L'expressió de RNA missatger del pTNFR2 s'ha detectat en teixits com cervell, pulmó, cor, el timus, ovari, intestí, i múscul [Cheng et al. 2007]. S'ha descrit una segona isoforma d'aquest receptor generada per un *splicing* alternatiu [Costa et al. 2007]. Aquesta variant conté una deleció de l'exó 4, identificada per homologia amb el

gen humà, que causa la fusió dels dominis rics en cisteïnes 2 i 3. Així doncs, aquesta variant anomenada pTNFR2 Δ E4 només conté 3 dominis rics en cisteïnes. No coneixem que s'hagi descrit cap isoforma amb aquestes característiques per altres homòlegs d'espècie mamífera o fins i tot per altres membres de la superfamília de TNFR. En aquest primer estudi, mitjançant experiments de competició pel TNF α , es va observar que el pTNFR2 Δ E4 uneix hTNF α amb poca eficiència, mentre que el pTNFR2 sencer mostra una bona capacitat de competició en assajos funcionals [Costa et al. 2007].

3 Via CD200/CD200R

La superfamília de les immunoglobulines està formada per multitud de proteïnes de superfície cel·lular o solubles que estan involucrades en processos de reconeixement, unió i adhesió cel·lular en el sistema immune dels vertebrats. Les molècules incloses en aquesta superfamília tenen una sèrie de distintius comuns, com l'homologia parcial de la seqüència aminoacídica (com a mínim un 15%) i estructures terciàries similars determinades precisament per l'homologia de seqüència. Aquestes estructures s'anomenen dominis d'immunoglobulina (IgSF) i es pleguen de forma independent en un motiu globular. N'hi ha de tres tipus, els homòlegs a la regió variable d'immunoglobulina (IgV), els homòlegs de la regió constant d'un anticòs (IgC) i per últim les que contenen seqüències típiques dels dos tipus. El nombre de dominis IgSF presents en la membrana pot variar entre 1 i 17, però quasi la meitat d'aquestes proteïnes tenen només dos dominis d'immunoglobulines situats a la regió extracel·lular [Barclay et al. 1997]. Els residus conservats del domini IgSF afavoreixen el plegament globular de l'estructura, que consta de dues làmines β antiparal·leles fetes alhora de 3 a 5 cadenes antiparal·leles β . Aquesta estructura s'estabilitza gracies als residus hidrofòbics interiors, als hidrofílics exteriors de les cadenes β i als enllaços disulfurs formats per residus de cisteïnes. El domini IgV és més llarg, ja que conté més cadenes β dins l'estructura de làmina β . En general doncs, les proteïnes que pertanyen a aquesta superfamília són proteïnes transmembrana amb els dominis d'immunoglobulina a la regió extracel·lular, un domini transmembrana format per aminoàcids hidrofòbics i una cua citoplasmàtica de gran diversitat [Abbas et al. 2008].

3.1 EI CD200

La molècula del CD200, inicialment anomenada Ox-2, va ser descrita per primera vegada per McMaster i Williams [McMaster et al. 1979]. En humans, el

CD200 (hCD200) està codificat en el cromosoma 3 (3q12-q13b) per un gen de 29744 parells de bases que pot produir tres transcrits processats. El primer transcrit, la isoforma a, és el majoritari i té una llargària de 2226 parells de bases. La regió codificant de 810 parells de bases conté set exons i produeix una proteïna de 269 aminoàcids. El segon transcrit, isoforma b, té un marc de lectura correcte de 2301 parells de bases i també està format per 7 exons però té l'extrem N-terminal més llarg, una regió codificant de 885 parells de bases i es tradueix en una proteïna de 294 aminoàcids. L'última variant, la isoforma c, té un llargària de 2085 parells de bases però li falta un exó. Aquesta deleció causa un canvi en el marc de lectura i l'aparició d'un codó de stop primerenc. No s'ha comprovat experimentalment la traducció de la seqüència de la isoforma c.

En aquest treball ens centrarem en el producte majoritari del gen, és a dir la isoforma a, que codifica per una glicoproteïna de tipus I associada a membrana. Aquesta glicoproteïna pertany a la superfamília de les immunoglobulines [Wright et al. 2000], amb dos dominis d'immunoglobulina extracel·lulars, una única regió transmembrana i una cua citoplasmàtica curta de només 19 aminoàcids sense cap motiu de senyalització conegut [Barclay et al. 1986]. El CD200 s'expressa en diferents tipus cel·lulars, com per exemple a cèl·lules d'origen hematopoètic com els limfòcits T i B, els timòcits, les cèl·lules dendrítiques i els mastòcits. També s'expressa a neurones, cèl·lules endotelials, trofoblàstiques i es detecta als glomèruls del ronyó, a la retina i al nervi òptic [Wright et al. 2001][Clark et al. 2001][Webb et al. 1984][Dick et al. 2001]. Per últim, també s'expressa en cèl·lules mare de la protuberància dels fol·licles pilosos [Ohyama et al. 2006]. S'ha de destacar que aquesta distribució es quasi idèntica en humans [Wright et al. 2001], ratolins [Hoek et al. 2000], i rates [Barclay et al. 1981]. La primera proteïna del CD200 que es va purificar va ser la de rata el 1982 [Barclay et al. 1982]. Des de llavors s'han caracteritzat homòlegs de CD200 de diferents espècies. La forma murina és una de les més estudiades ja que s'ha generat un model murí deficient en CD200. El CD200

murí (mCD200) està localitzat al cromosoma 16 regió B5 [Gorczyński et al. 2004]. Les homologies del hCD200 es mostren a la taula II.

Taula II. Taula de percentatge d'homologia entre el CD200 humà i el d'altres espècies.

		% Homologia	
		DNA	Proteïna
Homo sapiens	Pan troglodytes	99,4	99,3
	Bos taurus	84,8	80,2
	Mus musculus	81,7	77,6
	Rattus norvegicus	80,7	77,2
	Canis lupus familiaris	82,7	77,1
	Gallus gallus	51,0	36,8

Pot ser d'interès comentar que s'han descrit diferents marcs oberts de lectura (ORF) que codifiquen per proteïnes amb seqüències similars a CD200 en virus evolutivament poc propers i altament adaptats a coexistir amb els seus hostes, com són *Herpesviridae* i *Poxviridae* [Afonso et al. 2002]. Com els dominis IgSF no són freqüents en virus, és normal suposar que han estat adquirits de forma independent en diferents ocasions a partir del genoma de cèl·lules que han infectat [Barclay et al. 2002][Barclay et al. 2003]. El fet que aquestes proteïnes estiguin presents en diversos virus poc propers evolutivament pot significar que capturar el CD200 de l'hoste podria incrementar el rendiment evolutiu.

3.2 Receptor de CD200

El CD200 s'uneix al receptor de membrana CD200R. Aquest receptor té una expressió més restringida que el seu lligand, principalment en cèl·lules d'origen mieloide com macròfags, cèl·lules dendrítiques, neutròfils, mastòcits i cèl·lules T [Wright et al. 2000][Barclay et al. 2002][Wright et al. 2003]. S'ha pogut detectar l'expressió del CD200R en humans, rosegadors i aus [Viertlboeck et al. 2008]. El receptor va ser identificat per primera vegada a través de tècniques per detectar interaccions de baixa afinitat i estructuralment està molt

proper al CD200 [Wright et al. 2000]. El gen del receptor humà, localitzat en la regió cromosòmica 3q12-13, s'expandeix per una regió de 52000 parells de bases i conté 9 exons. Codifica per una proteïna de membrana de 348 aminoàcids que inclou dos dominis d'immunoglobulines en una disposició V/C2 típica. El domini citoplasmàtic conté 59 residus, dos dels quals són tirosines, i un d'ells està dins el motiu NPxY com en les rates [Vieites et al. 2003]. Aquest motiu del CD200R està relacionat amb la senyalització intracel·lular en rates [Wright et al. 2000][Wright et al. 2003].

Una característica dels gens que pertanyen a la superfamília de les immunoglobulines, i que també es manté en el receptor del CD200, és la de generar diferents isoformes de la proteïna a través de *splicing* alternatiu. Així, s'han descrit fins a 4 isoformes diferents pel receptor humà, dues d'elles solubles. La isoforma 1 (també anomenada a) és la completa, la isoforma 2 conté un *splicing* alternatiu que afecta a l'exó 2. A causa d'una inserció de 125 parells de bases entre l'exó 4 i 5, les isoformes 3 i 4 tenen un canvi en el marc de lectura que permet la generació de les dues formes solubles. A més a més, la isoforma 4 conté també el *splicing* de l'exó 2 (figura esquema IX) [Vieites et al. 2003].

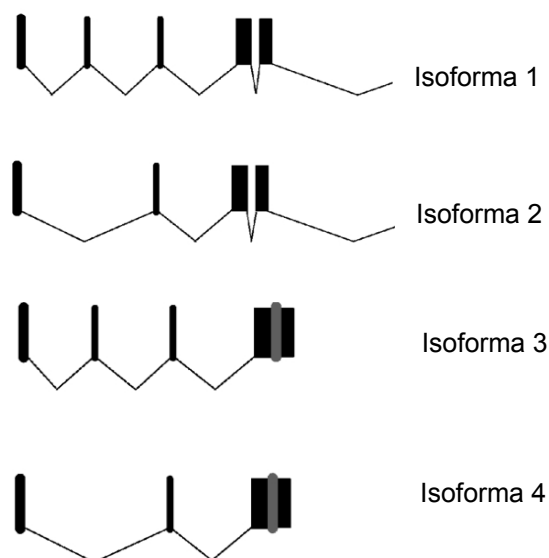


Figura esquema IX. Variants de mRNA produïdes pel gen humà del CD200R [Vieites et al. 2003].

Una anàlisi filogenètica demostra que el CD200 i el CD200R estan estretament relacionats i que el seu origen més probable és la duplicació gènica (en humans ambdós es situen en el cromosoma 3) [Douglas et al. 1988]. Aquesta duplicació gènica genera fins a 4 gens relacionats amb el receptor en ratolins (mCD200RLs), tots situats en el cromosoma 16, i un situat en el cromosoma 3 humà (hCD200RLs) (figura esquema X). Dos estudis han mostrat que ni el mCD200RLa ni el mCD200RLc són capaços d'unir el lligand mCD200. El hCD200RLa és estructuralment molt semblant al mCD200RLa i per tant s'assumeix que tampoc uniria el hCD200 [Wright et al. 2003] [Hatherley et al. 2005].

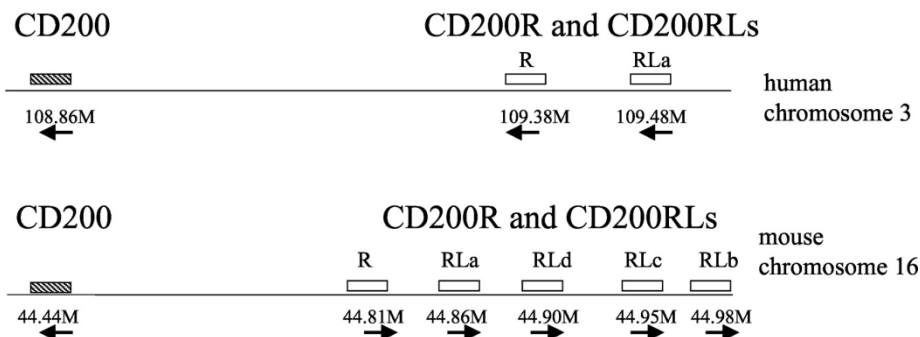


Figura esquema X. Organització dels gens del CD200 i del CD200R en els genomes humà i murí. Les posicions aproximades dels gens de CD200, CD200R i CD200RL es mostren en rectangles, les fletxes mostren la direcció de la transcripció.

La funció immunoreguladora del CD200 va ser identificada gràcies a l'ús del ratolí deficient en aquest gen. Es va determinar que la interacció del CD200 i el seu receptor regula l'activitat de les cèl·lules mieloides [Hoek et al. 2000]. Tot i que el receptor té nivells de glicosilació molt elevats, la cara N-terminal del domini IgSF conté la cadena GFCC' β que està lliure de glicosilacions i per tant sembla un possible lloc d'unió [Wright et al. 2000]. També està descrit que el domini N-terminal del CD200 està involucrat en la unió [Preston et al. 1997]. Un estudi on es van mutar diferents aminoàcids del receptor humà va identificar sis aminoàcids crítics per la unió amb el CD200 (figura esquema XI) [Hatherley et al. 2004].

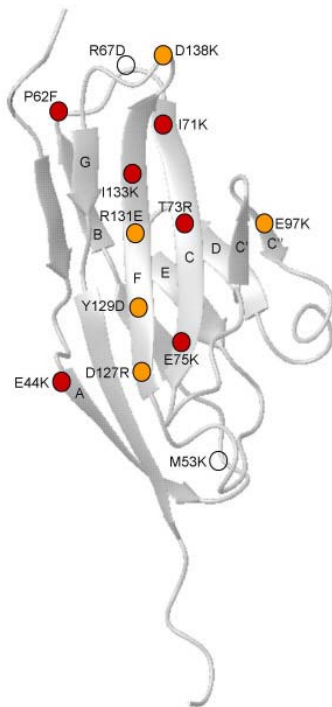


Figura esquema XI. Esquema del domini IgSF del hCD200R involucrat en la unió amb CD200. Els mutants que causen una inhibició completa o quasi completa de la unió amb CD200 estan indicats amb cercles vermells (<35% d'unió comparat amb la proteïna no mutada del hCD200R), mentre que els mutants amb una inhibició parcial (35–70% d'unió) estan marcats amb cercles taronges [Hatherley et al. 2004].

L'elevat grau d'identitat en les regions riques en tirosines dels dominis citoplasmàtics dels receptors humà i murí suggereix que recluten molècules similars pels mecanismes de senyalització. En ratolins està descrit que el motiu NPxY recluta molècules adaptadores de la senyalització Dok1 i Dok2, liderant la inhibició de la via Ras/MAPK [Zhang et al. 2004] (figura esquema XII).

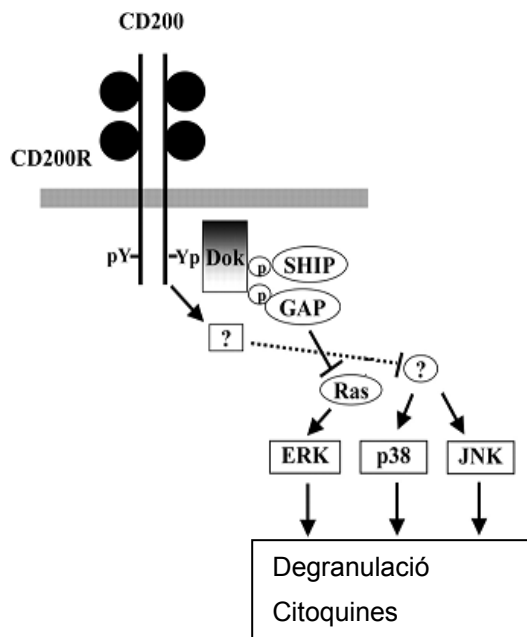


Figura esquema XII. Model proposat per la inhibició de l'activació dels mastòcits mitjançant la unió del CD200 al CD200R. L'activació del receptor pel CD200 induïx la fosforilació i el reclutament de Dok1 i Dok2, que es fosforilen i s'uneixen a RasGAP i SHIP. Aquestes dirigeixen la inhibició de l'activació de Ras i ERK. Altres molècules encara per identificar podrien mediar la inhibició de l'activació de p38 MAPK i JNK. Adaptada de [Zhang et al. 2004].

3.3 Mecanismes immunoregulators de la via del CD200/CD200R.

Les cèl·lules mononucleades del llinatge mieloides són vitals en els mecanismes de regulació, permetent al sistema immune respondre a organismes externs o infecciosos alhora que resta tolerant a elements de la pròpia espècie [Gordon et al. 2002][Hawiger et al. 2001]. En general, aquesta immunoregulació es porta a terme mitjançant citoquines [Moore et al. 2001][O'Garra et al. 2000][Nagy et al. 2004], tot i que el control més precís depèn de receptors d'activació i d'inhibició expressats en cèl·lules mieloides [Ravetch et al. 2000][Lucas et al. 2002]. La integració dels seus senyals permet el control de la inducció i el manteniment del *steady state* immunològic. Defectes en aquests mecanismes de control poden provocar inflamacions agudes, malalties autoimmunitàries o al·lèrgies [Ravetch et al. 2000][Lucas et al. 2002][Oldenborg et al. 2004]. Les cèl·lules monocítiques mieloides donen un enllaç entre la immunitat innata i l'adaptativa, i mecanismes pel seu control a través de receptors com el CD200R tenen un potencial terapèutic molt important. La combinació d'un lligand àmpliament distribuït i un receptor restringit a cèl·lules mieloides pot produir un senyal més localitzat a les cèl·lules mieloides comparat amb altres factors sistèmics solubles com el IFN γ [Barclay et al. 2002]. Aquest fet dona una explicació funcional a la distribució del CD200, que proveeix de punts de control per les cèl·lules mieloides en una gran varietat de teixits.

Tot i que el ratolí deficient de CD200 té un fenotip suau, amb una esperança de vida normal sota les condicions estàndard de laboratori, les cèl·lules mieloides estan més activades quan s'estimulen immunològicament que les cèl·lules normals. El mecanisme molecular d'inducció a la tolerància no està del tot definit, però es basa en la fosforilació dels residus de tirosina del receptor un cop s'ha unit al CD200. Tot seguit s'hi uneixen les proteïnes DOK1 i 2 que alhora recluten RasGAP i SHIP. Aquesta senyalització intracel·lular desencadena la inhibició de les vies MAPK p38, ERK i JNK, les vies més habituals en l'activació de macròfags. Com a conseqüència també hi ha una inhibició de l'alliberament de citoquines com TNF, IL-5, IL-6, IL-13 i IL-17 per

part de mastòcits, macròfags i monòcits [Zhang et al. 2004] [Jenmalm et al. 2006]. Concretament, la interacció CD200-CD200R desencadena un senyal inhibidor capaç de canviar la polarització de la producció de citoquines de tipus 1 cap a tipus 2 [Gorczynski et al. 1999]. També s'ha descrit un augment de l'expressió de l'enzim indoleamina 2,3 dioxigenasa (IDO) en DC plasmacitoides on esdevenia la unió CD200-CD200R [Fallarino et al. 2004]. L'elevada expressió d'aquest enzim s'ha associat a la inhibició de la resposta al·loreactiva i a la funcionalitat de les cèl·lules T reguladores [Funeshima et al. 2005]. .

L'existència d'homòlegs del CD200 virals i els seus efectes en la resposta immune també poden ser d'interés per entendre els mecanismes immunoreguladors d'aquesta via. El producte del marc obert de lectura K14 de l'herpesvirus humà (herpesvirus associat a sarcoma de Kaposi) és un homòleg viral del CD200 que s'expressa a la superfície de cèl·lules infectades durant el cicle lític. Encara que només comparteix un 40% d'identitat en la seqüència nucleotídica amb el hCD200, K14 interacciona amb el hCD200R amb una constant d'afinitat quasi idèntica a la del seu lligand, de l'ordre de μM [Foster-Cuevas et al. 2004]. Diversos herpes virus humans HHV-6, HHV-7, i HHV-8, tenen una proteïna homòloga al CD200, suggerint que aquests virus regulen la resposta del sistema immune a través del CD200R. Alguns estudis han constatat una elevada expressió del CD200R en basòfils que reconeixen tant el CD200 com l'homòleg viral i per tant, l'activació dels basòfils pot ser disminuïda a través d'aquesta via [Shiratori et al. 2005]. La proteïna similar al CD200 del virus mixoma és capaç de transmetre un senyal inhibidor als macròfags i possiblement també a les cèl·lules dendrítiques residents CD200R+, així redueix l'activació dels limfòcits i proveeix de senyals d'anergia a les cèl·lules T [Cameron et al. 2005].

3.4 Implicació de l'eix CD200-CD200R en processos patològics

Diversos estudis han descrit el paper immunoregulador essencial de la interacció CD200-CD200R en l'artritis autoimmunitària, l'al·lèrgia i la immunitat del càncer [Gorczyński et al. 2001][Moreaux et al. 2006][Zhang et al. 2004].

3.4.1 Càncer

Encara que el sistema immune és capaç de combatre molts càncers, la resposta generada és insuficient per aconseguir l'eradicació total a causa de certs factors del microambient del tumor que derroten la immunitat anti-tumoral. Així doncs es pot definir la tolerància tumoral com un mecanisme pel qual el tumor escapa del reconeixement del sistema immune, permetent que les cèl·lules transformades creixin. La interacció CD200-CD200R podria ser una peça clau en aquesta tolerància tumoral, ja que desencadena un senyal inhibidor per la inducció i proliferació de les cèl·lules T citotòxiques i és capaç de modificar la polarització de la producció de citoquines de tipus 1 cap a tipus 2 [Gorczyński et al. 1999]. Un canvi de producció de citoquines de perfil Th1 a Th2 es detecta en la progressió de molts càncers i s'associa a un pronòstic negatiu [Tendler et al. 1994][Takeuchi et al. 1997][Lauerova et al. 2002].

L'expressió de CD200 es troba incrementada entre 1,5 i 5,4 vegades en les cèl·lules B en la leucèmia limfocítica crònica [McWhirter et al. 2006]. Així mateix, el CD200 està elevat en la leucèmia mieloide aguda i en general en leucèmies múltiples [Tonks et al. 2007] i en melanomes, però rarament en tumors sòlids [Petermann et al. 2007]. També s'ha detectat el CD200 co-expressat amb marcadors de cèl·lules mare canceroses de pròstata, mama, glioblastomes i colon. Per això, s'ha proposat que les cèl·lules mare canceroses podrien evadir el sistema immunitari a través d'un mecanisme dependent de l'eix CD200-CD200R [Kawasaki et al. 2007].

S'han fet estudis en models murins humanitzats i amb xenoempelts amb cèl·lules tumorals humanes on l'expressió del CD200 era capaç d'inhibir l'eradicació de cèl·lules tumorals per part dels limfòcits. En canvi, les cèl·lules mononuclears humanes podien prevenir el creixement del tumor quan les cèl·lules tumorals no expressaven CD200 [Kretz-Rommel et al. 2007]. L'administració d'un anticòs anti-CD200 (anti-CD200-G2G4) en ratolins amb cèl·lules tumorals CD200 positives, produïa una eliminació quasi completa del creixement tumoral, fins i tot quan les interaccions CD200-CD200R ja existien [Kretz-Rommel et al. 2007]. En un estudi posterior es va certificar que la falta de funció efectora de l'anticòs anti-CD200-G2G4 era crítica per una activitat antitumoral eficient en aquests models murins, ja que segurament evitava l'eliminació de cèl·lules T activades [Kretz-Rommel et al. 2008].

3.4.2 Autoimmunitat

Utilitzant el model del ratolí deficient en CD200 es van estudiar les implicacions de la presència o absència d'aquesta molècula en malalties de perfil autoimmunitari com són l'encefalomielitis autoimmune experimental o EAE, l'artritis induïda per col·lagen (CIA) i la uveoretinitis autoimmune experimental (EAU). En absència del CD200, els animals mostraven una major susceptibilitat a l'autoimmunitat i l'aparició primerenca i agressiva de la malaltia autoimmune.

La EAE succeeix a causa de l'activació de limfòcits T perifèrics, macròfags i granulòcits. Les cèl·lules activades migren al sistema nerviós central i activen la micròglia, provoquen dany tissular i paràlisis. La pèrdua de CD200 té com a conseqüència l'aparició i progressió més ràpida de la malaltia comparada amb els ratolins que si expressen el gen. La CIA és una malaltia autoimmune inflamatòria de les articulacions i com la EAE, involucra limfòcits T, macròfags i granulòcits específics de teixit. La disrupció de la interacció del CD200-CD200R en els ratolins KO incrementa la susceptibilitat a patir la malaltia a ratolins que normalment hi són resistents. Els animals desenvolupen una artritis entre moderada i greu amb inflamació sinovial i formació de pannus invasiu que

provoca una degradació del cartílag i l'os [Hoek et al. 2000]. La EAU és una malaltia específica de la retina, on el CD200 s'expressa a neurones i endoteli. Un estudi demostra que els ratolins CD200 (-/-) tenen un augment en el nombre de macròfags infiltrats, que provoquen una forta resposta de NO. Quan s'administra un agonista del CD200R es suprimeix la EAU, encara que es manté la proliferació de limfòcits T i la producció de IFN γ . Amb aquests experiments es mostra que promovent la via de senyalització del CD200R es pot prevenir completament l'activació de macròfags induïda per IFN γ i protegir contra el dany tissular provocat durant la resposta autoimmune [Copland et al. 2007]. En rates també s'ha detectat un augment de la gravetat de la malaltia quan la via CD200-CD200R està bloquejada [Banerjee et al. 2004].

3.4.3 Malalties neurodegeneratives

El receptor del CD200 s'expressa majoritàriament a la micròglia de llinatge mieloide en el sistema nerviós central. Aquestes cèl·lules són les responsables de la principal defensa del sistema nerviós central [Hoek et al. 2000][Broderick et al. 2002]. S'ha descrit la importància de la micròglia activada en la patologia i desenvolupament del Parkinson [Wang et al. 2007b]. Per tant les neurones que expressen el CD200 probablement regulen la micròglia alliberant un senyal negatiu per inhibir la seva activació. En altres malalties neurodegeneratives com l'Alzheimer s'ha observat que l'expressió del CD200 en l'hipocamp disminueix [Frank et al. 2006].

3.4.4 Al·lèrgia

L'expressió del CD200R glicosilat en mastòcits va ser descrit com un mecanisme potencial de regulació del control a la resposta al·lèrgica excessiva [Wright et al. 2000][Wright et al. 2003]. Un model in vitro de degranulació de mastòcits va servir per demostrar que la unió del CD200 al seu receptor redueix la degranulació i la secreció de IL-13 i TNF α [Zhang et al. 2004]. Aquests resultats reforcen l'evidència de que la interacció de CD200-CD200R està

involucrada en la regulació del llindar de la resposta al·lèrgica, així com la regulació de la magnitud i durada de la resposta [Barclay et al. 2002]. Aquestes observacions in vitro s'han aplicat a un model in vivo, un model murí d'anafilaxi cutània passiva que confirma el potencial d'usar el receptor com a diana terapèutica en respostes al·lèrgiques [Cherwinski et al. 2005].

3.4.5 Avortament

El fetus per se no expressa antigens majors, ni menors, d'histocompatibilitat materns i és susceptible al rebuig pels mateixos efectors de la immunitat del trasplantament [Clark et al. 1999a]. El fetus sempre està envoltat per una capa de cèl·lules trofoblàstiques que formen la interfície materno-fetal. Aquestes cèl·lules no són susceptibles a l'atac dels efectors citotòxics que contribueixen al rebuig del trasplantament, ni tampoc pels efectors de la immunitat innata com les cèl·lules NK o macròfags activats [Clark et al. 1999b]. Alhora que els antigens MHC de classe I augmenten la seva expressió en cèl·lules trofoblàstiques durant la fase post-implantació del fetus de ratolins, el mRNA de CD200 també augmenta [Clark et al. 2001]. En avortaments espontanis, el CD200 està inhibit per citoquines proinflamatories de tipus Th1 com el TNF α . Per tant, un dels efectes del TNF α necessari per provocar l'avortament podria ser la disminució del CD200, que a la vegada permetria l'activació de cèl·lules proinflamatories que participarien en el dany de la placenta vascularitzada [Clark et al. 2001]. Un mecanisme comú en el procés d'avortament i de rebuig en el trasplantament és l'activació de la trombina. Aquesta proteïna promou la coagulació, l'activació dels neutròfils i l'endoteli, i un bloqueig de la vascularització [Ghanekar et al. 2004][Clark et al. 1998]. S'ha descrit en un model de ratolins que pateixen avortaments que la infusió de CD200-Fc els hi evita completament [Clark et al. 2001].

3.5 Implicació de l'eix CD200-CD200R en el rebuig del trasplantament

Diversos estudis han descrit el paper immunoregulator de la interacció CD200-CD200R en el control del rebuig de l'al·lotrasplantament i el xenotrasplantament concordant [Gorczyński et al. 1999]. Un dels primers estudis que es va fer sobre el CD200 en l'àmbit del trasplantament va ser a l'hospital de Toronto per R.M. Gorczyński fa una dècada [Gorczyński et al. 1999]. Es va dissenyar una proteïna de fusió que contenia la part extracel·lular del CD200 unida a la regió Fc IgG2a murina amb l'objectiu d'utilitzar-la com a immunosupressor quan les cèl·lules del sistema immunitari eren activades per antigen. In vitro, CD200-Fc inhibia la inducció i proliferació de limfòcits T citotòxics i alterava la polarització de la producció de citoquines de tipus 1 cap a tipus 2. In vivo, l'administració de CD200-Fc va prolongar la supervivència de ronyons i de pell al·lotrasplantats en ratolins. A més a més, el tractament amb anticossos bloquejants de CD200 abolia aquest augment de la supervivència. En aquest mateix sentit, un estudi recent realitzat en ratolins amb un trasplantament de pell o de cor i que rebien dosis baixes de rapamicina descriu que la sobreexpressió transgènica del CD200 afavoreix la inducció de tolerància envers l'empelt [Gorczyński et al. 2009]. Aquesta sobreexpressió però, no tenia efectes sobre la fase de manteniment de la tolerància. Les dades suggereixen una funció relacionada amb l'expressió de diversos gens implicats en la inducció i funcionament de limfòcits T reguladors.

En el cas del xenotrasplantament, les dades es limiten a un estudi de trasplantament renal de rata a ratolí. La infusió de la proteïna recombinant CD200-Fc produïa un augment significatiu de la supervivència de l'empelt. Així doncs, el tractament sistèmic amb CD200-Fc promou la supervivència dels al·loempelts i xenoempelts concordants vascularitzats en ratolins [Gorczyński et al. 1999]. Aquesta aproximació presenta certa semblança a l'ampliament testada amb èxit amb la molècula CTLA4-Fc que bloqueja la unió de CD80 i CD86 amb CD28 i allarga la supervivència de l'empelt en diferents models [Steurer et al. 1995]. Tanmateix, la via de CD80/CD86 i els seus receptors està

ben establerta en el sistema xenogènic rellevant de porc a humà [Murray et al. 1994][Costa et al. 2002b], mentre que la del CD200/CD200R no s'ha estudiat fins ara.

Els mecanismes concrets pels quals la interacció CD200-CD200R contribueix a la immunoregulació i prolongació de la supervivència de l'empelt encara no estan del tot definits. S'han proposat com a mecanismes implicats la significant immunosupressió de la resposta immunitària i la inducció de cèl·lules T reguladores [Rosenblum et al. 2004][Fallarino et al. 2004][Taylor et al. 2005][Gorczynski et al. 2005][Copland et al. 2007][Boudakov et al. 2007]. Hi ha estudis que suggereixen que les dinàmiques alterades de producció de citoquines tenen un paper clau en a la regulació de la resposta immune de les poblacions de cèl·lules T reguladores [Wan et al. 2006]. També pot ser molt important la forma de presentar l'antigen en el manteniment de la tolerància de l'al·lotrasplantament [Oliveira et al. 2006][Okumi et al. 2008]. Pot haver DC tolerogèniques involucrades en el manteniment de la supervivència de l'al·loempelt [O'Connell et al. 1999]. Els estudis s'han centrat en la importància de l'exposició en curs d'antígens ja que la presentació indirecte pot trencar la tolerància envers l'empelt, mentre que en animals tolerants la presentació d'antígens directa pot suprimir el rebuig [Okumi et al. 2008].

Objectius i Resultats

1 Objectiu general

Investigar les bases moleculars del rebuig xenogènic per tal de poder desenvolupar estratègies que permetin prolongar la supervivència de l'empelt.

2 PART I: Estudi de la via del TNFR2 porcí.

2.1 Hipòtesi

El coneixement actual involucra la via del TNF/TNFR en el rebuig del trasplantament [Or et al. 1996][Hoffmann et al. 2009][Speiser et al. 1997] i més concretament del xenotrasplantament [Lin et al. 1997b][Kobayashi et al. 1997] [Carel JC et al. 1993]. Els dos receptors d'alta afinitat del TNF estan involucrats en el rebuig de l'al·lotrasplantament, encara que amb papers diferents. Tanmateix, tenim poc coneixement dels mecanismes moleculars d'acció i regulació del TNF α en el sistema xenogènic. El TNF α humà té un potent efecte proinflamatori sobre cèl·lules porcines i s'ha confirmat la seva unió al pTNFR1 (Costa et al. 2004). Pel contrari, es desconeix com participa el pTNFR2. Per tant, plantegem la hipòtesi que el pTNFR2 podria participar en el procés de rebuig de cèl·lules, teixits i òrgans porcins a primats.

2.2 Objectius

1. Identificació i caracterització de les diferents variants del TNFR2 porcí.
Amb aquest objectiu s'ha dividit el treball en:
 - A. Clonació del cDNA de diferents variants del pTNFR2.
 - B. Anàlisis bioinformàtiques comparatives.
 - C. Estudis d'expressió a nivell de mRNA de les diferents variants.
 - D. Estudis de localització subcel·lular i FRET.

2. Estudis de funcionalitat en el sistema xenogènic. Inclou els objectius concrets següents:
 - E. Estudis d'afinitat entre els lligands (TNF α) i el receptors (TNFR2) humans i porcins.
 - F. Estudis funcionals amb les diferents variants.

2.3 Resultats

2.3.1 Obtenció i anàlisi de les 4 isoformes del TNFR2.

En aquest primer apartat es descriu l'obtenció i anàlisi de les seqüències de quatre isoformes del receptor 2 porcí del Factor de Necrosis Tumoral (pTNFR2).

2.3.1.1 Amplificació del cDNA de les isoformes del pTNFR2.

Per tal d'obtenir el cDNA del pTNFR2 es va aïllar RNA total de cèl·lules porcines i es va realitzar una transcripció reversa. El cDNA de primera cadena generat va servir per amplificar els cDNA concrets amb encebadors degenerats, dissenyats a partir de les seqüències de ratolí, rata i la humana [Costa et al. 2007]. En aquest procés es van obtenir dos fragments de diferent mida que corresponien a la seqüència del pTNFR2. El fragment més llarg corresponia al pTNFR2 complet amb 1386 parells de bases. El fragment amplificat més curt corresponia al pTNFR Δ E4 (una variant de receptor a la qual li manca la seqüència corresponent a l'exó 4 per homologia, però que és idèntica per la resta) amb un total de 1236 parells de bases. Aquests dos productes de PCR es van subclonar en el vector pCR2.1, seqüenciar i analitzar. Les dues isoformes restants es van detectar gràcies a la tecnologia del SMART 3' RACE, concretament usant una preparació de cDNA de primera cadena obtingut a partir de RNA total de cervell porcí. Aquest procés ens va permetre detectar un extrem 3' diferent i molt més curt al de les isoformes descrites anteriorment. Basant-nos en la seqüència d'aquest nou extrem 3', vam dissenyar uns encebadors, el corresponent a l'extrem 5' localitzat a l'exó 3, que amplifiquessin una regió específica per comprovar la seva expressió.

Com a motlle per la PCR es va usar el cDNA de monòcits porcins generat amb la metodologia SMART RACE i es van poder amplificar dos fragments amb èxit (figura 1). El primer, que anomenem pTNFR2 Δ E7-10, tenia una longitud de 650

parells de bases i li faltava la seqüència corresponent als exons 7 al 10, fet que causava l'aparició d'un codó de *stop* primerenc. El segon, anomenat pTNFR2 Δ E4 Δ E7-10, tenia una longitud de 500 parells de bases. En aquest cas es va determinar per homologia que faltaven tant la seqüència corresponent a l'exó 4 com la seqüència corresponent als exons 7 al 10 i per tant també es produïa un codó de *stop* primerenc. Tenint en compte que l'extrem 5' coincidia amb les isoformes ja descrites, vam determinar que les regions codificants dels cDNA de les dues noves isoformes tenen 888 parells i 738 parells de bases respectivament. Tots dos fragments van ser subclonats en el vector pCR4, analitzats i seqüenciats.

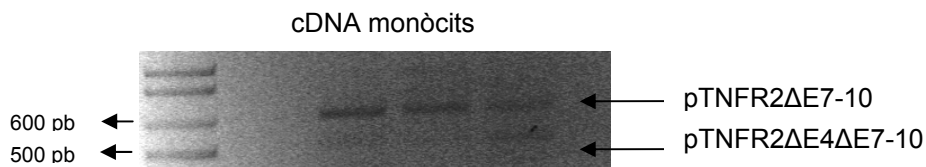


Figura 1. Amplificació específica per PCR d'una porció de cDNA de les isoformes solubles de pTNFR2.

La figura 2 mostra la seqüència nucleotídica de la regió codificant del pTNFR2 i s'assenyalen les regions sotmeses a *splicing* alternatiu.

ATGGCGCCCGCCCGCTCTGGGCCGCGCTGACCGTCGGACTGCAGCTCTGGGCCGCTGGGCGCCCGTGCCTCCAGGCTGTGTTCA
 TGCCCTACGCCCCGAGCTCGGGAGCTCATGCCGGCTGCCCTGAAAATACTATGACACAAAGGCCAGATGTGCTGCAGCAAGTG
 TCCACCAGGCTTCCGAATACAAACCTCATGCAACAGAACCTCGGACACTGTGTGTGGCTCCTGCGAGAGCAGCACATACACCAGCTC
 TGGAACTCGGTTTCTGCGTGCTTTAGCTGCAACTCCCGCTGTAGCTCCGACCAGGTAGAAACTCAAGCCTGCACTCCAAAACAGAACC
 GCATCTGCTCCTGCAAGCCGGGCTGGTACTGCACCCTGGGGAGGCAGGAGGGGTGCCGGCTGTGCATGGCACTGCGCAAATGCAGCCC
 CGGCTTCGGCGTGACCAAACCCGGAAGTGCAGATCAGATGTGGTATGTGCGCCCTGTGCCCGGGCAGTCTCCAGCACACTATCG
 TCCACGGACACCTGCCGGCCCCACCGGATCTGTAGCTCGGTGGCCATTCTGGCACCGCAAGGATGGATGCAGTCTGCACATCTGAGT
 CCCCCACCCTGAACGTGGCCAGGGCCAGCCCCACGAGATCACAACGCATGGAGCCAACGCCGGGGCCAGCGTAGTCCAAAGCAC
 CGCCCCCTGCCCGGATGACCCCAAGTCTCCAAGTCCCCAGTTGAAGGGCTCAACACAGGGAACATCTCTCTTCCAATTGGACTG
 ATCGTGGGTCTGCAGCCATGGGCTGTTAATAAATTGTCCTGGTGAAGTGTGTCATCATGACTCAGAAGAAAAAGGCCCTTCTGCC
 TGCAAGGAGACGCCAAGGTGCCGCACCTGCCCGCGAAAAGGCCCGAAGTGTCCCGGTCTGAGCAGCAGCACCTGCTGACCACGGC
 GCCCAGCTCCAGCAGCAGCTCCCTGGAGAGCTCGGCCAGCGCCCGGACAGGAGGGCACCCACCCGTCAGCTCCAGGCACCGGGC
 GCGGACAAGACCAGTGGGCTCTGGAGAGGCCCGGGCCAGCTCCAGCAGCTCAGAGTCACTTCCGGCAGCCAAGGACCCAGGTCAATG
 TCACCTGCATTGTCAACGTGTGCAGCAGCTCTGACCATAGCTCCAGTGGCCCTCCAGGCCAGCTCCACGAGGGACACAGATGCCAG
 CCTTCCAGCTCCCCCAAAGATGAGCAGGTCCCTTCTCCAAGGAGGAGCGTCCCTTTTCCAGCCCCAGCCGGGGGCTCCAGAGACTCTA
 CTGCAGAGCCCAGAGGAGAAGCCCTGCCCTGGGTGTGCCTGACGCTGGGATGAAGCCCAGCTAAATTAAGTACCCGGGGGGCCATTT
 GTCTCCCTCCAGCTCAGAGTCTTACCAAGAACCTGCTAGGGGCTGGACTCTGTATTCCATCTGGAATGCAGGTAG

Figura 2. Seqüència nucleotídica de la regió codificant del pTNFR2. La seqüència corresponent a l'exó 4, que està subjecte a splicing alternatiu, està marcada amb fons gris. Amb fons negre està marcada la seqüència corresponent a la regió transmembrana. L'àrea subratllada amb un puntejat assenjala la seqüència dels exons 7 al 10 objecte de splicing. Per últim, es presenta en cursiva la seqüència generada per l'extrem 3' curt. Els requadres marquen els diferents codons de stop.

Com comentàvem abans, es van poder amplificar dues regions 3' UTR diferents del pTNFR2 gràcies a la tecnologia SMART RACE. A partir del cDNA provinent de RNA de cervell porcí i amb un encebador 5' específic (localitzat a l'exó 5) pel pTNFR2, es va amplificar un fragment d'aproximadament 2,6 kb i un altre de 600 bp. A la figura 3 es mostren les seqüències consens dels dos 3' UTR a partir del codó *stop*. Les seqüències definitives es van establir a partir d'estudiar múltiples clons. El fragment curt (figura 3B) no mostrava cap homologia amb el llarg (figura 3A).

A.

TAACCAGGCTGGTGTGGGCTGTGTCTCTGGTCTTCTAGGCCCTCCCCCAGAACTCTGGCTCTTTCTGGGCTAAATTCTTT
TAGTGGCTTCCAAGCCCCGGGCTTCTCTCACCTGCAGGTGGAAGCATGAGGCAGGGAGAGTCGTGGTGTGTCTCTCTGGTGT
GTGTCTTTCTTGAAGGCTGGTGGACACGGATGTGCTGGGCAGCCTGGGGCAAGCCACCCCTGCCCAACCTCAGTCGGTCTCTG
TGGGCTTGGCTTCTGAAGCCCTTGTTCATGTTTGTGTTTTATTTTTCTTTTAAATCCTTGGGCTTTACTAGGCTCTGGCTTCTTCT
GGGGACGAGGGATGCTGGGTGCATCATCCGAGGACAAGGGGCAATGGAGAAAGGGCAAGCCGTTAAATTAACCTGGATGTGAGAC
TACAGGACAGTCCCAGCAGGGGTGGCAGGTTGCCGTCAATCAGATGGTTCATATGCACAGAGAGGGGTGGCAACCCCTGTAGGGGAC
AGGAGTCTCCAGGTTAGCTCAGGACCCTGAGAAGTGCATGTCCAAATCCACTCCTGCGAGCCCCATCTCTTGTATCATGGGG
TGAAAACAGATGCCAGGGAGCCAGACAGGCAGCCAAATGAGTGTGTGAGCTGGTTAAAATGGCAGACCTCTAACAGCAA
ACCTCTAATCAGTCGGAATCTTCCAGCTTTGACGTGGTAATTTAAAAACAAAAAAGTAAGCACCATACAGACAAAACAAGCCAACA
ATGTAACAAAGCCAAAGTCTCAGAGTTGCATCTGGTGTCTTTGATCTTCCCCCGCCCCGTTTACCATAGCTCTAACCTCCC
AACCTCCCCACTGTCTGGGGTTGAGTCCAATGCCACACCTTTTCTTATCAGGAACCGGAGGTGACTGAGGCCCTCAGCCATC
TCCTCTACCTCAGCCTGGACCTTCTCTCTTTGCCTCCCAAGGGGTGCTCCTGTTTTCTTCCACCCCTGCCGCTGTTCTCTGGA
GTTCCAGGTCCCAGTGGATCTCCGAGCCACTTTGGTACTGTGCCACTGAGAGCCGGAGTGGACGTGAGATGCTGAGAGCCAGT
CTTGTGTCTGTGTGTCTGTGAGTCTGTGTTGTACCTTGTGGTCTGTGTGCAGTCCGTGTATTAGGTTGTGGCTGCCAGAAGCAG
CTGAAGCCAACACTTTTGGCGAGGGATGCTTCTCATTAAAGGAGCCAGCCACTCCCCGAAACACGCGCCAGGCCCTGCAGGT
GGTGGACCAGTTGGCCTTAACTGGATGTGGGAAGGAAGGGGATGGGAGCTCCTTGAGAAGACAGGTCCCAGGTACTTGGATCC
CTTGTGAAAAAATCCACTGGACTTGAACCTGGCAGCTGAACTCTTGGAGGGTGGGAGAAGCCAGCCATTAGGCTGGAGTGAAG
AAAGGCATCCCACCCTGGGATCCCTCACGACATCCCTCTGGACTGGACGGCAGGCAGCTGGGGTCTCTGCCATGTTGGACCCTT
TGTGGCCGTGGAGACTTCTGCCCCCTGGCGACGGCGTGGGAGGACCTCAGGTCTCCTTGCCATCGCCCCAGCAGAAGCGGGA
AACTTTGGAAGGAGACTCTTTCTGGCAGTGGACTCATTTTGTACTTTGTTACCAGACTTGCAGCCAACAGACTCTTGCTCAA
AAGATGCCAACCTCTCTCTTGAACAGGAATAACACAGACCTTTCAGTTATTGGGTCTGGACCAAGCCATAAGAAGAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

B.

TAGCATTAAACTTGTTTTCTTCTTCTGGAGTTCCTGTGCATAGCTCAGTGGTTAACGAACCTGACTAGTATCCTTGAGAATGCAGGT
TCGATCCCTGGCCTCGCTCAGTAGGTTAAGGATCCAGCATGGCGTGAACCGTGGTGTAGTTTGCAGATGTGGCTCTAATCCTGT
GTCGCTGTGACTATGGCATAAGCCGGCAGCTGCAACTCTGATTCGACTCCTAACCTGGGAACCTCCATATACAGTGGGTACAGTC
CTAAAAAGGCCGAAAAA

Figura 3. Seqüència obtinguda mitjançant la metodologia de SMART RACE. A) Regió 3' UTR de 1,8 kb. B) Regió 3' UTR de 0,3 kb.

A continuació es va determinar el grau d'homologia de la seqüència nucleotídica corresponent a la regió codificant del pTNFR2 complet amb homòlegs d'altres espècies. La seqüència porcina mostrava una homologia del 80% amb la seqüència humana (segona seqüència a figura 4) i un 70% amb la murina (última seqüència a figura 4), que és la més llarga de totes. L'espècie més propera que es detectava fent un BLAST era la bovina amb un 84% d'identitat. S'ha de comentar que pot haver-hi una petita variació a l'inici de la seqüència porcina envers la nativa degut a que l'encebador 5' és degenerat.

1. Porc 2. Humà 3. Murí

```

1. ATGGGCCCGCCCGCCGCTCTGGGCCCGCTGACCGTCCGACTGCAGCTCTGGGCCGCTGGGCCGCGCCGTGCCCTCCCAGGC
2. ATGGGCCCGCTCCTCGCTCTGGGCCCGCTGCGGCTCGGACTGGAGCTCTGGGCCGCGCCGACGCTTGGCCGCCAGGT
3. ATGGGCCCGCCCGCCCTCTGGGTCGCGTGGTCTTCAACTGCAGCTGTGGGCCACCGGGCACACAGTGCCTCCAGGT
*****
1. TGTGTTTCATGCCCTACGCCCCGAGCTCGGGAGCTCATGCGCGGTGCCCTGAAAGAATACTATGACACAAAGGCCAGA
2. GGCATTTACACCTACGCCCCGAGCCCGGAGCACAATGCGCGGT--C---AGAGAATACTATGACACAGCTCAGA
3. TGTCTTGACACCTACAACCGAACCTGGGTACGAGTGCAGATCTCA---CAGGAATACTATGACAGGAAGGCTCAGA
* * * * *
1. TGTGCTGCAGCAAGTGTCCACCAGGCTTCCGAATACAACCTCATGCAACAGAACCTCGGACACTGTGTGTGGCTCTGTC
2. TGTGCTGCAGCAATGTCTGCCCGGCCAATCATGCAAAAGTCTTCTGTACCAAGACCTCGGACACCGTGTGTGACTCCTGT
3. TGTGCTGTGTAAGTGTCTCTGCGCAATATGTGAAACATTTCTGCAACAAGACCTCGGACACCGTGTGTGCGGACTGT
*****
1. GAGAGCAGCACATACACCCAGCTCTGGAACCTCGTTCCTGCGTCTTTAGCTGCAACTCCCGCTGTAGCTCCGACCAGGT
2. GAGGACAGCACATACACCCAGCTCTGGAACCTGGGTTCCCGAGTGTCTGAGCTGTGGCTCCCGCTGTAGCTCTGACCAGGT
3. GAGGCAAGCATGTATACCAGGCTCTGGAACCATTTTCGTACATGTTGAGCTGCAGTTCTTCCTGACCACTGACCAGGT
***
1. AGAAACTCAAGCCTGCACTCCAAAACAGAACCCGCATCTGCTCCCTGCAAGCCGGGCTGGTACTGCACCCTGGGAGGCAG-
2. GGAACCTCAAGCCTGCACTCGGGAACAGAACCCGCATCTGCACCTGCAAGCCCGGCTGGTACTGCGCGCTGAGCAAGCAG-
3. GGAGATCCGCGCTGCACTAAACAGCAGAACCCGAGTGTGTGCTTGCAGAGCTGGCAGGTACTGCGCTTGAAACCCATT
** * * *
1. --GAGGGGTGCCGCTGTGCATGGCACTGCGCAATGCAGCCCGGCTTCGGCGTGACCAAACCCGGAACCTGCGACATCA
2. --GAGGGGTGCCGCTGTGCGCGCCGCTGCGCAAGTGCAGCCCGGCTTCGGCGTGCCAGACAGGAACCTGAAACATCA
3. CTGGCAGCTGTGACAGTGCATGAGGCTGAGCAAGTGCAGCCCTGGCTTCGGAGTGGCCAGTTCAAGAGCCCCAATGGA
* * * * *
1. GATGTGGTATGTGCGCCCTGTGCCCCGGGCACGTTCTCCAGCACACTATCGTCCACGGACACCTGCGGGCCCCACCAGAT
2. GACGTGTGTGCAAGCCCTGTGCCCCGGGCACGTTCTCCAACAGACTTCATCCACGGATATTTGCAGGCCCCACCAGAT
3. AATGTGTATGCAAGCCCTGTGCCCCAGGCAGTCTCTGACACCACATCATCCACTGATGTGTGAGGCCCCACCAGAT
* * * * *
1. CTGTAGCTCGGTGGCCATTCCTGGCACCGAAGGATGGATGCAGTCTGCACATCTGAGTCCCCACCCTGAACGTGGC-C
2. CTGTAACGTGGTGGCCATCCCTGGGAATGCAAGCATGGATGCAGTCTGCACAGTCCACGTCCTCCACCCCGGATGAGGCC
3. CTGTAGCATCCTGGCTATTCGCGAAATGCAAGCACAGATGCAGTCTGTGCGCCAGGTCCCACTTAAGTGCATCC
*****
1. CAGGG-----CCCAGCC----CCCAGAGATCACAAACGCATGGAGCCAACGCCGGGGCCAGCGTAGCTCCA
2. CAGGGGCGTACTTACCAGCCAGTGTCCACACGATCCCAACACAGCAGCAACTCCAGAACCCAGCACTGCTCCA
3. CAAGGACTCTTACGATCTCAGCCAGAGCCCAAGATCCCAACCCCTGGATCAAGAGCCAGGGCCAGCCAACTCCA
** ** *
1. AGCACCGCCCCCTGCCCGGATGACCCCAAGTCTCCAAGTCCCCAGTTGAAGGGCTCAACACAGGGAACATCTCTCT
2. AGCACCTCCTTCTGCTCCCAATGGGCCCA-----GCCCCAGCTGAAGGG---AGCACTGGGACTTCTGCTCT
3. AGCATC--CTTA---CATCGTTGGGTTCAA-----CCCCATTATTGAACAAAGTACCAAGGGTGGCATCTCTCT
**** *
1. TCCAATTGGACTGATCGTGGGTGTGACAGCCATGGGTCGTTAATAATTGTCTGGTGAAGTGTGTCATCATGACTCAGA
2. TCCAGTTGGACTGATTGTGGGTGTGACAGCCTTGGGTTACTAATAATAGGAGTGGTGAAGTGTGTCATCATGACCCAGG
3. TCCAATTGGTCTGATTGTGGAGTGACATCACTGGGTCGCTGATGTTAGGACTGGTGAAGTGTGTCATCATCTGTCAGA
***
1. AGAAAAAGAAGCCCTTCTGCCTGCAAGGAGAGCCCAAGGTGCCGCACCTGCCCGCAAAGGCCGGAAGTGTCCCCGGT
2. TGA AAAAGAAGCCCTTGTGCTGCAGAGAGAAGCCCAAGGTGCCTCACTTGCCTGCCGATAAGGCCGGGTACACAGGGC
3. GGAAAAAGAAGCCCTCTGCCTACAAGAGATGCCAAGGTGCCTCATGTGCCTGATGAGAAATCCCAGGATGCGATAGGC
*****
1. CCTGAGCAGCAGCACCCTGCTGACCACGGCGCCAGCTCCAGCAGCAGCTCCCTGGAGAGCTCGGCCAGCGCCCGGACAG
2. CCCGAGCAGCAGCACCCTGCTGATCACAGCGCCGAGCTCCAGCAGCAGCTCCCTGGAGAGCTCGGCCAGTGCCTGGACAG
3. CTTGAGCAGCAGCACCCTGTTGACACAGCACCAGTTCCAGCAGCAGCTCCCTAGAGAGCTCAGCCAGCCTGGGGACC
*
1. GAGGGCACCCACCCCGTCCCAGTCCAGGCACCGGCGCGGACAAGACCAGTGGTCTGGAGAGGCCCGGCCCAGCTCCA
2. AAGGGCGCCACTCGGAACCAGCCACAGGCACCGGCTGG---AGGCCAGTGGGCGGGGAGGCCCGGCCCAGCACCC
3. AAGGGCGCCCTGGGGCCATCCCAAGCAAGAGTCATGGCGGAGGCCCAAGGTTTCAGGAGGCCCGTGCAGCTCCA
*****

```

Estudi de les vies del TNF/TNFR2 i del CD200/CD200R en el rebuig xenogènic

```
1. GCAGCTCAGAGTCATCTTCCGGCAGCCACGGGACCCAGGTCAATGTACCTGCATTGTCAACGTGTGCAGCAGCTCTGAC
2. GGAGCTCAGATTCTTCCCCTGGTGGCCATGGGACCCAGGTCAATGTACCTGCATCGTGAACGTCTGTAGCAGCTCTGAC
3. GGATTTGAGATTCTTCCACGGAAGCCACGGGACCCAGTCAACGTACCTGCATCGTGAACGTCTGTAGCAGCTCTGAC
* * ***** ** ** ** * ***** ***** ***** ***** ***** ** ***** ** *****

1. CATAGCTCCCAGTGGCCCTCCCAGGCCAGCTCCACGA---GGGACACAGATGCCAGCCCTTCCAGCTCCCCCAAAGATGA
2. CACAGCTCACAGTGTCTCTCCCAAGCCAGCTCCACAATGGGAGACACAGATTCCAGCCCTCGGAGTCCCCGAAGGACGA
3. CACAGTTCTCAGTGTCTCTCCCAAGCCAGGCCACAGTGGGAGACCCAGATGCCAAGCCCTCAGCGTCCCCAAAGGATGA
** ** * ***** * ***** ***** ***** * ** * ***** ** * ** ** ***** ** **

1. GCAGGTCCCTTTCTCCAAGGAGGAGCGTCTTTTCAGCCCGGGGGCTCCAGAGACTCTACTGCAGAGCCAGAGG
2. GCAGGTCCCTTTCTCCAAGGAGGAATGTGCCTTTGCGTCCAGCTGGAGACGCCAGAGACCCCTGTGGGAGCACC GAAG
3. GCAGGTCCCTTTCTCAGGAGGAGTGTCCGTCTCAGTCCCCGTGTGAGACTACAGAGACACT---GCAGAGCC---ATG
***** ***** ***** ** * * * * * * * * * * * * * ***** ** * ***** *

1. AGAAGCCCTTGCCCTGGGTGTGCCTGACGCTGGGATGAAGCCAGC-----
2. AGAAGCCCTTGCCCTGGGAGTGCCTGATGCTGGGATGAAGCCAGT-----
3. AGAAGCCCTTGCCCTGGGTGTGCCGATATGGGATGAAGCCAGCCAGCAAGCTGGCTGGTTTGTATCAGATTGCAGTCAA
***** ***** ** ***** ** ** ***** *****

1. -----TAA
2. -----TAA
3. GTGGCCCTGA
* *
```

Figura 4. Comparació de les seqüències nucleotídiques del TNFR2 de porc, humà i ratolí. En gris es marquen les 4 regions riques en cisteïnes. En negre es marca la regió transmembrana.

2.3.1.2 Anàlisi bioinformàtica de les proteïnes.

A partir de les seqüències de cDNA obtingudes es van deduir les seqüències aminoacídiques de cada isoforma i es van esbrinar les característiques de les proteïnes corresponents mitjançant prediccions bioinformàtiques amb diferents programes com SMART o el Compute pI/Mw, entre d'altres (Materials i Mètodes secció 3). En la figura 5 es presenta un esquema que resumeix la distribució del motius proteics en relació als exons per les diferents variants descobertes en aquest treball.

El receptor complet pTNFR2, isoforma 1, és una proteïna transmembrana de tipus I amb un total de 461 aminoàcids, pèptid senyal de 22 aminoàcids de llargària inclòs. Conté quatre dominis rics en cisteïnes a la regió extracel·lular (239 aminoàcids) seguida per una regió transmembrana (23 aminoàcids) i un domini citoplasmàtic que transmet els senyals intracel·lulars (177 aminoàcids). El seu pes molecular teòric és de 48 kDa i té un punt isoelèctric de 8,40. A nivell *in silico* està descrit com una proteïna de la via secretora.

La isoforma 2 és una variant generada per un *splicing* alternatiu que elimina els exons 7 al 10, pTNFR2 Δ 7-10. No té regió transmembrana i per tant, és una proteïna soluble. La proteïna immadura té un total de 296 aminoàcids i conté el mateix pèptid senyal que les altres isoformes. Conserva els quatre dominis rics en cisteïnes de la regió extracel·lular (239 aminoàcids), seguit d'una cua de baixa complexitat amb 35 aminoàcids que es genera a partir del *splicing*. Té un pes molecular de 31,2 kDa i un punt isoelèctric de 8,50. A nivell *in silico* està descrit com una proteïna de la via secretora. Per l'assignació del número 2 a aquesta isoforma ens hem basat en el que s'ha establert prèviament en humans.

La isoforma 3 del receptor està generada per un *splicing* alternatiu de l'exó 4, pTNFR Δ E4 i conté 411 aminoàcids incloent el pèptid senyal de 22 aminoàcids de llargària. S'assembla força al receptor complet però només té 3 dominis rics en cisteïnes en el domini extracel·lular (189 aminoàcids). La deleció d'aquest exó causa una fusió del dominis rics en cisteïnes 2 i 3. En canvi, la regió transmembrana (23 aminoàcids) i el domini citoplasmàtic (177 aminoàcids) són idèntics al pTNFR2. Té un pes de 42,5 kDa i un punt isoelèctric de 7,70. A nivell *in silico* també està descrit com una proteïna de la via secretora.

Finalment, la variant generada quan esdevenen els dos *splicings* descrits, pTNFR2 Δ E4 Δ E7-10, la denominem isoforma 4. La proteïna immadura conté 246 aminoàcids i com les altres isoformes es processa utilitzant el mateix pèptid senyal. Conté només 3 dominis rics en cisteïnes al domini extracel·lular (189 aminoàcids) i acaba amb una cua curta de baixa complexitat. Té un pes de 25,6 kDa i un punt isoelèctric de 7,85. Es dedueix que es comporta a nivell *in silico* com una proteïna de la via secretora (figura 5).

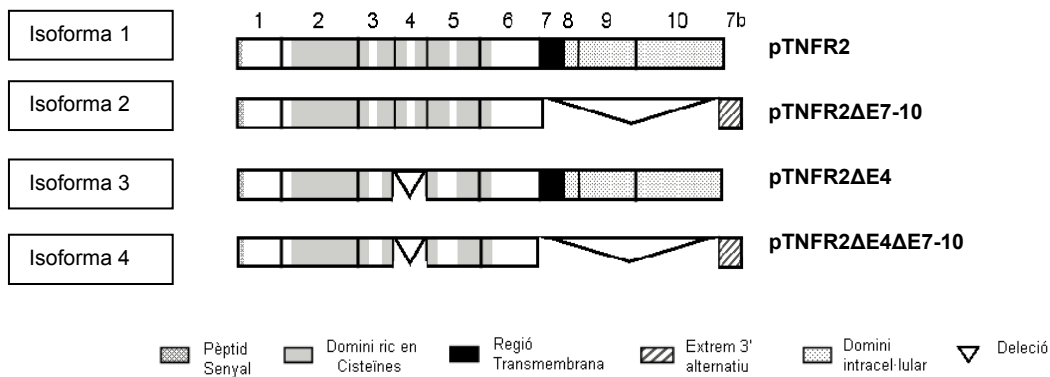


Figura 5. Esquema resum de les diverses isoformes del pTNFR2. Es mostren els exons i com es distribueixen les diferents regions i motius proteics.

Una anàlisi bioinformàtica amb el programa *T-Coffe* (Materials i Mètodes secció 3) ens va permetre detectar el percentatge d'homologia del pTNFR2 (isoforma 1) amb el d'altres espècies properes a nivell de seqüència aminoacídica (figura 6). Així doncs la seqüència del pTNFR2 complet mostra una identitat del 72,5% amb la seqüència del TNFR2 humà i un 52,7% amb el TNFR2 murí (figura 6). A més, trobem nombroses variacions d'aminoàcids que per les seves característiques són considerades de tipus conservatiu i algunes semiconservatives. S'ha de destacar que la identitat més elevada es correspon amb la seqüència aminoacídica bovina 80%. En humans, s'ha descrit l'existència d'una isoforma soluble generada per *splicing* alternatiu que causa la deleció dels exons 7 i 8 [Lainez et al. 2004]. La isoforma 2 porcina (generada per deleció dels exons 7 a 10) té una homologia del 64% amb aquesta isoforma humana. Finalment, Les variants amb *splicing* de l'exó 4 no han estat descrites en cap altre espècie i per tant no en fem de comparacions.

Es van poder determinar a nivell bioinformàtic dos llocs potencials de N-glicosilació, localitzats en els aminoàcids 70 (NRT) i 258 (NIS) (figura 6). El primer lloc potencial de N-glicosilació està també conservat en la seqüència murina.

2.3.2 Estudis d'expressió dels missatgers de les isoformes de pTNFR2.

L'existència dels diferents tipus de RNA missatger es va estudiar mitjançant un anàlisi per *Northern Blot* (figura 7). Es va utilitzar RNA total de cèl·lules mononuclears de sang perifèrica (PBMC) i de condrocits articulars (PAC). La hibridació es va fer amb una sonda de DNA que corresponia al domini extracel·lular sencer del pTNFR2 o amb una sonda que comprenia només l'exó 4. Es van observar múltiples bandes. Les més rellevants d'aproximadament 6 i 5 kb corresponien a diferents transcrits del pTNFR2 i podrien contenir també la variant amb el *splicing* de l'exó 4. La banda de 3,5 kb per mida podria correspondre a un transcrit més processat del pTNFR2. A continuació, les bandes de 2,8 i 2,6 kb són consistents amb diversos transcrits de les isoformes solubles, amb i sense exó 4, respectivament. A més a més, en la mostra de PBMC apareix una banda de 1,9 kb, que a causa de la seva mida, quadraria amb una variant soluble.

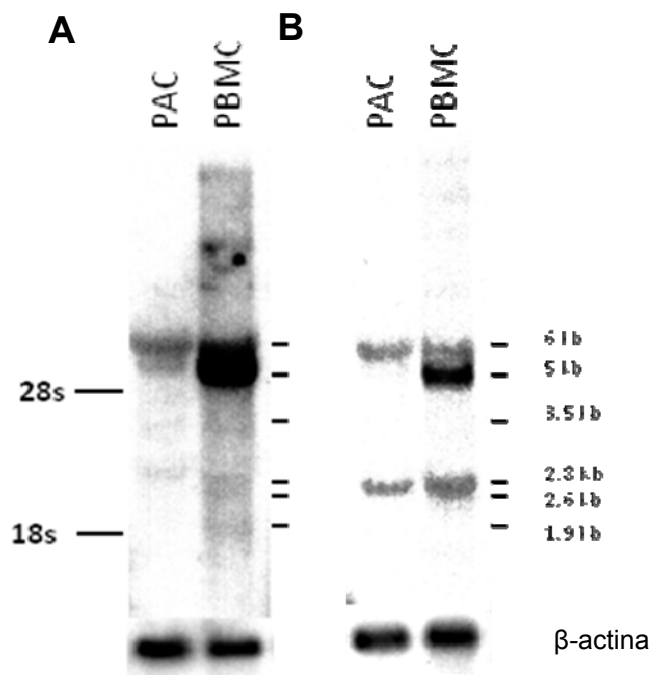


Figura 7. Anàlisi per *Northern Blot* per a la detecció de diferents transcrits del pTNFR2. Com a control de càrrega s'ha usat la β -actina. Es va fer servir una sonda corresponent al total de la regió extracel·lular del pTNFR2 (A) o només a l'exó 4 (B).

A continuació es va procedir a determinar el nivell d'expressió d'aquestes isoformes en diferents teixits i cèl·lules porcines mitjançant la tècnica de RT-PCR quantitativa (figures 8 i 9). Es van dissenyar els experiments per tal de determinar la proporció de molècules que presentaven o no un determinat *splicing* mitjançant el mètode Taqman. A la secció 4 de Materials i Mètodes s'especifiquen els detalls tècnics i a la figura 8 es localitzen les zones de reconeixement de sondes i encebadors específics per cada sèrie d'experiments. En concret, primer es van determinar simultàniament la presència o absència de l'exó 4 (figures 8A i 9A) i en una segona sèrie d'experiments la presència o absència del *splicing* dels exons 7 a 10 (figures 8B i 9B).

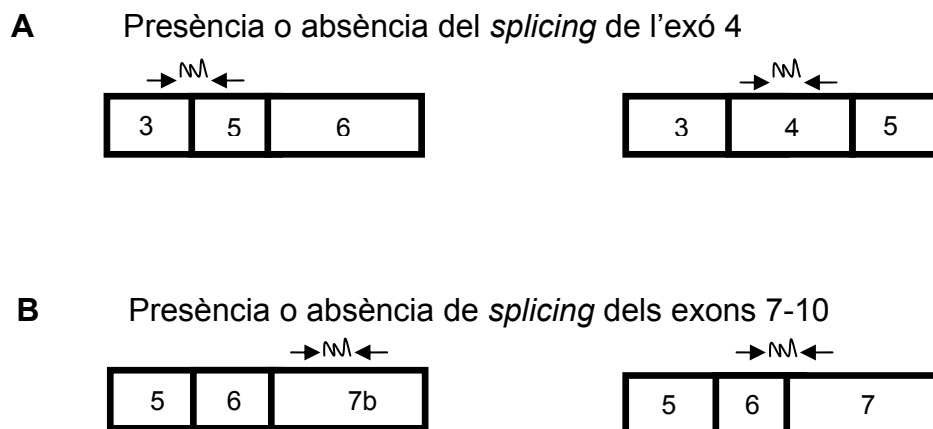


Figura 8. Esquema dels llocs de reconeixement dels encebadors ($\rightarrow\leftarrow$) i les sondes Taqman (M) per detectar la presència (deleció) o absència dels *splicings* mitjançant RT-PCR quantitativa. Es presenten els exons del pTNFR2 que estan involucrats en la detecció del *splicing* de l'exó 4 (A) i dels exons 7 a 10 (B).

En els dos casos, l'expressió global es va calcular sumant el número de molècules observades amb i sense *splicing* i es va normalitzar prenent els resultats de múscul (que eren molt robustos) com a comparació (figura 9). Es van observar variacions importants en els nivells globals d'expressió de pTNFR2 entre teixits. El pulmó és el teixit que presentava amb diferència els

nivells més elevats, més de 15 cops els nivells de referència del múscul. La melsa, els PBMC i els monòcits també mostraven nivells alts (entre 3 i 5 cops els nivells del múscul) en relació a la majoria de teixits. Els òrgans sòlids com el cor, els ronyons i el fetge, a més de l'intestí prim, donaven com a resultat nivells intermitjos. Els condrocits costals (PCC), les cèl·lules endotelials aòrtiques (PAEC) i el múscul presentaven nivells baixos i per últim, el cervell tenia els nivells més baixos de tots els analitzats.

La presència del *splicing* de l'exó 4 va ser detectada en tots els tipus cel·lulars i teixits (figura 9A). L'expressió d'aquest *splicing* es trobava al voltant del 5% del total en la major part de mostres analitzades. Els monòcits mostraven una major proporció (aproximadament 13%), mentre en el pulmó presentava el percentatge més baix (2,2%). Per tant, estimem que en la majoria de teixits la ràtio, presència del *splicing* de l'exó 4 en relació a l'absència de *splicing* de l'exó 4, és de 1 a 15. En monòcits puja fins a tenir una ràtio de 1 a 7 i al pulmó baixa fins a aproximadament 1 a 45.

La presència del *splicing* dels exons 7 a 10 es va detectar també a tots els teixits i cèl·lules (figura 9B). En general, la proporció de les variants solubles era superior a la proporció que mostraven les variants amb la deleció de l'exó 4 amb un rang entre el 7% i el 17%. El pulmó és una excepció ja que mostrava els nivells més baixos de variants solubles amb un percentatge del 1,7% (correspon a una ràtio de 1 a 58). Els nivells més elevats corresponien a múscul i PBMC, amb una ràtio de 1 molècula de la isoforma soluble per cada 5 de transmembrana, seguit dels monòcits amb una ràtio aproximada de 1 a 7. De fet, els monòcits i els condrocits porcins són dels pocs que presentaven la mateixa proporció de variants solubles i variants sense exó 4.

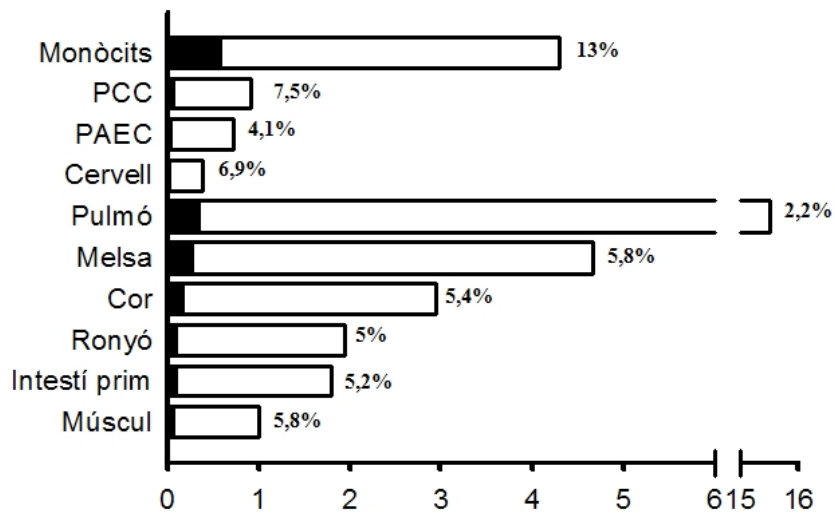
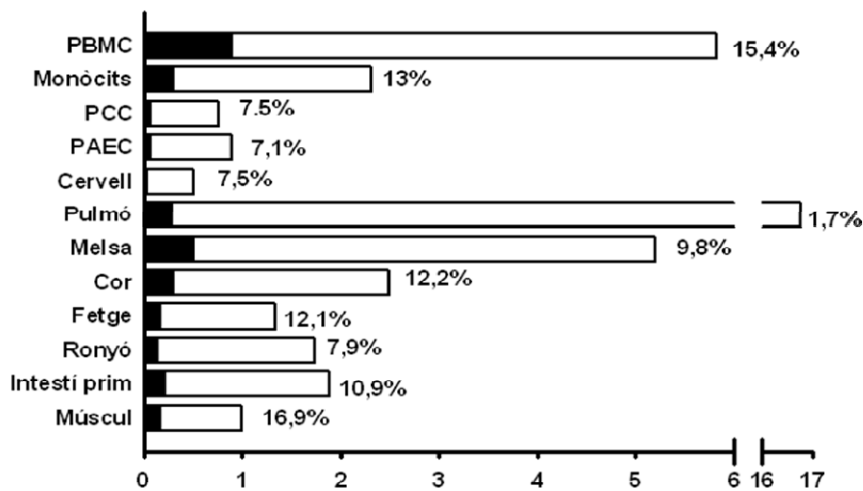
A Presència o absència de *splicing* de l'exó 4.**B** Presència o absència de *splicing* dels exons 7-10.

Figura 9. Quantificació de l'expressió de pTNFR2 i determinació del percentatge de *splicing*. Es va determinar la proporció de *splicing* alternatiu per l'exó 4 (A) i pels exons 7 a 10 (B). Les barres representen l'expressió global que inclou tant la presència del *splicing* (representat en negre) com l'absència (en blanc). En cada cas s'indica el percentatge de molècules sotmeses a *splicing*. Les dades es van calcular a partir de la mitjana de 5 experiments.

2.3.3 Estudis de localització subcel·lular i FRET de les isoformes de membrana del pTNFR2.

Amb la finalitat de determinar la localització de les isoformes pTNFR2 es van dur a terme una sèrie d'experiments de citometria de flux, immunofluorescència i FRET amb cèl·lules porcines o amb cèl·lules modificades genèticament per tal d'expressar les isoformes de membrana.

Mitjançant estudis de citometria de flux es va detectar una expressió moderada del pTNFR2 en la superfície de diferents tipus cel·lulars de porc com PAEC, PCC, limfòcits de sang perifèrica i la línia cel·lular limfoblàstica L35.

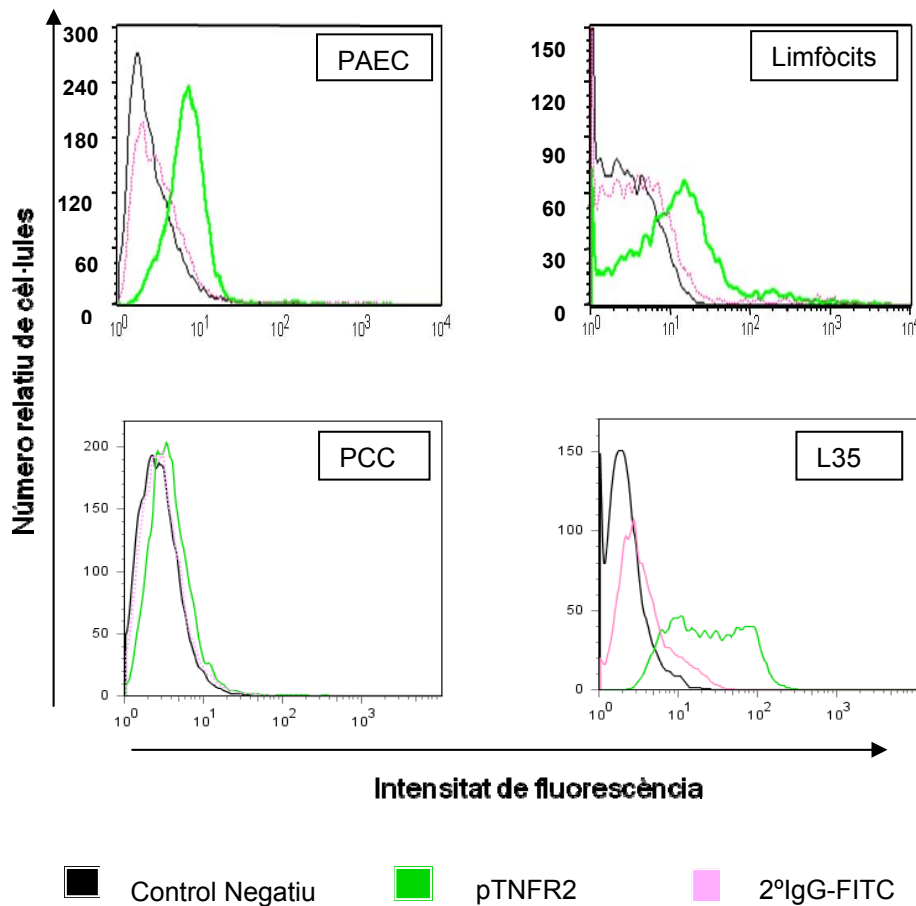


Figura 10. Determinació de l'expressió de pTNFR2 a la superfície de cèl·lules porcines mitjançant citometria de flux.

A continuació es va realitzar un estudi d'immunofluorescència amb cèl·lules PAEC o PAEC infectades amb el vector retrovíric pLXSN-pTNFR2 (figura 11).

Es van marcar amb l'anticòs policlonal ALP79 per detectar el pTNFR2 i la fal·loïdina per marcar les fibres d'actina que normalment envolten la membrana plasmàtica. Per aquest experiment es va usar com a control negatiu el marcatge amb l'anticòs secundari sol (IgG FITC) que no va donar reactivitat.

El patró general ens va mostrar una expressió del pTNFR2 nativa tant en el citosol com en la membrana plasmàtica ja que colocalitzava com a mitjana un 13,6% amb la fal·loïdina (figura 11A). Quan vam sobreexpressar el pTNFR2 complet en PAEC, es va detectar un augment de l'expressió en la membrana extracel·lular i la colocalització amb la fal·loïdina va augmentar aproximadament tres vegades fins un 39,6% (figura 11B).

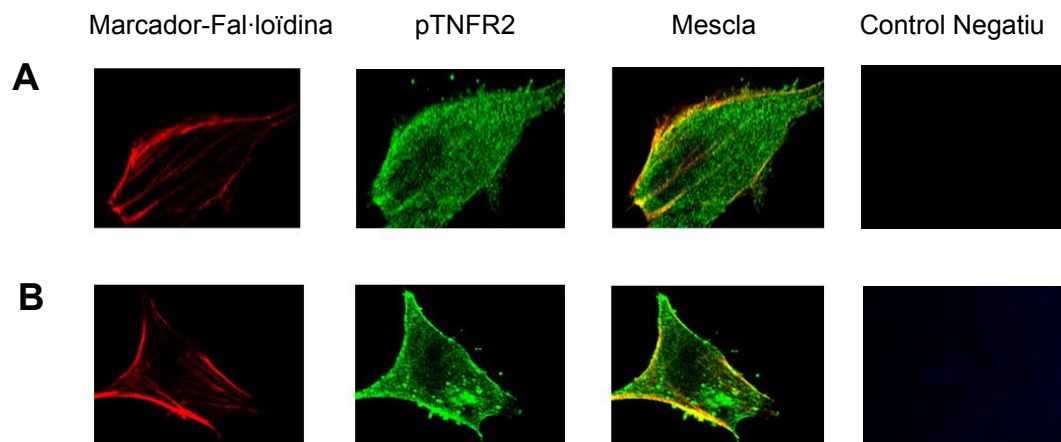


Figura 11. Estudi de colocalització del pTNFR2 i fal·loïdina en PAEC per immunofluorescència. Les PAEC control (A) o les infectades amb pLXSN-pTNFR2 (B) es van tenir amb fal·loïdina i l'anticòs per pTNFR2 (ALP79). Imatges de microscòpia confocal preses a 630 augments.

També es van incubar monòcits porcins aïllats a partir de sang perifèrica amb ALP79, per detectar el pTNFR2, i DRAQ5, per tal de marcar el nucli (figura12). El marcatge ens mostra l'expressió de pTNFR2 a l'àrea citosòlica. El control negatiu marcant les cèl·lules només amb l'anticòs secundari (IgG FITC) no va donar senyal que pogués interferir amb els resultats.

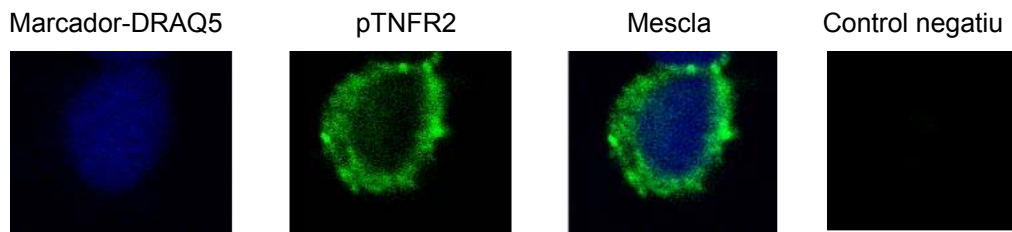


Figura 12. Detecció de pTNFR2 a monòcits porcins per immunofluorescència. Els monòcits porcins es van marcar amb ALP79, per detectar el pTNFR2, i DRAQ5, per marcar el nucli. Imatges preses amb microscopi Leica TCS-SL spectral confocal a 630 augments.

Aquests experiments no ens permetien afirmar si l'anticòs ALP79 detectava només el pTNFR2 o també detectava el pTNFR2 Δ E4. Per comprovar-ho es van transfectar cèl·lules Hela amb un vector que contenia cadascuna de les dues isoformes de membrana. Per poder detectar les isoformes es van generar proteïnes de fusió formades pel domini extracel·lular del receptor, la regió transmembrana i una part del domini intracel·lular unit a la proteïna EYFP o ECFP. Es van testar els anticossos policlonals de conill ALP79 i ALP80 i es va observar per immunofluorescència que cap d'ells discernia entre les dues variants (figura 13). Per tant, ambdós anticossos són vàlids per detectar tant el pTNFR2 complet com el pTNFR2 Δ E4 amb aquesta tècnica. El control negatiu marcant les cèl·lules només amb l'anticòs secundari (IgG Alexa555) no va donar senyal que pogués interferir amb els resultats. En successius experiments es va usar l'anticòs ALP79, que donava una mica més de reactivitat. El primer experiment va servir per confirmar que la proteïna de fusió amb la EYFP colocalitzava exactament amb la tinció de l'anticòs ALP79.

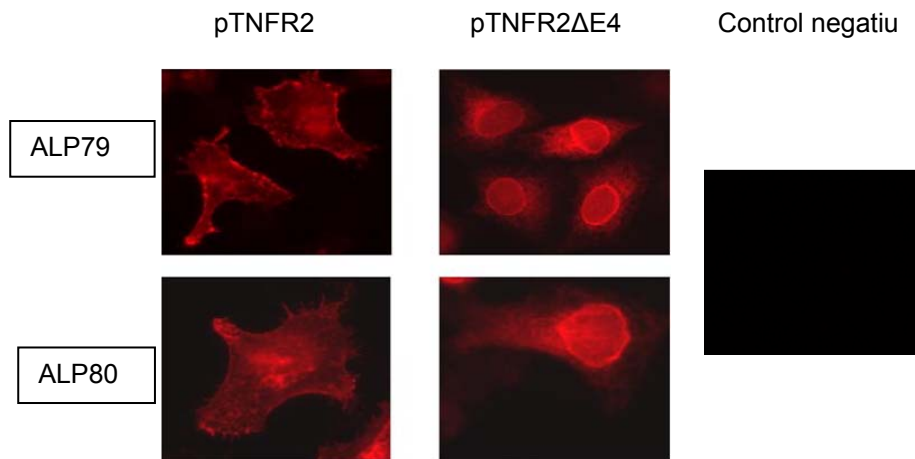


Figura 13. Estudi per determinar l'especificitat dels anticossos ALP79 i ALP80 per immunofluorescència. Les cèl·lules HeLa transfectades amb pTNFR2 o pTNFR2ΔE4 van ser tenyides per l'anticòs indicat. Imatge original presa amb microscopi d'epifluorescència Olympus BX-60, 100 augments.

Com els anticossos dels quals disposàvem no eren capaços de diferenciar entre les dues isoformes, vàrem optar per determinar la seva localització subcel·lular transfectant cèl·lules d'origen humà, HeLa i 293EBNA, amb vectors que contenien les isoformes unides en el seu C-terminal a una proteïna fluorescent. Aquestes proteïnes de fusió conservaven la regió transmembrana i una porció de la citosòlica. En primer lloc, les cèl·lules HeLa es van transfectar separatament amb pEYFP-pTNFR2 o pEYFP-pTNFR2ΔE4 i després de 48 h es va procedir a fer els estudis d'immunofluorescència. Es van fer tots els controls necessaris amb cèl·lules sense transfectar, o transfectedes amb els vectors que només contenien el fluorocrom, a més de controls amb els reactius emprats per confirmar que no hi havia cap interferència amb el resultat de l'assaig ni fals positiu. Tots els controls van donar negatius.

En el primer experiment de localització es va utilitzar la fal·loïdina com a marcador de membrana (figura 14). Es va observar un patró de les dues isoformes de pTNFR2 clarament diferent. El pTNFR2 es veia majoritàriament a la membrana plasmàtica dibuixant la morfologia de les cèl·lules HeLa. En canvi, la variant pTNFR2ΔE4 presentava un marcatge intracel·lular. Amb un programa d'anàlisi d'imatges es va calcular que la transfecció amb el pTNFR2 complet

colocalitzava de mitjana un 37% amb el marcatge de fal·loïdina, mentre l'expressió del pTNFR2 Δ E4 tan sol un 4%. De fet, la distribució del senyal immunofluorescent suggeria una localització a reticle endoplasmàtic d'aquesta isoforma.

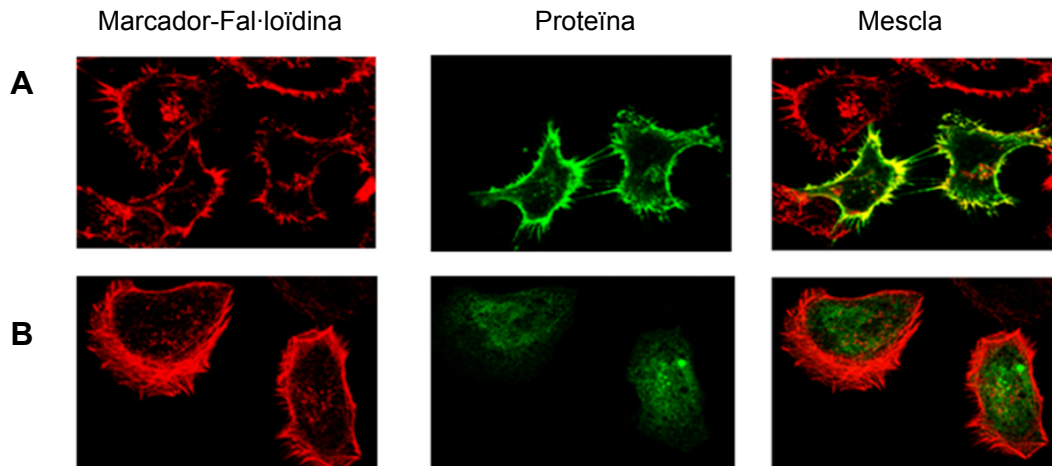


Figura 14. Estudis de colocalització de les isoformes de membrana de pTNFR2 amb el marcadore de fal·loïdina a cèl·lules HeLa transfectades. Es va analitzar les cèl·lules HeLa que expressaven pTNFR2-EYFP (A) o pTNFR2 Δ E4-EYFP (B) 48 h després de la transfecció transitòria. Imatge original presa amb microscòpia confocal a 630 augments.

Per tant, el segon experiment es va dissenyar per localitzar el pTNFR2 Δ E4 fent servir com a marcadore la calnexina, que és una proteïna transmembrana del reticle endoplasmàtic (figura 15). En aquest cas, podem comprovar com el receptor pTNFR2 no colocalitzava amb la calnexina (un 4,8% de mitjana), mentre les cèl·lules transfectades amb la isoforma pTNFR2 Δ E4 mostraven una elevada coincidència amb el marcadore de reticle (un 42% de mitjana). Tanmateix, encara restava una part del pTNFR2 Δ E4 que es localitzava dins la cèl·lula, però no coincidia amb el patró de tinció de la calnexina.

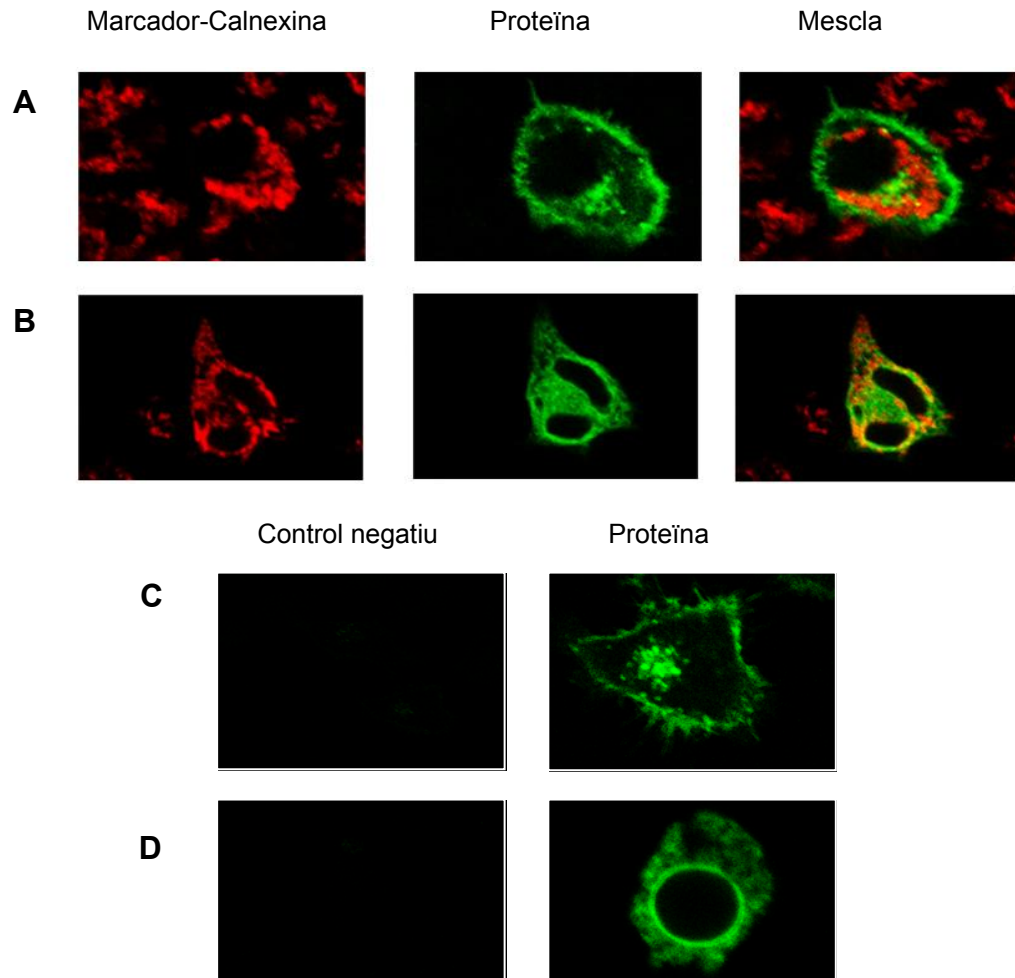


Figura 15. Estudis de colocalització de les isoformes de membrana del pTNFR2 amb el marcador de reticle endoplasmàtic calnexina a cèl·lules HeLa transfectades. Es van analitzar les cèl·lules HeLa que expressaven pTNFR2-EYFP (A) i pTNFR2ΔE4-EYFP (B) 48 h després de la transfecció transitòria. Com a controls negatius es van incubar només amb l'anticòs secundari IgG-FITC, sense anti-calnexina, les cèl·lules transfectades amb pTNFR2-EYFP (C) i pTNFR2ΔE4-EYFP (D). Imatge original presa amb microscòpia confocal a 630 augments.

En un tercer assaig es va emprar un altre marcador de reticle endoplasmàtic, ER-Tracker DPX Blue-White, que podia ser usat en cèl·lules sense fixar. Sabem que aquest marcador reconeix una proteïna que es troba dins el reticle, a diferència de la calnexina que està a la membrana del reticle endoplasmàtic. El resultat mostra com el pTNFR2-EYFP marcat colocalitza poc amb el

marcador de reticle endoplasmàtic (un 8,7% de mitjana), mentre el pTNFR2 Δ E4-EYFP colocalitzava fins a un 20% (figura 16).

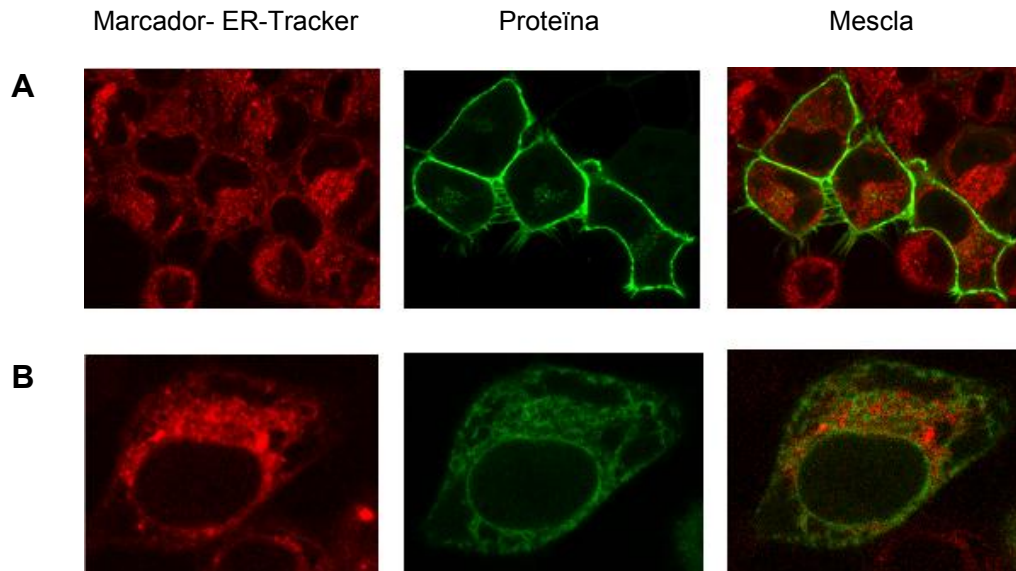
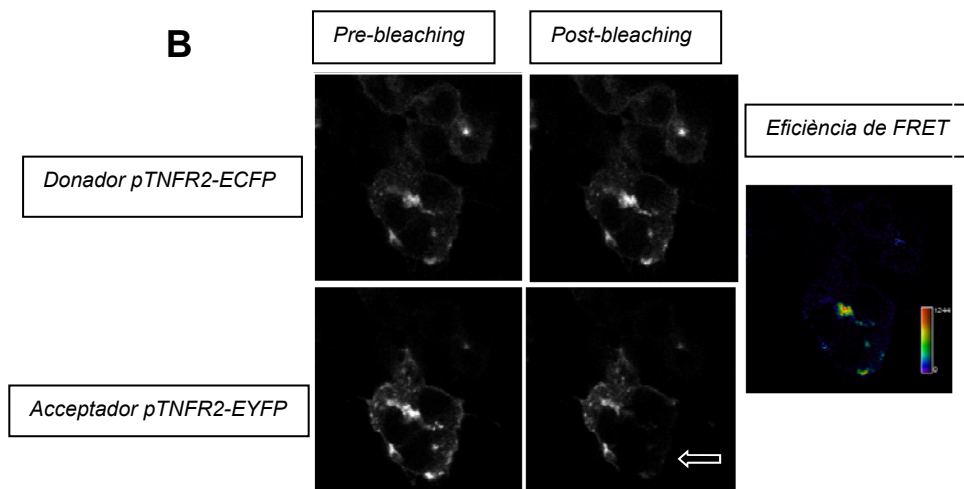
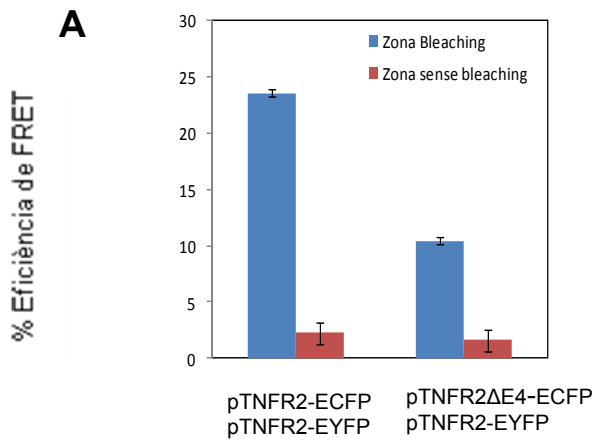


Figura 16. Estudis de colocalització de les isoformes de membrana de pTNFR2 amb el marcador de reticle endoplasmàtic ER-tracker a cèl·lules HeLa transfectades i sense fixar. Es van analitzar les cèl·lules HeLa que expressaven pTNFR2-EYFP (A) o pTNFR2 Δ E4-EYFP (B) 48 h després de la transfecció transitòria. Imatge original presa amb microscòpia confocal a 630 augments.

Com els receptors del TNF formen homotrímers per ser funcionals [Chan et al. 2000], vam dissenyar un experiment que simulés la situació fisiològica on les dues proteïnes foren expressades alhora. Amb aquest assaig volíem determinar si la isoforma pTNFR2 Δ E4 es podia expressar a la membrana plasmàtica juntament amb la variant llarga i en cas positiu, si formaven heterotrímers. Amb aquest objectiu es va fer un experiment de FRET usant la tècnica *Acceptor Photobleaching* en cèl·lules sotmeses a una doble transfecció amb les dues isoformes marcades amb fluoròfors diferents. En una primera transfecció es seleccionaven les cèl·lules per una de les proteïnes de fusió i en una segona ronda es feia una transfecció transitòria amb l'altre per procedir a

fer l'experiment de FRET al cap de 48 h. El control positiu va consistir en detectar la unió de pTNFR2-EYFP amb pTNFR2-ECFP que en combinar-se va produir FRET a la superfície cel·lular (figura 17B) on s'havia realitzat el *bleaching*, i no a les regions control (figura 17A). En el segon cas es van mesclar els dos tipus de receptors, el pTNFR2-EYFP, i el pTNFR2ΔE4-ECFP i també es va detectar FRET, encara que amb menor eficiència que amb el control positiu (figura 17A). Les dues isoformes colocalitzaven intracel·lularment, ja que només s'observava el FRET entre el pTNFR2ΔE4-ECFP i el pTNFR2-EYFP que quedava retingut dins la cèl·lula (figura 17C).



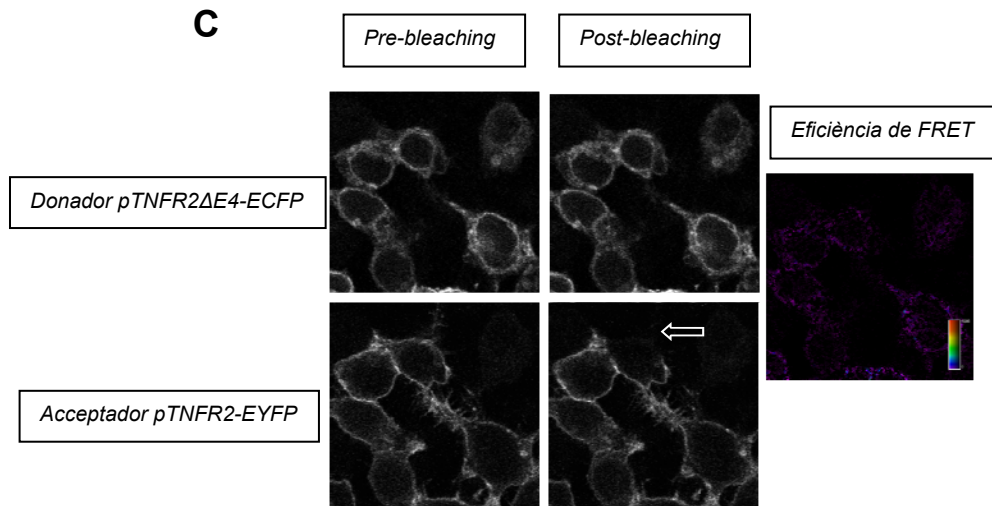


Figura 17. Experiment de FRET per detectar la unió de les isoformes de pTNFR2 en cèl·lules 293-EBNA. Es detecta el ECFP (donador) a una longitud d'ona de 488 nm i el EYFP (acceptador) a 514 nm. A) Resum de l'eficiència de FRET usant el mètode *Acceptor Photobleaching*. Les dades es van calcular a partir de la mitjana de 6 regions diferents. B) Imatges originals de microscopi confocal de pTNFR2-ECFP i pTNFR2-EYFP en una mateixa cèl·lula com a control positiu amb FRET. C) Expressió de pTNFR2ΔE4-ECFP i pTNFR2-EYFP en una mateixa cèl·lula per valorar la formació d'heterotrímiers.

A continuació es va dissenyar un experiment on les cèl·lules 293-EBNA transfectades amb el pTNFR2 o el pTNFR2ΔE4 marcat amb EYFP eren estimulades amb TNF α . L'objectiu era determinar si aquest estímul seria capaç de canviar la localització del pTNFR2ΔE4 i ubicar-lo a la membrana plasmàtica i induir la seva alliberació en el medi de cultiu. Primerament les cèl·lules es van estimular amb TNF α 20 ng/ml a diferents temps (5 minuts, 10 minuts, 15 minuts, 14 hores i 24 hores) i analitzar mitjançant microscòpia confocal (figura 18). Cap de les situacions descrites va resultar en una translocació del pTNFR2ΔE4 cap a la membrana plasmàtica.

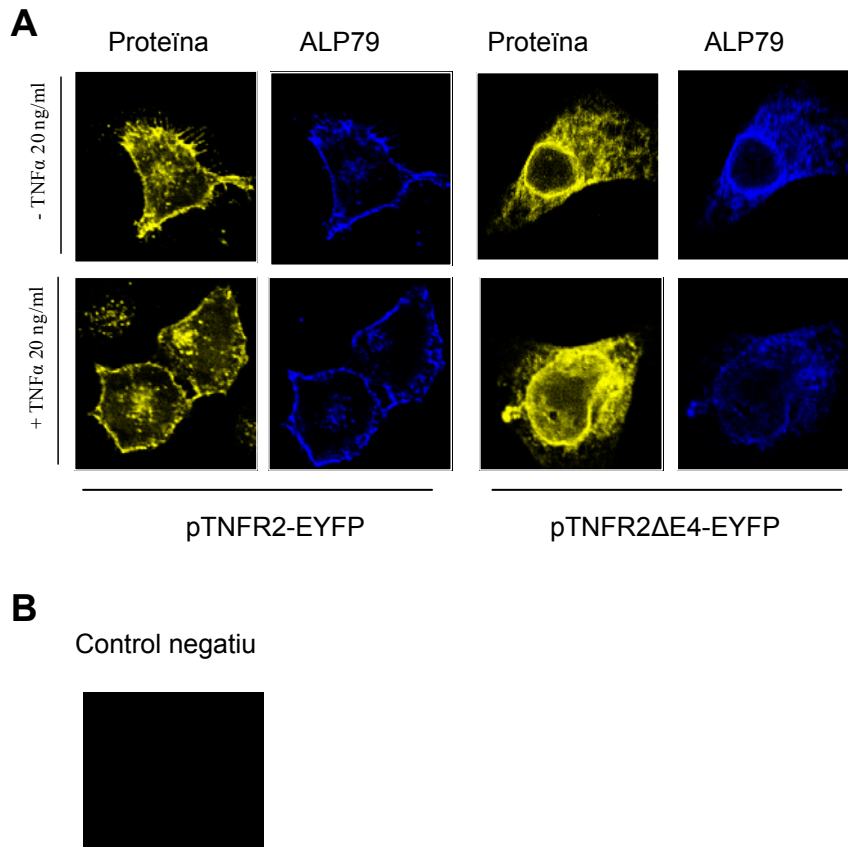


Figura 18. Estudis de localització de les isoformes de pTNFR2 després d'un tractament curt amb TNF α . Es mostren resultats de l'estimulació amb hTNF α durant 5 minuts de les cèl·lules Hela que expressaven pTNFR2-EYFP o pTNFR2 Δ E4-EYFP (com s'indica). B) Com a control negatiu es va usar l'anticòs secundari anti-conill IgG-647. Imatge original presa amb microscòpia confocal a 630 augments.

Les cèl·lules transfectades també es van analitzar mitjançant citometria de flux i tampoc es va detectar el receptor TNF2R Δ E4 en la membrana extracel·lular. En canvi, es va poder comprovar com l'expressió del TNFR2 complet disminuïa a mesura que augmentava el temps d'estímul amb TNF α (15 i 60 minuts) (figura 19).

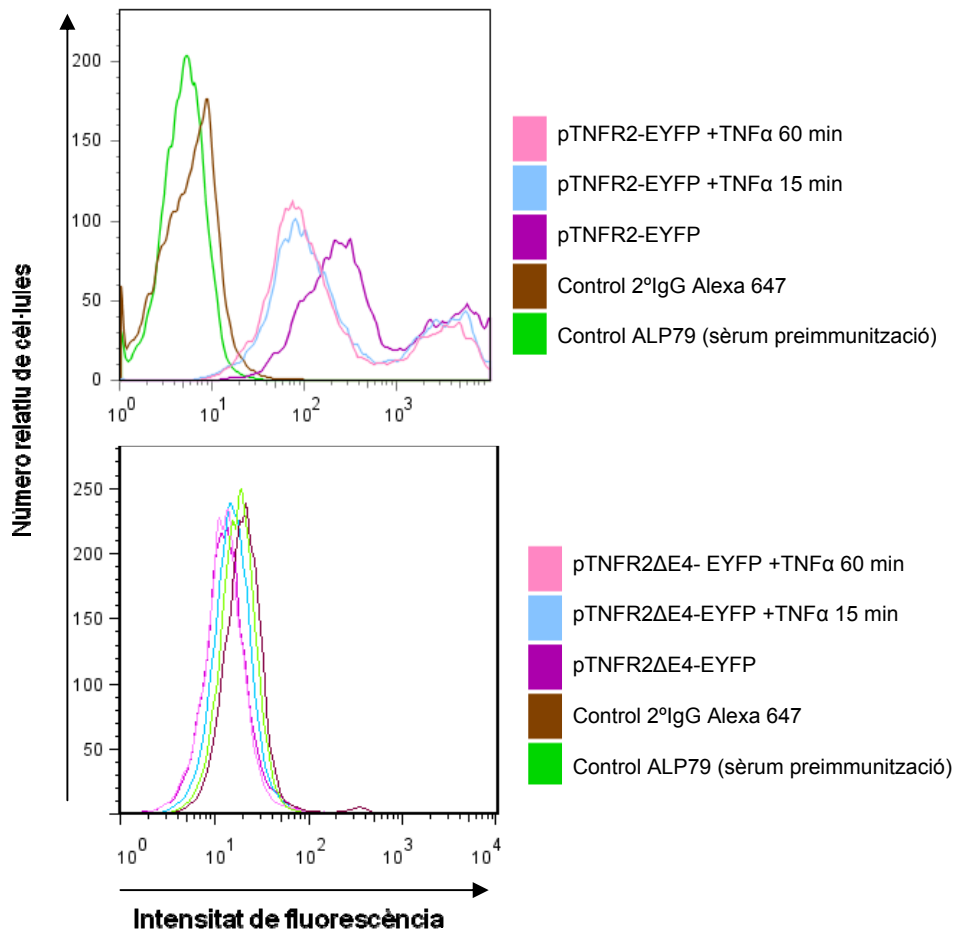


Figura 19. Determinació per citometria de flux de pTNFR2 a la superfície de cèl·lules 293-EBNA transfectades per expressar pTNFR2-EYFP o pTNFR2ΔE4-EYFP (com s'indica) i tractades amb TNF α .

Per demostrar que efectivament el receptor s'havia després de la membrana plasmàtica, es van recollir els sobrenedants de les diferents condicions experimentals al temps de 15 minuts de tractament. Mitjançant un anàlisi per *western blot* vam poder detectar el pTNFR2 alliberat, però no el pTNFR2ΔE4 soluble (Figura 20).

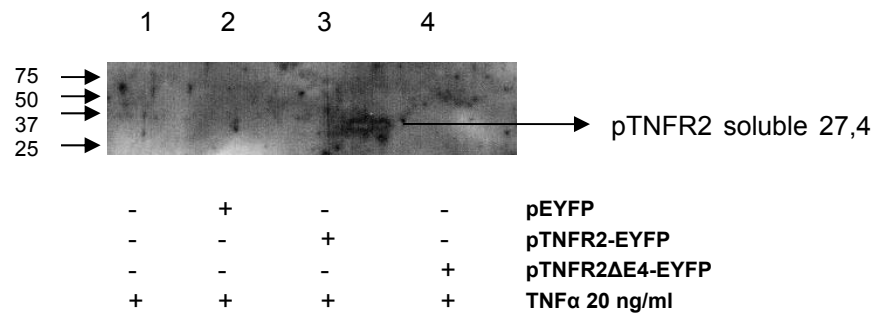
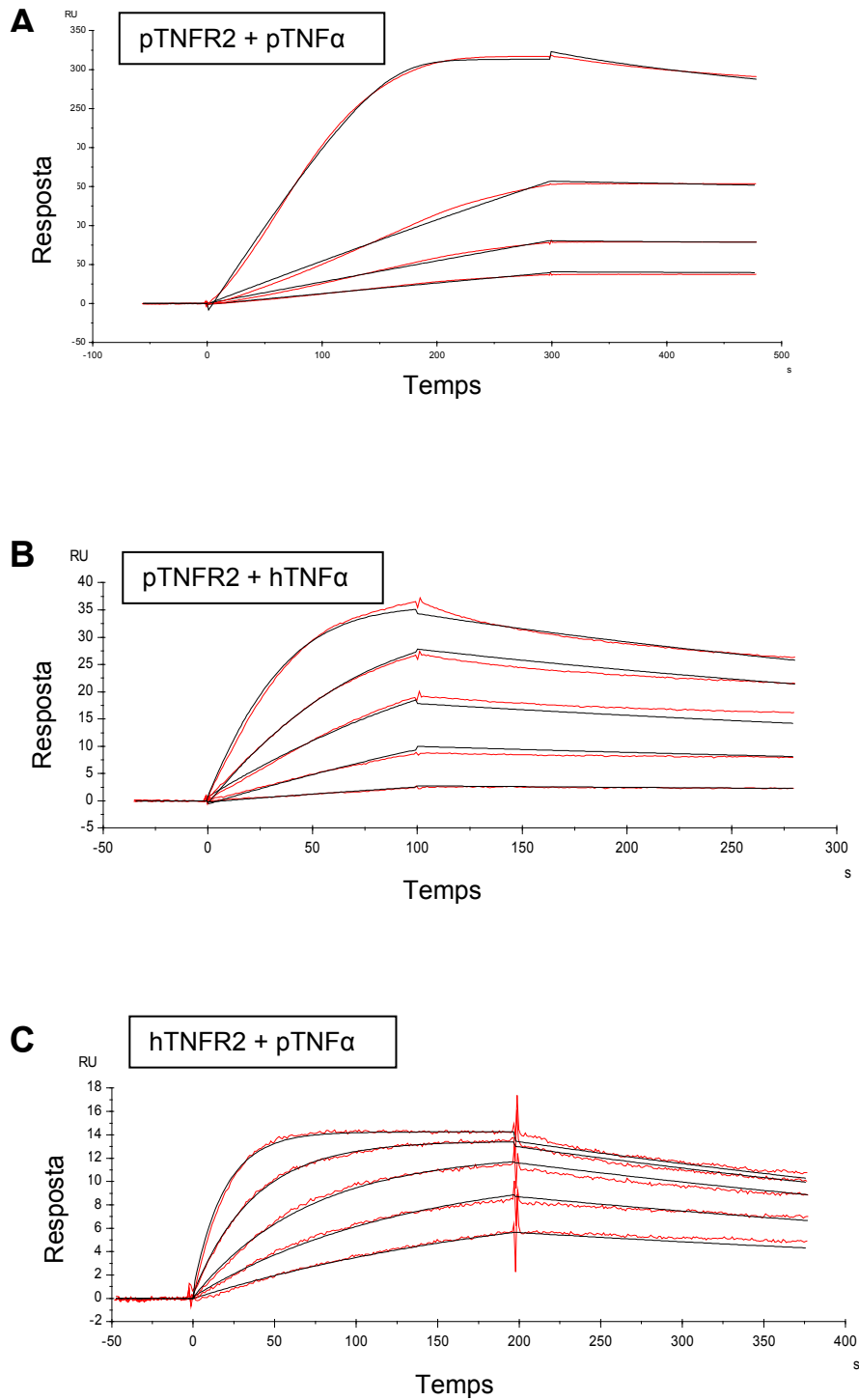


Figura 20. Detecció per *Western Blot* de pTNFR2 en el del sobrenedant de cèl·lules 293-EBNA transfectades per expressar pTNFR2 o pTNFR2ΔE4 i tractades amb TNFα durant 15 minuts.

2.3.4 Estudis d'afinitat de les isoformes del pTNFR2 pel TNFα.

Per tal d'elucidar quina funció podien tenir aquestes isoformes en els sistema porcí i en el sistema xenogènic, es van dissenyar estudis d'afinitat mitjançant ressonància de plasmó de superfície. Es van fer servir dues aproximacions per tal de determinar l'afinitat dels receptors als TNFα humà i porcí. Per un costat, els receptors es van immobilitzar directament al xip CM5, el que comporta una unió no orientada al sensor. Per altra banda, es van unir a través d'un anticòs monoclonal anti-GST que permet orientar la proteïna. Els analits emprats van ser el TNF humà i el porcí, que es van usar en solució a múltiples concentracions com es detalla a l'apartat de materials i mètodes.

Amb l'aproximació de la unió no orientada dels receptors es van obtenir resultats robustos (figura 21 i Taula 1). El pTNFR2 mostrà una elevada afinitat, de l'ordre de nanomolar tant pel TNF humà com pel porcí i es va adaptar bé a un model d'unió 1:1. Alhora de comparar les dues interaccions, només es va veure alguna diferència en la cinètica, ja que la velocitat de dissociació era més elevada en la combinació xenogènica. Tot i així, l'estabilitat de les unions era molt alta i no es dissociaven espontàniament. El hTNFR2 va mostrar un alta afinitat pel TNFα de les dues espècies i per tant, un comportament semblant al del receptor porcí.



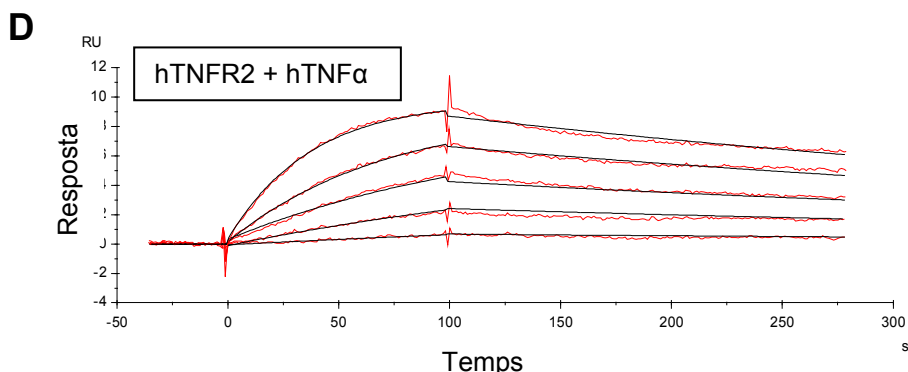


Figura 21. Anàlisi d'afinitat per ressonància de plasmó superficial del TNFR2 humà i porcí. Es van immobilitzar en diferents canals d'un xip CM5 el pTNFR2 (A i B) i el hTNFR2 (C i D) i es van passar múltiples concentracions dels analits TNF α porcí (A i C) i TNF α humà (B i D). Sensogrames amb un temps d'injecció de l'analit que varia entre 100 i 300 segons i un període de dissociació de 180 segons.

Taula 1. Resum de les variables determinades durant l'assaig de ressonància de plasmó amb els receptors no orientats.

Lligand/Analít	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)	Chi ² (RU ²)
pTNFR2/pTNF α	5,30E+05	8,65E-04	1,63E-09	6,17
pTNFR2/hTNF α	7,37E+05	1,75E-03	2,38E-09	0,671
hTNFR2/pTNF α	4,37E+05	1,50E-03	3,45E-09	0,065
hTNFR2/hTNF α	5,24E+05	2,06E-03	3,94E-09	0,085

K_a constant d'associació, K_d constant de dissociació, KD constant d'afinitat
Chi² < 10 mesura estadística que dona validesa als resultats.

L'aproximació de la unió orientada dels receptors van donar resultats semblants, ja que confirmaven una elevada afinitat del receptor porcí pel TNF α humà (taula 2). Tanmateix, aquesta mateixa alta afinitat implicava una dificultat tècnica elevada perquè no es podia regenerar bé la superfície del xip i reduïa la robustesa dels resultats. En canvi, aquesta aproximació ens va permetre avaluar millor les característiques de la unió de la isoforma pTNFR2 Δ E4 amb

els TNF α ja que l'afinitat era molt més baixa (figura 22). En aquestes condicions, el pTNFR2 Δ E4 no s'unia gens al TNF α humà i poc al TNF α d'origen porcí (una diferència de 4 ordres de magnitud respecte l'afinitat del pTNFR2 pel pTNF α).

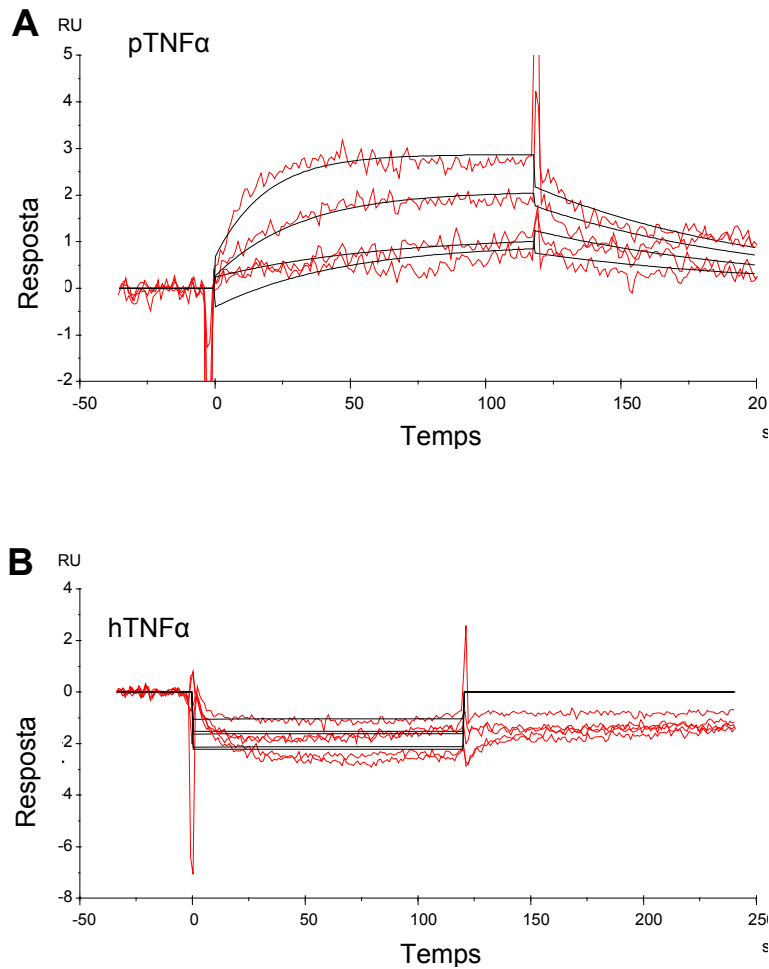


Figura 22. Anàlisi d'afinitat per ressonància de plasmó del pTNFR2 Δ E4. Es van determinar les cinètiques d'unió pel TNF α porcí (A) i humà (B). Sensogrames amb un temps d'injecció de l'analit de 120 segons i un període de dissociació de 180 segons.

Taula 2. Resum de les variable determinades per ressonància de plasmó amb els receptors orientats.

Lligand/Analit	ka(1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Chi ² (RU ²)
pTNFR2-pTNF α	1,86E+06	7,52E-06	4,02E-12	2,47
pTNFR2-hTNF α	2,45E+05	1,33E-04	5,44E-10	3.22
hTNFR2-pTNF α	9,59E+04	1,26E-05	1,31E-10	1.24
hTNFR2-hTNF α	5,76E+06	3,70E-05	6,41E-12	3,14
pTNFR2 Δ E4-pTNF α	7,87E+05	8,74E-03	1,11E-08	0.06
pTNFR2 Δ E4-hTNF α	-	-	-	-

Ka constant d'associació, Kd constant de dissociació, KD constant d'afinitat, Chi² <10 mesura estadística que dona validesa als resultats.

2.3.5 Assaig de *Pull down* i competició de formes solubles del pTNFR2.

Després de comprovar que el pTNFR2 Δ E4 porcí uneix molt poc el TNF α , es van dissenyar uns assajos per determinar si les dues variants podrien combinar-se i formar heterotrímers en forma soluble per regular negativament la via del TNF α . Per demostrar aquesta hipòtesi, vam produir de forma simultània en sobrenedants de cèl·lules mamíferes les isoformes de pTNFR2 amb i sense exó 4 marcades amb diferents *tags* (GST o His). Les proteïnes de fusió contenien la totalitat del domini extracel·lular seguit del *tag* en el seu extrem C-terminal. Per fer el *pull down* es van capturar les proteïnes amb GST fent servir sefàrosa amb glutatió i seguidament es detectaven les proteïnes mitjançant un anàlisi de *Western Blot*.

La figura 23A mostra els experiments realitzats transfectant les cèl·lules 293-EBNA de forma estable amb les variants que contenien la GST com a *tag* i de forma transitòria les variants amb el His *tag*. Els carrils 1 i 2 presenten els controls corresponents a la purificació del sobrenedant de cèl·lules

transfectades amb cadascuna de les variants marcades amb GST soles. Podem comprovar el senyal produït per l'anticòs anti-GST i la manca de senyal per l'anticòs anti-His. En el cas de la purificació del sobrenedant de cèl·lules transfectades de forma estable amb pTNFR2 Δ E4-GST i de forma transitòria amb pTNFR2-His (carril 3), ambdós anticossos donaven senyal després de la purificació amb GST. Finalment, el carril 4 mostrava com la combinació de pTNFR2-GST transfectat de forma estable i pTNFR2 Δ E4-His de forma transitòria també produïa senyal amb els dos anticossos. Aquests resultats ens indicaven que les dues isoformes solubles eren capaces d'unir-se entre elles. Per confirmar-ho, es va repetir l'experiment, però en aquest cas transfectant de forma estable amb el vector que contenia les variants amb el *tag* His i de forma transitòria amb les variants amb el *tag* GST (figura 23B). Els carrils 1 i 2 mostren com a control les variants amb el *tag* His purificades del sobrenedant de cèl·lules transfectades de forma estable. Com era d'esperar, s'observava senyal després d'incubar amb l'anticòs anti-His, però no amb l'anticòs anti-GST. A més a més, es va afegir un control d'especificitat d'unió que consistia en fer les transfeccions transitòries amb una proteïna irrellevant marcada amb GST (carrils 3 i 4). La manca de senyal en aquests carrils demostra que la purificació de la proteïna irrellevant GST no arrossegava cap de les variants del receptor marcades amb His. En canvi, la purificació del sobrenedant de cèl·lules amb una doble transfecció, una d'estable amb pTNFR2-His i l'altre de transitòria amb pTNFR2 Δ E4-GST (carril 5), comportava una reactivitat positiva amb els dos anticossos. El mateix resultat s'obtenia quan la transfecció estable corresponia al pTNFR2 Δ E4-His i la transitòria al pTNFR2-GST (carril 6). Aquest assaig de *pull down* ens permetia afirmar que els dos receptors són capaços de combinar-se.

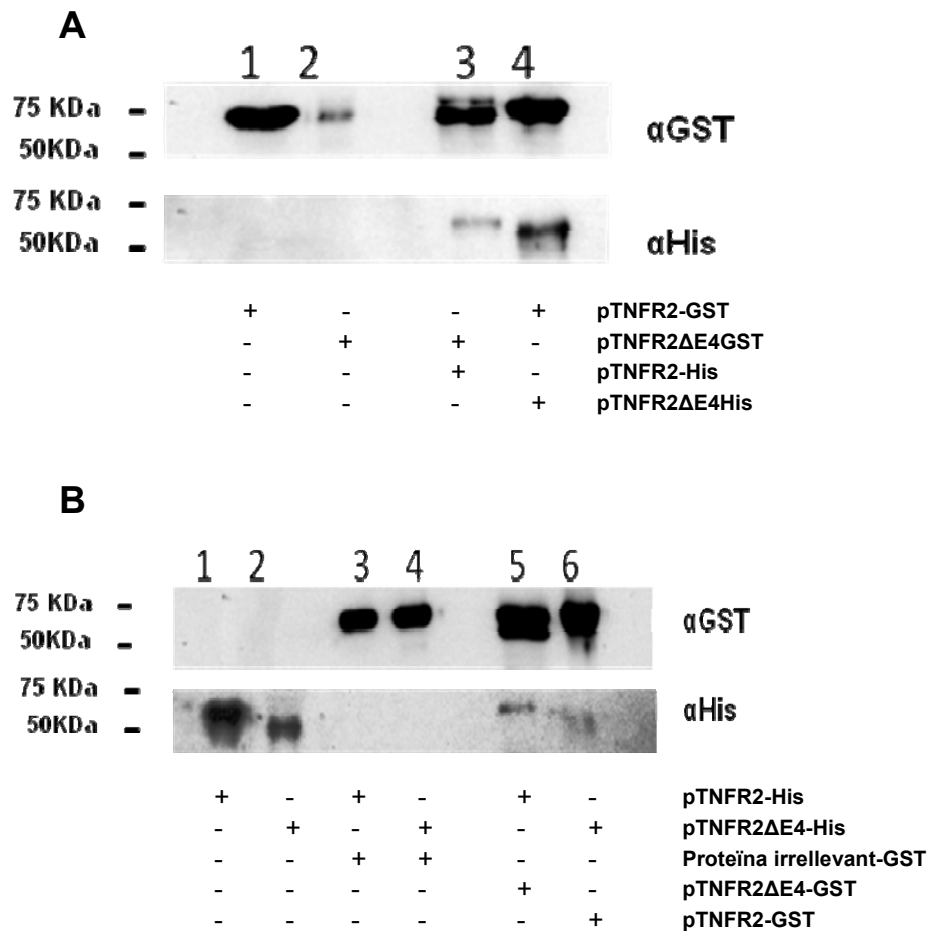


Figura 23. Western Blot del *pull down* de les variants solubles del pTNFR2. A) Transfecció estable amb variants amb GST i transitòria amb variants His. B) Transfecció estable amb variants amb His i transitòria amb variants GST. Incubacions amb els anticossos anti-GST (αGST) i anti-His (αHis).

Per demostrar la funcionalitat de les dues isoformes solubles al combinar-se, vam dissenyar un experiment de competició amb cèl·lules endotelials porcines (figura 24). Amb l'objectiu de valorar l'efecte de l'addició o no dels receptors, es va determinar el nivell d'expressió a superfície dels marcadors SLA I i pVCAM-1. Aquests marcadors ens permetien mesurar el grau d'activació de l'endoteli porcí estimulat amb TNF α humà. Amb aquest experiment s'establí una situació on els receptors solubles competien amb els receptors de membrana

per la unió al TNF α , repercutint en l'activació de l'endoteli. Si els receptors solubles no eren capaços d'unir el TNF α , hi hauria un desencadenament de l'activació. Si pel contrari eren capaços de competir i segrestar la citoquina, l'activació es podria evitar.

En aquest assaig es van comparar sis escenaris diferents. L'endoteli porcí sense cap tipus d'estímul va ser designat com el control negatiu. L'addició única de TNF α en el cultiu de cèl·lules endotelials va ser el control positiu d'activació que es va normalitzar com a 100% de la resposta. Simultàniament, es va determinar l'efecte de l'addició al tractament amb TNF α de 50 μ g/ml de pTNFR2, 50 μ g/ml de pTNFR2 Δ E4 o 50 μ g/ml de hTNFR2, cadascun d'ells per separat. Per estudiar la combinació de les dues isoformes es van afegir 50 μ g/ml de pTNFR2 més 50 μ g/ml de pTNFR2 Δ E4 (figura 24). L'addició de pTNFR2 va abolir en gran mesura l'activació de l'endoteli produïda pel TNF α humà. Com a control d'aquest efecte, el hTNFR2 va ser encara més eficient en aquest bloqueig. En canvi, el pTNFR2 Δ E4 no semblava capaç d'evitar l'efecte del TNF α ja que tant el SLA I com el VCAM-1 s'incrementaven a la superfície cel·lular a nivells similars als obtinguts amb hTNF α sol. El més interessant és que la combinació de les dues variants amb el hTNF α mostrava com resultat un nivell d'activació intermedi de l'endoteli. Encara que les diferències no eren molt marcades, aquests efectes eren reproduïbles.

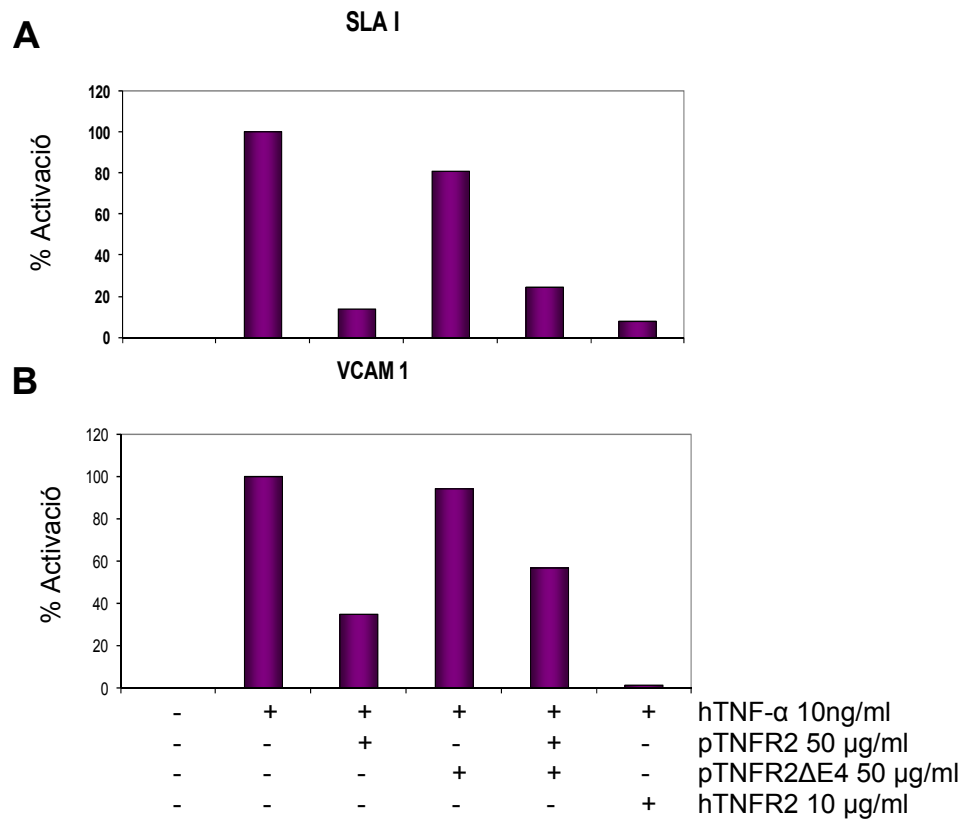


Figura 24. Estudis de competició de les variants solubles del pTNFR2. Determinació de l'activació de PAEC estimulades amb TNF α a través de SLA I (A) i pVCAM-1 (B). Es mostra la mesura de la intensitat de fluorescència, normalitzada pel control positiu a 100%, d'un experiment representatiu de 4.

3 PART II: Estudi de la via del CD200 porcí.

3.1 Hipòtesi

Actualment sabem que el CD200 regula l'activitat de les cèl·lules mieloides a través de la interacció amb el seu receptor [Hoek et al. 2000]. Diferents estudis han descrit el paper immunoregulator de la interacció CD200-CD200R en el control del rebuig de l'al·lotrasplantament i del xenotrasplantament concordant, entre d'altres processos amb un component inflamatori [Gorczyński et al. 2005] [Gorczyński et al. 1999] [Rosenblum et al. 2004]. Per tant, l'expressió del CD200 en les cèl·lules donadores o en l'òrgan podria jugar un paper crucial en el rebuig del xenotrasplantament de porc a primat, i més concretament en els mecanismes d'inducció de tolerància necessaris per la supervivència de l'empelt. A més a més, la unió receptor/l·ligand del CD200 podria no estar conservada en aquesta combinació d'espècies i contribuir al rebuig de l'empelt porcí.

3.2 Objectius

1. Identificació i caracterització del CD200 i CD200R porcins. Amb aquest objectiu s'ha dividit el treball en:
 - A. Clonació de les molècules CD200 i CD200R porcines.
 - B. Anàlisis bioinformàtiques comparatives entre diferents espècies.
 - C. Estudis d'expressió a nivell de mRNA del pCD200.
 - D. Estudis d'expressió del CD200 en cèl·lules d'interès pel xenotrasplantament.
2. Estudis de funcionalitat en el sistema xenogènic. Inclou els objectius concrets següents:
 - E. Estudis d'afinitat entre els l·ligands (CD200) i el receptors (CD200R) humans i porcins.

3.3 Resultats

3.3.1 Obtenció i anàlisi del CD200 porcí i de 3 isoformes del seu receptor.

En aquest primer apartat es presenten els clonatges de diferents cDNA corresponents a molècules porcines de la via del CD200/CD200R, cap d'elles descrita fins a l'actualitat.

3.3.1.1 Amplificació del cDNA de les isoformes del pCD200.

La seqüència nucleotídica de la regió codificant del CD200 porcí (pCD200) es va obtenir fent ús d'oligonucleotids degenerats i RT-PCR a partir de RNA total de cervell porcí. Posteriorment, es va obtenir la seqüència completa del cDNA del pCD200 usant la tecnologia SMART RACE amb RNA total de cervell (figura 25).

En aquest treball també es van amplificar els cDNA del CD200 humà (hCD200) i murí (mCD200). Per aquesta tasca, es va aïllar respectivament el RNA total de cèl·lules endotelials humanes HUVEC i el de pulmó de ratolí i es va realitzar una transcripció reversa. Una PCR amb encebadors específics va permetre l'amplificació posterior.

Una anàlisi bioinformàtica ens va permetre comparar i determinar el percentatge d'homologia entre les regions codificants de diferents espècies. La molècula porcina té un percentatge d'homologia amb la seqüència nucleotídica bovina del 92%, del 86% amb la humana i del 80% amb la murina (figura 26).

Estudi de les vies del TNF/TNFR2 i del CD200/CD200R en el rebuig xenogènic

CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGGGGAAAGGGCTTGAGCCGGAGCAGTGAGGCAGCTCGGGGGAGCT
 AGACCTGGGTAGCCTTGTCTCCACCGAACTAGAGGAACGCTGCTAGGTCTGGCTTGCGATTCTCCGGGCTTCTGGGTGAAGCTAGCCACCGCGCGC
 GGCCAGGAGCGACGATCGAGAGACTGGTGTTCAGGAGCTTCTTCTGCCATCTCTTACCTTCCAAGTATTGGTTTATGCGCAGCAGGGATGCTGT
 GCAGGGCACAAAGTGGTGACCCAAGATGTAAGAGAGCGGCTGAACACACCTGCTTCTTTAAGATGCTCTCTGCAAAAATCCCCAGGAAGTTTTGATTG
 TGACATGGCAAAAAATCAAGGCTGTGAGCCAGAAAACATGATCACCTTCAGCAAGAACCATGGGGTTGTAGTTACGCTGCTTATAAGGACAAGA
 TAAACATCACCCAGCTGGGACTCATGAACCAACCATTACCTTCTGGAATACCACCTTGGAGGATGAGGGTTGTTACAAGTGCCTCTTCAATACCT
 TTGGTGCCGGGAAGATCTCAGGAATAGCCTGCCTCACCTCTCTGTACAGCCACAGTATCCCTTCACTATAAAATATCTGAAGACCAACTAAATA
 TCACCTTGCTCTGCCAATGCTCGCCAGCCCTATGATCTCTGGAAGATATCTGGGTGAGGATTGAGAACAGTACTGAGATTCTCGTACACCCCA
 ATGGGACAACGCTGTGTACAGCATCCTCCAGATCAAAGACCCCAAGAGTCAAGTGGGGAAGGAGGTGATCTGCCAGGTGCTGCACCTGGGGACTG
 TGACTGACTACAGGGAACTGTGAACAAAGGCTTTTGGTTTTTCAGTTCCCTGTGTTAAGTATCGTTTCTCTGGTGATTCTTCTGGTCTTAATCT
 CAATCTTACTATACTGGAAACGCTGCTGAAACCAAGACCAGAGCCCTAGAGGAGTACACAGAGCCCTGAAAGTTATTCCCTGGTCTACTTGAAT
 CTGACTTAGGAAAGCAGGAGGAAAAAAGGTCATTCTCCATGGAACCTAAAGAAGCAAAAGAAAGTGGGAGTCAAGGCCAAGAATTTCAAACCTTT
 ATATCATCTAGGCTACCTAGTGTCTATGTGAGTTCCAAGAGGAAGTTACTTTACCTGTGAGGTCTGTTGTAGGACTTGATTTTGTGCTGTTGTGAG
 GCTACTGGACTTAGAATCAGGAGCCACTGCTCAGAGGCTGACTTTGACTCTGACTGGTGGCAACTCGAGTTAATCACTATGTCAATGAGCTTCCC
 CGTTTGCATCCAGAAAATTAAGGAGTTGGACCAGATAATTTGCCATTCTGCTCAAAAAAATATCTCATTCCAGGAAAAAAGAATAAACAAAGAGA
 AAAGAAATGGAAAAAGAGAGAGAACACAGGAAGGTTAAGGACCAAGAACTTTTCTGAGACAAACTTTTGCCTTTCTGTTGATGTTCCATTTCTTCT
 TCCCTTCTTCTTTGGTCCCTAAGTCTATTTCCCTCATTACTTGGCGTTTAGTCCATTCCTGCTTACCCTTTTGCCTAATAAGCATTCTTTCTAGAAC
 CCTCAGTTTCACTGCTGTTCTTCACTGACTTCTGTGATGTTTACCAGGATGAAATAGAACTGAATTTATTTGTGAAATAATATTGACTTTACTTAT
 CTGTTTTTATAGCAGAGTAAATATTGTTAGTTGTAGCTAGCAGCTCACATTTTTAAAAAAGCATGCGTATCTCATCCATTTGTCCATAATGTGAC
 CTAGCCGTATTTTAGTCTTAAATTCAGCCATTATAAATCACATAATGAAAACACATTATGAAAACAGGCACCTTAGACAGTTTTCTGAATAGCC
 GTCCCCAGTTGTGCTCTCCAGCTTCTTTTCTCATGAGTCTCACAGTAGCAGAGGAAGCATGTATGGATGTATAAATCTGTTTGTGTAACGTATT
 GTTTTAACTAGTGAAACGGTTTTCAACTCTTAAATAATCATAAGACCAAGTTAGTGGCTTTGTCCGTGCTTTTGTCTTCTTGTCTATCAGTGACG
 TAAGAACTAAAACCTGTTTTTCAATTGTTGAATGAATATTATATATTTAGTAAGCTTTTTCATATGTTATTTAATTCGTATTATTTTCGTATATTTG
 TATTAATACACCTAATAATTAAGTGTCAACCCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATACACCTAATAATTAAGTGTCAACCCCAAAAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Figura 25. Seqüència completa del CD200 porcí. En fons negre es marca el codó d'inici i el codó de stop.

1.boví 2.humà 3.murí 4.porcí

1. ATGCAGTGTCTGGTGTTCAGAAGGCTCGTCTGTCATCTATCTACCTTCCAAGTATTGGTTCTTGGCACCCTGATCTT
 2. ATGGAGAGGCTGGTGATCAGGATGCCCTTCTCTCATCTGTCTACCTACAGCCTGGTTTGGGTCATGGCAGCAGTGGTGTCT
 3. ATGGGAGTCTGGTATTTCAGGAGACCTTCTGCCATCTCTCCACTACAGCCTGATTTGGGGCATGGCAGCAGTAGCGCT
 4. ATGGAGAGACTGGTGTTCAGGAGCTTCTTCTGCCATCTCTTACCTTCCAAGTATTGGTTTATGCGCAGCAGGGATGCT
 *** * ***** ***** * *** ***** * ***** * *** ***** ***** ***** *

1. ATGCAGGGCACAA-----GTGGTGACCCAGGATGTAAGAGGGCTGCTGAACACACCTGCTTCTTTAAGATGCTCTCTGA
 2. GTGCACAGCACAAAGTGAAGTGGTGACCCAGGATGAAAGAGAGCAGCTGTACACACCTGCTTCTTTAAATGCTCTCTGC
 3. GAGCACAGCTCAAGTGAAGTGGTGACCCAGGATGAAAGAAAGGCGCTGCACACAACCTGCATCTTACGATGTTCTCTAA
 4. GTGCAGGGCACAA-----GTGGTGACCCAAGATGTAAGAGAGCGGCTGAACACACCTGCTTCTTTAAGATGCTCTCTGC
 *** ** *** ***** ***** ***** ***** ***** ***** * * * *****

1. AAAATCCCAGGAAGTTTTGATTGTGACATGGCAAAAAATCAAGGCTGTAAGCCAGAAAACATGATCACCTACAGCGAG
 2. AAAATGCCAGGAAGCCCTCATTTGTGACATGGCAGAAAAAGAAAGCTGTAAGCCAGAAAACATGGTCACTTACAGCGAG
 3. AAACATCCCAGGAACCTTTGATTGTGACATGGCAGAAAAAGAAAGCCGTGAGCCAGAAAACATGGTCACTACAGCAAA
 4. AAAATCCCAGGAAGTTTTGATTGTGACATGGCAAAAAATCAAGGCTGTAAGCCAGAAAACATGATCACCTTACAGCAAG
 *** ***** * ***** ***** ***** * * * ***** ***** ***** *

1. AACCCAGGGGTTGTAGTCCAGCCTGCCTACAAGGACAAGATAAACATCACCCAGCTGGGACTCATGAACCAACCATTAC
 2. AACCATGGGGTGGTGATCCAGCCTGCCTATAAGGACAAGATAAACATTACCCAGCTGGGACTCCAAAACCAACCATTAC
 3. ACCCATGGGGTTGTAATCCAGCCTGCCTACAAGACAGGATAAATGTACAGAGCTGGGACTCTGGAACCAAGCATCAC
 4. AACCATGGGGTGTAGTTACAGCCTGCCTATAAGGACAAGATAAACATCACCCAGCTGGGACTCATGAACCAACCATTAC
 * *** ***** * * ***** * * ***** * * ***** * * ***** * * ***** * *

```

1. CTTCTGGAATACCACCTTGGAAGATGAGGCGTGTACAAAGTGCCCTCTTAATACCTTTGGTTCTGGAAGATCTCAGGAA
2. CTTCTGGAATATCACCCCTGGAGGATGAAGGGTGTACATGTGTCTCTTCAATACCTTTGGTTTTGGGAAGATCTCAGGAA
3. CTTCTGGAACACAACATTGGAAGATGAGGGCTGCTACATGTGTCTCTTCAACACGTTTGGTTCTCAGAAGGTCTCAGGAA
4. CTTCTGGAATACCACCTTGGAAGATGAGGGTGTGTACAAAGTGCCCTCTTCAATACCTTTGGTGCCGGGAAGATCTCAGGAA
   ***** * ** **** ***** * ** **** * * ***** ** *****

1. TAGCCTGCCTCACTCTCTTTGTACAGCCACAGTATTCCCTTCACTATAAACTATCTGAAGATCACCTAAATATCACTTGC
2. CGGCCTGCCTCACCGTCTATGTACAGCCCATAGTATCCCTTCACTACAAATTCCTCTGAAGACCACCTAAATATCACTTGC
3. CAGCTTGCCTTACCCTCTATGTACAGCCCATAGTACACCTTCACTACAACTATTTGGAAGACCACCTAAACATCACTTGC
4. TAGCCTGCCTCACCGTCTCTGTACAGCCACAGTATCCCTTCACTATAAAATTAATCTGAAGACCACTAAATATCACTTGC
   ** ***** * ** ***** ***** * * ***** * ** ***** *****

1. TCTGCCAATGCTCGCCAGCCCCTATGATCTCTGGAAGGTCCTTTGGGTCAGGATTGAGAACAGTACCAGAGATCGTGTG
2. TCTGCCACTGCCCGCCAGCCCCATGGTCTTCTGGAAGGTCCTCGGTCAGGATTGAAAATAGTACAGTGACTCTGTG
3. TCTGCGACTGCCGTCAGCCCCTGCCATCTCTGGAAGGTCCTGAGACAGGAATTGAGAATAGTACCAGAGTCACTT
4. TCTGCCAATGCTCGCCAGCCCCTATGATCTCTGGAAGATATCTGGGTCAGGATTGAGAACAGTACTGAGATTTCTCGT
   ***** * ** ** ***** ** ***** * ** ***** ** ***** * **

1. ACACCCCAATGGAAACAACATCTGTCCAGCATCCTCCAGATCAAAGACCCCAAGACACAGGTGGGGAAGGATGTGATCT
2. TCACCCCAATGGGACCAGCTGTGTTACCAGCATCCTCCATATCAAAGACCCCTAAGAATCAGGTGGGGAAGGAGGTGATCT
3. CCATTCAAATGGGACTACATCTGTCCAGCATCCTCCGGTCAAAGACCCCAAACTCAAGTTGGGAAGGAAGTGTGATCT
4. ACACCCCAATGGGACAACGTCGTCCAGCATCCTCCAGATCAAAGACCCCAAGGTCAGGTGGGGAAGGAGGTGATCT
   ** * ***** ** * ***** ***** ***** ***** * * ** * ***** *****

1. GCCAGGTGCTACACCTGGGACTGTGACCGACTACAGGAAACTGTGAACAAAGGCTTTTGGTTTTCAGTTCCACTGTTG
2. GCCAGGTGCTGCACCTGGGACTGTGACCGACTTTAAGCAAACCGTCAAACAAAGGCTATTGGTTTTCAGTTCGGCTATTG
3. GCCAGGTTTTATACCTGGGAAATGTGATTGACTACAAGCAGAGTCTGGACAAAGGATTTTGGTTTTCAGTTCCTACTGTTG
4. GCCAGGTGCTGCACCTGGGACTGTGACTGACTACAGGAAACTGTGAACAAAGGCTTTTGGTTTTCAGTTCCTACTGTTG
   ***** * ***** ***** ***** * * * * * ***** * ***** ***** ** **

1. TTAAGCATCGTCTCCTTGGTAATTCCTTCTGGTCTTAATCTCAATCTTACTCTACTGGAACGTCATCGGAACCAAGATCG
2. CTAAGCATTTGTTCCCTGGTAATTCCTTCTCGTCTAATCTCAATCTTACTGTACTGGAACGTCACCGGAATCAGGACCG
3. CTAAGCATTTGTTCTCTGGTAATTCCTTCTGATCTTGATCTCCATCTTACTATACTGGAACGTCACCGGAATCAGGAGCG
4. TTAAGTATCGTTTCTCTGGTATTCTTCTGGTCTTAATCTCAATCTTACTATACTGGAACGTCGTCGAACCAAGACCG
   **** * * ** * ** ***** ** * ***** ** ***** ***** ***** ** * * * *

1. AG---A-----GCCCTAG
2. AG---A-----GCCCTAA
3. GGGTGAATCATCACAGGGATGCAAAGATGAAATAA
4. AG---A-----GCCCTAG
   * * * * *

```

Figura 26. Comparació de les seqüències nucleotídiques del CD200 de diferents espècies.

També vam comparar la seqüència aminoacídica del pCD200 amb la d'altres espècies d'interès (figura 27 i taula 3). Mitjançant una anàlisi bioinformàtica es van identificar i determinar els dos dominis IgSF, la regió transmembrana i la curta porció citosòlica. El pèptid senyal està localitzat entre l'aminoàcid 1 i el 30 amb una probabilitat del 77% segons l'anàlisi realitzat. La proteïna pCD200 té una identitat del 90% amb la bovina, un 82% amb la humana i d'un 74% amb la murina. A més a més, vam determinar dos possibles llocs de N-glicosilació, localitzats en els aminoàcids 101 (NSTI) i 179 (NSTE) que semblen coincidents amb les altres espècies comparades. També vam trobar nombrosos llocs de O-glicosilació, però cap d'ells estava situat a la regió que correspon a l'exó 4.

Estudi de les vies del TNF/TNFR2 i del CD200/CD200R en el rebuig xenogènic



- * Els aminoàcids de la columna són idèntics en totes les seqüències alineades.
- : Substitucions conservades d'aminoàcids entre les diferents seqüències.
- . Substitucions semiconservades d'aminoàcids entre les seqüències analitzades.
- L'absència de símbol indica un canvi d'aminoàcid no conservat.

Figura 27. Comparació de les seqüències aminoacídiques del CD200 de diverses espècies. Els dominis IgSF estan marcats en gris i la regió transmembrana s'assenyala amb un requadre negre. Els llocs potencials de N-glicosilació estan marcats amb una fletxa.

Taula 3. Taula resum de les característiques de la seqüència aminoacídica de la regió codificant del CD200 de diferents espècies.

	Nº Aminoàcids	Pes Molecular (kDa)	Punt isoelèctric
pCD200	267	30,052	9.03
hCD200	269	30,331	8.63
mCD200	278	31,270	9.02

3.3.1.2 Amplificació dels cDNA i anàlisi bioinformàtica del CD200R porcí.

A partir de cDNA de monòcits porcins i mitjançant una PCR clàssica amb encebadors degenerats (basats en altres receptors del CD200 ja descrits), es va obtenir el cDNA de la part corresponent a la regió codificant de tres isoformes encara no descrites del receptor del CD200 porcí (pCD200R). Es van obtenir múltiples clons per cadascuna d'elles, a partir dels quals es va deduir una seqüència consens (figura 28). Per identificar-les, vam decidir utilitzar una nomenclatura concordant amb la utilitzada amb els receptors humans. El pCD200Ra, deduït d'una regió codificant de 1089 parells de bases, té 362 aminoàcids (pèptid senyal inclòs), conté una regió transmembrana i una cua citosòlica de 68 aminoàcids. El pCD200Rb, provinent d'una seqüència codificant de 795 parells de bases per un codó de *stop* primerenc, té 264 aminoàcids (pèptid senyal inclòs), genera una proteïna sense regió transmembrana i per tant és una isoforma soluble. El pCD200Rc, codificat per 786 parells de bases degut a un codó de *stop* primerenc, genera inicialment una proteïna de 261 aminoàcids (pèptid senyal inclòs) i conseqüentment correspon a una segona variant soluble (figura 28). Aquestes dues isoformes estan generades probablement per *splicing* alternatiu, ja que on es produeix la variació de seqüència dels receptors porcins coincideix amb un canvi d'exó en la seqüència humana. El pCD200Ra té una homologia del 84% amb la seqüència nucleotídica bovina, un 74% amb la seqüència bovina i un 61% amb la murina.

pCD200Ra

B. pCD200Rb

C. pCD200Rc

```

A. ATGCCCTGCACTTGGATAACTTCTGATCTTCAGCTACTACTGAGTTTGACTCTCTTCTTAGTTGCTGGACGTTCAAGTGC
B. ATGCCCTGCACTTGGATAACTTCTGATCTTCAGCTACTACTGAGTTTGACTCTCTTCTTAGTTGCTGGACGTTCAAGTGC
C. ATGCCCTGCACTTGGATAACTTCTGATCTTCAGCTACTACTGAGTTTGACTCTCTTCTTAGTTGCTGGACGTTCAAGTGC
*****

A. AGGAACGGAAGGTCCTTTTACATCAAACAACCTCAATAATGCCACAGATTCACCAGGACAAATACAGTTTGGCTTCAACAA
B. AGGAACGGAAGGTCCTTTTACATCAAACAACCTCAATAATGCCACAGATTCACCAGGACAAATACAGTTTGGCTTCAACAA
C. AGGAACGGAAGGTCCTTTTACATCAAACAACCTCAATAATGCCACAGATTCACCAGGACAAATACAGTTTGGCTTCAACAA
*****

A. TTACTTCATCTACATACAGAAAACAGAGCACTGTAACACCTCTTGCGGAAGTTAATATTTCACTACCTGTACTGGTGGAT
B. TTACTTCATCTACATACAGAAAACAGAGCACTGTAACACCTCTTGCGGAAGTTAATATTTCACTACCTGTACTGGTGGAT
C. TTACTTCATCTACATACAGAAAACAGAGCACTGTAACACCTCTTGCGGAAGTTAATATTTCACTACCTGTACTGGTGGAT
*****

A. ACAACGGCTGAGCTCTATTGCCCTCCTGTGCTGTGGACAACCTGTGGTGGTAGCAACATGGGAAATAGTCCTCAGAGACAA
B. ACAACGGCTGAGCTCTATTGCCCTCCTGTGCTGTGGACAACCTGTGGTGGTAGCAACATGGGAAATAGTCCTCAGAGACAA
C. ACAACGGCTGAGCTCTATTGCCCTCCTGTGCTGTGGACAACCTGTGGTGGTAGCAACATGGGAAATAGTCCTCAGAGACAA
*****

```


Estudi de les vies del TNF/TNFR2 i del CD200/CD200R en el rebuig xenogènic

```

A. GGCCCCCTGCTTCAGAGCCTACAGGGCTGATACAAATGAGACCACATCAGGAACTGTACTGATGAGAGAATAATCTGGT
B. GGCCCCCTGCTTCAGAGCCTACAGGGCTGATACAAATGAGACCACATCAGGAACTGTACTGATGAGAGAATAATCTGGT
C. GGCCCCCTGCTTCAGAGCCTACAGGGCTGATACAAATGAGACCACATCAGGAACTGTACTGATGAGAGAATAATCTGGT
*****

A. CCTCCAGACTTGACCAGAATCCTGCCCTTCAGATTGGTCCAGTGGCCATCACTCATGATGGGTATTACAGGTGTCAAAAAG
B. CCTCCAGACTTGACCAGAATCCTGCCCTTCAGATTGGTCCAGTGGCCATCACTCATGATGGGTATTACAGGTGTCAAAAAG
C. CCTCCAGACTTGACCAGAATCCTGCCCTTCAGATTGGTCCAGTGGCCATCACTCATGATGGGTATTACAGGTGTCAAAAAG
*****

A. GTAGCACCAAATGGGAATTTCCATCGTGGCTATCACCTCCAAGTATTAGTACCCCTGAGGTGACCCTGGTTCAAAGCGA
B. GTAGCACCAAATGGGAATTTCCATCGTGGCTATCACCTCCAAGTATTAGTACCCCTGAGGTGACCCTGGTTCAAAGCGA
C. GTAGCACCAAATGGGAATTTCCATCGTGGCTATCACCTCCAAGTATTAGTACCCCTGAGGTGACCCTGGTTCAAAGCGA
*****

A. GAATGGAACTGTGGTGTGCAAGGCGGTGCGAGGGAAGCCGGCTGCTCAGATTTCTGGACCCCTGAGGGGGACTGTGTCA
B. GAATGGAACTGTGGTGTGCAAGGCGGTGCGAGGGAAGCCGGCTGCTCAGATTTCTGGACCCCTGAGGGGGACTGTGTCA
C. GAATGGAACTGTGGTGTGCAAGGCGGTGCGAGGGAAGCCGGCTGCTCAGATTTCTGGACCCCTGAGGGGGACTGTGTCA
*****

A. CTGAGCAAAACCTCACGGGGCAATGGCACAGTGACTGTCTGGAGTATGTGCTACTGGAAGGCCCGTCATGTACCTAAT
B. CTGAGCAAAACCTCACGGGGCAATGGCACAGTGACTGTCTGGAGTATGTGCTACTGGAAGGCCCGTCATGTACCTAAT
C. CTGAGCAAAACCTCACGGGGCAATGGCACAGTGACTGTCTGGAGTATGTGCTACTGGAAGGCCCGTCATGTACCTAAT
*****

A. GTGTCCTGCACTGTCTCCACGTGACTGGCAACAAGAGTCTCTTCTTAGAGCTGAATCAAGTTGATAATTACAAAAGAAT
B. GTGTCCTGCACTGTCTCCACGTGACTGGCAACAAGAGTCTCTTCTTAGAGCTGAATCAAG-----
C. GTGTCCTGCACTGTCTCCACGTGACTGGCAACAAGAGTCTCTTCTTAGAGCTGAATCAAG-----
*****

A. GTAAGTAAAGAAATTTATATATATCATCCCTCCTATTTTTATTATCTGGTCATCGTGGGATCCATTGGCTTTTGAAAATCC
B. -----
C. -----

A. TTGGCTGCAGAAAATGTAAATTGAAAAAACAGAACCTACTCCAGTTGTCGAGGAGGATGAAATGCAGCCCTATGCCAGC
B. -----AAATGTAAATTGAAAAAAACAGAACCTACTCCAGTTGTCGAGGAGGATGAAATGCAGCCCTATGCCAGC
C. -----GATGAAATGCAGCCCTATGCCAGC
*****

A. TACACGGAGAAGAATAATCCACTTTACGATACCACAAACAGAGTGAAGACATCTCAGGTGTTAAATGAAGTTGATGGGAT
B. TACACGGAGAAGAATAATCCACTTTACGATACCACAAACAGAGTGAAGACATCTCAGGTGTTAAATGAAGTTGATGGGAT
C. TACACGGAGAAGAATAATCCACTTTACGATACCACAAACAGAGTGAAGACATCTCAGGTGTTAAATGAAGTTGATGGGAT
*****

A. AAATCTCATACTATATATGTTTTTGGCATCTCCACGAGGACAAATTGA
B. AAATCTCATACTATATATGTTTTTGGCATCTCCACGAGGACAAATGA
C. AAATCTCATACTATATATGTTTTTGGCATCTCCACGAGGACAAATGA
*****

```

Figura 28. Seqüència nucleotídica de les tres isoformes del receptor porcí del CD200. Amb fons negre es marca el codó de stop de cada isoforma.

L'anàlisi bioinformàtica ens va permetre caracteritzar i comparar la seqüència aminoacídica del pCD200R amb el d'altres espècies (figura 29 i taula 4). A més a més, es va determinar la presència dels dominis tipus IgSF (en les tres isoformes), la regió transmembrana i la citosòlica (més extensa que en el CD200)(figura 29). També vam comprovar que el motiu NPXY, essencial per l'activitat de senyalització del receptor, està conservat dins la regió citosòlica (ombrejat en gris clar). S'han identificat prèviament en el receptor humà (hCD200R) un mínim de sis aminoàcids claus per la

unió amb el hCD200 (detallats en la introducció). Hem determinat que tres d'ells estan presents en el receptor porcí i tres més no ho estan (fletxes)(figura 29). Cal esmentar que les isoformes solubles del pCD200R conservaven sencer el domini extracel·lular i per tant entenem que la seva capacitat d'unió a lligand està preservada.

```

hCD200: humà    mCD200: murí    pCD200: porcí
hCD200R      MLCPWRTANLGLLLILTIFLVAEA-----EGAAQPNNLSMLQTSKENHALASSSLCMDEK
mCD200R      MFCFWRTSALAVLLIWGVFV-AGS-----SCTDKN
pCD200R      MPCPWITSDLQLLLSLTLFLVAGRSSAGTEGPFSTNNSIMPQIHQDKYSLASTIT--SST
* * * * : * : ** : * : *
          ▼          ▼ ▼ ▼ ▼
hCD200R      QITQN-YSKVLAEVNTSWPKMATNAVLCCPPIALRNLIITWEIILRGQPSCTKAYKKE
mCD200R      QTTQNNSSPLTQVNTTVSVQIGTKALLCCFSIPLTKAVLITWIKLRGLPSCITAYKVD
pCD200R      YRKQS-TVTPLAEVNISLPVLVDTTAELCYCPPVLWTTVVVATWEIVLRDKAPCFRAYRAD
* . . . * : * : * : * . * : * * * * . : . : * * * * * . * * * :
          ▼
hCD200R      TNETKETNCTDERITWVSRPDQNSDLQIRTVAITHDGYRCIMVTPDGNFHRGYHLQVLV
mCD200R      T-KTNETSCLGRNITWASTPDHSPQLISAVTLQHEGYTCETVTPEGNFEKNYDLQVLV
pCD200R      TNETTSGNCTDERI IWSSRLDQNPALQIGPVAITHDGYYRCQKVAPNGNFRHGYHLQVLV
* : * . . * . . . * * * * * : * * * * * * * * * : * * * * * . : * * * * *
TPEVTLFQNRNR TAVCKAVAGKPAAHISWIPEGDCATKQEFW-SNGTIVTKSTCHWEVHN
mCD200R      PPEVTYFPEKNRSVAVCEAMAGKPAAQISWSPDGDCVTTSESH-SNGTIVTRSTCHWEQNN
pCD200R      PPEVTLVQSENGTVVCKAVAGKPAAQISWTPEGDCVTEQNPHGNGTVTVWMCYWKARH
* * * * . . . * : * * : * * * * * * * * * * * * * * * : * * * * * . :
VSTVTCHVSHLTGNKSLYLELLPVPGAKKSAKLYIPYIILTI-IILTIVGFIWLLKVNCG
mCD200R      VSDVSCIVSHLTGNQSLSELSRGGN--QSLRPYIPYIIPSI-IILIIIGCICLLKISGF
pCD200R      VPNVSVCTVSHVTGNKSLFLELNQVDN-YKRMYLEILYIIPPIFIIIVIVGSIWLLKILGC
* . * : * * * * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
RKYKLNKTESTPVVEEDEMOPYASYTEKNNPLYDTTNKVKASEALQSEVD-TDLHT----
mCD200R      RKCKLPKLEATSIAIEEDEMOPYASYTEKSNPLYDVTVKVEAFPVSQGEVNGTDCLTLSAI
pCD200R      RKCKLKKTEPTPVVEEDEMOPYASYTEKNNPLYDTNTRVKTSQVLN-EVDGINLHTIYVF
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
hCD200R      -----L
mCD200R      G-----I
pCD200R      GISHEDK ENVN G

```

- * Els aminoàcids de la columna són idèntics en totes les seqüències aliniades.
- : Substitucions conservades d'aminoàcids entre les diferents seqüències.
- . Substitucions semiconservades d'aminoàcids entre les seqüències analitzades.
- L'absència de símbol indica un canvi d'aminoàcid no conservat.

Figura 29. Comparació de les seqüències aminoacídiques del CD200R de diferents espècies. El pèptid senyal està marcat en negreta. Els dominis IgSF estan marcats en gris i la transmembrana s'assenyala amb un requadre negre. El motiu senyalitzador intracel·lular NPLY està marcat en gris clar. La part delecionada en els pCD200R b i c està subratllada amb una línia continua. Els 4 aminoàcids restants que es generen a la isoforma b després de la delecio estan marcats amb una línia discontinua. El doble subratllat correspon a l'aminoàcid que es genera a la isoforma c després de la delecio.

Taula 4. Taula resum de les característiques de la seqüència aminoacídica de la regió codificant del CD200R de diferents espècies.

	Nº Aminoàcids totals	Pes Molecular (kDa)	Punt isoelectric
pCD200Ra	362	40,389	6,75
pCD200Rb	264	28,965	6,15
pCD200Rc	261	28,582	6,37
hCD200Ra	348	39,040	7,35
mCD200R	326	35,504	5,44

3.3.2 Determinació de l'expressió de mRNA del pCD200.

Per tal de quantificar el nivell d'expressió de la molècula CD200 porcina en diferents teixits i cèl·lules es va utilitzar la tècnica de RT-PCR a temps real. Es va usar el mateix mètode que en el cas del pTNFR2, sondes TaqMan i encebadors que van ser dissenyats específicament per amplificar només el pCD200 (figura 30A). També es van normalitzar els resultats envers els nivells en múscul. L'expressió total del pCD200 variava segons el teixit analitzat, però es va detectar en tots els teixits. El pulmó era el teixit que presentava els nivells més elevats, quasi el triple dels nivells detectats a cervell, intestí prim i melsa. En comparació, el cor i el fetge expressaven una mica menys que els altres. Respecte als diferents tipus cel·lulars, els limfòcits L35 i els aïllats de sang perifèrica van mostrar els nivells més alts. Els nivells en cèl·lules endotelials d'aorta PAEC i condrocits costals (PCC) foren baixos, però detectables (figura 30B). Els monòcits presentaven els nivells més baixos de tots els testats.

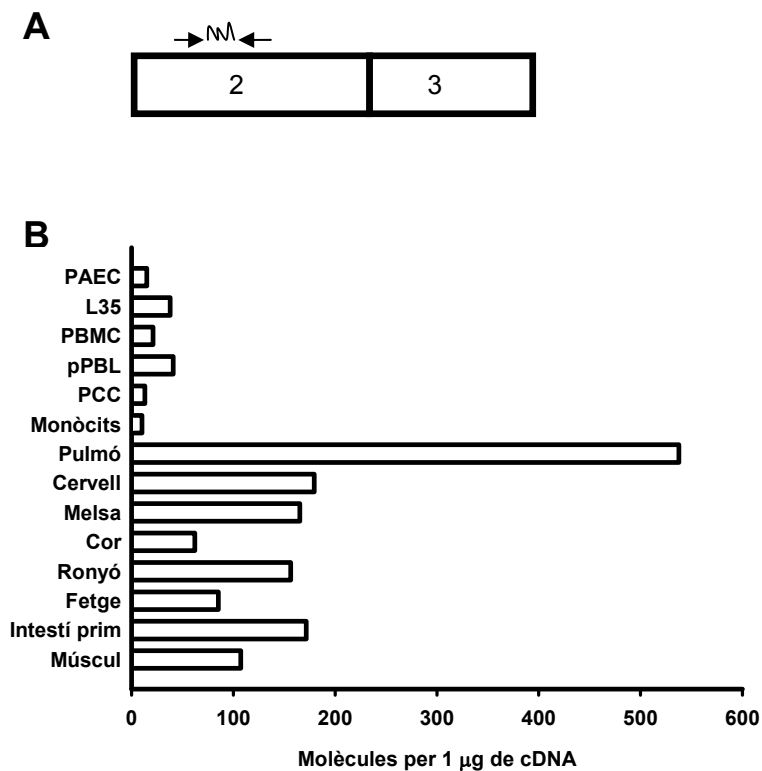


Figura 30. Determinació de l'expressió del mRNA del CD200 en cèl·lules i teixits. A) Esquema de la localització dels encebadors (→ ←) i la sonda Taqman (M) en l'exó 2 del pCD200. B) Anàlisi del producte d'amplificació. Les barres blanques representen el número de molècules del mRNA de pCD200 per 1 µg de cDNA de cada teixit.

3.3.3 Generació de reactius per detectar les molècules porcines.

Un cop amplificades, clonades i analitzades les molècules corresponents al pCD200 i les isoformes del seu receptor, el proper pas va ser produir reactius per la seva detecció. Inicialment, es va avaluar si els reactius comercials contra les molècules humanes eren capaços de reconèixer també la molècula porcina. Amb aquest objectiu, es van infectar cèl·lules mamíferes amb retrovirus generats amb el vector pLXSN sol o que contenien el hCD200 o el pCD200.

Els resultats analitzats per citometria de flux mostren com el millor anticòs dels testats per detectar el CD200 humà és l'anticòs anti-hCD200 OX-104 (BD) (figura 31). A més, cap dels anticòs comercials per la detecció del CD200 humà o de rata és capaç de reconèixer la molècula porcina (figura 31).

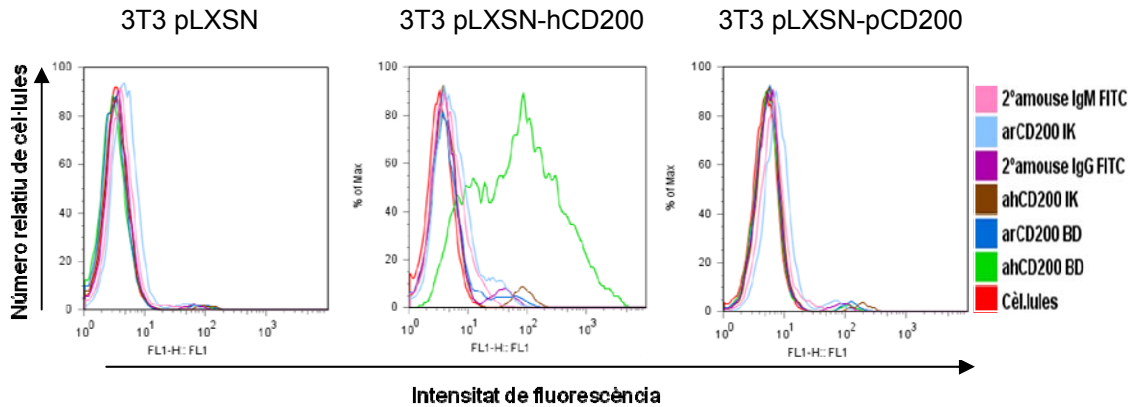


Figura 31. Mesura de l'expressió de hCD200 i pCD200 en cèl·lules NIH3T3 infectades amb retrovirus generats per pLXSN sol o amb els inserts indicats. Es comparen per citometria de flux els anticossos anti-CD200 humà (ahCD200) o de rata (arCD200) de dues cases comercials (IK i BD).

A continuació es va extreure RNA de les cèl·lules NIH3T3 infectades amb pLXSN-pCD200 per verificar que la molècula porcina s'estava expressant. Es va obtenir el cDNA mitjançant una retrotranscripció i es va realitzar una PCR convencional amb encebadors específics per la molècula del pCD200 (figura 32). Els resultats mostren un única banda al voltant dels 800 parells de bases, que és exactament la mida esperada.



Figura 32. Mesura de l'expressió de pCD200 en cèl·lules NIH3T3 infectades amb retrovirus que contenen aquest insert. Es mostra l'amplificació específica per RT-PCR del pCD200 a partir de RNA extret de les cèl·lules murines infectades amb pLXSN-pCD200 o pLXSN sol. S'inclouen el control de β-actina (carril 4) i el de reactius (carril 5).

Es va realitzar un últim experiment per verificar que els anticossos comercials contra el hCD200 i el seu receptor no reconeixien les molècules porcines en condicions desnaturalitzants. Amb aquest objectiu, es van produir proteïnes recombinants que contenien la part extracel·lular del CD200 o CD200R de diverses espècies fusionada amb la molècula glutatió S-transferasa (GST) a l'extrem N-terminal. Mitjançant la tècnica de *Western Blot* (SDS-PAGE desnaturalitzant) es va comprovar que els anticossos comercials no tenien una reactivitat creuada amb les molècules porcines en aquestes condicions (figura 33). Tampoc es detectava el mCD200.

Un cop confirmat que els reactius comercials testats no reconeixien les molècules porcines del CD200 i el CD200R, es va procedir a generar anticossos específics seguint dos mètodes diferents. Per un costat, es va optar per la generació d'anticossos policlonals de conill del tipus antipeptid a través d'un servei extern. Amb aquest fi, vam dissenyar una seqüència peptídica que complís una sèrie de requisits (estar localitzada en la superfície i en un lloc flexible com un *loop*, i que fóra una seqüència complicada i única). El servei només va obtenir amb èxit l'antipeptid anti-pCD200 i no ens va proporcionar l'anti-pCD200R. També es van generar anticossos policlonals mitjançant la injecció en conills de les proteïnes recombinants purificades pCD200-GST i pCD200R-GST per l'obtenció d'antisèrum. Es van utilitzar dos conills per a cada preparació. Un cop obtinguts tots aquests reactius, es van testar sobre un *Western Blot* que contenia les proteïnes recombinants purificades. Tots els anticossos generats, els antipeptid i els antisèrums obtinguts al laboratori, eren capaços de detectar les proteïnes porcines recombinants mitjançant la tècnica de *Western Blot* (figura 34).

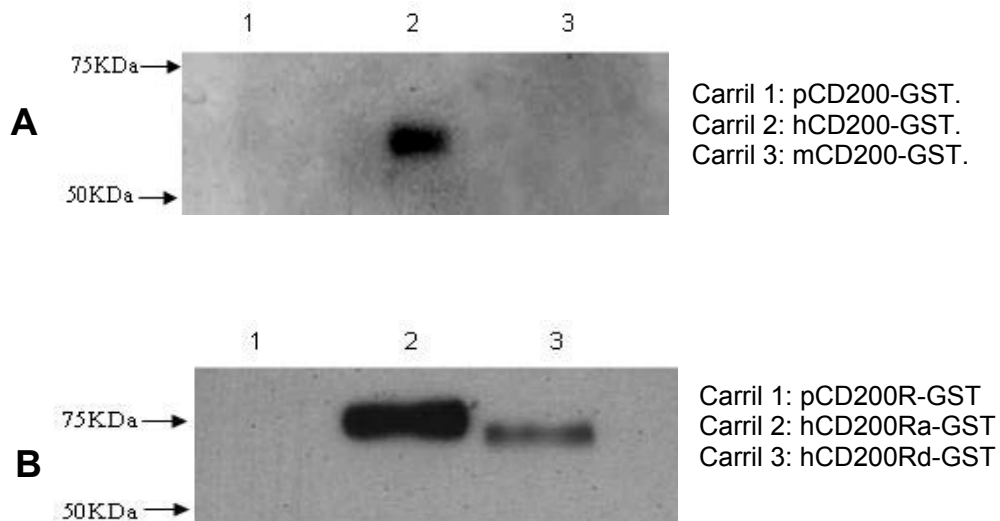


Figura 33. Detecció per *Western Blot* de molècules porcines amb els anticossos comercials de CD200. A) Molècules amb la porció extracel·lular del CD200 incubades amb l'anticòs anti-hCD200 (clon OX-104). B) Molècules CD200R incubades amb l'anticòs anti-hCD200R (clon OX-108).



Figura 34. Anàlisi dels anticossos produïts per detectar el pCD200 mitjançant la tècnica de *Western Blot*. Es van testar els dos reactius obtinguts per cada metodologia, els antipeptid EZA i b, i antisèrums AS1 i 2.

El proper pas fou detectar la proteïna a la superfície cel·lular. Primer, es van analitzar per citometria de flux les cèl·lules d'origen murí que expressaven el pCD200 (figura 35). Els resultats ens mostren com efectivament els antisèrums de conill generats al nostre laboratori eren capaços de detectar l'expressió de pCD200 (figura 35A). En canvi, els anticossos antipeptid donaven comparativament menys senyal (figura 35B).

També es van expressar de forma recombinant el pCD200 i el seu receptor en línies cel·lulars d'altres espècies, com les 293-EBNA d'origen humà i les CHO procedents de

hàmsster. En ambdues línies cel·lulars es van poder expressar amb èxit les molècules porcines ja que les vam detectar amb els antisèrums produïts per nosaltres (figura 36).

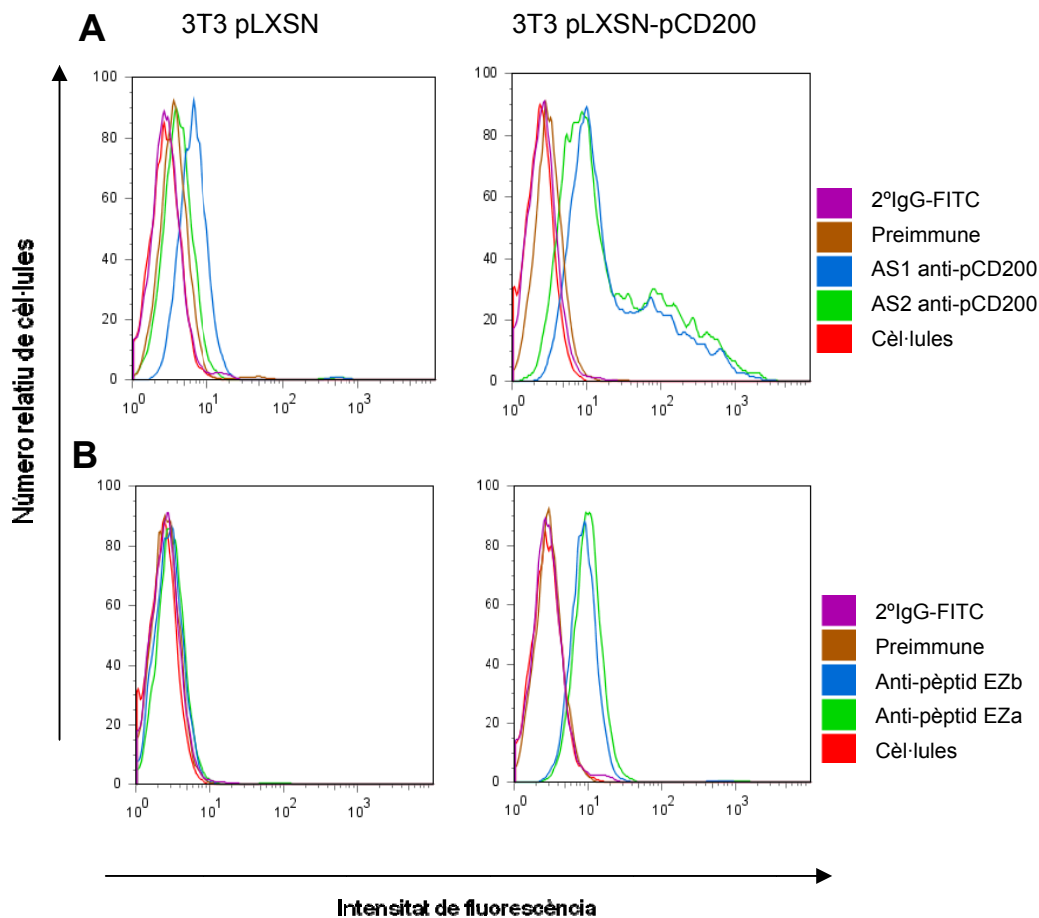


Figura 35. Determinació de l'expressió del pCD200 a NIH3T3 per citometria de flux. A) Detecció amb els anticossos policlonals de conill produïts al laboratori. B) Detecció amb els anticossos antipeptid.

Un cop vam comprovar que els reactius funcionaven, vam analitzar dues línies cel·lulars porcines, PAEC i condrocits costals que anomenem PCC. Ambdós tipus cel·lulars mostraven una lleugera expressió a superfície del pCD200 natiu, quasi negligible a les PAEC i més elevada als PCC (Figura 37).

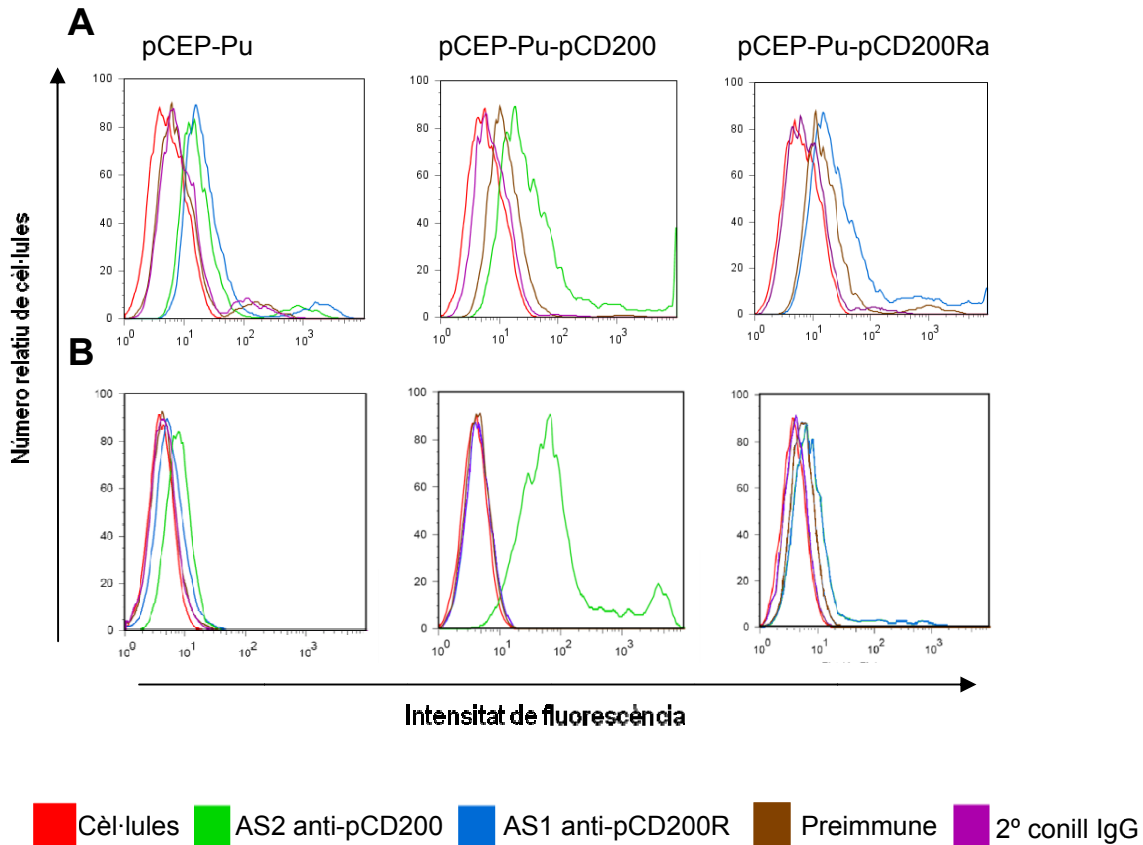


Figura 36. Determinació de l'expressió recombinant de pCD200 i CD200R per citometria de flux. Detecció a la superfície de cèl·lules CHO (A) o 293-EBNA (B) transfectades amb el vector d'expressió pCEP-Pu (buit com a control), pCEP-Pu-pCD200 o pCEP-Pu-pCD200R.

Posteriorment, es van infectar amb èxit els PCC per tal de sobreexpressar el pCD200 i expressar el hCD200 de forma recombinant (figura 38). El nivell d'expressió del pCD200 natiu es veia més baix als PCC control infectats, probablement pel procés de selecció amb antibiòtic, però era marcadament superior als que contenien el recombinant. El hCD200 també s'expressava amb bons nivells, tenint en compte que com en el cas del porcí recombinant no s'havien separat els clons cel·lulars supervivents a la selecció. A més, s'observava que l'antisèrum anti-pCD200 reaccionava parcialment amb hCD200.

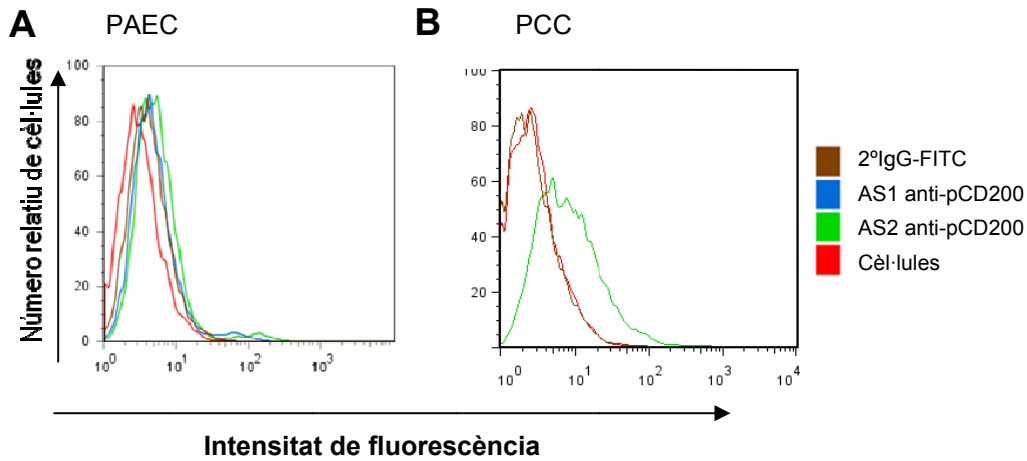


Figura 37. Determinació de l'expressió del pCD200 natiu per citometria de flux. Detecció en cèl·lules endotelials porcines PAEC (A) i en condrocits costals PCC (B).

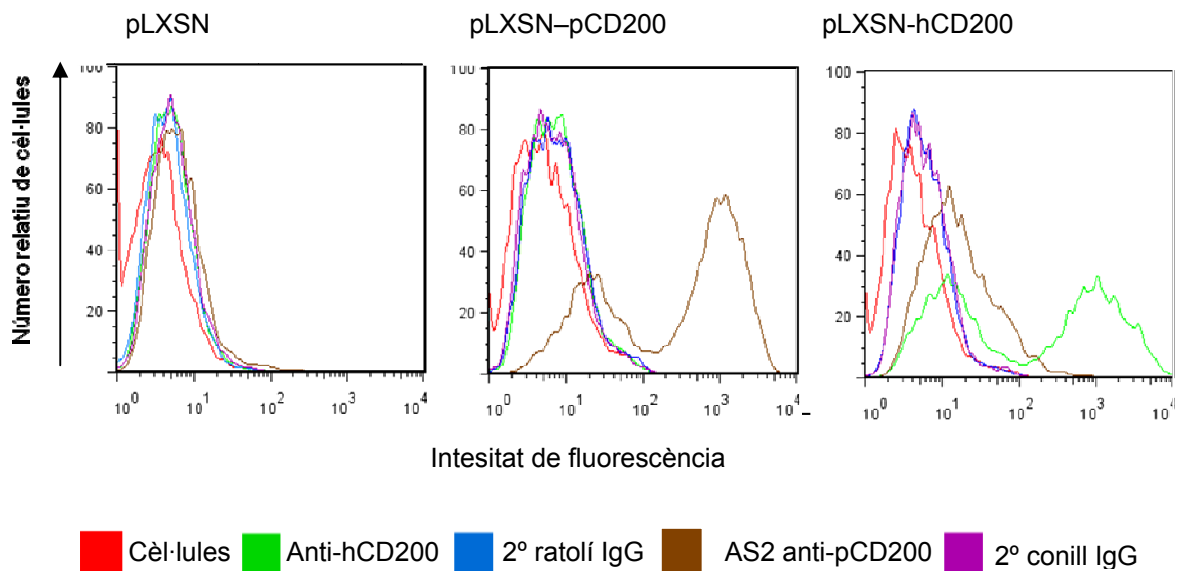


Figura 38. Mesura de l'expressió del CD200 porcí i humà mitjançant citometria de flux. Condrocits porcins infectats amb els retrovirus generats amb pLXSN (Control), pLXSN-pCD200 i pLXSN-hCD200.

Amb l'objectiu d'identificar una eina de treball per fer els assajos funcionals, també vam determinar l'expressió del hCD200R a la superfície cel·lular de les línies cel·lulars monoblàstiques U937 i Thp1 (Figura 39). Només les U937 mostraven una lleugera expressió.

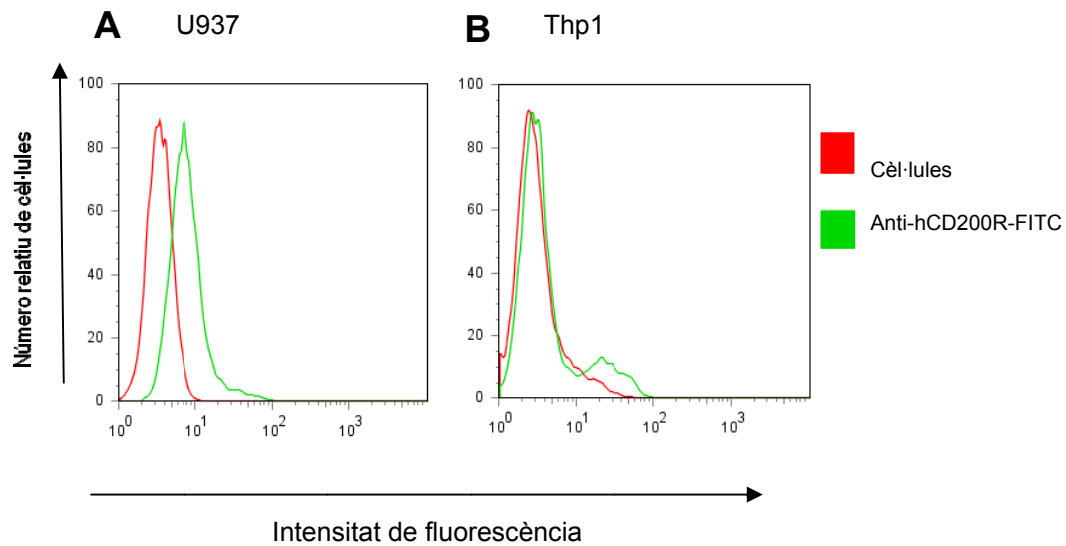


Figura 39. Determinació de l'expressió del hCD200R mitjançant citometria de flux a dues línies monoblàstiques humanes. A) U937. B) Thp1.

3.3.4 Estudi d'afinitat entre el CD200 i CD200R en el sistema xenogènic.

Es va utilitzar la tècnica de ressonància de plasmó de superfície (BIAcore T100) per tal de fer els estudis d'afinitat del pCD200 pel receptor humà i per comparar-ho amb les unions pròpies de cada espècie. La immobilització de les molècules al sensor CM5 es va fer a través d'unions covalents per les diferents molècules hCD200-GST, pCD200-GST i mCD200-GST (cadascuna d'elles immobilitzada a un canal diferent del xip). Per tant, els lligands estaven immobilitzats de forma no orientada. Els analits emprats en aquest assaig van ser les dues isoformes del receptor humà, hCD200Ra i hCD200Rd, i el pCD200Ra, que van ser passats en solució a múltiples concentracions.

Primer, vam comprovar que el hCD200-GST presentava una afinitat mitja que oscil·lava entre 10^{-7} i 10^{-8} M depenent del receptor amb el qual s'unia (figura 40 i taula 5). El receptor amb més afinitat pel hCD200-GST era la isoforma a del receptor humà. En canvi la isoforma d humana mostrava una afinitat lleugerament menor amb una associació més lenta i una dissociació més ràpida. La combinació del hCD200-GST

amb el pCD200R mostrava la velocitat de dissociació més elevada dels tres tipus d'interaccions (taula 5). Tanmateix, l'afinitat pel hCD200 era bastant semblant a la dels receptors humans.

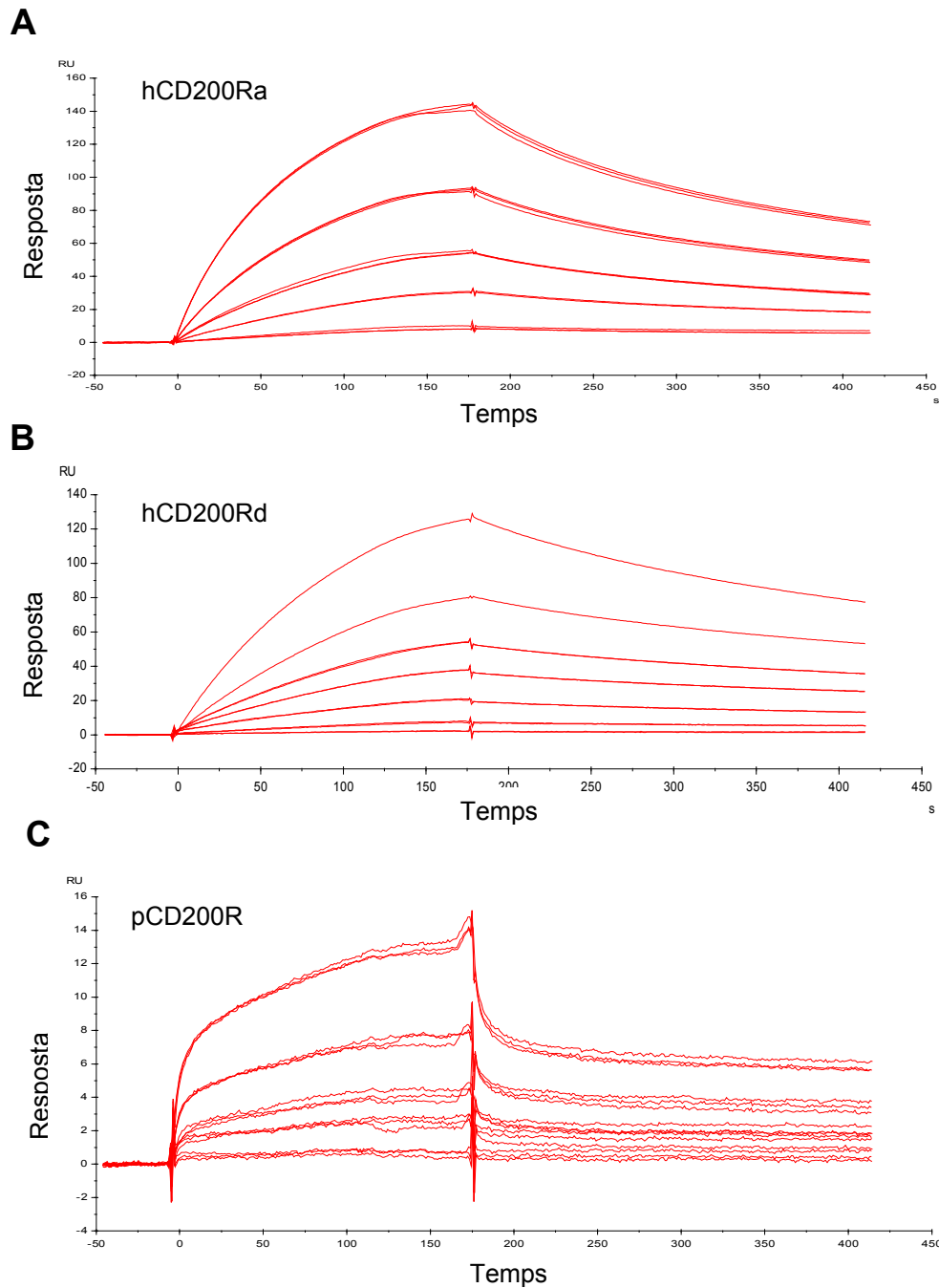


Figura 40. Anàlisi de les interaccions de la molècula hCD200-GST i els receptors humans i porcí per ressonància de plasmó. Sensogrames amb un temps d'injecció de l'analít de 180 segons i un període de dissociació de 240 segons. A) hCD200Ra. B) hCD200Rd. C) pCD200R.

Taula 5. Resum de les variables d'afinitat del lligand hCD200.

Analit	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Chi² (RU²)
hCD200Ra	3,43E+04	2,80E-03	8,17E-08	3,31
hCD200Rd	1,04E+04	1,86E-03	1,79E-07	5,89
pCD200Ra	2,03E+04	1,27E-03	6,31E-08	0,18

Ka constant d'associació, Kd constant de dissociació, KD constant d'afinitat, Chi² < 10 per donar validesa als resultats.

En la mateixa sèrie d'assajos es va testar l'afinitat del pCD200-GST enfront els mateixos receptors. Es va observar que l'afinitat del pCD200-GST estava en el mateix rang de 10^{-7} a 10^{-8} M pels CD200R (figura 41 i taula 6). Aquestes combinacions són de major interès de cara a les possibles repercussions en el rebuig xenogènic. El receptor amb més afinitat pel pCD200-GST va tornar a ser la isoforma a del receptor humà. Així, tant el receptor porcí com la isoforma d del receptor humà presentaven una afinitat una mica menor i comparable entre elles. Respecte a la cinètica, es va determinar que en la combinació xenogènica d'unió del pCD200-GST al hCD200Ra tenia la velocitat de dissociació més elevada dels tres tipus d'interaccions.

Taula 6. Taula resum de les variables d'afinitat del lligand pCD200.

Analit	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Chi² (RU²)
hCD200Ra	5,78E+04	3,57E-03	6,18E-08	1,18
hCD200Rd	2,32E+04	3,11E-03	1,34E-07	1,13
pCD200Ra	2,71E+04	2,97E-03	1,10E-07	0,21

Ka constant d'associació, Kd constant de dissociació, KD constant d'afinitat, Chi² < 10 per donar validesa als resultats.

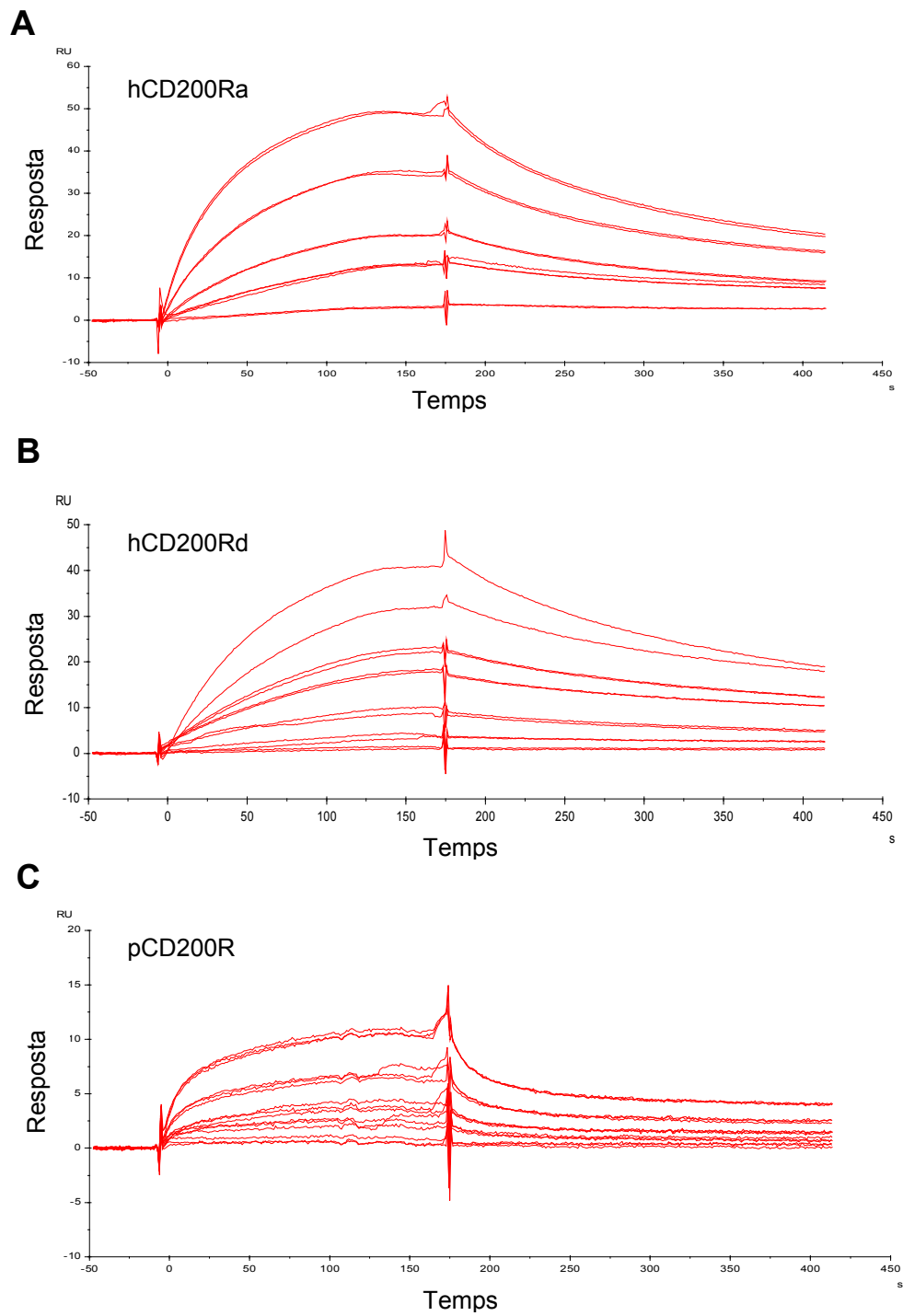


Figura 41. Anàlisi de les interaccions de la molècula pCD200-GST i els receptors humans i porcí per ressonància de plasmó de superfície. Sensogrames amb un temps d'injecció de l'anàlit de 180 segons, i un període de dissociació de 240 segons. A) hCD200Ra. B) hCD200Rd. C) pCD200Ra.

En aquest assajos de ressonància de plasmó superficial també vàrem testar la molècula mCD200-GST enfront els receptors ja mencionats. Tanmateix ni els receptors humans ni el porcí van ser capaços d'unir-se a la molècula murina en les condicions testades (figura 42).

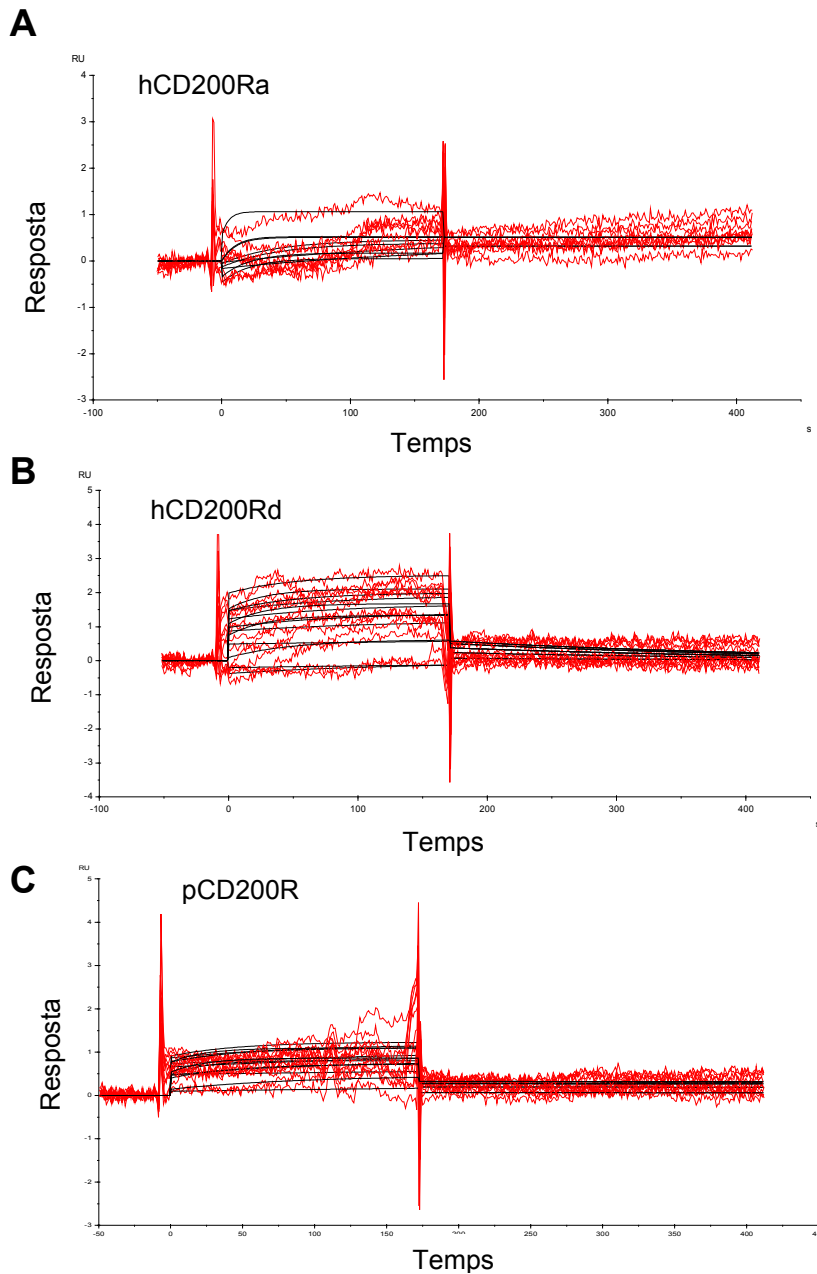


Figura 42. Anàlisi de les interaccions de la molècula mCD200-GST i els receptors humans i porcí per ressonància de plasmó de superfície. Sensogrames amb un temps d'injecció de l'analit de 180 segons, i un període de dissociació de 240 segons. A) hCD200Ra. B) hCD200Rd. C) pCD200R.

Discussió

1 Via del TNF/TNFR2

En aquest treball experimental s'han identificat i caracteritzat les 4 isoformes del TNFR2 porcí: pTNFR2, pTNFR2 Δ E7-10, pTNFR2 Δ E4 i pTNFR2 Δ E4 Δ E7-10. Les variants pTNFR2 i pTNFR2 Δ E4 ja havien estat descrites en un primer treball [Costa et al. 2007]. En canvi, pTNFR2 Δ E7-10 i pTNFR2 Δ E4 Δ E7-10 són dues variants no descrites fins a l'actualitat i que a més, juntament amb pTNFR2 Δ E4, tampoc s'han identificat en cap altre espècie. Totes elles van ser clonades a partir de RNA de teixit porcí, identificades i analitzades tan a nivell bioinformàtic com a nivell funcional.

Basant-nos en els nostres resultats, el pTNFR2 està sotmès com a mínim a dos tipus diferents de *splicing* que generen aquestes 4 variants de mRNA. Un primer *splicing* engloba una part més gran de seqüència, el que correspondria per homologia als exons 7 al 10 humans. El segon *splicing* provoca la deleció de l'exó 4, determinat per homologia amb la seqüència humana.

La isoforma 1, pTNFR2, la més llarga en ser produïda sense deleccions per *splicing*, té una homologia del 80% amb la seqüència nucleotídica humana i s'estructura també en 4 dominis rics en cisteïna en la regió extracel·lular. L'elevada homologia estructural i de seqüència amb els receptors humans i murins fa preveure una funció similar.

La isoforma 2, el pTNFR2 Δ E7-10, conté el *splicing* dels exons 7 al 10, aquesta deleció de quatre exons provoca un canvi en el marc de lectura i l'aparició d'un codó de stop primerenc. La manca d'aquests exons, que codifiquen per les regions transmembrana i citoplasmàtica, comporta la predicció d'una proteïna soluble. Aquesta conserva la capacitat d'unió al seu lligand TNF α ja que els dominis rics en cisteïnes que hi intervenen, CRD 2 i CRD 3, queden intactes. Aquest tipus de *splicing*, és únic per l'extensa zona de seqüència que engloba. La falta d'homologia de la cua 3' UTR suggereix que el *splicing* provoca una deleció gran, però no disposem de dades genòmiques que ens indiquin on es pot localitzar aquest extrem 3' UTR. Tanmateix, aquesta isoforma probablement juga

un paper similar al de la variant soluble humana DS-TNFR2(Δ 7,8). Aquesta isoforma és l'única soluble descrita fins a l'actualitat en humans i es produeix per un *splicing* alternatiu que afecta als exons 7 i 8, corresponents a la regió transmembrana [Lainez et al. 2004].

La isoforma 3, que anomenem pTNFR2 Δ E4, es produeix per *splicing* de l'exó 4. Aquesta variant, com les altres aquí descrites, conserva la regió PLAD (*Preligand assembly domain*) situada al primer domini CRD (a l'extrem N-terminal). El PLAD és essencial per la trimerització dels receptors i per la posterior senyalització del TNF α [Chan et al. 2000]. Aquest fet ens permet pensar que el pTNFR2 Δ E4, al igual que totes les altres variants, compleix aquest requisit per a ser funcional. Malgrat tot, la deleció de l'exó 4 provoca una fusió entre els dominis CRD 2 i 3 i per tant només té 3 CRD a la porció extracel·lular. Aquesta fusió altera els dos dominis implicats en la unió del receptor al seu lligand [Bodmer et al. 2002]. Aquest és el primer indici que pTNFR2 Δ E4 podria tenir un rol diferent al del pTNFR2 complet.

La isoforma 4, pTNFR2 Δ E4 Δ E7-10 es produeix pel processament dels dos *splicings*, com a conseqüència també té tres CRD en la regió extracel·lular en comptes de quatre. A més a més, el *splicing* dels darrers quatre exons comporta que la proteïna que codifica sigui soluble.

Finalment, no descartem que pugui haver més isoformes. Si aquest és el cas, el més probable es que provinguin de diferents punts d'iniciació de la transcripció. El fet que no poguéssim amplificar l'extrem 5' mitjançant el sistema SMART RACE, la llargària dels transcrits observats per *Northern Blot* i que s'ha descrit aquest tipus de variacions en altres espècies [Seitz et al. 2001] [Hauser et al. 2007], en donen suport.

Per *Northern Blot* es van observar dues bandes predominants de 6 i 5 kb aproximadament, una de 3,5 kb menys intensa, dues bandes de 2,8 i 2,6 kb i una banda de 1,9 kb. La diferència entre els transcrits de 5 i 6 kb la desconeixem. Tots dos podrien correspondre al pTNFR2 sencer i també a la variant amb el *splicing* de l'exó 4 ja que una diferència de 150 bp no es notaria en aquest nivell

de la electroforesi. La diferència podria ser deguda a nivells de processament del mRNA o a canvis en l'inici de transcripció com el descrit en humans i ratolins [Seitz et al. 2001] [Hauser et al. 2007]. Al contrari, les bandes de 2,8 i 2,6 kb si que són consistents amb una deleció de l'exó 4 a la segona. A més, la sonda que conté només l'exó 4 no hibrida a 2,6 kb. Per mida però, han de codificar per les isoformes solubles ja que són massa petites per contenir el mRNA sencer de les isoformes inserides a membrana. La de 1,9 kb potser correspon a algun canvi en l'inici de transcripció per una isoforma soluble. Altres treballs han realitzat estudis per detectar els transcrits de TNFR2 d'altres espècies. En humans s'han detectat diversos transcrits, des de 12 kb en una línia tumoral pancreàtica, 6,4 kb en cèl·lules B i 5 kb i 4,5 kb en limfòcits de sang perifèrica [Goodwin et al. 1991] [Ware et al. 1991]. Aquests tres últims transcrits serien propers per mida amb els descrits en aquest treball pel pTNFR2. Aquesta variabilitat podria correspondre a diferents processaments del transcrit, però també podrien correspondre a isoformes generades per *splicing* alternatiu del hTNFR2. Un transcrit més petit de 2,3 kb va ser detectat en la línia cel·lular monocítica Thp1, i coincideix amb els descrits en aquesta tesi per les isoformes solubles del pTNFR2. En ratolins també s'han detectat un parell de transcrits predominants de 4,1 i 3,2 kb [Goodwin et al. 1991].

En els experiments de RT-PCR en temps real vam detectar el mRNA de pTNFR2, així com els dos tipus de *splicing* descrits, en tots els teixits que vam analitzar. Tot i així, vam observar grans variacions entre teixits en els nivells d'expressió global. Els nivells més elevats els vam trobar en cèl·lules del sistema immunitari com els PBMC o els monòcits aïllats i en òrgans com la melsa i el pulmó, molt avesats al contacte amb cèl·lules del sistema immune. Aquests resultats estarien d'acord amb els primers estudis en humans que mostren que l'expressió basal del hTNFR2 està bastant restringida a cèl·lules del sistema immunitari i endotelial [Hohmann et al. 1989] i amb les funcions més específiques que s'han descrit per aquest receptor [Kim et al. 2006][Lucas et al. 1998][Rauert et al. 2010]. Tanmateix, és probable que també hi hagi alta expressió a cèl·lules epitelials com s'ha descrit pel ronyó [Al-Lamki et al. 2005],

que puguin explicar els nivells tant alts a pulmó. Probablement l'alta expressió de la isoforma 1 estigui localitzada principalment a l'epiteli pulmonar, ja que altres tipus cel·lulars presents en el pulmó com monòcits o cèl·lules endotelials no tenen uns nivells tan elevats.

El *splicing* que condueix a la formació de proteïnes solubles del pTNFR2 presentava un patró d'expressió que no es correlacionava exactament amb el d'expressió global. Els percentatges més elevats de mRNA pel receptor soluble es trobaven a PBMC i monòcits aïllats, però també a múscul. En canvi, el pulmó mostrava la proporció més baixa de les formes solubles. Aquestes dades ens posaven sobre la pista d'una altra forma de regulació de la via del TNF α a través d'aquest tipus de *splicing*.

Tenint en compte tots els resultats relacionats amb les isoformes solubles, trobem que en el sistema porcí probablement es produeixen dos tipus d'isoformes solubles. Els resultats obtinguts durant l'estimulació amb TNF α de cèl·lules 293-EBNA transfectades amb pTNFR2 mostren que el receptor porcí s'allibera al medi. A més, hem produït eficientment de forma recombinant proteïnes de fusió pTNFR2-GST i pTNFR2 Δ E4-GST mitjançant secreció al medi de cultiu. Aquestes contenen la seqüència generada per l'amplificació del cDNA de la regió extracel·lular del pTNFR2 i pTNFR2 Δ E4, inclòs el pèptid senyal, sense més modificacions a l'extrem N-terminal. Es coneixen dos processos independents responsables de la generació de proteïnes solubles. Tots dos tipus tenen lloc en el cas del hTNFR2, com passa amb altres molècules com CD40 o IL-6R [Lainez et al. 2004]. Un primer tipus es produeix a partir d'un *splicing* alternatiu de mRNA que engloba els exons corresponents a la transmembrana, i un altre succeeix a partir d'un tall proteolític de la proteïna ancorada a la membrana. En condicions fisiològiques, el hTNFR2 soluble es produeix majoritàriament a través d'aquest últim mecanisme. El tall proteolític de TNFR2 està causat per la unió del TNF α gràcies a un senyal transmès pel TNFR1 [Higuchi et al. 1994]. És molt probable que el pTNFR2 es proteolitzi com l'homòleg humà i que el hTNFR1 de les cèl·lules 293-EBNA sigui capaç de mitjançar aquest despreniment. Al contrari, el TNFR2 soluble provinent de

splicing es troba notablement elevat en sèrum de pacients amb malalties inflamatòries com la sèpsia i l'artritis reumatoide [Lainez et al. 2004]. Per tant, podria ser un mecanisme que sota condicions patològiques serviria per antagonitzar l'estimulació del receptor induïda pel lligand [Hehlgans et al. 2002]. Tot i això, la proporció de TNFR2 soluble també varia segons la patologia, indicant que els mecanismes de *splicing* depenen d'elements reguladors diferents [Heaney et al. 1996]. Si ens basem en aquests precedents, es podria especular que les variants pTNFR2 Δ E7-10 i pTNFR2 Δ E4 Δ E7-10 són un mecanisme afegit al tall proteolític del receptor ancorat a membrana per tal de regular la senyalització del TNF α . Els monòcits concretament, com una de les cèl·lules principals del sistema immune, podrien regular millor els processos inflamatoris gràcies a tenir un major percentatge d'expressió de proteïnes solubles. Estudis de la regulació de la seva producció en monòcits i cèl·lules relacionades com macròfags i DC podrien ser d'interès.

Podem comprovar també en el cas del *splicing* de l'exó 4 que els monòcits són amb diferència els que tenen un nivell més elevat, per tant podria tenir un paper regulador en aquest tipus de cèl·lules que són les majors productores de TNF. Com en el cas del *splicing* d'isoformes solubles, aquest el vam trobar a totes les cèl·lules i teixits testats, però amb menys variacions en el percentatge d'isoformes amb Δ E4 entre ells. A l'extrem de l'escala també estaria el pulmó amb els nivells més baixos. La seva possible funció la discutirem més endavant en la discussió.

Els resultats dels experiments de RT-PCR quantitativa ens mostren com el pulmó és el teixit amb més expressió de pTNFR2, però en canvi presenta el nivell relatiu més baix d'expressió de mRNA dels dos tipus de *splicing*. El trasplantament de pulmó és dels que té pitjor pronòstic ja que genera una resposta immunològica forta. El procés inflamatori s'inicia immediatament després de la mort cerebral del donador i continua amb l'activació de limfòcits T del receptor a través de la seva interacció amb les cèl·lules epitelials del pulmó [Mornex et al. 2003]. Per això plantejem que un dels factors d'aquest rebuig tan marcat podria estar causat per l'alta expressió de la isoforma 1 i per la falta

d'expressió de les variants generades pels *splicing* alternatius que atenuarien l'activació de les vies inflammatòries.

Mitjançant els estudis de ressonància de superfície de plasmó hem demostrat que tant el hTNF α com el pTNF α poden unir-se al pTNFR2 amb una constant d'afinitat molt elevada (nanomolar) i equiparable a la unió al hTNFR2. Només es va veure alguna diferència en la cinètica, ja que la velocitat de dissociació era lleugerament més baixa en la combinació de pTNF α /pTNFR2 i per tant presentava una major estabilitat. Aquests resultats són coherents amb l'elevada identitat entre les seqüències aminoacídiques dels CRD2 i CRD3 dels TNFR2 humà i porcí. La constant d'afinitat entre hTNFR2 i hTNF descrita a la literatura ($K_D = 2,1E^{-09}M$) [Shibata et al. 2008] coincideix amb l'obtinguda en aquest treball. Per tant, el nostre sistema de determinació d'afinitat amb els receptors immobilitzats de forma no orientada és prou acurat. El fet que tant l'afinitat com la cinètica de les combinacions hTNF α /pTNFR2 i hTNF α /hTNFR2 siguin similars indica que l'òrgan porcí no ha de ser més resistent a l'acció del hTNF a través del TNFR2 de membrana. Així mateix, també està d'acord en que les isoformes solubles pTNFR2 generades per proteòlisi o *splicing* també són capaces d'inhibir el hTNF. Els nostres experiments de competició de proteïnes de fusió amb la porció extracel·lular del pTNFR2 per bloquejar l'acció del hTNF α així ho corroboren. A més, ja sabem que el pTNFR1 pot unir-se al hTNF α amb alta afinitat [Costa et al. 2004], el que ens indica que la via del TNF/TNFRs està prou conservada en la combinació xenogènica de porc a primat.

Una possible diferència la trobem en la existència de la isoforma pTNFR2 $\Delta E4$. Els experiments de ressonància de superfície de plasmó van confirmar que el pTNFR2 $\Delta E4$ tenia una baixa afinitat pel seu lligand i era incapaç d'unir el hTNF α . Això ens va fer plantejar quin rol podria tenir un receptor que no s'unís, o s'unís poc, al seu lligand però que s'expressés en diferents teixits. Per aquesta raó, vam portar a terme una sèrie d'experiments per esbrinar-ho.

Els estudis de localització subcel·lular ens van permetre identificar dos patrons d'expressió diferents per les isoformes pTNFR2 i pTNFR2 $\Delta E4$. Per una banda, el pTNFR2-EYFP transfectat en cèl·lules humanes presentava un marcat patró de

membrana. La infecció de PAEC amb el retrovirus amb el pTNFR2 sencer també augmentava l'expressió del receptor a la membrana plasmàtica. Alhora s'observava expressió de pTNFR2 intracel·lularment, d'acord amb la distribució descrita pel hTNFR2 que es localitza principalment al Golgi [Scherübl et al. 2005]. Al contrari del pTNFR2, la isoforma pTNFR2 Δ E4 només es localitzava dins la cèl·lula, amb una alta colocalització amb marcadors de reticle endoplasmàtic. Tot i així, les tincions per immunofluorescència ens mostraven que la variant pTNFR2 Δ E4 no es quedava retinguda totalment al reticle endoplasmàtic. Pensem que probablement segueix el seu camí per l'aparell de Golgi. Tanmateix la proporció que podria arribar a la superfície és molt baixa en condicions de repòs ja que no hem estat capaços de detectar-la. En humans, hi ha dues descripcions d'isoformes intracel·lulars del TNFR2, que de fet podrien correspondre a la mateixa proteïna. Primer, es va observar una proteïna amb capacitat d'unir TNF α que es localitzava a la membrana interior de la mitocòndria [Ledgerwood et al. 1998]. Posteriorment, s'ha identificat una isoforma generada per una deleció en la regió del pèptid senyal i que presenta una distribució intracel·lular molt difusa amb predominança al transGolgi i als endosomes [Seitz et al. 2001] [Scherübl et al. 2005]. Al contrari que el pTNFR2 Δ E4, si que pot unir el TNF α amb alta afinitat dins la cèl·lula i transduir senyal. A més a més s'ha descrit que aquesta isoforma humana pot arribar a la membrana plasmàtica quan s'expressa de forma recombinant, encara que en una proporció més baixa que la isoforma 1 [Scherübl et al. 2005]. En ratolí també s'ha descrit una isoforma intracel·lular que es genera per un canvi en l'inici de transcripció, però aquest no uneix el TNF α i té una localització perinuclear [Hauser et al. 2007]. Per tant, el pTNFR2 Δ E4 presenta similituds, sobre tot amb aquesta darrera, amb la diferència de que conté pèptid senyal.

Hi pot haver diverses explicacions per a que una proteïna amb pèptid senyal quedi retinguda a l'espai intracel·lular. La primera explicació seria assumir que una proteïna amb un caràcter regulador com el que estem hipotetitzant podria anar fins a la membrana plasmàtica només en condicions molt determinades, per exemple quan la cèl·lula necessités atenuar la senyalització produïda per la via

del TNF α . Diversos estudis han descrit el canvi de localització d'una proteïna després d'un estímul determinat. Per exemple, el receptor de mort 5 (DR5) és un membre de la superfamília de receptors TNF que uneix el TRAIL i forma un complexe senyalitzador amb FADD i procaspasa-10 [Kischkel et al. 2000]. S'ha descrit que el tractament de cèl·lules trofoblàstiques amb TNF α durant 18 h causa una redistribució del DR5 intracel·lular a la superfície cel·lular [Bai et al. 2009]. El DR4, l'altre receptor de TRAIL, també pateix un canvi de localització. El nivell d'expressió a la membrana plasmàtica disminueix a causa d'una modificació post-transcripcional (glicosilacions) o d'un plegament incorrecte de la proteïna (*trafficking*). Per tant la proteïna és queda retinguda intracel·lularment, aquesta es perfila com la causa més probable de la resistència a l'apoptosi induïda per TRAIL de cèl·lules sw480 [Jin et al. 2004]. Malgrat tot, no hem trobat cap condició experimental que deslocalitzi aquesta isoforma de l'espai intracel·lular, ni estímuls amb el TNF α , ni diferents temps d'expressió, ni coexpressió amb el pTNFR2. Tot i així, no descartem que pugui haver-hi unes condicions determinades en les quals el receptor pogués sortir a membrana. A nivell bioinformàtic tampoc hem detectat cap diferència en les glicosilacions que pogués explicar els diferents patrons de localització

La segona explicació es basaria en que la falta de l'exó 4, de caràcter hidrofílic, altera el plegament de la proteïna en presència de la regió transmembrana que és hidrofòbica. Quan la regió transmembrana no hi és, com en el cas de les proteïnes solubles, la secreció no hauria de ser un problema, com ja observem amb les proteïnes de fusió.

Totes les evidències que nosaltres hem trobat indiquen, tant a nivell teòric com pràctic, que el pTNFR2 Δ E4 no s'uneix correctament al hTNF α i molt poc al pTNF α . A més a més, té un patró d'expressió intracel·lular que el fa poc coincident amb del pTNFR2. Tot i així els estudis realitzats amb la tècnica de FRET, que té una precisió molt elevada, van posar de relleu la interacció entre pTNFR2 i pTNFR2 Δ E4 dins l'espai intracel·lular, probablement al Golgi, encara que aquest punt no l'hem esclarit. Aquesta és la primera dada que prova que efectivament les dues variants poden combinar-se, a més està d'acord amb un

possible rol del pTNFR2 Δ E4 per formar heterotrímers amb pTNFR2 i interferir en la unió i senyalització del receptor. És ben conegut que el TNFR2 forma homotrímers per ser funcional [Chan et al. 2000], per això aquesta seria una forma de regulació de la via del TNF α /TNFR2 no descrita fins ara. Hem mostrat que les dues proteïnes quan estan en la mateixa localització subcel·lular són capaces d'interaccionar per formar heterotrímers i probablement atenuar la senyalització de la via del TNF gràcies a la poca capacitat del pTNFR2 Δ E4 d'unir el lligand. També podrien tenir interconnexions a nivell d'elements de transducció de senyal, com per exemple sobre les proteïnes adaptadores TRAF2.

Gràcies a que vàrem secretar les proteïnes solubles de pTNFR2 Δ E4 i la de pTNFR2, vam poder comprovar que eren capaces d'interaccionar a l'espai extracel·lular. Amb aquest objectiu vam realitzar un assaig de *pull down*, que va confirmar que les proteïnes solubles podien combinar-se entre elles de forma específica. Finalment, vam confirmar que aquesta interacció era realment funcional. Tal i com van mostrar els assajos de competició, la combinació de receptors solubles era funcional i contrarestava l'efecte inhibitor de l'homotrímer pTNFR2. Així doncs, proposem una nova forma de regulació de la via del TNF/TNFR2 a partir de la combinació de les diferents variants descrites en aquest treball. Una regulació que principalment facilitaria la disminució dels processos inflamatoris activats per TNF α com els que es donen en trasplantaments d'òrgans sòlids. Aquesta regulació també podria participar en el desenvolupament de patologies inflamatòries al porc.

2 Via del CD200/CD200R

Hem amplificat i identificat per primera vegada el CD200 porcí i tres isoformes del seu receptor per tal d'estudiar el seu paper en el rebuig del xenotrasplantament. Aquestes molècules presenten una elevada homologia amb les humanes i en segon terme amb les murines, el que fa preveure una funció similar d'inhibició de la resposta immunològica. El fet que les molècules porcines i humanes es puguin unir entre elles amb similar afinitat encara reforça més aquesta idea. El CD200 ha estat descrit com clau en la regulació del sistema immunitari de diferents espècies [Gorczynski et al. 2001][Moreaux et al. 2006][Zhang et al. 2004]. Es coneix que la interacció amb el seu receptor produeix un senyal inhibidor de l'activitat de les cèl·lules del llinatge mieloide, com per exemple els monòcits i els mastòcits [Hoek et al. 2000] [Zhang et al. 2004]. A més a més, el CD200R també es troba a limfòcits T i B on sembla que també pot jugar un paper regulador [Rijkers et al. 2008] [Rygiel et al. 2009].

A partir de RNA aïllat de teixit de cervell porcí es va poder clonar el CD200 porcí. De fet, primer vam provar a partir de RNA de PBMC sense èxit. Ens hem basat en la distribució de l'expressió de la molècula, que està molt conservada entre humans, rata i ratolí [Wright et al. 2001] [McMaster et al. 1979] [Hoek et al. 2000], per tal d'escollir el teixit per obtenir el cDNA de pCD200. En humans hi ha una alta expressió d'aquesta molècula en el sistema nerviós central [Wright et al. 2001], per tant vam considerar amb encert que una font important de pCD200 podria ser el cervell.

Amb els experiments de PCR en temps real vam quantificar l'expressió del pCD200 en diferents teixits i cèl·lules d'origen porcí. Vam usar una gran bateria de mostres per verificar que la distribució de l'expressió del CD200 no era una excepció en referència a la distribució en altres espècies [Wright et al. 2001]. Vam observar que el pCD200 està àmpliament distribuït per diferents teixits i tipus cel·lulars, com per exemple cervell, intestí, múscul i ronyó, així com a cèl·lules endotelials i limfòcits. Aquesta distribució és coincident amb la descrita

per humans i rosegadors [McMaster et al. 1979] [Webb et al. 1984] [Dick et al. 2001] [Wright et al. 2001]. També hem confirmat l'expressió d'aquesta molècula en teixits on no s'havia testat fins l'actualitat, com al cor, pulmó, condrocits o monòcits. Els monòcits presentaven uns nivells molt baixos en relació a altres leucòcits, això pot estar relacionat amb el fet que expressen el CD200R i la seva funció inhibidora es produeix pel contacte amb altres tipus cel·lulars i no entre ells. Òrgans com el pulmó, l'intestí prim o el cervell són els que expressen nivells més elevats de CD200. Una elevada concentració d'aquesta molècula en el pulmó o l'intestí prim permetria mantenir l'homeòstasi immunològica. En una zona on constantment es barregen agents interns i externs, una molècula com el CD200 és essencial per evitar que el sistema immune reaccioni contra el propi organisme i només es dirigeixi cap als agents externs [Jiang-Shieh et al. 2010]. En el cervell, l'elevada expressió de pCD200 segurament contribueix al privilegi immunològic que caracteritza el sistema nerviós central. Per estudis en altres espècies es coneix que el CD200 està localitzat a les pròpies neurones [Wright et al. 2001][Koning et al. 2009], mentre que l'expressió del CD200R en aquest teixit està principalment localitzada a la microglia (de llinatge mioeloid) [Webb et al. 1984][Wright et al. 2000].

A continuació, vam determinar la quantitat de pCD200 natiu a la superfície cel·lular de PAEC i condrocits porcins. Ens vam centrar en aquests dos tipus cel·lulars pel seu interès en el xenotrasplantament. Per la detecció en endoteli porcí, només disposavem de PAEC provinents d'aorta, que són molt utilitzades com a model cel·lular per estudiar el rebuig del xenotrasplantament d'òrgan sòlid [Murray et al. 1994] [Costa et al. 2002b]. En aquestes cèl·lules els nivells de pCD200 eren baixos, aquest fet ens indicava que tenen una baixa capacitat d'inhibir les cèl·lules d'origen mioeloid. Com hem comentat a la introducció, els macròfags juguen un paper molt important en el rebuig xenogènic tant d'empelts cel·lulars com d'òrgan vascularitzat. Encara que és probable que les cèl·lules endotelials de venes i capil·lars expressin nivells una mica més alts, com els detectats en rata [Ko et al. 2009], aquest resultat ens fa pensar que l'expressió o sobreexpressió transgènica de CD200 és una bona idea pel

desenvolupament d'empelts resistents al rebuig xenogènic. Els resultats en condrocits són una mica diferents. L'expressió nativa del pCD200 en superfície de PCC és clarament més alta que en les PAEC. Fins ara no s'havia descrit quina era l'expressió de CD200 en aquest tipus cel·lular. En qualsevol cas, el cartílag és reconeix com un teixit amb cert privilegi immune i aquesta troballa ens suggereix que el CD200 pot contribuir en aquest sentit. En el nostre laboratori volem seguir estudiant aquestes característiques, així com la possibilitat d'augmentar l'expressió mitjançant manipulació genètica. Creiem que els condrocits porcins tenen un gran potencial per a ser utilitzats en teràpies xenogèniques per la reparació de defectes de cartílag a humans.

Com a incís, volem comentar que en el desenvolupament de reactius per la detecció de les molècules porcines, la generació d'anticossos policlonals en conills mitjançant la injecció de proteïnes purificades va donar bons resultats. Aquests van ser capaços de detectar les proteïnes mitjançant *Western Blot* i citometria de flux. En canvi, els anticossos antipeptid podien reconèixer les proteïnes porcines purificades mitjançant *Western Blot*, però no funcionaven tan bé a l'hora de detectar les proteïnes per citometria de flux. La generació dels antipeptid va exigir el disseny d'una seqüència de 15 aminoàcids basats en el mètode Kolaskar&Tongaonkar [Kolaskar et al. 1990]. Tot i el disseny acurat de la seqüència, els antipeptid generats contra el pCD200 probablement no reconeixen epítops accessibles quan la proteïna era expressada a superfície amb el seu plegament de forma nativa.

Una anàlisi bioinformàtica ens va permetre caracteritzar la molècula de pCD200 i comprovar que conté dos dominis d'immunoglobulines (IgSF), una regió transmembrana i una regió citosòlica curta sense motius senyalitzadors coneguts. Aquest és un patró molt similar al descrit pel CD200 d'altres espècies [Barclay et al. 1982][Clark et al. 1985]. La falta de motius senyalitzadors en la regió citoplasmàtica del CD200 indica que aquesta molècula té principalment una funció de lligand i que exerceix la seva funció biològica sobre les cèl·lules que expressen el seu receptor. En humans i ratolins s'ha descrit l'acció del

CD200 a través de la seva unió amb el CD200R localitzat a membrana plasmàtica [Hoek et al. 2000].

Per tant era bàsic per aquest estudi la clonació del receptor porcí del CD200. Vam utilitzar RNA obtingut a partir de monòcits aïllats de sang perifèrica porcina per amplificar el cDNA del receptor ja que s'ha descrit en altres espècies que les cèl·lules del llinatge mieloide són les que expressen majorment el CD200R [Wright et al. 2000] [Barclay et al. 2002]. Es van amplificar i identificar tres variants de mRNA del receptor porcí. Molt probablement, les isoformes es generen per *splicing* alternatiu ja que per homologia amb la seqüència humana el punt de *splicing* coincideix amb un canvi d'exó. En humans, el gen del receptor del CD200 també pateix *splicing* alternatiu, fet que produeix un total de 4 variants, dues de membrana i dues solubles [Vieites et al. 2003]. La isoforma porcina de membrana, que anomenem pCD200R, té una homologia elevada amb la variant a del receptor humà (o isoforma 1). La seva regió citosòlica conté el domini NPXY que està conservat a diferents espècies inclosa la humana, el que indica que comparteix la via de senyalització que s'inicia per la unió de les proteïnes adaptadores Dok 1 i Dok 2 [Zhang et al. 2006]. Les variants solubles porcines, que anomenem pCD200Rb i pCD200Rc, presenten delecions de 109 pb i 155 pb, respectivament. De fet, només tenen tres aminoàcids de diferència entre elles. Es generen per un canvi en el marc de lectura que fa aparèixer un codó de stop primerenc just abans de la regió transmembrana. Per tant, conserven tots dos dominis IgSF de la regió extracel·lular. Aquest és un fet diferencial amb les variants humanes descrites, que només tenen un dels dominis [Vieites et al. 2003]. En qualsevol cas, probablement totes conserven la capacitat d'unió a CD200 ja que el domini IgSF localitzat a l'extrem N-terminal sembla ser el principal implicat en aquesta interacció [Hatherley et al. 2004].

Hem observat que el pCD200Ra també mostra una alta homologia amb la porció extracel·lular del receptor humà. Un estudi de Hatherley et al. demostrava que el receptor humà té sis aminoàcids (E44, P62, I71, T73, E75 i I133) importants per a la seva unió amb el hCD200. Quan aquests aminoàcids

es mutaven, el percentatge d'unió al lligand dequeia a menys del 35% [Hatherley et al. 2004]. El pCD200R té tres d'aquests aminoàcids conservats (E44, T73 i E75), que són precisament els més importants. La mutació de E44 disminueix fins al 8% el percentatge d'unió, el T73 aboleix totalment la unió entre receptor i lligand, i per últim la mutació de l'aminoàcid E75 disminueix fins a un 22% el percentatge d'unió del CD200 respecte al receptor no mutat. A més, dels tres restants, el canvi de l'aminoàcid 71 és de tipus conservatiu. Aquest fet suggereix una pressió evolutiva per conservar aquests aminoàcids i està d'acord amb els resultats que demostren una afinitat semblant.

Mitjançant ressonància de plasmó de superfície vam demostrar que la interacció del pCD200 amb el hCD200R és força similar a la generada amb el hCD200, tot i que les constants d'associació i dissociació són lleugerament més ràpides. Està descrit que la isoforma *d* del receptor CD200 humà interacciona amb el seu receptor amb una constant d'afinitat de 0,5 μM a 37°C i una constant de dissociació de 0,09 1/s, d'una manera similar a la descrita en les interaccions en rates i ratolins [Wright et al. 2003]. Els nostres resultats avalen les dades publicades a la literatura sobre el hCD200Rd. En el experiments realitzats, aquest receptor mostra una constant d'afinitat amb el hCD200 i el pCD200 de l'ordre de μM , amb una K_D 0,17 μM i 0,13 μM respectivament. Per tant, una de les preguntes claus a resoldre en aquest projecte queda contestada. No s'observa un defecte en la capacitat d'unió al hCD200R per part del pCD200 que pugui justificar un major rebuig del xenoempelt. Per corroborar-ho, tenim programat fer un estudi funcional comparatiu en un model cel·lular xenogènic. Resta també fer un estudi comparatiu per esbrinar si pot haver una menor expressió de CD200 a superfície de cèl·lules porcines d'interès pel trasplantament en relació a les humanes, però no creiem que sigui el cas.

Aquest és el primer treball que mostra una comparació de les constants d'afinitat de les dues isoformes del receptor humà diferenciades en el domini extracel·lular. Observem que el hCD200Ra té una constant d'afinitat moderadament més elevada que el hCD200Rd dins la pròpia espècie (K_D

$8,17E^{-08}$ i $1,79 E^{-07}$ M, respectivament). També es reproduïx aquest tipus de resultat amb el pCD200. Aquest fet podria indicar que el hCD200Ra podria exercir certa preferència per desencadenar el senyal inhibidor quan el CD200 és baix i en el cas que els dos receptors s'expressessin a la mateixa cèl·lula. No hi ha estudis que hagin determinat l'expressió diferencial de les dues isoformes del hCD200R, però és probable que s'expressin tots dos a l'hora pel fet de produir-se per *splicing* i que els hem amplificat d'una mateixa preparació (si bé de població mixta). La regulació diferencial de l'expressió de les dues isoformes podria tenir efectes funcionals, així com variacions en la capacitat de transmetre el senyal.

Amb la mateixa tècnica es van testar les interaccions del hCD200 i el pCD200 al receptor porcí. Les constants d'afinitat i de velocitat d'associació i dissociació són semblants. Aquestes combinacions només es van incloure com a control per verificar que el pCD200 s'unia al seu receptor en el mateix rang d'afinitat que ho fa el hCD200 amb el seu propi i ho hem confirmat. La combinació xenogènica de hCD200 i pCD200R té probablement un interès limitat en la majoria de casos de xenotrasplantament. En un escenari de xenotrasplantament de teixit o òrgan sòlid sol, la molècula crítica seria el pCD200 expressat per l'endoteli o parènquima porcí per tal de desencadenar amb eficàcia el senyal per suprimir la resposta immunitària i evitar el dany a l'empelt. Tanmateix, hi ha un escenari on podria ser d'interès tenir aquesta informació i és pel desenvolupament de teràpies tolerogèniques basades en el xenotrasplantament de moll d'ós porcí o ronyons amb teixit tímic porcí. Els nostres resultats indiquen que no hi ha un defecte d'interacció en aquesta via que pugui promoure la GVHD.

Fins ara tampoc s'havien testat les interaccions entre el mCD200 i els diferents receptors humans i el porcí. En cap dels experiments realitzats vam veure una interacció significativa entre el mCD200 i els diversos receptors. Això indica que el sistema porcí del CD200/CD200R és clarament més proper a l'humà que al murí. Aquesta troballa està reforçada pels resultats de la comparació bioinformàtica de les seqüències nucleotídiques i aminoacídiques del CD200 i

els seu receptor per aquestes espècies. En estudis realitzats també mitjançant la tècnica de ressonància de plasmó en superfície, el hCD200 s'uneix de forma dèbil amb el mCD200R i el rCD200R [Wright et al. 2003]. A més, en assajos in vitro la proteïna quimèrica hCD200lg no es capaç d'unir-se al receptor CD200 murí [Wright et al. 2003]. Amb aquest coneixement, vam amplificar el mCD200 amb la intenció d'utilitzar-lo en teixits porcins per tal d'expressar-lo transgènicament quan fem estudis de xenotrasplantament discordant de porc a ratolí. Aquest tipus d'estudis poden ser una prova de concepte abans de decidir aplicar-los en porcs transgènics.

Finalment, hem estat capaços de produir proteïnes recombinants de CD200 humà i porcí que serviran pels experiments funcionals que estan pendents. Tots dos CD200 els hem expressat a la superfície de condrocits porcins, el que ens pot permetre avaluar l'efecte protector en assaigs de cocultiu amb leucòcits humans. A més, les proteïnes purificades les poden afegir als cocultius d'altres cèl·lules porcines com PAEC. Així, hem identificat la línia cel·lular U937 com a cèl·lules que ens permetran dur a terme aquests estudis funcionals ja que expressen el CD200R. Com els monòcits/macròfags i les DC són l'enllaç entre la resposta immunitària innata i l'adaptativa, el CD200 expressat en les cèl·lules o òrgan trasplantat podria ser cabdal en la regulació de la resposta inflamatòria generada pel sistema immunitari després del trasplantament. Tot apunta que una sobreexpressió del CD200 porcí a l'empelt xenogènic podria contribuir a protegir-lo enfront el rebuig agut. L'expressió transgènica de hCD200 seria molt probablement una opció equivalent. A més de l'elevat interès dels nostres estudis en el camp del xenotrasplantament, els nostres estudis podrien ser útils per generar coneixement per aplicacions en veterinària i producció animal.

Conclusions

1 Estudi de la via TNF/TNFR2

1. El pTNFR2 té un mínim de quatre isoformes, dos amb transmembrana (pTNFR2 i pTNFR2 Δ E4) i dues solubles (pTNFR2 Δ E7-10 i pTNFR2 Δ E4 Δ E7-10), que es generen a partir de dos *splicings* alternatius diferents.
2. Cadascuna té un patró d'expressió diferent depenent del teixit o cèl·lula.
3. Tant el pTNFR2 com el hTNFR2 són capaços d'unir el pTNF α i el hTNF α amb una constant d'afinitat elevada i equiparable.
4. El pTNFR2 Δ E4 uneix el pTNF α amb una afinitat molt menor que el pTNFR2 i no és capaç d'unir el hTNF α .
5. El pTNFR2 es localitza principalment a la membrana plasmàtica, mentre que el pTNFR2 Δ E4 es localitza intracel·lularment, principalment al reticle endoplasmàtic.
6. El pTNFR2 es proteolitza per l'acció del hTNF α .
7. El pTNFR2 i el pTNFR2 Δ E4 interaccionen a nivell intracel·lular.
8. En solució, El pTNFR2 Δ E4 és capaç d'unir-se directament de forma específica al pTNFR2, probablement formant heterotrímers.
9. El pTNFR2 Δ E4-GST no pot revertir l'augment dels marcadors d'activació cel·lulars en cèl·lules endotelials porcines tractades amb TNF α , a més a més modula l'efecte inhibidor del pTNFR2-GST en aquest sistema.

2 Estudi de la via CD200/CD200R

1. El CD200 porcí presenta una elevada homologia al hCD200 i té una estructura molt similar a la d'altres homòlegs.
2. L'expressió del pCD200 a diferents teixits té una distribució àmplia i anàloga a la d'altres espècies.
3. S'han identificat i clonat 3 isoformes del receptor porcí del CD200, una de les quals té motius de senyalització.
4. El pCD200R té 3 dels 6 aminoàcids que s'han descrit com essencials per a la unió del receptor humà amb el seu lligand.
5. Demostrem mitjançant estudis d'afinitat que el pCD200 s'uneix al hCD200R amb una afinitat similar a la del propi hCD200.
6. La isoforma d del hCD200R, que té el domini extracel·lular més curt, presenta una afinitat moderadament inferior a la isoforma a.
7. Tant el hCD200 com el pCD200 es poden expressar de forma recombinant a cèl·lules porcines amb l'objectiu de protegir-les del rebuig xenogènic.

Materials i Mètodes

1 Obtenció de teixits i cèl·lules.

1.1 Materials

1.1.1 Obtenció del material

Es van obtenir mostres de sang i diferents teixits porcins a través de l'estabulari de Bellvitge de la UB. La sang es va extreure de la vena jugular de porcs anestesiats i els teixits van ser obtinguts després de l'eutanàsia dels animals en condicions estèrils dins l'estabulari seguint els procediments aprovats pel comitè d'ètica. Els teixits van ser embolicats amb paper d'alumini, congelats immediatament en nitrogen líquid i es van emmagatzemar a -80°C .

Les mostres de sang humanes van ser obtingudes a través del banc de sang de Bellvitge.

1.2 Mètodes

1.2.1 Aïllament de cèl·lules mononuclears de sang perifèrica.

La purificació de cèl·lules mononucleades es va portar a terme seguint el protocol bàsic de gradient Ficol (Amersham GE Healthcare) a partir de sang amb heparina. Es fonamenta en la diferència de densitat entre les cèl·lules mononucleades i els altres elements presents en una mostra de sang.

L'aïllament es va fer segons el protocol bàsic del *Current Protocols in Immunology*. Breument, es va barrejar la sang heparinitzada i el PBS a parts iguals, i es va avocar la mescla en un tub que contenia Ficol sense barrejar les fases. Es va centrifugar i recollir només la fase de cèl·lules mononucleades. Després de diversos rentats, es va determinar el número de cèl·lules i la seva viabilitat [Kanof et al. 1991].

1.2.2 Aïllament de monòcits/macròfags i limfòcits sanguinis.

Aproximadament un 40% de les cèl·lules mononucleades obtingudes amb el protocol previ són monòcits i macròfags. El seu aïllament es va fer seguint el mètode d'adherència del *Current Protocols in Immunology*. Breument es van resuspendre les cèl·lules amb medi i durant 1 hora es van incubar en un flascó a 37°C i 5%CO₂. Es va descartar el sobrenedant amb les cèl·lules no adherents i després de rentar les cèl·lules adherents, es va afegir medi fresc RPMI [Kanof et al. 1991]. Per obtenir els limfòcits es va recollir la fracció no adherent.

1.2.3 Extracció de RNA total

Per la preparació de l'instrumental, com pinces i morter, per processar les mostres es va rentar el material amb aigua destil·lada i etanol al 70% i tot seguit es va fornejar a 200°C durant tota la nit. En el primer pas es va mesurar el pes de la mostra del teixit congelat (-80°C) i a continuació es va triturar amb un morter. Sense deixar que la pols del teixit es descongelés, es va afegir 1 ml de TRIzol (Invitrogen) per cada 100 mg de teixit triturat i es tornà a congelar a -80°C per afavorir el trencament cel·lular. El procediment posterior consistia en separar, precipitar, rentar i dissoldre el RNA, seguint les instruccions del reactiu TRIzol. La determinació de la concentració de RNA es feia mitjançant espectrofotometria, mesurant l'absorbància a la longitud d'ona de 260 nm. Després d'aliquotar el RNA, s'emmagatzemava a -80°C.

El protocol utilitzat per extreure RNA de cèl·lules va ser el mateix a partir de l'addició del TRIzol (per cada 5-10x10⁶ cèl·lules s'utilitzava 1 ml TRIzol).

2 Clonatges

2.1 Materials

2.1.1 Soques Bacterianes

TOP10: F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ (araleu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG (Invitrogen)

DH5 α : F- ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ - (Invitrogen)

2.1.2 Plasmidis

pCR $\text{\textcircled{R}}$ 2.1 (Invitrogen)

pcDNATM3.1D/V5-His-TOPO $\text{\textcircled{R}}$ (Invitrogen)

pCR $\text{\textcircled{R}}$ 4-TOPO (Invitrogen)

pLXSN (Clontech/Takara)

pCEP-Pu, pECFP-N1, pEYFP-N1 i pBABE (obtinguts d'altres investigadors).

2.1.3 Medis

Per créixer els bacteris transformats és va usar medi LB (Lennox broth) o SOC (Invitrogen). Les plaques per obtenir colònies de bacteries estaven fetes de medi LB amb agar (Agar Bacteriologic Europeo, Pronadisa, Espanya). L'antibiòtic de selecció ampicil·lina o kanamicina (Sigma) s'afegia a les plaques i medis segons convenia.

2.1.4 Encebadors

Van ser encarregats a Invitrogen per a l'amplificació de DNA per PCR i seqüenciació. S'indica la mida dels fragments obtinguts per PCR.

Taula 7. Encebadors emprats per amplificar els inserts per PCR pels clonatsges

DNA	Seqüència	T ^a Hibridació	Mida (pb)
hTNFR2e	5'CACCATGGCGCCCGTCGCCGTCTG3' 5'GCCAGTGCTCCCTCAGCTGG3'	54°C	783
pTNFR2/ pTNFR2ΔE4	5'GCCACCATGGCGCCCRCCGCKTC3' 5'TTARCTGGGCTTCATHCCWGC3'	54°C	1386/ 1236
pTNFR2 / ΔE4e	5'GCCACCATGGCGCCCRCCGCKTC3' 5' CCCTGTGTTGAGCCCTCAAC3'	52°C	783/ 633
pTNFR2Δ7-10 /ΔE4Δ7-10	5'CTCTGGAACCTCGTTTCTGCG3' 5'ACTCCAGGAAGAAAACAAGTTTAAATG3'	55°C	650/ 500
pTNFR2/ ΔE4 tmb	5'GCCACCATGGCGCCCRCCGCKTC3' 5'GGATCCTGCTGCTGCTCAGGACC3'	53°C	954/ 804
GST	5'CTCGAGTATGGCCCTATACTAGGTTATTG3' 5'GGATCCCTAATCCGATTTTGGAGGATGG3'	59°C	663
hCD200	5'CACCGAATTCGCCACCATGGAGAGGCTGGTGATCAGG3' 5' GACTTATTTAGGGCTCTCGGTCCTG3'	65°C	810
hCD200Re	5'CACCGCCACCATGCTCTGCCCTTGAGAACTGC3' 5'AATGGGAGACGTGGCAGGTCACG3'	63°C	789
hCD200R	5'CACCGCCACCATGCTCTGCCCTTGAGAACTGC3' 5'CTTATAAAGTATGGAGGTCTGTGTC3'	60°C	1047
mCD200e	5'CACCGAATTCGCCACCATGGGCAGTCTGGTATTCAGG3' 5'AAACCAAAATCCTTTGTCCAGAC3'	59°C	705
pCD200e	5'CACCGAATTCGCCACCATGGRSAGKCTGGTRWTCAGG3' 5'RACTGAAAACCAAWAKCCTTTG3'	56°C	705
pCD200	5'GCCACCATGSAGWGKCTGGTGWTCAGRAG3' 5'YTAGGGCTCTCGRTCYTGRITC3'	53°C	804
pCD200R	5'CACCGCCACCATGCYCTGCMCTTGGAACAAC3' 5'TCATTTGTCTCGTGGGAG3'	52°C	1089
pCD200Re	5'CACCGCCACCATGCYCTGCMCTTGGAACAAC3' 5'TCTTAAGTACATTCTTTGTAATTATC3'	52°C	810

Taula 8. Encebadors per a la seqüenciació.

Plasmidi	Seqüència
pCR2.1 / pCR4 <i>Forward</i>	5'GTAAAACGACGGCCAG3'
pCR2.1 / pCR4 <i>Reverse</i>	5'CAGGAAACAGCTATGAC3'
pLXSN <i>Forward</i>	5'CCCTTGAACCTCCTCGTTTCGACC3'
pLXSN <i>Reverse</i>	5'GAGCCTGGGGACTTTCCACACCC3'
pcDNA™3.1D/V5-His-TOPO® <i>Forward</i>	5'TAATACGACTCACTATAGGG3'
pcDNA™3.1D/V5-His-TOPO® <i>Reverse</i>	5'ATTTAGGTGACACTATAG3'
pCEP-Pu <i>Forward</i>	5'AGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCG3'
pCEP-Pu <i>Reverse</i>	5'GTGGTTTGTCCAAACTCATC3'

2.2 Mètodes

2.2.1 Retrotranscripció de RNA

La retrotranscripció és el procés pel qual es sintetitza una cadena simple de DNA complementari (cDNA) a partir d'una cadena simple de RNA usant una transcriptasa reversa. Es van retrotranscriure entre 100 ng i 1 µg del RNA total, utilitzant el *Cloned AMV First-strand cDNA Synthesis Kit* (Invitrogen) que empra la transcriptasa reversa del virus aviar de la mioblastosis (AMV) i l'oligonucleòtid (dT)₂₀ com a encebador.

→ Condicions generals de retrotranscripció.

Pas	Temperatura	Temps	Número de Cicles
Desnaturalització RNA	65°C	5 minuts	1
Síntesis cDNA	50°C	60 minuts	1
Inactivació AMV	85°C	5 minuts	1

2.2.2 Amplificació per PCR dels gens d'interès

La *Polymerase Chain Reaction*, tècnica desenvolupada per K.Mullis al 1984, permet amplificar DNA a partir de poques còpies i augmentar-ne la quantitat diversos ordres de magnitud. Es produeix gràcies a una polimerasa termostable i encebadors específics que limiten l'extensió de l'amplificació.

Les reaccions es van dur a terme habitualment en 50 µl de volum final i les concentracions finals dels components de la barreja de reacció depenien de la polimerasa usada:

I. Concentracions de la reacció GoTaq® Green Master Mix (Promega)

cDNA < 250 ng

0,1 µM de cadascun dels encebadors

GoTaq® Green Master Mix 2X⁽¹⁾

Aigua lliure de nucleases fins a 50 µl

→ Condicions generals d'amplificació dels gens

Pas	Temperatura	Temps	Número de Cicles
Desnaturalització inicial	95°C	2 minuts	1
Desnaturalització	95°C	1 minut	} 25-35
Hibridació	X°C ⁽²⁾	1 minut	
Extensió	72°C	1 minut	
Extensió Final	72°C	5 minuts	1
Manteniment	4°C	∞	1

II. Concentracions de la reacció Pfx50™ DNA Polymerase (Invitrogen)

cDNA de 10 ng a 1 µg de RNA total d'inici

0,3 µM de cadascun dels encebadors

0,3 mM dNTP mix

Pfx amplification Buffer 1X

5 unitats Pfx50™ DNA Polimerasa

Aigua lliure de nucleases fins a 50 µl

→ Condicions generals d'amplificació dels gens

Pas	Temperatura	Temps	Número de Cicles
Desnaturalització inicial	94°C	2 minuts	1
Desnaturalització	94°C	15 segons	} 25-35
Hibridació	X°C ⁽²⁾	30 segons	
Extensió	68°C	1 minut	
Extensió Final	68°C	5 minut	1
Manteniment	4°C	∞	1

III. Concentracions de la reacció ReadyMix™ Taq PCR Reaction Mix with MgCl₂ (Sigma)

cDNA < 250 ng

0,1 µM de cadascun dels encebadors

ReadyMix™ Taq PCR Reagent Mix 2X⁽³⁾

Aigua lliure de nucleases fins a 50 µl

→ Condicions generals d'amplificació dels gens

Pas	Temperatura	Temps	Número de Cicles
Desnaturalització inicial	94°C	1 minut	1
Desnaturalització	94°C	1 minut	} 25-35
Hibridació	X°C ⁽²⁾	2 minuts	
Extensió	72°C	3 minuts	
Manteniment	4°C	∞	1

⁽¹⁾Conté una Taq DNA polimerasa no recombinant modificada sense activitat 5'→3' exonucleasa. També inclou dNTPs, MgCl₂ i buffer d'amplificació.

⁽²⁾ La temperatura d'hibridació varia segons la seqüència d'encebadors que s'usa, la temperatura d'hibridació s'aproxima a través de la fórmula: $T_a (^{\circ}\text{C}) = (4^{\circ}\text{C} \times (\text{G}+\text{C})) + (2^{\circ}\text{C} \times (\text{A}+\text{T}))$

⁽³⁾ Conté 0,06 unitats Taq DNA Polimerasa per microlitre, 0,4 mM dNTPs mix, 3 mM MgCl₂ i buffer d'amplificació.

2.2.3 Amplificació per SMART RACE

L'amplificació a través del *SMART RACE* (*Switching Mechanism at 5' End of RNA Template Rapid Amplification of cDNA Ends*) *cDNA amplification Kit* (Clontech) es basa en la incorporació de seqüències conegudes als dos extrems del cDNA durant la seva síntesi sense necessitat d'adaptadors, i la posterior amplificació amb encebadors específics, *Gene-Specific Primers* (GPS). Un dels punts més importants alhora d'aconseguir l'amplificació és un bon disseny d'encebadors específics que ha d'incloure una sèrie de paràmetres, com tenir una llargària entre 23 i 28 nucleòtids, un contingut entre el 50-70% GC i una temperatura d'hibridació per sobre els 70°C. El RNA de partida va ser aïllat de cervell de porc, tal i com s'explica en el punt 1.2.3. Es van dissenyar encebadors específics per a cadascun dels dos extrems de la molècula que es volia amplificar.

Taula 9. Llista d'encebadors utilitzats en l'amplificació SMART RACE

Encebador	Seqüència
GSP2 pTNFR2 <i>Forward</i>	5'TGGCCATTCTGGCACCGCAAGG3'
GSP1 pTNFR2 <i>Reverse</i>	5'CTGCTCAGGACCGGGGACACTTC3'
GSP2 pCD200 <i>Forward</i>	5'AAGATAAACATCACCCAGCTGGGAC3'
GSP1 pCD200 <i>Reverse</i>	5'TTGTCCCATTGGGGTGTACGAGAATC3'

El protocol d'amplificació és va fer seguint les instruccions del fabricant.

En el cas de la molècula porcina del CD200, tant l'extrem 5' com el 3' del cDNA van ser amplificats i es va obtenir la seqüència completa del pCD200 a partir d'un transcrit de RNA total de cervell porcí. Respecte al pTNFR2, només es va aconseguir amplificar l'extrem 3' dels cDNA.

2.2.4 Clonació

A continuació el producte obtingut de l'amplificació de PCR o digestió enzimàtica, es barrejava amb tampó de càrrega 6x (Orange G diluït en un 30% glicerol) i es resolia per electroforesi en un gel d'agarosa (Pronadisa, Espanya) amb el percentatge adequat (en funció de la mida esperada del fragment). El marcador de DNA emprat és *1Kb plus ladder* (Invitrogen). La visualització del DNA es feia amb bromur d'etidi que estava inclòs en el gel d'agarosa. A continuació amb un bisturí es retallava la banda d'interès i es purificava amb el GeneClean® II Kit (Q-biogene, França) seguint les instruccions del fabricant.

Per tal d'introduir l'insert en el plasmidi corresponent es van usar diverses estratègies, en funció de l'objectiu del nostre clonatge.

2.2.4.1 Sistema topoisomerasa

Vectors pCR®2.1, pcDNA™3.1D/V5-His-TOPO® i pCR®4-TOPO.

Seguint les instruccions d'ús del fabricant, s'utilitzava el fragment de PCR purificat directament per la clonació i es transformava en cèl·lules Top 10 seguint el protocol de transformació química del fabricant.

2.2.4.2 Manipulació enzimàtica

Vectors pLXSN, pBABE, pCEP-Pu, pECFP-N1 i pEYFP-N1

Els fragments provinents d'altres vectors eren introduïts mitjançant subclonatges. S'obtenia l'insert per digestió amb enzims de restricció. El protocol era el següent:

Estudi de les vies del TNF/TNFR2 i del CD200/CD200R en el rebuig xenogènic

0,5 a 4 µg de plasmidi amb o sense l'insert d'interès (depenent de tamany de fragment purificat)

1 unitat d'enzim de restricció (Takara)

2 µl de tampó 10X corresponent a l'enzim utilitzat

Aigua destil·lada estèril fins a 20 µl

La reacció es duia a terme a 37°C durant 2 hores

Un cop purificat el plasmidi i l'insert (com s'ha descrit al començament d'aquet apartat), es procedia a la lligació en les proporcions indicades a continuació. La reacció es duia a terme a 16°C durant 16 hores.

50 ng plasmidi purificat

x⁽⁴⁾ ng insert d'interès

1 µl tampó 10X T4 DNA lligasa (Takara)

Aigua destil·lada fins 10 µl

⁽⁴⁾ La quantitat d'insert es calculava segons la formula: $X \text{ ng insert} = ((50 \text{ ng plasmidi} \times \text{kb insert}) / \text{kb plasmidi}) \times 5$

El proper pas és la transformació de cèl·lules competents Top10 o DH5α per xoc tèrmic per introduir DNA plasmídic a cèl·lules procariotes. El protocol consistia en barrejar el DNA, la meitat de la lligació, amb 25 µl de cèl·lules competents i incubar-ho durant 30 minuts en gel. A continuació es realitzava el xoc tèrmic a 42°C durant 30 segons, i es refredava immediatament en gel durant 2 minuts. El següent pas era afegir 900 µl de LB sense antibiòtic i deixar-ho a 37°C durant 1 hora a 250 rpm, després es sembrava tot el ml de cultiu en plaques de LB amb l'antibiòtic adient per seleccionar. El creixement bacterià a les plaques es realitza en una estufa a 37°C tota la nit.

El primer pas per verificar el clonatge, era picar colònies de la placa de LB i posar a créixer el cultiu de LB amb l'antibiòtic adient a 37°C durant tota la nit a 250 rpm.

L'endemà es feia una extracció de DNA plasmídic amb *Fast Plasmid Mini Kit* (5Prime, GmbH) seguint les instruccions del fabricant. Es reservava una alíquota, que es barrejava amb glicerol, concentració final 17%, i s'emmagatzemava a -80°C si es determinava que el clon contenia l'insert. Amb aquest objectiu es realitzava una digestió enzimàtica resolta amb un gel d'agarosa. Si la mida de l'insert era l'adient, es realitzava una reacció de seqüenciació pels clons seleccionats. Un cop el resultat de la clonació era verificat, per tal d'aconseguir més material, es realitzava un cultiu de 100 ml de LB amb l'antibiòtic adient. S'inoculaven 100 µl del cultiu en glicerol i es feia créixer a 37°C i 250 rpm durant tota la nit. L'endemà es feia l'extracció de DNA amb *PureLink™ HiPure Plasmid DNA Purification Kit* (Invitrogen) seguint les instruccions del fabricant.

Taula 10. Llista de constructes per estudiar el TNFR2

Plasmidi	Insert d'interès
pCR®2.1	hTNFR2e, pTNFR2fl, pTNFR2ΔE4fl
pcDNA™3.1D/V5-HisTOPO®	pTNFR2e, pTNFR2ΔE4e
pCR®4-TOPO	pTNFR2ΔE7-10, pTNFR2ΔE4 ΔE7-10
pLXSN	pTNFR2fl, pTNFR2ΔE4fl
pCEP.Pu	hTNFR2GST, pTNFR2GST, pTNFR2ΔE4GST, pTNFR2His, pTNFR2ΔE4His
pECFP-N1 i pEYFP-N1	pTNFR2tmb, pTNFR2ΔE4tmb

Taula 11. Llista de plasmidis per estudiar la via del CD200.

Plasmidi	Insert d'interès
pCR®2.1	hCD200fl, hCD200e, hCD200R1ea, hCD200R1ed, pCD200fl, pCD200e, pCD200R1fla, pCD200R1flb, pCD200R1fl c
pcDNA™3.1D/V5- HisTOPO®	hCD200e, hCD200gpi, hCD200R1fla, hCD200R1fld, hCD200R1ea, hCD200R1ed, pCD200e, pCD200R1ea
pLXSN	hCD200fl, hCD200gpi, pCD200fl, mCD200fl, hCD152hCD200fl
pCEP-Pu	hCD200GST, pCD200GST, pCD200His, hCD200RHis, pCD200RHis,

2.2.5 Seqüenciació del DNA

Per a seqüenciar el DNA es feia servir el següent protocol:

2 µl de Big Dye Ready Reaction Mix⁽⁵⁾

10 µM encebador corresponent

700 ng DNA plasmídic

2 µl Tampó x1 Big Dye

Aigua destil·lada estèril fins a 10 µl

⁽⁵⁾ Bigdye® Terminator v3.1 Cycle sequencing Kit, (Applied Biosystems, USA)

→ Condicions generals d'amplificació dels gens

Pas	Temperatura	Temps	Número de Cicles
Desnaturalització inicial	95°C	3 minuts	1
Desnaturalització	95°C	30 segons	} 32
Hibridació	50°C	1 minut	
Extensió	60°C	1 minut	
Extensió Final	68°C	10 minuts	1
Manteniment	4°C	∞	1

Els resultats es van obtenir mitjançant un seqüenciador de DNA per electroforesi i capil·lars ABIPRISM 3130XL de Applied Biosystems i es van analitzar gràcies al software Accelrys DS Gene 1.5 (Discovery Studio).

3 Anàlisi bioinformàtica

3.1 Mètodes

Diverses eines i aplicacions informàtiques van ser emprades durant la realització d'aquesta tesi doctoral. Així es van estudiar els cDNA descoberts i la seva homologia amb d'altres ja coneguts.

El *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, troba regions de similitud local entre seqüències. El programa compara seqüències nucleotídiques o proteïques amb seqüències d'una base de dades i calcula si els resultats assignats son estadísticament significatius.

El *T-Coffee*, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/t-coffee/index.html>, és un programa d'alineament múltiple de seqüències que compara totes les seqüències introduïdes de dos en dos i genera una sèrie d'alineaments, tot seguit combina tots els alineaments en un de múltiple emprant el lalign (mètode d'alineament).

L'ExpASY (**Expert Protein Analysis System**), <http://au.expasy.org/tools/#proteome>, és un servidor de proteòmica del [Swiss Institute of Bioinformatics](http://www.sib.ac.ch) (SIB) dedicat a l'anàlisi de seqüències i estructures de proteïnes. Aquest servidor té multitud d'eines per a la identificació i caracterització de proteïnes, algunes d'elles es van usar en aquesta treball.

- **Translate**, és una eina que permet la traducció d'una seqüència nucleotídica (DNA/RNA) a una proteïca.

- **Compute pI/Mw** és una programa utilitzat per l'anàlisi de l'estructura primària d'una proteïna, permet el càlcul teòric del pI (punt isoelèctric) i del PM (pes molecular).
- **SignalP 3.0 Server** preveu la presència, i la localització, del lloc de tall del pèptid senyal en seqüències aminoacídiques de diferents organismes, tant procariotes Grampositius o Gramnegatius i eucariotes. El mètode de previsió es basa en una combinació de diverses neuroxarxes artificials i models ocults de Markov.
- **SMART** és l'acrònim de *Simple Modular Architecture Research Tool*, aquesta aplicació permet la identificació i anotació de dominis genèticament mòbils i l'anàlisi de la seva arquitectura.
- **TargetP 1.1 Server** determina la localització subcel·lular de proteïnes eucariotes. Per fer aquesta previsió es fonamenta en la presència de qualsevol pre-sequència en l'extrem N-terminal, entre d'altres, el pèptid dirigit a la mitocòndria (*mitochondrial targeting peptide* mTP) o el pèptid senyal de la via secretora (secretory pathway SP). També assigna el lloc potencial del tall peptídic.
- **NetNGlyc 1.0 i NetOGlyc 3.1** per detectar els llocs potencials de N- i O-glicosilació, respectivament.

4 Northern Blot

4.1 Materials

4.1.1 Cèl·lules

Els PBMC (cèl·lules mononucleades de sang perifèrica) porcins es van aïllar de sang total mitjançant un gradient de Ficoll seguint el mètode descrit en el punt 1.2.1. Els condrocits articulars (PAC) i els costals (PCC) van ser aïllats de cartílag porcí seguint la metodologia ja publicada [Costa et al. 2003] [Sommaggio et al. 2009].

4.1.2 Sondes

Es van obtenir dues sondes per la hibridació amb el pTNFR2 mitjançant amplificació per PCR i aïllament del fragment. La primera tenia una mida de 807 pb generada pels encebadors 5' (5'-ATG GCG CCC GYC GCC STC TGG GYC GCG CTG-3') i 3' (5'-TGT CAS WCC MAC RAT CAG WCC AAY TGG AAG AG-3') i la segona més curta contenia només l'exó 4. Els blots es van deshibridar i hibridar posteriorment amb una sonda d'uns 300 pb corresponent a la β -actina com a control de càrrega de RNA, encebador 5' (5'-CCA ACT GGG ACG ACA TGG AG-3') i 3' (5'-AGG TCC AGA CGC AGG ATG GC).

4.2 Mètodes

L'anàlisi de *Northern Blot* permet detectar i quantificar el RNA específic d'un tipus cel·lular concret. L'extracció de RNA total de PBMC i PAC es va fer amb RNA Isolation TM (Genosys Biotechnologies, Inc. USA) seguint les instruccions del fabricant.

Es van carregar 10 μ g de RNA per realitzar aquest anàlisi en un gel d'agarosa. Un cop separada la mostra en diverses mides es va transferir a una membrana de nylon i el RNA es va detectar amb les sondes específiques marcades amb P^{32} dCTP (PerkinElmer) pel mètode de *random priming* amb el *Prime it II Random Primer labeling Kit* (Agilent Technologies).

5 RT-PCR quantitativa

5.1 Materials

5.1.1 RNA i cDNA

L'extracció de RNA de diferents fonts i la seva retrotranscripció a cDNA es va fer seguint el mètode explicat anteriorment en el punt 1.2.3 i 2.2.1 respectivament.

5.1.2 Encebadors i sondes taqMan

Els encebadors i les sondes taqMan es van dissenyar específicament per a cada gen d'interès amb el software *Primer Express 3.0 sequence* (Applied Biosystems).

Taula 12. Encebadors i sondes TaqMan per a la qRT-PCR de pTNFR2.

Detecció	Encebadors i sondes
Absència <i>splicing</i> exó 4	<i>Forward</i> 5'ACTCCAAAACAGAACCGCATCT 3' <i>Reverse</i> 5'CCCCAGGGTGACGTACCA 3' Sonda 5'CTCCTGCAAGCCGG3'
Presència <i>splicing</i> exó 4	<i>Forward</i> 5'TAGCTGCAACTCCCGCTGTA3' <i>Reverse</i> 5'AGGGCGCACATACCACATCT3' Sonda 5'CTCCGGAAGTGGGACAT3'
Absència <i>splicing</i> exó 7-10	<i>Forward</i> 5'GCTCAACACAGGGAACATCTCTCT3' <i>Reverse</i> 5'ACAGACCCATGGCTGTCACA3' Sonda 5'CCAATTGGACTGATCG3'
Presència <i>splicing</i> exó 7-10	<i>Forward</i> 5'CCCAGCTCAGAGTCTTACCAAGA3' <i>Reverse</i> 5'ACTCCAGGAAGAAAACAAGTTTAAATG3' Sonda 5'CTGGACTCTGTATTCCAT3'

Taula 13. Encebadors i sondes TaqMan per a la qRT-PCR de pCD200.

Detecció	Encebadors i sondes
pCD200	<i>Forward</i> 5'GGCAAAAATCAAGGCTGTGA3' <i>Reverse</i> 5'CCCCATGGTCTTGCTGAA3' Sonda 5'CCCAGAAAACATGATCA3'

5.2 Mètodes

La PCR a temps real es basa en la reacció de la polimerasa en cadena, però en aquest cas ens permet detectar i quantificar de manera absoluta i relativa seqüències específiques d'una mostra en concret. La clau d'aquesta tècnica és l'ús de sondes marcades amb dos fluoròfors: el *reporter* a l'extrem 5' que normalment és un marcador de longitud d'ona curta com el fluoròfor 6-*carboxyfluorescein* (FAM) i el *quencher* a l'extrem 3' que acostuma a ser un marcador de longitud llarga com el *tetramethylrhodamine* (TAMRA). La proximitat del *quencher* redueix la fluorescència del *reporter* a través de la transferència d'energia de ressonància de Förster. Durant el procés d'amplificació es degrada la sonda Taqman®, separant així el reporter del quencher, i permetent l'emissió de fluorescència.

Les reaccions es van dur a terme amb 25 µl de volum final i les concentracions finals dels components de la barreja de reacció van ser:

12,5 µl TaqMan Universal PCR Master Mix No AmpErase UNG (Applied Biosystems)

50 nM de cadascun dels encebadors (Invitrogen)

200 nM sonda TaqMan (Applied Biosystems)

1 µg cDNA

Fins a 25 µl d'aigua estèril

Per fer la recta patró es van utilitzar els següents plasmidis.

pcDNA™3.1-pTNFR2e

pcDNA™3.1-pTNFR2ΔE4e

pCR@2.1-pTNFR2 fl

pCR@4-pTNFR2Δ7-10

El banc de dilucions comprenia entre 10^4 i 10^1 molècules totals. el càlcul es va fer segons la fórmula que s'indica a continuació amb un exemple. Aquests càlculs es van aplicar a la resta de plasmidis usats per a les rectes patrons.

Estudi de les vies del TNF/TNFR2 i del CD200/CD200R en el rebuig xenogènic

pcDNA™3.1-pTNFR2e → 6268 pb

330 Da per nucleòtid ≈ 660 Da per pb ≈ 660 g/mols

Pes Molecular (PM) pcDNA™3.1-pTNFR2e → PM= 660 Da per pb x 6268 pb = 4,41x10⁶ Da

Número Avogadro= 6,022x10²³ molècules /mol

1,8 µg/µl template x (1g/10⁶ µg)x(1mol/4,14x10⁶ gr) x (6,022x10²³molècules/mol) = 2,6 10¹¹ molècules / µl

→ Condicions generals d'amplificació

Pas	Temperatura	Temps	Número de Cicles
AmpErase UNG activation	50°C	2 minuts	1
Desnaturalització inicial	95°C	10 minuts	1
Desnaturalització	95°C	15 segons	40
Hibridació	60°C	1 minut	

Els resultats es van analitzar amb el software *7300 System SDS* (Applied Biosystems).

6 Expressió, anàlisi i purificació de proteïnes recombinants.

6.1 Materials

6.1.1 Plasmidis

Segons l'objectiu es van utilitzar diferents plasmidis per obtenir expressió de proteïnes en superfície o bé produir-les en forma soluble.

Taula 14. Plasmidis emprats per a l'expressió en superfície de TNFR2.

Plasmidi	Molècules
pEYFP-N1	pTNFR2tmb / pTNFR2ΔE4tmb
pECFP-N1	pTNFR2tmb / pTNFR2ΔE4tmb
pLXSN	pTNFR2

Taula 15. Plasmidis emprats per a la producció en forma soluble de TNFR2.

Plasmidi	Molècules
pCEP-Pu	pTNFR2-GST / pTNFR2ΔE4-GST / hTNFR2-GST

Taula 16. Plasmidis emprats en l'expressió de superfície del CD200.

Plasmidi	Molècules
pLXSN	pCD200 / hCD200
pCEP-Pu	pCD200/pCD200Ra

Taula 17. Plasmidis utilitzats en la producció soluble de diverses molècules de la via de CD200.

Plasmidi	Molècules
pCEP-Pu	pCD200-GST / hCD200-GST / mCD200-GST / pCD200R-GST / hCD200R1a-GST / hCD200R1d-GST

6.1.2 Línies cel·lulars

293-EBNA de ronyó embrionari humà i que expressen EBNA-1 (proteïna que dirigeix la replicació episomal dels plasmidis que contenen oriP).

HeLa, de carcinoma epitelial de cèrvix humà.

PAEC, d'endoteli aòrtic porcí van ser adquirides a l'*European Collection of Cell Cultures (ECACC)*.

PA317, es una línia cel·lular empaquetadora que conté la proteïna env amfotròpica d'un retrovirus murí. Aquesta línia va ser adquirida a l' *European Collection of Cell Cultures (ECACC)*.

PG13, es una línia cel·lular empaquetadora derivada de fibroblast murins i conté el retrovirus GaLV.

NIH 3T3, és una línia cel·lular fibroblàstica murina.

L35, és una línia cel·lular limfoblastoide porcina.

CHO, és un línia cel·lular derivada de cèl·lules d'ovari de hàmmster xinès.

6.1.3 Medis de cultiu

Totes les línies es van créixer en medi DMEM (*Dulbecco's modified eagle medium*), 4,5 g/l glucosa i L-glutamina (Invitrogen) suplementat amb un 10% (v/v) de sèrum boví fetal (FBS), 200 unitats/ml de penicil·lina i 200 µg/ml d'estreptomicina. El medi de les PAEC es va complementar amb mitogen endotelial 50 mg/ml (Biomedical Technologies Inc), i les 293-EBNA es cultivaven amb un suplement de geneticina G418 sulfat 150 µg/ml (Invivogen)

6.2 Mètodes

6.2.1 Transfecció

Per transfectar les diverses línies cel·lulars amb els plasmidis corresponents es va usar dos mètodes diferents. En el cas de les cèl·lules 293-EBNA i PA317 es va usar lipofectamina 2000 (Invitrogen) seguint les instruccions del fabricant. Per les cèl·lules HeLa es va emprar polietilenamina, *Polyethylenimine linear* (Polysciences). En aquest cas, es va incubar la mescla de transfecció indicada a continuació, amb les cèl·lules durant 4-6 hores a 37°C i 5%CO₂. Després de 48 h en duien a terme els assajos corresponents.

8 µg plasmidi corresponent

48 µl de PEI (1mg/ml)

Fins a 100 µl de medi sense antibiòtic

Incubació de la mescla durant 5 minuts a temperatura ambient

Addició de 900 µl de medi sense antibiòtic

6.2.2 Infecció de PAEC i PCC

Per infectar les cèl·lules primàries porcines, primer es van produir les partícules víriques. Per això, es transfectava la línia cel·lular empaquetadora de virus PA317 o PG13, amb el plasmidi pLXSN sol o amb el cDNA d'interès.

A les 48 h es recollia el sobrenedant que contenia les partícules infectives i es filtrava amb un filtre de 0,45 µm. A partir d'aquí, s'afegia medi amb selecció de geniticina 500 µg/ml per tal d'obtenir una línia cel·lular estable i recollir més sobrenedants. Per comprovar l'eficàcia dels virus produïts s'infectaven cèl·lules NIH3T3 i es contaven els clons generats en selecció. Es seguia un protocol similar per totes les cèl·lules, incloses PAEC i PCC, que s'ajustava segons la superfície cultivada.

El protocol d'infecció per un flascó T75 (75 cm² de superfície) amb un 50-60% de confluència es realitzava barrejant 5 ml de medi DMEM amb 10% v/v FBS, un ml de sobrenedant infectiu i 8 µg/ml *polybrene* (*Hexadimethrine bromide*, Sigma). Passades entre 4 i 6 hores es retirava el medi i es substituïa per medi DMEM 10% FBS amb mitogen. Per tal de seleccionar les cèl·lules infectades després de 48 h es posava l'antibiòtic de selecció al medi, geniticina 500 µg/ml.

6.2.3 Purificació de proteïnes recombinants solubles

Per a produir proteïnes recombinants solubles, es va transfectar un tipus cel·lular, les 293-EBNA amb els plasmidis de les taules 15 i 17, tal i com es descriu en el punt 5.2.1. Un cop les cèl·lules transfectades ja estaven seleccionades, es va recollir el sobrenedant cada 48 h i es va filtrar amb un filtre de 0,45 µm (Sarsted) per eliminar les possibles restes cel·lulars. A continuació, es va procedir a purificar el sobrenedant en *batch*, amb *Bulk GST Purification Module* (GE Healthcare), seguint les instruccions del fabricant. Aquest és un sistema de purificació per afinitat que usa una reïna de Glutatió-Sepharosa-4B i unes condicions d'elució suaus (10 mM glutatió) que assegurin la funcionalitat i antigenicitat de les proteïnes.

Un cop la proteïna era eluïda es procedia a concentrar la mostra gràcies als Amicon® (Millipore) amb un tall de 50 kDa. Tot seguit amb una columna Protein Desalting (Pierce) es va fer un canvi de tampó a PBS (Phosphate buffer saline), ja que la proteïna havia estat eluïda amb glutatió. La concentració de la mostra es va determinar amb *MicroBCA™ Protein Assay Kit* (Pierce) seguint les instruccions del fabricant.

6.2.4 Electroforesi de proteïnes i Western Blot

La comprovació de la purificació es duia a terme mitjançant una electroforesi amb un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Les mostres purificades es bullien durant 5 minuts a 95°C juntament amb un tampó de càrrega incloent entre altres reactius SDS (dodecil sulfat sòdic) i β -mercaptoetanol per obtenir condicions reductores. Les mostres es desnaturalitzaven i carregaven negativament, permetent una migració proporcional a la massa de la proteïna. El gel de poliacrilamida té dos parts, el gel concentrador que permet que les mostres comencin des del mateix punt la migració i el gel separador que resol segons el pes molecular de la proteïna. En general, el gel separador utilitzat contenia poliacrilamida al 10%, i es resolgia durant 90 minuts a 110 V. A partir d'aquí es portava a terme una d'aquestes dues opcions:

- **Tinció del gel:** La tinció del gel es feia amb una solució fixadora colorant amb Blau de Coomassie durant 20 minuts, i després es destenyia amb una solució amb àcid acètic i metanol.
- **Transferència de Western:** La primera vegada que es resolien les mostres es realitzava una electrotransferència en semi-sec a una membrana Immobilon-P (Immobilon transfer Membrane pore size 0.45 μ m, Millipore), durant 45 minuts a 300 mA.

Després de bloquejar la membrana transferida durant tota la nit a 4°C amb una solució de TTBS (TBS (150 mM NaCl i 50 mM Tris.HCl pH 7,4) Tween 10% i H₂O) i un 5% de llet, es feia una hibridació amb l'anticòs primari durant dues

hores a temperatura ambient i una incubació amb un anticòs secundari si era necessari.

La detecció de les proteïnes es feia amb un sistema de quimioluminescència usant *ECL Western blotting detection* (GE healthcare) i exposant les membranes en un film *High performance chemiluminescence film* (Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare) durant un temps variable.

Taula 18. Anticossos utilitzats per Western Bot de proteïnes CD200 i receptor.

Anticòs	Tipus	Origen	Dilució
α CD200 humà (OX-104) (Serotec)	Monoclonal	Ratolí	1/2000
α CD200 Receptor humà (OX-108) (Serotec)	Monoclonal	Ratolí	1/2000
α GST-HRP (Amersham)	Policlonal	Cabra	1/2000
α IgG murí HRP (invitrogen)	Policlonal	Cabra	1/2000

Taula 19. Anticossos utilitzats per Western Blot de proteïnes TNFR2

Anticòs	Tipus	Origen	Dilució
α porcí TNFR2 (ALP79) (Alexion)	Policlonal	Conill	1/2000
α GST-HRP	Policlonal	Cabra	1/2000
α IgG murí HRP	Policlonal	Cabra	1/2000

6.2.5 Citometria de flux

És una tècnica que permet analitzar diferents paràmetres d'una cèl·lula en suspensió en un fluid a través d'un aparell electrònic de detecció òptica. Bàsicament es poden obtenir els següents paràmetres, mida de la cèl·lula, complexitat de la membrana cel·lular i emprant anticossos i fluorocroms, es pot avaluar si les cèl·lules posseeixen els antígens complementaris als anticossos usats.

Els estudis de citometria de flux d'aquesta tesi doctoral els vam dur a terme al Servei Científic-Tècnic del campus de Bellvitge de la Universitat de Barcelona amb un citòmetre de flux analitzador FACScalibur amb el làser 488.

Els anticossos utilitzats per detectar les molècules d'interès estan especificats al punt corresponent.

6.2.6 Estudis de crosreactivitat d'anticossos anti-CD200 comercials

Per a aquest estudi es va infectar la línia cel·lular NIH 3T3 amb pLXSN-hCD200fl i pLXSN-pCD200fl. L'antibiòtic per a seleccionar les cèl·lules positives va ser G418 (350µg/ml). L'anàlisi dels resultats es va realitzar per citometria de flux.

Taula 20. Anticossos emprats per l'anàlisi.

Anticòs	Tipus	Origen	Dilució
α CD200 humà (BD Pharmingen)	Monoclonal	murí	1/10
α CD200 humà (Immunokontakt)	Monoclonal	murí	1/100
α CD200 rata (BD Pharmingen)	Monoclonal	murí	1/10
α CD200 rata (Immunokontakt)	Monoclonal	murí	1/2000
α IgG murí FITC (Invitrogen)	Policlonal	cabra	1/100
α IgM murí FITC (Invitrogen)	Policlonal	cabra	1/100

L'expressió del pCD200 es va comprovar inicialment fent una extracció de RNA, tal i com es descriu en el punt 1.2.3. de les cèl·lules infectades i una PCR amb encebadors específics mostrats en la taula 7 per pCD200. Quan vam disposar dels anticossos policlonals produïts en el laboratori (punt 5.2.5), les mateixes cèl·lules PAEC infectades, o les transfectades CHO i 293-EBNA, es van analitzar per citometria de flux.

6.2.7 Producció d' anticossos anti-pCD200 i anti-pCD200R

Primer es van produir anticossos antipeptid pel CD200 porcí i pel receptor del CD200 porcí a través de l'empresa EZbiolab. Es van seleccionar unes seqüències peptídiques de 15 aminoàcids de longitud per a cada molècula, usant el seu servei de disseny de peptids basat en el mètode de Kolaskar i Tongaonkar [Kolaskar et al. 1990]. El protocol d'immunització es va realitzar en conills durant 10 setmanes, i es va purificar l'antipeptid amb la precipitació d'amoni sulfat.

Taula 21. Seqüències peptídiques emprades per la generació d'antipeptids

Molècula	Seqüència peptídica
pCD200	LHYKLSAQQLNITCS
pCD200R	TLVQSENGTVVCKAV

La producció d'anticossos policlonals contra els dominis extracel·lulars complets es va realitzar a continuació en conills de la soca New Zealand a la Unitat d'Experimentació d'Animals de Bellvitge. El primer pas fou produir i purificar les proteïnes recombinats (pCD200-GST i pCD200R1-GST), seguint la mateixa metodologia del punt 5.2.1 i 5.2.3. A més a més, es va constatar l'absència d'endotoxines a les mostres amb un test LAL (Limulus Amebocyte Lysate). Seguidament, just abans de cada injecció es barrejaven 300 µg de proteïna amb l'adjuvant complet o incomplet de Freund (Sigma) formant una emulsió en una relació 1:1 en volum per la seva administració via subcutània.

El protocol d'immunització que es va seguir estava distribuït per setmanes. Es van injectar 2 conills per cada proteïna purificada. Primerament es va fer una extracció de sang de la vena de l'orella per obtenir sèrum pre-immune. La primera injecció es va fer amb 300 µg de proteïna recombinant amb adjuvant complet de Freud (temps 0 de protocol). Dues setmanes després es repetia la injecció. Durant la quarta setmana es va fer la primera extracció de sang de la vena de l'orella per l'obtenció d'antisèrum. La propera injecció de proteïna

recombinant es va realitzar a la cinquena setmana amb adjuvant incomplet de Freud i durant la següent setmana es feu l'extracció de sang de l'orella per l'obtenció de sèrum. Durant la setena setmana es va procedir a l'última injecció de proteïna amb adjuvant incomplet de Freud i finalment a la vuitena setmana es va realitzar l'extracció terminal de sang per punció intracardíaca amb l'animal anestesiàt.

L'obtenció de sèrum de totes les mostres de sang es va fer mantenint les mostres a temperatura ambient durant 30 minuts, després es deixava una hora a 4°C fins que la sang es coagulés totalment. A continuació es centrifugava 10 minuts a 5000 rpm i 4°C. El sobrenedant obtingut es traspassava a un tub nou i es tornava a centrifugar en les mateixes condicions. Finalment el sobrenedant d'aquesta segona centrifugació s'emmagatzemava a -80°C.

L'eficàcia dels anticossos generats es va testar mitjançant western blot de proteïnes purificades, o mitjançant citometria de flux de cèl·lules que sobreexpressaven les molècules porcines.

7 Localització subcel·lular i FRET

7.1 Materials

7.1.1 Plasmidis

En aquests assajos es van usar els plasmidis pEYFP-N1-pTNFR2tmb, pEYFP-N1-pTNFR2ΔE4tmb, pECFP-N1-pTNFR2tmb i pECFP-N1-pTNFR2ΔE4tmb. Aquests plasmidis contenen la *enhanced yellow fluorescent protein* (EYFP) o la *enhanced cyan fluorescent protein* (ECFP), que són els fluorocroms situats en l'extrem N terminal de les proteïnes de fusió que ens permetran fer estudis de localització.

7.1.2 Línies cel·lulars i medis de cultius

Per aquest assajos es van utilitzar cèl·lules 293-EBNA i HeLa que van ser crescudes amb DMEM i 10% FBS. Les cèl·lules PAEC es van créixer amb DMEM 10% FBS complementat amb 50 mg/ml de mitogen. Els medis es van preparar com es descriu en el punt 6.1.3.

7.2 Mètodes

7.2.1 Localització subcel·lular i Immunofluorescència

El creixement de línies cel·lulars es va fer en plaques de 6 pous, que contenien un cobreobjectes de 12 mm de diàmetre, fins a una confluència del 50% en HeLa i un 90% en 293-EBNA i PAEC. La transfecció de les cèl·lules 293-EBNA i les HeLa, i la infecció de les PAEC es van fer com es descriu en els punts 6.2.1 i 6.2.2 respectivament. Les cèl·lules HeLa transfectades es van tractar també amb hTNF α (20ng/ml) a diferents temps (5 minuts, 10 minuts, 15 minuts, 14 hores i 24 hores).

Per la immunodetecció, les cèl·lules es van fixar amb paraformaldehid en PBS al 4% durant 30 minuts a 4°C i tot seguit es va bloquejar i permeabilitzar amb un solució de PBS més un 20% de FBS i Tritó X100 0,2%. Cada cobreobjectes es va incubar durant 2 hores amb l'anticòs primari corresponent dissolt amb PBS 1% FBS i 0.2% Tritó x-100. Després de fer rentats amb PBS a baixa agitació, s'afegí l'anticòs secundari 45 minuts (també dissolt com el primari). Els cobreobjectes es van muntar en els portaobjectes amb medi de muntatge Mowiol 4-88 (Calbiochem). En el cas de cèl·lules marcades amb ER-Tracker™ Blue-White DPX, aquestes van ser analitzades sense fixar ja que fixar-les feia que el marcatge perdés fluorescència. També es van usar diferents marcadors químics seguint les indicacions del fabricant. El procés d'anàlisi es va fer al Servei Científic Tècnic de la Universitat de Barcelona (Unitat de Microscopia - Hospital Clínic) amb un microscopi confocal espectral d'alta velocitat i multifotó

Leica TCS-SP5. La quantificació de la co-localització es va realitzar mitjançant el programa ImageJ (National Institutes of Health).

Taula 22 . Anticossos emprats per a la localització subcel·lular.

Anticòs	Tipus	Origen	Dilució
Anti-pTNFR2 (Alexion Pharmaceuticals)	Policlonal	Conill	1/300
ER-Tracker™ Blue-White DPX (Invitrogen)	Secret	Secret	1/2000
Anti-calnexina murina (AbCam)	Monoclonal	Cabra	1/1000
Anti-IgG murí FITC (Invitrogen)	Policlonal	Cabra	1/500
Anti-IgG conill FITC (Invitrogen)	Policlonal	Cabra	1/500
Alexa Fluor 647 anti-IgG conill (Invitrogen)	Policlonal	Pollastre	1/500

Taula 23. Marcadors químics.

Marcador	Unió
Dapi (Fluka)	S'uneix al DNA amb fluorescència ultraviolada
Draq5 (Biostatus Ld)	S'uneix al DNA amb fluorescència de vermell llunyà
Phalloidin-TRICT (Sigma)	Marca els filaments d'actina amb isotiocianat de tetrametil rodamina

7.2.2 FRET (*Förster resonance energy transfer*)

La tècnica es fonamenta en la transferència d'energia de ressonància de Förster, un mecanisme de transferència d'energia entre cromòfors molt propers (10-100Å), i on l'espectre d'emissió de fluorescència del donador s'ha de solapar un 30% amb l'espectre d'admissió de l'acceptador. En el nostre cas es va usar la tècnica *Acceptor Photobleaching*, basada en l'extinció de la fluorescència del cromòfor acceptador i en el conseqüent augment de la intensitat d'emissió del cromòfor donador. Breument, es destrueix la transferència d'energia de ressonància de Förster excitant molt l'acceptador,

aquest és incapaç d'absorbir més fotons. Per tant, quan s'excita el cromòfor donador la intensitat d'emissió augmenta respecte a quan es produïa FRET ja que els fotons que emet ja no poden ser absorbits per l'acceptor.

En aquests assajos es va determinar que l'acceptador fóra el el pTNFR2-EYFP, i el donador el pTNFR2 Δ E4-ECFP o pTNFR2-ECFP com a control positiu.

Per aquest experiment es van usar 293-EBNA que es van transfectar amb diverses combinacions de plasmidis per tal de tenir tots els controls necessaris. Les cèl·lules es van créixer en plaques de 6 pous que contenien un cobreobjectes de 12 mm de diàmetre, fins a una confluència del 90% en 293-EBNA . La preparació de les mostres es va fer seguint el protocol descrit en el punt 7.2.1. L'anàlisi es va dur a terme al Servei Científicotècnic de la Universitat de Barcelona (Unitat de Microscòpia -Hospital Clínic) amb un Microscopi confocal espectral Leica TCS-SL .

Taula 24. Transfeccions per l'estudi de FRET.

Transfeccions
293-EBNA
293-EBNA pECFP-N1
293-EBNA pEYFP-N1
293-EBNA pECFP-N1-pTNFR2 Δ E4tmb
293-EBNA pEYFP-N1-pTNFR2 Δ E4tmb
293-EBNA pECFP-N1-pTNFR2 Δ E4tmb + pEYFP-N1- pTNFR2tmb
293-EBNA pECFP-N1-pTNFR2tmb
293-EBNA pEYFP-N1- pTNFR2tmb
293-EBNA pECFP-N1-pTNFR2tmb + pEYFP-N1- pTNFR2tmb

8 Ressonància de plasmó de superfície

8.1 Materials

8.1.1 Plasmidis

Els vectors emprats en aquest experiment, Taula 15 i Taula 17 del punt 6.1.1, són especialment indicats per l'expressió de proteïnes recombinants. Els clonatges es van fer seguint la metodologia explicada en el punt 2.2.4. En concret, es van dissenyar proteïnes de fusió que permetessin la seva purificació en un sistema senzill com el de la Glutació S Transferasa (GST). Amb aquest objectiu s'introduïa la porció extracel·lular dels cDNA d'interès fusionada davant la GST en el mateix ordre de lectura. Com totes les proteïnes que hem estudiat aquí són de tipus I, la porció extracel·lular queda a l'extrem amino i la GST amb el codó stop a l'extrem C-terminal.

8.1.2 Línies cel·lulars i medis de cultiu

Es van emprar cèl·lules 293-EBNA i es van créixer en medi DMEM i 10% FBS tal i com s'explica en el punt 6.1.3.

8.2 Mètodes

8.2.1 Transfecció

Les transfeccions es van dur a terme tal i com es descriu en el punt 6.2.1, amb lipofectamina 2000 (Invitrogen) en flascons T25 (25cm² de superfície) i partint de 10 µg de DNA.

Per tal d'obtenir un línia estable, es va afegir al medi de cultiu puromicina 1.5 µg/ml (Invitrogen) 48 h després de la transfecció.

8.2.2 BIAcore

La ressonància de plasmó de superfície és un fenomen generat per la incidència de llum polaritzada sobre una superfície metàl·lica en un angle determinat. Part de la llum és reflexada, mentre que una altra part és absorbida pels electrons de la superfície metàl·lica, així es propaga un camp elèctric a través de la superfície creant la zona evanescent.

L'angle de llum que genera la mínima reflexió de llum observada, és conegut com l'angle de ressonància i és directament proporcional a l'índex refractiu de la solució que està en contacte amb la superfície. Es mesura l'angle de ressonància i la variació d'aquest angle causada pels canvis en l'índex refractiu de la solució. Quan s'uneix una molècula a la superfície, modifica la massa de l'índex refractiu de la solució, provocant un canvi en l'angle que comporta una senyal mesurable. La quantitat necessària per una canvi en l'angle de ressonància és directament proporcional a la massa unida.

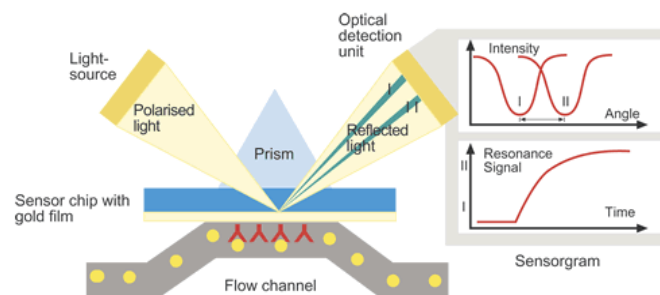


Figura 43. Esquema del fenomen de ressonància de superfície de plasmó

Els estudis de ressonància de plasmó de superfície es van realitzar al servei científicotècnic de la Universitat de Barcelona (Parc Científic de Barcelona) amb un BIAcore T100 a 37°C. Els xips CM5 (BIAcore) utilitzats contenen una làmina d'or recoberta de dextrans carboximetilat on s'hi uneixen les molècules de forma covalent. El procés d'obtenció i anàlisi de les proteïnes recombinants utilitzades en aquests experiments es descriu en els punts 6.2.3 i 6.2.4.

Es van aplicar dos sistemes d'immobilització al xip, un d'unió directe i l'altre fent servir un anticòs anti-GST. En el cas de la unió directe, les unions covalents

dels receptors pTNFR2-GST i hTNFR2-GST es van fer a través de la formació d'un enllaç amida entre els grup amino de les proteïnes i els grups carboxil de la superfície del sensor. Això pot condicionar l'orientació de la proteïna i no tenim coneixement de l'orientació que prenen sobre el xip, que es considera aleatòria. Aquesta aproximació va ser usada per immobilitzar els CD200.

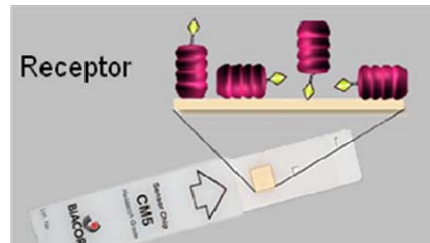


Figura 44. Esquema de la immobilització no orientada del lligand a través d'unions covalents.

En el cas del pTNFR2 Δ E4 es va haver de dirigir l'orientació del receptor a través de la unió prèvia de l'anticòs GST (0,8 mg/ml), ja que sense aquest pas, la unió d'aquesta proteïna a la matriu era molt difícil. El pTNFR2-GST i el hTNFR2-GST es van unir de la mateixa manera per comparar els resultats.

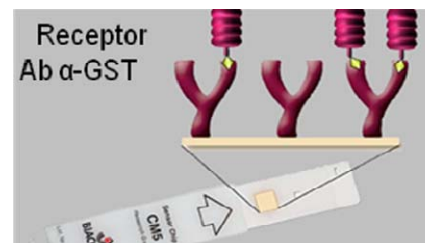


Figura 45. Esquema de la immobilització del lligand a través de l'anticòs GST.

Per tal d'immobilitzar les proteïnes al xip CM5 després d'activar-lo seguint les instruccions del fabricant, es va determinar el *pH scouting*, és a dir a quin pH la proteïna s'uneix millor al xip. La matriu està carregada negativament, per tant és recomanable que la solució on hi ha el lligand estigui per sota del punt isoelèctric (pI), per afavorir la seva càrrega positiva. Es van acoblar diferents lligands en quantitats diferents (unitats de resposta RU), que havien estat diluïts

fins a 0,5 μM amb Maleat 5 mM o amb sodi acetat 10 mM. S'indiquen en la taula 25 i 27 les condicions finalment seleccionades. Un dels canals del xip era usat com a control, la matriu era activada i desactivada, però no s'hi unia cap molècula.

Taula 25. Lligands TNFR2 immobilitzats al xip.

Lligand	<i>pH Scouting</i>	RU immobilitzades
pTNFR 2-GST	pH=6 Maleat 5 mM	1300
pTNFR2 Δ E4-GST	pH=6 Maleat 5 mM	450 (orientat)
hTNFR2-GST	pH=6 Maleat 5 mM	4000

Taula 26. Analits pels estudis d'afinitat del TNFR2.

Analit	Concentracions (nM)
hTNF α (R&D Systems)	58 / 29 / 14,5 / 7,25 / 1,85
pTNF α (R&D Systems)	116 / 58 / 29 / 14,25 / 7,25

Taula 27. Lligands CD200 immobilitzats al xip.

Lligand	<i>pH Scouting</i>	RU immobilitzades
hCD200-GST	pH= 5,5 Sodi acetat 10 mM	3036
pCD200-GST	pH= 5,5 Sodi acetat 10 mM	1740
mCD200-GST	pH= 5,5 Sodi acetat 10 mM	1800

Taula 28. Analits pels estudis d'afinitat del CD200.

Analit	Concentracions (μM)
hCD200Ra-GST	0,28 / 0,14 / 0,07 / 0,0375 / 0,0095
hCD200Rd-GST	0,6 / 0,28 / 0,14 / 0,07 / 0,0375 / 0,0095
pCD200Ra-GST	0,28 / 0,14 / 0,07 / 0,0375 / 0,0095

El tampó en el qual es va diluir l'analit, i per tant el que es va usar en l'experiment era el HBS-N (10 mM HEPES [pH 7,4], 150 mM NaCl) pels TNFR2, i el HBS-EP (10 mM HEPES [pH 7,4], 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, i 0,005% vol/vol P20) pel CD200. És important ressaltar que totes les mostres i tampons eren filtrats immediatament abans de fer-los servir per tal d'evitar qualsevol tipus d'agregats. A les taules 26 i 28 es presenten les concentracions testades. Cadascuna d'elles va ser assajada dues o tres vegades per confirmar els resultats.

Es van fer servir uns temps d'injecció del analits entre 200 i 300 segons a un flux de 20 µl/minut. La senyal de ressonància, unitats de resposta RU, es va registrar en temps real mentre l'analit passava en solució. Per analitzar el resultat es va restar aquesta senyal de l'obtinguda al canal control. Una vegada el senyal control estava restat, la diferència entre les senyals d'abans i la de després d'injectar l'analit, es relacionava amb la quantitat d'analit unit als diferents lligands. Els resultats van ser analitzats amb el software Biaeval propi del Biacore.

9 Assaig de *Pull down*

9.1 Materials

9.1.1 Plasmidis

Per aquest assaig vam necessitar dos tipus de plasmidis, un que contingués un GST i un altre que contingués una cua d'histidines. Els clonatges es van fer seguint la metodologia explicada en l'apartat de clonatges.

Taula 29. Plasmidis emprats en el *pull down*

GST tag	His tag
pCEP-Pu pTNFR2GST	pCEP-Pu pTNFR2His
pCEP-Pu pTNFR2ΔE4GST	pCEP-Pu pTNFR2ΔE4His

9.1.2 Línies cel·lulars i medis de cultius

Per aquest assaig és van usar cèl·lules 293-EBNA, que es van créixer en DMEM 10 % FBS tal i com es descriu en el punt 6.1.3.

9.2 Mètodes

9.2.1 Transfecció

Les transfeccions es van dur a terme tal i com es descriu en el punt 6.2.1, amb lipofectamina 2000 (Invitrogen) en flascons T25 (25 cm² de superfície) i partint de 10 µg de DNA. Per tal d'obtenir una línia estable 48 h després de la transfecció, es va afegir al medi de cultiu puromicina 1,5 µg/ml (Invivogen). Un cop la línia cel·lular ja estava seleccionada, es realitzava una segona transfecció de forma transitòria amb l'altre variant de TNFR unida al *tag* diferent.

Taula 30. Combinacions de plasmidis per les transfeccions del *pull down*.

Transfecció estable	Transfecció transitòria	Tipus
pCEP-Pu-pTNFR2-GST o His	-	Control
pCEP-Pu-pTNFR2ΔE4-GST o His	-	Control
pCEP-Pu-pTNFR2-GST	pCEP-Pu-pTNFR2ΔE4-His	Pull down
pCEP-Pu-pTNFR2ΔE4-GST	pCEP-Pu-pTNFR2-His	Pull down
pCEP-Pu-pTNFR2-His	pCEP-Pu-pTNFR2ΔE4-GST	Pull down
pCEP-Pu-pTNFR2ΔE4-His	pCEP-Pu-pTNFR2-GST	Pull down
pCEP-Pu-pTNFR2-His	pCEP-Pu-hCD200-GST	Control d'unió específica
pCEP-Pu-pTNFR2ΔE4-His	pCEP-Pu-hCD200-GST	Control d'unió específica

El procediment de purificació és idèntic al descrit en l'apartat 6.2.3. Breument, el sobrenedant de cèl.lules transfectades es passava per un filtre 0,45 µm per treure possibles restes cel.lulars del medi, tot seguit es purificava en *batch* amb un sistema d'afinitat amb una reïna de Glutatió-Sepharosa-4B i unes condicions d'elució suaus. Per últim, es realitzava una concentració de la mostra amb Amicon® (Millipore) amb un tall de 50 KDa

Un cop la mostra estava preparada, es separava per electroforesi en gel de poliacrilamida i es procedia a fer la transferència de Western.

Taula 31. Anticossos emprats en el *pull down*

Anticòs	Tipus	Origen	Dilució
Anti-GST-HRP (GE healthcare)	Policlonal	Cabra	1/2000
THE™ anti-His (GenScript)	Monoclonal	Murí	1/5000
Anti-IgG –HRP murí (Invitrogen)	policlonal	Cabra	1/5000

10 Estudis funcionals

10.1 Materials

10.1.1 Línies cel·lulars

PAEC d'endoteli aòrtic porcí van ser adquirides a l' *European Collection of Cell Cultures (ECACC)*.

NIH 3T3, línia cel·lular embrionària fibroblàstica murina.

PA317 es una línia cel·lular empaquetadora que conté la proteïna env amfotròpica d'un retrovirus murí. Aquesta línia va ser adquirida a l' *European Collection of Cell Cultures (ECACC)*

10.1.2 Medis de cultius

Les cèl·lules PAEC es van créixer en medi DMEM 10% FBS complementat amb mitogen endotelial 25 mg/ml.

Les línies cel·lulars NIH 3T3 i PA317 es van créixer en medi DMEM 10% FBS.

10.1.3 Plasmidis

Per aquest tipus d'assajos es van fer servir diversos plasmidis que es resumeixen en la següent taula.

Taula 32. Plasmidis utilitzats per a estudis funcionals

Plasmidis amb CD200	Plasmidis amb pTNFR2
pLXSN	pCEP-Pu
pLXSN-hCD200fl	pCEP-Pu-pTNFR2-GST
pLXSN-pCD200fl	pCEP-Pu-pTNFR2 Δ E4-GST
-	pCEP-Pu-hTNFR2-GST

10.1.4 Proteïnes purificades

Es van usar les mateixes proteïnes de fusió purificades que pels experiments d'afinitat del projecte TNFR2: pTNFR2-GST, pTNFR2 Δ E4-GST i hTNFR2-GST (procediment descrit en l'apartat 6.2.2 d'aquest capítol). Els receptors porcins es van utilitzar a 50 μ g/ml i l'humà a 10 μ g/ml.

10.2 Mètodes

10.2.1 Estudi funcional del pTNFR2 i pTNFR2 Δ E4 solubles

Un cop les cèl·lules van arribar a la confluència es va afegir o no, hTNF α a 10 ng/ml i les proteïnes purificades en diferents combinacions indicades a continuació:

Estudi de les vies del TNF/TNFR2 i del CD200/CD200R en el rebuig xenogènic

pTNFR2-GST 50 µg/ml

pTNFR2ΔE4-GST 50 µg/ml

pTNFR2-GST 50 µg/ml + pTNFR2ΔE4-GST 50 µg/ml⁽⁶⁾

hTNFR2-GST 10 µg/ml

Durant 24h en un incubador a 37°C i 5%CO₂

⁽⁶⁾Les proteïnes es van mesclar prèviament durant 15 minuts a temperatura ambient

A continuació es va procedir a analitzar l'activació de la cèl·lules fent servir els marcadors SLAI i VCAM-1 detectats amb anticossos específics mitjançant un estudi de citometria de flux.

Taula 33. Anticossos utilitzats per l'estudi funcional.

Anticòs	Tipus	Origen	Dilució
α SLA I porcí PT85A (VMRD)	Monoclonal	mouse	1/100
α VCAM-1 porcí (Alexion)	Monoclonal	mouse	1/100
α IgG murí FITC (Invitrogen)	Policlonal	cabra	1/100

Bibliografia

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. 2008. Cellular And Molecular Immunology. Elsevier Science Health Science Div

Aderka D, Englemann H, Hornik V, Skornick Y, Levo Y, Wallach D, Kushtai G. 1991. Increased serum levels of soluble receptors for tumor necrosis factor in cancer patients. *Cancer research* [Internet] 51:5602-7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1655258>

Afonso CL, Tulman ER, Lu Z, Zsak L, Osorio FA, Balinsky C, Kutish GF, Rock DL. 2002. The genome of swinepox virus. *Journal of virology* [Internet] 76:783-90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11752168>

Al-Lamki RS, Brookes AP, Wang J, Reid MJ, Parameshwar J, Goddard MJ, Tellides G, Wan T, Min W, Pober JS, et al. 2009. TNF receptors differentially signal and are differentially expressed and regulated in the human heart. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* [Internet] 9:2679-96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19788501>

Al-Lamki RS, Wang J, Vandenabeele P, Bradley JA, Thiru S, Luo D, Min W, Pober JS, Bradley JR. 2005. TNFR1- and TNFR2-mediated signaling pathways in human kidney are cell type-specific and differentially contribute to renal injury. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* [Internet] 19:1637-45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16195372>

Alsalamah S, Mattka B, Al-Ward R, Lorenz HM, Manger B, Pfizenmaier K, Grell M, Kalden JR. 1999. Preferential expression of tumor necrosis factor receptor 55 (TNF-R55) on human articular chondrocytes: selective transcriptional upregulation of TNF-R75 by proinflammatory cytokines interleukin 1beta, tumor necrosis factor-alpha, and basis fibroblast gro. *The Journal of rheumatology* [Internet] 26:645-53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10090177>

Artrip JH, Kwiatkowski P, Michler RE, Wang SF, Tugulea S, Ankersmit J, Chisholm L, McKenzie IF, Sandrin MS, Itescu S, et al. 1999. Target cell susceptibility to lysis by human natural killer cells is augmented by alpha(1,3)-galactosyltransferase and reduced by alpha(1, 2)-fucosyltransferase. *The Journal of biological chemistry* [Internet] 274:10717-22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10196142>

Ashton-Chess J, Roussel J, Manez R, Ruiz C, Moreau A, Cozzi E, Minault D, Souillou J, Blancho G. 2003. Cellular participation in delayed xenograft rejection of hCD55 transgenic pig hearts by baboons. *Xenotransplantation* [Internet] 10:446-53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12950987>

Auchincloss H, Sachs DH. 1998. Xenogeneic transplantation. *Annual review of immunology* [Internet] 16:433-70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9597137>

Bach FH, Fishman JA, Daniels N, Proimos J, Anderson B, Carpenter CB, Forrow L, Robson SC, Fineberg HV. 1998. Uncertainty in xenotransplantation: individual benefit versus collective risk. *Nature medicine* [Internet] 4:141-4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9461178>

Bai X, Williams JL, Greenwood SL, Baker PN, Aplin JD, Crocker IP. 2009. A placental protective role for trophoblast-derived TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *Placenta* [Internet] 30:855-60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19674787>

Banerjee D, Dick AD. 2004. Blocking CD200-CD200 receptor axis augments NOS-2 expression and aggravates experimental autoimmune uveoretinitis in Lewis rats. Ocular immunology and inflammation [Internet] 12:115-25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15512981>

Barclay A. 1997. Leucocyte Antigens Factsbook. 2nd. Academic Press

Barclay AN, Clark MJ, McCaughan GW. 1986. Neuronal/lymphoid membrane glycoprotein MRC OX-2 is a member of the immunoglobulin superfamily with a light-chain-like structure. Biochemical Society symposium [Internet] 51:149-57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2880589>

Barclay AN, Ward HA. 1982. Purification and chemical characterisation of membrane glycoproteins from rat thymocytes and brain, recognised by monoclonal antibody MRC OX 2. European journal of biochemistry / FEBS [Internet] 129:447-58. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6129975>

Barclay AN, Wright GJ, Brooke G, Brown MH. 2002. CD200 and membrane protein interactions in the control of myeloid cells. Trends in immunology [Internet] 23:285-90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12072366>

Barclay AN. 1981. Different reticular elements in rat lymphoid tissue identified by localization of Ia, Thy-1 and MRC OX 2 antigens. Immunology [Internet] 44:727-36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6119291>

Barclay AN. 2003. Membrane proteins with immunoglobulin-like domains--a master superfamily of interaction molecules. Seminars in immunology [Internet] 15:215-23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14690046>

Baud V, Karin M. 2001. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. Trends in cell biology [Internet] 11:372-7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11514191>

Beltinger CP, White PS, Maris JM, Sulman EP, Jensen SJ, LePaslier D, Stallard BJ, Goeddel DV, de Sauvage FJ, Brodeur GM, et al. 1996. Physical mapping and genomic structure of the human TNFR2 gene. Genomics [Internet] 35:94-100. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8661109>

Benda B, Lycke N, Holstad M, Korsgren O. 2000. Delayed type hypersensitivity-associated cytokines in islet xenotransplantation: limited efficacy of interleukin-2- and tumor necrosis factor-alpha-blockade in interferon-gamma receptor-deficient mice. xenotransplantation [Internet]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/pubmed>

Bodmer J, Schneider P, Tschopp J. 2002. The molecular architecture of the TNF superfamily. Trends in biochemical sciences [Internet] 27:19-26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11796220>

Boudakov I, Liu J, Fan N, Gulay P, Wong K, Gorczynski RM. 2007. Mice lacking CD200R1 show absence of suppression of lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha and mixed leukocyte culture responses by CD200. Transplantation [Internet] 84:251-7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17667818>

Brockhaus M, Schoenfeld HJ, Schlaeger EJ, Hunziker W, Lesslauer W, Loetscher H. 1990. Identification of two types of tumor necrosis factor receptors on human cell lines by monoclonal antibodies. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America

[Internet] 87:3127-31. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=53847&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Broderick C, Hoek RM, Forrester JV, Liversidge J, Sedgwick JD, Dick AD. 2002. Constitutive retinal CD200 expression regulates resident microglia and activation state of inflammatory cells during experimental autoimmune uveoretinitis. *The American journal of pathology* [Internet] 161:1669-77. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12414514>

Brouard S, Vanhove B, Gagne K, Neumann A, Douillard P, Moreau A, Cuturi C, Souillou JP. 1999. T cell repertoire alterations of vascularized xenografts. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) [Internet] 162:3367-77. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10092791>

Brown GR, Lee E, Thiele DL. 2002. TNF-TNFR2 interactions are critical for the development of intestinal graft-versus-host disease in MHC class II-disparate (C57BL/6J-->C57BL/6J x bm12)F1 mice. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) [Internet] 168:3065-71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11884480>

Burkly LC. 2001. CD40 pathway blockade as an approach to immunotherapy. *Advances in experimental medicine and biology* [Internet] 489:135-52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11554588>

Bühler L, Yamada K, Kitamura H, Alwayn IP, Basker M, Appel JZ, Colvin RB, White-Scharf ME, Sachs DH, Robson SC, et al. 2001. Pig kidney transplantation in baboons: anti-Gal(alpha)1-3Gal IgM alone is associated with acute humoral xenograft rejection and disseminated intravascular coagulation. *Transplantation* [Internet] 72:1743-52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11740383>

Calzascia T, Pellegrini M, Hall H, Sabbagh L, Ono N, Elford AR, Mak TW, Ohashi PS. 2007. TNF-alpha is critical for antitumor but not antiviral T cell immunity in mice. *The Journal of clinical investigation* [Internet] 117:3833-45. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2066188&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Cameron CM, Barrett JW, Liu L, Lucas AR, McFadden G. 2005. Myxoma virus M141R expresses a viral CD200 (vOX-2) that is responsible for down-regulation of macrophage and T-cell activation in vivo. *Journal of virology* [Internet] 79:6052-67. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15857991>

Candinas D, Belliveau S, Koyamada N, Miyatake T, Hechenleitner P, Mark W, Bach FH, Hancock WW. 1996. T cell independence of macrophage and natural killer cell infiltration, cytokine production, and endothelial activation during delayed xenograft rejection. *Transplantation* [Internet] 62:1920-7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8990388>

Cantu E, Gaca JG, Palestrant D, Baig K, Lukes DJ, Gibson SE, Gonzalez-Stawinski GV, Olausson M, Parker W, Davis RD, et al. 2006. Depletion of pulmonary intravascular macrophages prevents hyperacute pulmonary xenograft dysfunction. *Transplantation* [Internet] 81:1157-64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16641602>

Cardona K, Korbitt GS, Milas Z, Lyon J, Cano J, Jiang W, Bello-Laborn H, Hacquoil B, Strobert E, Gangappa S, et al. 2006. Long-term survival of neonatal porcine islets in nonhuman primates

by targeting costimulation pathways. *Nature medicine* [Internet] 12:304-6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16501570>

Carel JC, Sheehan KC, Schreiber RD, Lacy PE. 1993. Prevention of rejection of transforming growth factor beta-treated rat-to-mouse islet xenografts by monoclonal antibody to tumor necrosis factor. *Transplantation* [Internet]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/pubmed>

Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. 1975. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [Internet] 72:3666-70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1103152>

Cha SS, Kim MS, Choi YH, Sung BJ, Shin NK, Shin HC, Sung YC, Oh BH. 1999. 2.8 A resolution crystal structure of human TRAIL, a cytokine with selective antitumor activity. *Immunity* [Internet] 11:253-61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10485660>

Chan FK, Chun HJ, Zheng L, Siegel RM, Bui KL, Lenardo MJ. 2000. A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science (New York, N.Y.)* [Internet] 288:2351-4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10875917>

Chandrasekharan UM, Siemionow M, Unsal M, Yang L, Poptic E, Bohn J, Ozer K, Zhou Z, Howe PH, Penn M, et al. 2007. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) receptor-II is required for TNF-alpha-induced leukocyte-endothelial interaction in vivo. *Blood* [Internet] 109:1938-44. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1801063&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Cheema GS, Roschke V, Hilbert DM, Stohl W. 2001. Elevated serum B lymphocyte stimulator levels in patients with systemic immune-based rheumatic diseases. *Arthritis & Rheumatism* [Internet] 44:1313-1319. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11407690>

Chen G, Qian H, Starzl T, Sun H, Garcia B, Wang X, Wise Y, Liu Y, Xiang Y, Copeman L, et al. 2005. Acute rejection is associated with antibodies to non-Gal antigens in baboons using Gal-knockout pig kidneys. *Nature medicine* [Internet] 11:1295-8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16311604>

Chen X, Oppenheim JJ. 2010. TNF-alpha: an activator of CD4+FoxP3+TNFR2+ regulatory T cells. *Current directions in autoimmunity* [Internet] 11:119-34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20173391>

Cheng Y, Maeda A, Goto Y, Matsuda-Minehata F, Manabe N. 2007. Molecular cloning of porcine (*Sus scrofa*) tumor necrosis factor receptor 2. *The Journal of reproduction and development* [Internet] 53:1291-7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17827878>

Cherwinski HM, Murphy CA, Joyce BL, Bigler ME, Song YS, Zurawski SM, Moshrefi MM, Gorman DM, Miller KL, Zhang S, et al. 2005. The CD200 receptor is a novel and potent regulator of murine and human mast cell function. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* [Internet] 174:1348-56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15661892>

Chinnaiyan AM, Tepper CG, Seldin MF, O'Rourke K, Kischkel FC, Hellbardt S, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM. 1996. FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and

tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry* [Internet] 271:4961-5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8617770>

Clark DA, Arck PC, Chaouat G. 1999. Why did your mother reject you? Immunogenetic determinants of the response to environmental selective pressure expressed at the uterine level. *American journal of reproductive immunology* (New York, N.Y. : 1989) [Internet] 41:5-22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10097783>

Clark DA, Chaouat G, Arck PC, Mittrucker HW, Levy GA. 1998. Cytokine-dependent abortion in CBA x DBA/2 mice is mediated by the procoagulant fgl2 prothrombinase [correction of prothombinase]. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) [Internet] 160:545-9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9551885>

Clark DA, Ding JW, Yu G, Levy GA, Gorczynski RM. 2001. Fgl2 prothrombinase expression in mouse trophoblast and decidua triggers abortion but may be countered by OX-2. *Molecular human reproduction* [Internet] 7:185-94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11160845>

Clark DA. 1999. Hard science versus phenomenology in reproductive immunology. *Critical reviews in immunology* [Internet] 19:509-39. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10647748>

Clark MJ, Gagnon J, Williams AF, Barclay AN. 1985. MRC OX-2 antigen: a lymphoid/neuronal membrane glycoprotein with a structure like a single immunoglobulin light chain. *The EMBO journal* [Internet] 4:113-8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2862025>

Cope AP, Aderka D, Doherty M, Engelmann H, Gibbons D, Jones AC, Brennan FM, Maini RN, Wallach D, Feldmann M, et al. 1992. Increased levels of soluble tumor necrosis factor receptors in the sera and synovial fluid of patients with rheumatic diseases. *Arthritis and rheumatism* [Internet] 35:1160-9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1329774>

Copland DA, Calder CJ, Raveney BJ, Nicholson LB, Phillips J, Cherwinski H, Jenmalm M, Sedgwick JD, Dick AD. 2007. Monoclonal antibody-mediated CD200 receptor signaling suppresses macrophage activation and tissue damage in experimental autoimmune uveoretinitis. *The American journal of pathology* [Internet] 171:580-8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17600119>

Corredor J, Yan F, Shen CC, Tong W, John SK, Wilson G, Whitehead R, Polk DB. 2003. Tumor necrosis factor regulates intestinal epithelial cell migration by receptor-dependent mechanisms. *American journal of physiology. Cell physiology* [Internet] 284:C953-61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12466150>

Costa C, Barber DF, Fodor WL. 2002. Human NK cell-mediated cytotoxicity triggered by CD86 and Gal alpha 1,3-Gal is inhibited in genetically modified porcine cells. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) [Internet] 168:3808-16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11937533>

Costa C, Bell NK, Stabel TJ, Fodor WL. 2004. Use of porcine tumor necrosis factor receptor 1-Ig fusion protein to prolong xenograft survival. *Xenotransplantation* [Internet] 11:491-502. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15479458>

Costa C, Brokaw JL, Wang Y, Fodor WL. 2003. Delayed rejection of porcine cartilage is averted by transgenic expression of alpha1,2-fucosyltransferase. *The FASEB journal : official*

publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology [Internet] 17:109-11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12475900>

Costa C, Casinghino SR, Fodor WL. 2007. Characterization of porcine tumor necrosis factor receptor 2: implications for xenotransplantation. *Transplantation proceedings* [Internet] 39:2443-6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17889214>

Costa C, Zhao L, Burton WV, Bondioli KR, Williams BL, Hoagland TA, Ditullio PA, Ebert KM, Fodor WL. 1999. Expression of the human alpha1,2-fucosyltransferase in transgenic pigs modifies the cell surface carbohydrate phenotype and confers resistance to human serum-mediated cytolysis. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* [Internet] 13:1762-73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10506579>

Costa C, Zhao L, Burton WV, Rosas C, Bondioli KR, Williams BL, Hoagland TA, Dalmaso AP, Fodor WL. 2002. Transgenic pigs designed to express human CD59 and H-transferase to avoid humoral xenograft rejection. *Xenotransplantation* [Internet] 9:45-57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12005104>

Costa C, Zhao L, Decesare S, Fodor WL. 1999. Comparative analysis of three genetic modifications designed to inhibit human serum-mediated cytolysis. *Xenotransplantation* [Internet] 6:6-16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10355728>

Cowan PJ. 2007. Coagulation and the xenograft endothelium. *Xenotransplantation* [Internet] 14:7-12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17214700>

Cozzi E, Langford GA, Wright L, Tucker A, Yannoutsos N, Richards A, Rosengard A, Elsome K, Lancaster R, White DJ, et al. 1995. Comparative analysis of human DAF expression in the tissues of transgenic pigs and man. *Transplantation proceedings* [Internet] 27:319-20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7533397>

Cui X, Hawari F, Alsaaty S, Lawrence M, Combs CA, Geng W, Rouhani FN, Miskinis D, Levine SJ. 2002. Identification of ARTS-1 as a novel TNFR1-binding protein that promotes TNFR1 ectodomain shedding. *The Journal of clinical investigation* [Internet] 110:515-26. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=150410&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Dalmaso AP, Vercellotti GM, Fischel RJ, Bolman RM, Bach FH, Platt JL. 1992. Mechanism of complement activation in the hyperacute rejection of porcine organs transplanted into primate recipients. *The American journal of pathology* [Internet] 140:1157-66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1580328>

Davila E, Byrne GW, LaBreche PT, McGregor HC, Schwab AK, Davies WR, Rao VP, Oi K, Tazelaar HD, Logan JS, et al. 2006. T-cell responses during pig-to-primate xenotransplantation. *Xenotransplantation* [Internet] 13:31-40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16497210>

Dempsey PW, Doyle SE, He JQ, Cheng G. 2003. The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine & growth factor reviews* [Internet] 14:193-209. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12787559>

Dhillon S, Lyseng-Williamson KA, Scott LJ. 2007. Etanercept: a review of its use in the management of rheumatoid arthritis. *Drugs* [Internet] 67:1211-41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17521223>

Dick AD, Broderick C, Forrester JV, Wright GJ. 2001. Distribution of OX2 antigen and OX2 receptor within retina. *Investigative ophthalmology & visual science* [Internet] 42:170-6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11133863>

Diez-Ruiz A, Tilz GP, Zangerle R, Baier-Bitterlich G, Wachter H, Fuchs D. 1995. Soluble receptors for tumour necrosis factor in clinical laboratory diagnosis. *European journal of haematology* [Internet] 54:1-8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7859870>

Diller R, Winde G, Kötting S, Senninger N, Dietl K, Spiegel H. 2002. sTNF-RII: is it useful for the early diagnosis of rejection and for prognosis after renal transplantation? *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation* [Internet] 15:335-40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12122509>

Dinarello CA. 2002. The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clinical and experimental rheumatology* [Internet] 20:S1-13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14989423>

Doménech N, Diaz T, Moscoso I, López-Peláez E, Centeno A, Máñez R. 2003. Elicited non-anti-alphaGAL antibodies may cause acute humoral rejection of hDAF pig organs transplanted in baboons. *Transplantation proceedings* [Internet] 35:2049-50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12962892>

Douglas J, Albertson DG, Barclay AN, Davis M, Rabbitts PH. 1988. RFLP and mapping of human MOX-1 gene on chromosome 3. *Nucleic acids research* [Internet] 16:9067. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2902568>

Douni E, Kollias G. 1998. A critical role of the p75 tumor necrosis factor receptor (p75TNF-R) in organ inflammation independent of TNF, lymphotoxin alpha, or the p55TNF-R. *The Journal of experimental medicine* [Internet] 188:1343-52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9763613>

Dufrane D, Goebbels R, Saliez A, Guiot Y, Gianello P. 2006. Six-month survival of microencapsulated pig islets and alginate biocompatibility in primates: proof of concept. *Transplantation* [Internet] 81:1345-53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16699465>

Dunkelberger JR, Song W. 2010. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell research* [Internet] 20:34-50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20010915>

Dwyer KM, Mysore TB, Crikis S, Robson SC, Nandurkar H, Cowan PJ, D'Apice AJ. 2006. The transgenic expression of human CD39 on murine islets inhibits clotting of human blood. *Transplantation* [Internet] 82:428-32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16906044>

Dwyer KM, Robson SC, Nandurkar HH, Campbell DJ, Gock H, Murray-Segal LJ, Fiscaro N, Mysore TB, Kaczmarek E, Cowan PJ, et al. 2004. Thromboregulatory manifestations in human CD39 transgenic mice and the implications for thrombotic disease and transplantation. *The Journal of clinical investigation* [Internet] 113:1440-6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15146241>

Eason JD, Wee S, Kawai T, Hong HZ, Powelson JA, Widmer MB, Cosimi AB. 1995. Inhibition of the effects of TNF in renal allograft recipients using recombinant human dimeric tumor necrosis

factor receptors. Transplantation [Internet]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/pubmed>

Eck MJ, Sprang SR. 1989. The structure of tumor necrosis factor-alpha at 2.6 A resolution. Implications for receptor binding. The Journal of biological chemistry [Internet] 264:17595-605. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2551905>

Eck MJ, Ultsch M, Rinderknecht E, de Vos AM, Sprang SR. 1992. The structure of human lymphotoxin (tumor necrosis factor-beta) at 1.9-A resolution. The Journal of biological chemistry [Internet] 267:2119-22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1733919>

Edge AS, Gosse ME, Dinsmore J. 1998. Xenogeneic cell therapy: current progress and future developments in porcine cell transplantation. Cell transplantation [Internet] 7:525-39. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9853581>

Eigenbrodt ML, Eigenbrodt EH, Thiele DL. 1990. Histologic similarity of murine colonic graft-versus-host disease (GVHD) to human colonic GVHD and inflammatory bowel disease. The American journal of pathology [Internet] 137:1065-76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2240158>

Erikstein BK, Smeland EB, Blomhoff HK, Funderud S, Prydz K, Lesslauer W, Espevik T. 1991. Independent regulation of 55-kDa and 75-kDa tumor necrosis factor receptors during activation of human peripheral blood B lymphocytes. European journal of immunology [Internet] 21:1033-7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1850359>

Fallarino F, Asselin-Paturel C, Vacca C, Bianchi R, Gizzi S, Fioretti MC, Trinchieri G, Grohmann U, Puccetti P. 2004. Murine plasmacytoid dendritic cells initiate the immunosuppressive pathway of tryptophan catabolism in response to CD200 receptor engagement. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) [Internet] 173:3748-54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15356121>

Feldmann M, Brennan FM, Maini R. 1998. Cytokines in autoimmune disorders. International reviews of immunology [Internet] 17:217-28. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9914949>

Feldmann M. 2002. Development of anti-TNF therapy for rheumatoid arthritis. Nature reviews. Immunology [Internet] 2:364-71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12033742>

Fesik SW. 2000. Insights into programmed cell death through structural biology. Cell [Internet] 103:273-82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11057900>

Fishman JA, Patience C. 2004. Xenotransplantation: infectious risk revisited. American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons [Internet] 4:1383-90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15307825>

Foa R, Massaia M, Cardona S, Tos AG, Bianchi A, Attisano C, Guarini A, di Celle PF, Fierro MT. 1990. Production of tumor necrosis factor-alpha by B-cell chronic lymphocytic leukemia cells: a possible regulatory role of TNF in the progression of the disease. Blood [Internet] 76:393-400. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2114936>

Fodor WL, Williams BL, Matis LA, Madri JA, Rollins SA, Knight JW, Velander W, Squinto SP. 1994. Expression of a functional human complement inhibitor in a transgenic pig as a model for the prevention of xenogeneic hyperacute organ rejection. Proceedings of the National Academy

of Sciences of the United States of America [Internet] 91:11153-7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7526391>

Forte P, Lilienfeld BG, Baumann BC, Seebach JD. 2005. Human NK cytotoxicity against porcine cells is triggered by NKp44 and NKG2D. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) [Internet] 175:5463-70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16210654>

Foster-Cuevas M, Wright GJ, Puklavec MJ, Brown MH, Barclay AN. 2004. Human herpesvirus 8 K14 protein mimics CD200 in down-regulating macrophage activation through CD200 receptor. *Journal of virology* [Internet] 78:7667-76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15220441>

Fotin-Mleczek M, Henkler F, Samel D, Reichwein M, Hausser A, Parmryd I, Scheurich P, Schmid JA, Wajant H. 2002. Apoptotic crosstalk of TNF receptors: TNF-R2-induces depletion of TRAF2 and IAP proteins and accelerates TNF-R1-dependent activation of caspase-8. *Journal of cell science* [Internet] 115:2757-70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12077366>

Fox A, Koulmanda M, Mandel TE, van Rooijen N, Harrison LC. 1998. Evidence that macrophages are required for T-cell infiltration and rejection of fetal pig pancreas xenografts in nonobese diabetic mice. *Transplantation* [Internet] 66:1407-16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9869080>

Fox A, Mountford J, Braakhuis A, Harrison LC. 2001. Innate and adaptive immune responses to nonvascular xenografts: evidence that macrophages are direct effectors of xenograft rejection. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) [Internet] 166:2133-40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11160265>

Frank MG, Barrientos RM, Biedenkapp JC, Rudy JW, Watkins LR, Maier SF. 2006. mRNA up-regulation of MHC II and pivotal pro-inflammatory genes in normal brain aging. *Neurobiology of aging* [Internet] 27:717-22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15890435>

Fudaba Y, Spitzer TR, Shaffer J, Kawai T, Fehr T, Delmonico F, Preffer F, Tolckoff-Rubin N, Dey BR, Saidman SL, et al. 2006. Myeloma responses and tolerance following combined kidney and nonmyeloablative marrow transplantation: in vivo and in vitro analyses. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* [Internet] 6:2121-33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16796719>

Funeshima N, Fujino M, Kitazawa Y, Hara Y, Hara Y, Hayakawa K, Okuyama T, Kimura H, Li X. 2005. Inhibition of allogeneic T-cell responses by dendritic cells expressing transduced indoleamine 2,3-dioxygenase. *The journal of gene medicine* [Internet] 7:565-75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15543532>

Funk JO, Walczak H, Voigtländer C, Berchtold S, Baumeister T, Rauch P, Rössner S, Steinkasserer A, Schuler G, Lutz MB, et al. 2000. Cutting edge: resistance to apoptosis and continuous proliferation of dendritic cells deficient for TNF receptor-1. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) [Internet] 165:4792-6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11046001>

Galili U. 1993. Evolution and pathophysiology of the human natural anti-alpha-galactosyl IgG (anti-Gal) antibody. *Springer seminars in immunopathology* [Internet] 15:155-71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7504839>

Ghanekar A, Mendicino M, Liu H, He W, Liu M, Zhong R, Phillips MJ, Levy GA, Grant DR. 2004. Endothelial induction of fgl2 contributes to thrombosis during acute vascular xenograft rejection. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) [Internet] 172:5693-701. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15100314>

Goddard MJ, Dunning J, Horsley Jo, Atkinson C, Pino-Chavez G, Wallwork J. 2002. Histopathology of cardiac xenograft rejection in the pig-to-baboon model. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation* [Internet] 21:474-84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11927225>

Goodman DJ, Millan MT, Ferran C, Bach FH. 1997. Mechanisms of delayed xenograft rejection. D. K. C. Cooper and E. Kemp (Eds). : (pp 95-103).

Goodwin RG, Anderson D, Jerzy R, Davis T, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Smith CA. 1991. Molecular cloning and expression of the type 1 and type 2 murine receptors for tumor necrosis factor. *Molecular and cellular biology* [Internet] 11:3020-6. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=360136&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Gorczyński RM, Cattral MS, Chen Z, Hu J, Lei J, Min WP, Yu G, Ni J. 1999. An immunoadhesin incorporating the molecule OX-2 is a potent immunosuppressant that prolongs allo- and xenograft survival. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) [Internet] 163:1654-60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10415071>

Gorczyński RM, Chen Z, Clark DA, Kai Y, Lee L, Nachman J, Wong S, Marsden P. 2004. Structural and functional heterogeneity in the CD200R family of immunoregulatory molecules and their expression at the feto-maternal interface. *American journal of reproductive immunology* (New York, N.Y. : 1989) [Internet] 52:147-63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15274657>

Gorczyński RM, Chen Z, He W, Khatri I, Sun Y, Yu K, Boudakov I. 2009. Expression of a CD200 transgene is necessary for induction but not maintenance of tolerance to cardiac and skin allografts. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) [Internet] 183:1560-8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19592654>

Gorczyński RM, Chen Z, Yu K, Hu J. 2001. CD200 immunoadhesin suppresses collagen-induced arthritis in mice. *Clinical immunology* (Orlando, Fla.) [Internet] 101:328-34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11726225>

Gorczyński RM, Lee L, Boudakov I. 2005. Augmented Induction of CD4+CD25+ Treg using monoclonal antibodies to CD200R. *Transplantation* [Internet] 79:1180-3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15880066>

Gordon S. 2002. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell* [Internet] 111:927-30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12507420>

Granger GA, Shacks SJ, Williams TW, Kolb WP. 1969. Lymphocyte in vitro cytotoxicity: specific release of lymphotoxin-like materials from tuberculin-sensitive lymphoid cells. *Nature* [Internet] 221:1155-7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4975283>

Gray PW, Aggarwal BB, Benton CV, Bringman TS, Henzel WJ, Jarrett JA, Leung DW, Moffat B, Ng P, Svedersky LP, et al. Cloning and expression of cDNA for human lymphotoxin, a

lymphokine with tumour necrosis activity. *Nature* [Internet] 312:721-4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6334807>

Greenwald AG, Jin R, Waddell TK. 2009. Galectin-3-mediated xenoactivation of human monocytes. *Transplantation* [Internet] 87:44-51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19136890>

Grell M, Becke FM, Wajant H, Männel DN, Scheurich P. 1998. TNF receptor type 2 mediates thymocyte proliferation independently of TNF receptor type 1. *European journal of immunology* [Internet] 28:257-63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9485205>

Grell M, Douni E, Wajant H, Löhden M, Clauss M, Maxeiner B, Georgopoulos S, Lesslauer W, Kollias G, Pfizenmaier K, et al. 1995. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* [Internet] 83:793-802. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8521496>

Grell M, Wajant H, Zimmermann G, Scheurich P. 1998. The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [Internet] 95:570-5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9435233>

Grell M, Zimmermann G, Gottfried E, Chen CM, Grünwald U, Huang DC, Wu Lee YH, Dürkop H, Engelmann H, Scheurich P, et al. 1999. Induction of cell death by tumour necrosis factor (TNF) receptor 2, CD40 and CD30: a role for TNF-R1 activation by endogenous membrane-anchored TNF. *The EMBO journal* [Internet] 18:3034-43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10357816>

Gross JA, Johnston J, Mudri S, Enselman R, Dillon SR, Madden K, Xu W, Parrish-Novak J, Foster D, Lofton-Day C, et al. 2000. TACI and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B-cell autoimmune disease. *Nature* [Internet] 404:995-9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10801128>

Hancock WW, Blakely ML, Van der Werf W, Bach FH. 1993. Rejection of guinea pig cardiac xenografts post-cobra venom factor therapy is associated with infiltration by mononuclear cells secreting interferon-gamma and diffuse endothelial activation. *Transplantation proceedings* [Internet] 25:2932. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8212288>

Hara H, Ezzelarab M, Rood PP, Lin YJ, Busch J, Ibrahim Z, Zhu X, Ball S, Ayares D, Zeevi A, et al. 2006. Allosensitized humans are at no greater risk of humoral rejection of GT-KO pig organs than other humans. *Xenotransplantation* [Internet] 13:357-65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16768729>

Hatherley D, Barclay AN. 2004. The CD200 and CD200 receptor cell surface proteins interact through their N-terminal immunoglobulin-like domains. *European journal of immunology* [Internet] 34:1688-94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15162439>

Hatherley D, Cherwinski HM, Moshref M, Barclay AN. 2005. Recombinant CD200 protein does not bind activating proteins closely related to CD200 receptor. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) [Internet] 175:2469-74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16081818>

Hauser A, Hehlhans T, Männel DN. 2007. Characterization of TNF receptor type 2 isoform in the mouse. *Molecular immunology* [Internet] 44:3563-70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17485115>

Hawiger D, Inaba K, Dorsett Y, Guo M, Mahnke K, Rivera M, Ravetch JV, Steinman RM, Nussenzweig MC. 2001. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *The Journal of experimental medicine* [Internet] 194:769-79. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11560993>

Heaney ML, Golde DW. 1996. Soluble cytokine receptors. *Blood* [Internet]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/pubmed>

Hehlgans T, Männel DN. 2002. The TNF-TNF receptor system. *Biological chemistry* [Internet] 383:1581-5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12452434>

Hehlgans T, Pfeffer K. 2005. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* [Internet] 115:1-20. Available from: <http://www.blackwell-synergy.com/links/doi/10.1111/j.1365-2567.2005.02143.x>

Hering BJ, Wijkstrom M, Graham ML, Hårdstedt M, Aasheim TC, Jie T, Ansite JD, Nakano M, Cheng J, Li W, et al. 2006. Prolonged diabetes reversal after intraportal xenotransplantation of wild-type porcine islets in immunosuppressed nonhuman primates. *Nature medicine* [Internet] 12:301-3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16491083>

Higuchi M, Aggarwal BB. 1994. TNF induces internalization of the p60 receptor and shedding of the p80 receptor. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) [Internet] 152:3550-8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8144934>

Hober D, Benyoucef S, Bocket L, Chieux V, Lion G, Mouton Y, De Groote D, Wattré P. 1999. Soluble tumor necrosis factor receptor type II (sTNFRII) in HIV-infected patients: relationship with the plasma level of HIV-1 RNA. *Immunology letters* [Internet] 67:91-4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10232388>

Hoek RM, Ruuls SR, Murphy CA, Wright GJ, Goddard R, Zurawski SM, Blom B, Homola ME, Streit WJ, Brown MH, et al. 2000. Down-regulation of the macrophage lineage through interaction with OX2 (CD200). *Science* (New York, N.Y.) [Internet] 290:1768-71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11099416>

Hoffmann U, Bergler T, Rihm M, Pace C, Krüger B, Rümmele P, Stoelcker B, Banas B, Männel DN, Krämer BK, et al. 2009. Upregulation of TNF receptor type 2 in human and experimental renal allograft rejection. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* [Internet] 9:675-86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19298452>

Hohmann HP, Remy R, Brockhaus M, van Loon AP. 1989. Two different cell types have different major receptors for human tumor necrosis factor (TNF alpha). *The Journal of biological chemistry* [Internet] 264:14927-34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2549042>

Hymowitz SG, Christinger HW, Fuh G, Ultsch M, O'Connell M, Kelley RF, Ashkenazi A, de Vos AM. 1999. Triggering cell death: the crystal structure of Apo2L/TRAIL in a complex with death receptor 5. *Molecular cell* [Internet] 4:563-71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10549288>

Ide K, Wang H, Tahara H, Liu J, Wang X, Asahara T, Sykes M, Yang Y, Ohdan H. 2007. Role for CD47-SIRPalpha signaling in xenograft rejection by macrophages. *Proceedings of the*

National Academy of Sciences of the United States of America [Internet] 104:5062-6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17360380>

Idriss HT, Naismith JH. 2000. TNF α and the TNF receptor superfamily: Structure-function relationship(s). *Microscopy Research and Technique* [Internet] 50:184-195. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10891884>

Itescu S, Kwiatkowski P, Artrip JH, Wang SF, Ankersmit J, Minanov OP, Michler RE. 1998. Role of natural killer cells, macrophages, and accessory molecule interactions in the rejection of pig-to-primate xenografts beyond the hyperacute period. *Human immunology* [Internet] 59:275-86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9619766>

Jenmalm MC, Cherwinski H, Bowman EP, Phillips JH, Sedgwick JD. 2006. Regulation of myeloid cell function through the CD200 receptor. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) [Internet] 176:191-9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16365410>

Jiang Y, Woronicz JD, Liu W, Goeddel DV. 1999. Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaling by silencer of death domains. *Science* (New York, N.Y.) [Internet] 283:543-6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9915703>

Jiang-Shieh Y, Chien H, Chang C, Wei T, Chiu M, Chen H, Wu C. 2010. Distribution and expression of CD200 in the rat respiratory system under normal and endotoxin-induced pathological conditions. *Journal of anatomy* [Internet] 216:407-16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20070425>

Jin L, Raymond DP, Crabtree TD, Pelletier SJ, Houlgrave CW, Pruett TL, Sawyer RG. 2000. Enhanced murine macrophage TNF receptor shedding by cytosine-guanine sequences in oligodeoxynucleotides. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) [Internet] 165:5153-60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11046047>

Jin R, Greenwald A, Peterson MD, Waddell TK. 2006. Human monocytes recognize porcine endothelium via the interaction of galectin 3 and alpha-GAL. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) [Internet] 177:1289-95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16818789>

Jin Z, McDonald ER, Dicker DT, El-Deiry WS. 2004. Deficient tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) death receptor transport to the cell surface in human colon cancer cells selected for resistance to TRAIL-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry* [Internet] 279:35829-39. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15155747>

Jones EY, Stuart DI, Walker NP. 1989. Structure of tumour necrosis factor. *Nature* [Internet] 338:225-8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2922050>

Jorgensen C, Apparailly F, Couret I, Canovas F, Jacquet C, Sany J. 1998. Interleukin-4 and interleukin-10 are chondroprotective and decrease mononuclear cell recruitment in human rheumatoid synovium in vivo. *Immunology* [Internet]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/pubmed>

June CH, Ledbetter JA, Gillespie MM, Lindsten T, Thompson CB. 1987. T-cell proliferation involving the CD28 pathway is associated with cyclosporine-resistant interleukin 2 gene expression. *Molecular and cellular biology* [Internet] 7:4472-81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2830495>

Kanof M, Smith P. 1991. Current Protocols of Immunology. In: Coligan J, Kruiser A, Margulis D, Shevach E, Strober W New York: Greene publishing associates and Wiley-Interscience.

Karpusas M, Hsu YM, Wang JH, Thompson J, Lederman S, Chess L, Thomas D. 1995. 2 A crystal structure of an extracellular fragment of human CD40 ligand. *Structure* (London, England : 1993) [Internet] 3:1426. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8747468>

Kawasaki BT, Mistree T, Hurt EM, Kalathur M, Farrar WL. 2007. Co-expression of the toleragenic glycoprotein, CD200, with markers for cancer stem cells. *Biochemical and biophysical research communications* [Internet] 364:778-82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17964286>

Khare SD, Sarosi I, Xia XZ, McCabe S, Miner K, Solovyev I, Hawkins N, Kelley M, Chang D, Van G, et al. 2000. Severe B cell hyperplasia and autoimmune disease in TALL-1 transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [Internet] 97:3370-5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10716715>

Kim EY, Priatel JJ, Teh S, Teh H. 2006. TNF receptor type 2 (p75) functions as a costimulator for antigen-driven T cell responses in vivo. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) [Internet] 176:1026-35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16393990>

Kim EY, Teh HS. 2001. TNF type 2 receptor (p75) lowers the threshold of T cell activation. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) [Internet] 167:6812-20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11739497>

Kirkiles-Smith NC, Tereb DA, Kim RW, McNiff JM, Schechner JS, Lorber MI, Pober JS, Tellides G. 2000. Human TNF can induce nonspecific inflammatory and human immune-mediated microvascular injury of pig skin xenografts in immunodeficient mouse hosts. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) [Internet] 164:6601-9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10843720>

Kischkel FC, Lawrence DA, Chuntharapai A, Schow P, Kim KJ, Ashkenazi A. 2000. Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity* [Internet] 12:611-20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10894161>

Ko Y, Chien H, Jiang-Shieh Y, Chang C, Pai M, Huang J, Chen H, Wu C. 2009. Endothelial CD200 is heterogeneously distributed, regulated and involved in immune cell-endothelium interactions. *Journal of anatomy* [Internet] 214:183-95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19166481>

Kobayashi T, Taniguchi S, Neethling FA, Rose AG, Hancock WW, Ye Y, Niekrasz M, Kosanke S, Wright LJ, White DJ, et al. 1997. Delayed xenograft rejection of pig-to-baboon cardiac transplants after cobra venom factor therapy. *Transplantation* [Internet] 64:1255-61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9371665>

Kolaskar AS, Tongaonkar PC. 1990. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS letters* [Internet] 276:172-4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1702393>

Koning N, Swaab DF, Hoek RM, Huitinga I. 2009. Distribution of the immune inhibitory molecules CD200 and CD200R in the normal central nervous system and multiple sclerosis lesions suggests neuron-glia and glia-glia interactions. *Journal of neuropathology and*

experimental neurology [Internet] 68:159-67. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19151626>

Kozłowski T, Shimizu A, Lambrigts D, Yamada K, Fuchimoto Y, Glaser R, Monroy R, Xu Y, Awwad M, Colvin RB, et al. 1999. Porcine kidney and heart transplantation in baboons undergoing a tolerance induction regimen and antibody adsorption. *Transplantation* [Internet] 67:18-30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9921791>

Kretz-Rommel A, Qin F, Dakappagari N, Cofield R, Faas SJ, Bowdish KS. 2008. Blockade of CD200 in the presence or absence of antibody effector function: implications for anti-CD200 therapy. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) [Internet] 180:699-705. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18178807>

Kretz-Rommel A, Qin F, Dakappagari N, Ravey EP, McWhirter J, Oltean D, Frederickson S, Maruyama T, Wild Ma, Nolan M, et al. 2007. CD200 expression on tumor cells suppresses antitumor immunity: new approaches to cancer immunotherapy. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) [Internet] 178:5595-605. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17442942>

Kuhnert P, Wüthrich C, Peterhans E, Pauli U. 1991. The porcine tumor necrosis factor-encoding genes: sequence and comparative analysis. *Gene* [Internet] 102:171-8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1874444>

Kuwaki K, Tseng Y, Dor FJ, Shimizu A, Houser SL, Sanderson TM, Lancos CJ, Prabharasuth DD, Cheng J, Moran K, et al. 2005. Heart transplantation in baboons using alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout pigs as donors: initial experience. *Nature medicine* [Internet] 11:29-31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15619628>

Kwiatkowski P, Artrip JH, Edwards NM, Lietz K, Tugulea S, Michler RE, McKenzie IF, Sandrin MS, Itescu S. 1999. High-level porcine endothelial cell expression of alpha(1,2)-fucosyltransferase reduces human monocyte adhesion and activation. *Transplantation* [Internet] 67:219-26; discussion 193-4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10075584>

Lai L, Kolber-Simonds D, Park K, Cheong H, Greenstein JL, Im G, Samuel M, Bonk A, Rieke A, Day BN, et al. 2002. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science* (New York, N.Y.) [Internet] 295:1089-92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11778012>

Lainez B, Fernandez-Real JM, Romero X, Esplugues E, Cañete JD, Ricart W, Engel P. 2004. Identification and characterization of a novel spliced variant that encodes human soluble tumor necrosis factor receptor 2. *International immunology* [Internet] 16:169-77. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14688072>

Larsen RD, Rivera-Marrero CA, Ernst LK, Cummings RD, Lowe JB. 1990. Frameshift and nonsense mutations in a human genomic sequence homologous to a murine UDP-Gal:beta-D-Gal(1,4)-D-GlcNAc alpha(1,3)-galactosyltransferase cDNA. *The Journal of biological chemistry* [Internet] 265:7055-61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2108966>

Lauerova L, Dusek L, Simickova M, Kocák I, Vagundová M, Zaloudík J, Kovarík J. 2002. Malignant melanoma associates with Th1/Th2 imbalance that coincides with disease progression and immunotherapy response. *Neoplasma* [Internet] 49:159-66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12098001>

Ledgerwood EC, Prins JB, Bright NA, Johnson DR, Wolfreys K, Pober JS, O'Rahilly S, Bradley JR. 1998. Tumor necrosis factor is delivered to mitochondria where a tumor necrosis factor-binding protein is localized. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* [Internet] 78:1583-9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9881958>

Lee LA, Gritsch HA, Sergio JJ, Arn JS, Glaser RM, Sablinski T, Sachs DH, Sykes M. 1994. Specific tolerance across a discordant xenogeneic transplantation barrier. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [Internet] 91:10864-7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7971974>

Lee RS, Yamada K, Womer KL, Pillsbury EP, Allison KS, Marolewski AE, Geng D, Thall AD, Arn JS, Sachs DH, et al. 2000. Blockade of CD28-B7, but not CD40-CD154, prevents costimulation of allogeneic porcine and xenogeneic human anti-porcine T cell responses. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* [Internet] 164:3434-44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10706740>

Lehnert AM, Mottram PL, Han W, Walters SN, Patel AT, Hawthorne WJ, Cowan PJ, d'Apice AJ, O'Connell PJ. 2001. Blockade of the CD28 and CD40 pathways result in the acceptance of pig and rat islet xenografts but not rat cardiac grafts in mice. *Transplant immunology* [Internet] 9:51-6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11680572>

Li X, Yang Y, Ashwell JD. 2002. TNF-RII and c-IAP1 mediate ubiquitination and degradation of TRAF2. *Nature* [Internet] 416:345-347. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/pubmed>

Lin H, Gastman BR, Wei RQ, Kunkel SL, Gordon D, Bolling SF. 1997. Phase-directed therapy and cardiac xenograft survival. *J Surg Res.* [Internet]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/pubmed>

Lin SS, Hanaway MJ, Gonzalez-Stawinski GV, Lau CL, Parker W, Davis RD, Byrne GW, Diamond LE, Logan JS, Platt JL, et al. 2000. The role of anti-Galalpha1-3Gal antibodies in acute vascular rejection and accommodation of xenografts. *Transplantation* [Internet] 70:1667-74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11152095>

Lin Y, Vandeputte M, Waer M. 1997. Contribution of activated macrophages to the process of delayed xenograft rejection. *Transplantation* [Internet] 64:1677-83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9422401>

Lin Y, Vandeputte M, Waer M. 1997. Natural killer cell- and macrophage-mediated rejection of concordant xenografts in the absence of T and B cell responses. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* [Internet] 158:5658-67. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9190914>

Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* [Internet] 104:487-501. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11239407>

Loetscher H, Stueber D, Banner D, Mackay F, Lesslauer W. 1993. Human tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) mutants with exclusive specificity for the 55-kDa or 75-kDa TNF receptors. *The Journal of biological chemistry* [Internet] 268:26350-7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8253759>

Lucas M, Daniel L, Tomasello E, Guia S, Horschowski N, Aoki N, Figarella-Branger D, Gomez S, Vivier E. 2002. Massive inflammatory syndrome and lymphocytic immunodeficiency in

KARAP/DAP12-transgenic mice. *European Journal of Immunology* [Internet] 32:2653-2663. Available from: [http://doi.wiley.com/10.1002/1521-4141\(200209\)32:93.0.CO;2-V](http://doi.wiley.com/10.1002/1521-4141(200209)32:93.0.CO;2-V)

Lucas R, Garcia I, Donati YR, Hribar M, Mandriota SJ, Giroud C, Buurman WA, Franssen L, Suter PM, Nunez G, et al. 1998. Both TNF receptors are required for direct TNF-mediated cytotoxicity in microvascular endothelial cells. *European journal of immunology* [Internet] 28:3577-86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9842900>

Lucas R, Juillard P, Decoster E, Redard M, Burger D, Donati Y, Giroud C, Monso-Hinard C, De Kesel T, Buurman WA, et al. 1997. Crucial role of tumor necrosis factor (TNF) receptor 2 and membrane-bound TNF in experimental cerebral malaria. *European journal of immunology* [Internet] 27:1719-25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9247583>

Lung HL, Leung KN, Stadlin A, Ma CM, Tsang D. 2001. Induction of tumor necrosis factor receptor type 2 gene expression by tumor necrosis factor-alpha in rat primary astrocytes. *Life sciences* [Internet] 68:2081-91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11324713>

Luo D, Luo Y, He Y, Zhang H, Zhang R, Li X, Dobrucki WL, Sinusas AJ, Sessa WC, Min W, et al. 2006. Differential functions of tumor necrosis factor receptor 1 and 2 signaling in ischemia-mediated arteriogenesis and angiogenesis. *The American journal of pathology* [Internet] 169:1886-98. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1780200&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

MacEwan DJ. 2002. TNF ligands and receptors--a matter of life and death. *British journal of pharmacology* [Internet] 135:855-75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11861313>

Mackay F, Kalled SL. 2002. TNF ligands and receptors in autoimmunity: an update. *Current opinion in immunology* [Internet] 14:783-90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12413530>

Mackay F, Woodcock SA, Lawton P, Ambrose C, Baetscher M, Schneider P, Tschopp J, Browning JL. 1999. Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations. *The Journal of experimental medicine* [Internet] 190:1697-710. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10587360>

Manna PP, Duffy B, Olack B, Lowell J, Mohanakumar T. 2001. Activation of human dendritic cells by porcine aortic endothelial cells: transactivation of naïve T cells through costimulation and cytokine generation. *Transplantation* [Internet] 72:1563-71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11707746>

Manna PP, Steward N, Lowell J, Mohanakumar T. 2002. Differentiation and functional maturation of human CD14(+) adherent peripheral blood monocytes by xenogeneic endothelial cells: up-regulation of costimulation, cytokine generation, and toll-like receptors. *Transplantation* [Internet] 74:243-52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12151738>

Mason AT, McVicar DW, Smith CA, Young HA, Ware CF, Ortaldo JR. 1995. Regulation of NK cells through the 80-kDa TNFR (CD120b). *Journal of leukocyte biology* [Internet] 58:249-55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7543923>

Matthews N. 1981. Production of an anti-tumour cytotoxin by human monocytes. *Immunology* [Internet] 44:135-42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7275181>

McMaster WR, Williams AF. 1979. Monoclonal antibodies to la antigens from rat thymus: cross reactions with mouse and human and use in purification of rat la glycoproteins. *Immunological reviews* [Internet] 47:117-37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/398324>

McWhirter JR, Kretz-Rommel A, Saven A, Maruyama T, Potter KN, Mockridge CI, Ravey EP, Qin F, Bowdish KS. 2006. Antibodies selected from combinatorial libraries block a tumor antigen that plays a key role in immunomodulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [Internet] 103:1041-6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16418292>

Mease PJ, Goffe BS, Metz J, VanderStoep A, Finck B, Burge DJ. 2000. Etanercept in the treatment of psoriatic arthritis and psoriasis: a randomised trial. *The Lancet* [Internet] 356:385-390. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10972371>

Mongkolsapaya J, Grimes JM, Chen N, Xu XN, Stuart DI, Jones EY, Screaton GR. 1999. Structure of the TRAIL-DR5 complex reveals mechanisms conferring specificity in apoptotic initiation. *Nature structural biology* [Internet] 6:1048-53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10542098>

Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual review of immunology* [Internet] 19:683-765. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11244051>

Moreaux J, Hose D, Reme T, Jourdan E, Hundemer M, Legouffe E, Moine P, Bourin P, Moos M, Corre J, et al. 2006. CD200 is a new prognostic factor in multiple myeloma. *Blood* [Internet] 108:4194-7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16946299>

Morita C, Horiuchi T, Tsukamoto H, Hatta N, Kikuchi Y, Arinobu Y, Otsuka T, Sawabe T, Harashima S, Nagasawa K, et al. 2001. Association of tumor necrosis factor receptor type II polymorphism 196R with Systemic lupus erythematosus in the Japanese: molecular and functional analysis. *Arthritis and rheumatism* [Internet] 44:2819-27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11762942>

Mornex J. 2003. [Graft immunity in lung transplantation]. *Revue des maladies respiratoires* [Internet] 20:257-66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12844023>

Murray AG, Khodadoust MM, Pober JS, Bothwell AL. 1994. Porcine aortic endothelial cells activate human T cells: direct presentation of MHC antigens and costimulation by ligands for human CD2 and CD28. *Immunity* [Internet] 1:57-63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7889399>

Nagy ZS, Ross J, Cheng H, Stepkowski SM, Kirken RA. 2004. Regulation of lymphoid cell apoptosis by Jaks and Stats. *Critical reviews in immunology* [Internet] 24:87-110. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15581392>

Nedwin GE, Naylor SL, Sakaguchi AY, Smith D, Jarrett-Nedwin J, Pennica D, Goeddel DV, Gray PW. 1985. Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization. *Nucleic acids research* [Internet] 13:6361-73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2995927>

Neuhof H. 1923. *The Transplantation of Tissues.*

Nikolic B, Gardner JP, Scadden DT, Arn JS, Sachs DH, Sykes M. 1999. Normal development in porcine thymus grafts and specific tolerance of human T cells to porcine donor MHC. *Journal of*

immunology (Baltimore, Md. : 1950) [Internet] 162:3402-7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10092795>

O'Connell PJ, Burlingham WJ. 1999. Donor dendritic cell persistence in organ allograft recipients in the absence of immunosuppression. *Journal of leukocyte biology* [Internet] 66:301-5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10449172>

O'Dell JR. 1999. Anticytokine therapy--a new era in the treatment of rheumatoid arthritis? *The New England journal of medicine* [Internet] 340:310-2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9920958>

O'Garra A, Arai N. 2000. The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation. *Trends in cell biology* [Internet] 10:542-50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11121747>

Ohyama M, Terunuma A, Tock CL, Radonovich MF, Pise-Masison CA, Hopping SB, Brady JN, Udey MC, Vogel JC. 2006. Characterization and isolation of stem cell-enriched human hair follicle bulge cells. *The Journal of clinical investigation* [Internet] 116:249-60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16395407>

Okumi M, Fishbein JM, Griesemer AD, Gianello PR, Hirakata A, Nobori S, Moran S, Samelson-Jones E, Shimizu A, Sachs DH, et al. 2008. Role of persistence of antigen and indirect recognition in the maintenance of tolerance to renal allografts. *Transplantation* [Internet] 85:270-80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18212633>

Oldenborg P. 2004. Role of CD47 in erythroid cells and in autoimmunity. *Leukemia & lymphoma* [Internet] 45:1319-27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15359629>

Oldmixon BA, Wood JC, Ericsson TA, Wilson CA, White-Scharf ME, Andersson G, Greenstein JL, Schuurman H, Patience C. 2002. Porcine endogenous retrovirus transmission characteristics of an inbred herd of miniature swine. *Journal of virology* [Internet] 76:3045-8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11861871>

Oliveira V, Agua-Doce A, Duarte J, Soares MP, Graca L. 2006. Regulatory T cell maintenance of dominant tolerance: induction of tissue self-defense? *Transplant immunology* [Internet] 17:7-10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17157205>

Or R, Kalinkovich A, Nagler A, Weisman Z, Naparstek E, Weiss L, Hahn T. 1996. Soluble tumor necrosis factor (sTNF) receptors: a possible prognostic marker for bone marrow transplantation-related complications. *Cytokines and molecular therapy* [Internet] 2:243-50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9384711>

Pan S, An P, Zhang R, He X, Yin G, Min W. 2002. Etk/Bmx as a tumor necrosis factor receptor type 2-specific kinase: role in endothelial cell migration and angiogenesis. *Molecular and cellular biology* [Internet] 22:7512-23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12370298>

Pauli U, Beutler R B, Peterhans E. 1989. Porcine tumor necrosis factor alpha: cloning with the polymerase chain reaction and determination of the nucleotide sequence. *Gene* [Internet] 81:185-191. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/0378-1119\(89\)90350-8](http://dx.doi.org/10.1016/0378-1119(89)90350-8)

Pennica D, Nedwin GE, Hayflick JS, Seeburg PH, Derynck R, Palladino MA, Kohr WJ, Aggarwal BB, Goeddel DV. Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology

to lymphotoxin. Nature [Internet] 312:724-9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6392892>

Peschon JJ, Slack JL, Reddy P, Stocking KL, Sunnarborg SW, Lee DC, Russell WE, Castner BJ, Johnson RS, Fitzner JN, et al. 1998. An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. Science (New York, N.Y.) [Internet] 282:1281-4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9812885>

Peschon JJ, Torrance DS, Stocking KL, Glaccum MB, Otten C, Willis CR, Charrier K, Morrissey PJ, Ware CB, Mohler KM, et al. 1998. TNF receptor-deficient mice reveal divergent roles for p55 and p75 in several models of inflammation. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) [Internet] 160:943-52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9551933>

Petermann KB, Rozenberg GI, Zedek D, Groben P, Mckinnon K, Buehler C, Kim WY, Shields JM, Penland S, Bear JE, et al. 2007. CD200 is induced by ERK and is a potential therapeutic target in melanoma. North 117.

Phelps CJ, Koike C, Vaught TD, Boone J, Wells KD, Chen S, Ball S, Specht SM, Polejaeva IA, Monahan JA, et al. 2003. Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs. Science (New York, N.Y.) [Internet] 299:411-4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12493821>

Pimentel-Muñoz FX, Seed B. 1999. Regulated commitment of TNF receptor signaling: a molecular switch for death or activation. Immunity [Internet] 11:783-93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10626900>

Porter CM, Bloom ET. 2005. Human CD4+CD25+ regulatory T cells suppress anti-porcine xenogeneic responses. American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons [Internet] 5:2052-7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15996259>

Preston S, Wright GJ, Starr K, Barclay AN, Brown MH. 1997. The leukocyte/neuron cell surface antigen OX2 binds to a ligand on macrophages. European journal of immunology [Internet] 27:1911-8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9295026>

Princeteau G. 1905. Greffe rénale. J Méd Bordeaux 26:549.

Ramsoondar J, Vaught T, Ball S, Mendicino M, Monahan J, Jobst P, Vance A, Duncan J, Wells K, Ayares D, et al. 2009. Production of transgenic pigs that express porcine endogenous retrovirus small interfering RNAs. Xenotransplantation [Internet] 16:164-80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19566656>

Rauert H, Wicovsky A, Müller N, Siegmund D, Spindler V, Waschke J, Kneitz C, Wajant H. 2010. Membrane tumor necrosis factor (TNF) induces p100 processing via TNF receptor-2 (TNFR2). The Journal of biological chemistry [Internet] 285:7394-404. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20038584>

Ravetch JV, Lanier LL. 2000. Immune inhibitory receptors. Science (New York, N.Y.) [Internet] 290:84-9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11021804>

Reemsta K, McCracken BH, Schlegel JU, Pearl MA, Pearce CW, Dewitt CW, Smith PE, Hewitt RL, Flinner RL, Creeck O, et al. 1964. RENAL HETEROTRANSPLANTATION IN MAN. Annals of surgery [Internet] 160:384-410. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14206847>

Rijkers ES, de Ruiter T, Baridi A, Veninga H, Hoek RM, Meyaard L. 2008. The inhibitory CD200R is differentially expressed on human and mouse T and B lymphocytes. *Molecular immunology* [Internet] 45:1126-35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17714785>

Rimaniol AC, Boussin FD, Dormont D, Bach JF, Zavala F. 1997. Mechanisms of downmodulation and release of tumour necrosis factor receptor induced by human immunodeficiency virus type 1 in human monocytes. *Cytokine* [Internet] 9:9-18. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9067091>

Robson SC, Cooper DK, d'Apice AJ. 2000. Disordered regulation of coagulation and platelet activation in xenotransplantation. *Xenotransplantation* [Internet] 7:166-76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11021661>

Rollins SA, Kennedy SP, Chodera AJ, Elliott EA, Zavoico GB, Matis LA. 1994. Evidence that activation of human T cells by porcine endothelium involves direct recognition of porcine SLA and costimulation by porcine ligands for LFA-1 and CD2. *Transplantation* [Internet] 57:1709-16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7912457>

Rollins SA, Matis LA, Springhorn JP, Setter E, Wolff DW. 1995. Monoclonal antibodies directed against human C5 and C8 block complement-mediated damage of xenogeneic cells and organs. *Transplantation* [Internet] 60:1284-92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8525523>

Rosenblum MD, Olasz E, Woodliff JE, Johnson BD, Konkol MC, Gerber KA, Orentas RJ, Sandford G, Truitt RL. 2004. CD200 is a novel p53-target gene involved in apoptosis-associated immune tolerance. *Blood* [Internet] 103:2691-8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14644999>

Rothe M, Pan MG, Henzel WJ, Ayres TM, Goeddel DV. 1995. The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell* [Internet] 83:1243-52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8548810>

Rothe M, Sarma V, Dixit VM, Goeddel DV. 1995. TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF receptor 2 and CD40. *Science (New York, N.Y.)* [Internet] 269:1424-7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7544915>

Russo C, Polosa R. 2005. TNF-alpha as a promising therapeutic target in chronic asthma: a lesson from rheumatoid arthritis. *Clinical science (London, England : 1979)* [Internet] 109:135-42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16033328>

Rygiel TP, Rijkers ES, de Ruiter T, Stolte EH, van der Valk M, Rimmelzwaan GF, Boon L, van Loon AM, Coenjaerts FE, Hoek RM, et al. 2009. Lack of CD200 enhances pathological T cell responses during influenza infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* [Internet] 183:1990-6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19587022>

Sandrin MS, Fodor WL, Mouhtouris E, Osman N, Cohnhey S, Rollins SA, Guilmette ER, Setter E, Squinto SP, McKenzie IF, et al. 1995. Enzymatic remodelling of the carbohydrate surface of a xenogenic cell substantially reduces human antibody binding and complement-mediated cytotoxicity. *Nature medicine* [Internet] 1:1261-7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7489406>

Sandrin MS, Vaughan HA, Dabkowski PL, McKenzie IF. 1993. Anti-pig IgM antibodies in human serum react predominantly with Gal(alpha 1-3)Gal epitopes. *Proceedings of the National*

Academy of Sciences of the United States of America [Internet] 90:11391-5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7504304>

Santee SM, Owen-Schaub LB. 1996. Human tumor necrosis factor receptor p75/80 (CD120b) gene structure and promoter characterization. *The Journal of biological chemistry* [Internet] 271:21151-9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8702885>

Scherübl C, Schneider-Brachert W, Schütze S, Hehlgans T, Männel DN. 2005. Colocalization of endogenous TNF with a functional intracellular splice form of human TNF receptor type 2. *Journal of inflammation (London, England)* [Internet] 2:7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15996269>

Schneider-Brachert W, Tchikov V, Neumeyer J, Jakob M, Winoto-Morbach S, Held-Feindt J, Heinrich M, Merkel O, Ehrenschwender M, Adam D, et al. 2004. Compartmentalization of TNF receptor 1 signaling: internalized TNF receptors as death signaling vesicles. *Immunity* [Internet] 21:415-28. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15357952>

Schröder J, Stüber F, Gallati H, Schade FU, Kremer B. Pattern of soluble TNF receptors I and II in sepsis. *Infection* [Internet] 23:143-8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7499002>

Schütze S, Tchikov V, Schneider-Brachert W. 2008. Regulation of TNFR1 and CD95 signalling by receptor compartmentalization. *Nature reviews. Molecular cell biology* [Internet] 9:655-62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18545270>

Seitz C, Muller P, Krieg RC, Mannel DN, Hehlgans T. 2001. A novel p75TNF receptor isoform mediating NFkappa B activation. *The Journal of biological chemistry* [Internet] 276:19390-5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11279196>

Sharma A, Okabe J, Birch P, McClellan SB, Martin MJ, Platt JL, Logan JS. 1996. Reduction in the level of Gal(alpha1,3)Gal in transgenic mice and pigs by the expression of an alpha(1,2)fucosyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [Internet] 93:7190-5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8692967>

Shibata H, Yoshioka Y, Ohkawa A, Minowa K, Mukai Y, Abe Y, Taniai M, Nomura T, Kayamuro H, Nabeshi H, et al. 2008. Creation and X-ray structure analysis of the tumor necrosis factor receptor-1-selective mutant of a tumor necrosis factor-alpha antagonist. *The Journal of biological chemistry* [Internet] 283:998-1007. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18003610>

Shiratori I, Yamaguchi M, Suzukawa M, Yamamoto K, Lanier LL, Saito T, Arase H. 2005. Down-regulation of basophil function by human CD200 and human herpesvirus-8 CD200. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* [Internet] 175:4441-9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16177086>

Shrivastava S, McVey JH, Dorling A. 2007. The interface between coagulation and immunity. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* [Internet] 7:499-506. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17229071>

Siegel JB, Grey ST, Lesnikoski BA, Kopp CW, Soares M, Schulte am Esch J, Bach FH, Robson SC. 1997. Xenogeneic endothelial cells activate human prothrombin. *Transplantation* [Internet] 64:888-96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9326416>

- Siegel RM, Chan FK, Chun HJ, Lenardo MJ. 2000. The multifaceted role of Fas signaling in immune cell homeostasis and autoimmunity. *Nature immunology* [Internet] 1:469-74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11101867>
- Silke J, Brink R. 2010. Regulation of TNFRSF and innate immune signalling complexes by TRAFs and cIAPs. *Cell death and differentiation* [Internet] 17:35-45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19680262>
- Smith CA, Farrah T, Goodwin RG. 1994. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* [Internet] 76:959-62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8137429>
- Solinas S, Pauli U, Kuhnert P, Peterhans E, Fries R. 1992. Assignment of the porcine tumour necrosis factor alpha and beta genes to the chromosome region 7p11-q11 by in situ hybridization. *Animal genetics* [Internet] 23:267-71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1503261>
- Sommaggio R, Máñez R, Costa C. 2009. TNF, pig CD86 and VCAM-1 identified as potential targets for intervention in xenotransplantation of pig chondrocytes. *Cell transplantation* [Internet]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19796501>
- Speiser DE, Bachmann MF, Frick TW, McKall-Faienza K, Griffiths E, Pfeffer K, Mak TW, Ohashi PS. 1997. TNF receptor p55 controls early acute graft-versus-host disease. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) [Internet] 158:5185-90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9164935>
- Sprangers B, Waer M, Billiau AD. 2008. Xenotransplantation: where are we in 2008? *Kidney international* [Internet] 74:14-21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18418354>
- Spriggs DR, Deutsch S, Kufe DW. 1992. Genomic structure, induction, and production of TNF-alpha. *Immunology series* [Internet] 56:3-34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1550865>
- Steurer W, Nickerson PW, Steele AW, Steiger J, Zheng XX, Strom TB. 1995. Ex vivo coating of islet cell allografts with murine CTLA4/Fc promotes graft tolerance. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) [Internet] 155:1165-74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7543517>
- Suenaert P, Bulteel V, Lemmens L, Noman M, Geypens B, Van Assche G, Geboes K, Ceuppens JL, Rutgeerts P. 2002. Anti-tumor necrosis factor treatment restores the gut barrier in Crohn's disease. *The American journal of gastroenterology* [Internet] 97:2000-4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12190167>
- Summerfield A, McCullough KC. 2009. The porcine dendritic cell family. *Developmental and comparative immunology* [Internet] 33:299-309. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18582937>
- Sun H, Chen G, Liu W, Kubelik D, Yang H, White DJ, Zhong R, Garcia B. 2005. The influence of baseline expression of human decay accelerating factor transgene on graft survival and acute humoral xenograft rejection. *Transplantation* [Internet] 80:1331-9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16314803>

Suter B, Pauli U. 1995. Cloning of the cDNA encoding the porcine p55 tumor necrosis factor receptor. *Gene* [Internet] 163:263-6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7590278>

Suzuki J, Cole SE, Batirel S, Kosuge H, Shimizu K, Isobe M, Libby P, Mitchell RN. 2003. Tumor necrosis factor receptor -1 and -2 double deficiency reduces graft arterial disease in murine cardiac allografts. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* [Internet] 3:968-76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12859531>

Takayama K, Yokozeki H, Ghoreishi M, Satoh T, Katayama I, Umeda T, Nishioka K. 1999. IL-4 inhibits the migration of human Langerhans cells through the downregulation of TNF receptor II expression. *The Journal of investigative dermatology* [Internet] 113:541-6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10504438>

Takeuchi T, Ueki T, Sasaki Y, Kajiwara T, Li B, Moriyama N, Kawabe K. 1997. Th2-like response and antitumor effect of anti-interleukin-4 mAb in mice bearing renal cell carcinoma. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* [Internet] 43:375-81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9067410>

Tartaglia LA, Goeddel DV, Reynolds C, Figari IS, Weber RF, Fendly BM, Palladino MA. 1993. Stimulation of human T-cell proliferation by specific activation of the 75-kDa tumor necrosis factor receptor. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* [Internet] 151:4637-41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8409424>

Taylor N, McConachie K, McConnachie K, Calder C, Dawson R, Dick A, Sedgwick JD, Liversidge J. 2005. Enhanced tolerance to autoimmune uveitis in CD200-deficient mice correlates with a pronounced Th2 switch in response to antigen challenge. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* [Internet] 174:143-54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15611236>

Tendler CL, Burton JD, Jaffe J, Danielpour D, Charley M, McCoy JP, Pittelkow MR, Waldmann TA. 1994. Abnormal cytokine expression in Sézary and adult T-cell leukemia cells correlates with the functional diversity between these T-cell malignancies. *Cancer research* [Internet] 54:4430-5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7913876>

Theiss AL, Simmons JG, Jobin C, Lund PK. 2005. Tumor necrosis factor (TNF) alpha increases collagen accumulation and proliferation in intestinal myofibroblasts via TNF receptor 2. *The Journal of biological chemistry* [Internet] 280:36099-109. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16141211>

Thiele DL, Eigenbrodt ML, Bryde SE, Eigenbrodt EH, Lipsky PE. 1989. Intestinal graft-versus-host disease is initiated by donor T cells distinct from classic cytotoxic T lymphocytes. *The Journal of clinical investigation* [Internet] 84:1947-56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2531761>

Thoma B, Grell M, Pfizenmaier K, Scheurich P. 1990. Identification of a 60-kD tumor necrosis factor (TNF) receptor as the major signal transducing component in TNF responses. *The Journal of experimental medicine* [Internet] 172:1019-23. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2188608&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Tonks a, Hills R, White P, Rosie B, Mills KI, Burnett aK, Darley RL. 2007. CD200 as a prognostic factor in acute myeloid leukaemia. *Leukemia : official journal of the Leukemia*

Society of America, Leukemia Research Fund, U.K [Internet] 21:566-8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17252007>

Torre-Amione G, Wallace CK, Young JB, Koerner MM, Thohan V, McRee S, Bogaev RC. 2007. The effect of etanercept on cardiac transplant recipients: a study of TNF α antagonism and cardiac allograft hypertrophy. *Transplantation* [Internet] 84:480-3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17713431>

Tracey KJ, Cerami A. 1994. Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Annual review of medicine* [Internet] 45:491-503. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8198398>

Tseng Y, Kuwaki K, Dor FJ, Shimizu A, Houser S, Hisashi Y, Yamada K, Robson SC, Awwad M, Schuurman H, et al. 2005. α 1,3-Galactosyltransferase gene-knockout pig heart transplantation in baboons with survival approaching 6 months. *Transplantation* [Internet] 80:1493-500. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16340796>

Unger E. 1910. Nierentransplantationen. *Klin Wochenschr* 47:573.

Van Zee KJ, Kohno T, Fischer E, Rock CS, Moldawer LL, Lowry SF. 1992. Tumor necrosis factor soluble receptors circulate during experimental and clinical inflammation and can protect against excessive tumor necrosis factor α in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [Internet] 89:4845-9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1317575>

Vandenabeele P, Declercq W, Vercammen D, Van de Craen M, Grooten J, Loetscher H, Brockhaus M, Lesslauer W, Fiers W. 1992. Functional characterization of the human tumor necrosis factor receptor p75 in a transfected rat/mouse T cell hybridoma. *The Journal of experimental medicine* [Internet] 176:1015-24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1328463>

Vassalli P. 1992. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annual review of immunology* [Internet] 10:411-52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1590993>

Vieites JM, de la Torre R, Ortega MA, Montero T, Peco JM, Sánchez-Pozo A, Gil A, Suárez A. 2003. Characterization of human cd200 glycoprotein receptor gene located on chromosome 3q12-13. *Gene* [Internet] 311:99-104. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12853143>

Viertlboeck BC, Hanczaruk MA, Schmitt FC, Schmitt R, Göbel TW. 2008. Characterization of the chicken CD200 receptor family. *Molecular immunology* [Internet] 45:2097-105. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18062907>

Waage A, Liabakk N, Lien E, Lamvik J, Espevik T. 1992. p55 and p75 tumor necrosis factor receptors in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood* [Internet] 80:2577-83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1384790>

Wallach D, Engelmann H, Nophar Y, Aderka D, Kemper O, Hornik V, Holtmann H, Brakebusch C. 1991. Soluble and cell surface receptors for tumor necrosis factor. *Agents and actions. Supplements* [Internet] 35:51-7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1664189>

Wallach D, Varfolomeev EE, Malinin NL, Goltsev YV, Kovalenko AV, Boldin MP. 1999. Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annual review of immunology* [Internet] 17:331-67. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10358762>

Wallgren AC, Karlsson-Parra A, Korsgren O. 1995. The main infiltrating cell in xenograft rejection is a CD4+ macrophage and not a T lymphocyte. *Transplantation* [Internet] 60:594-601. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7570957>

Wan YY, Flavell RA. 2006. The roles for cytokines in the generation and maintenance of regulatory T cells. *Immunological reviews* [Internet] 212:114-30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16903910>

Wang H, VerHalen J, Madariaga ML, Xiang S, Wang S, Lan P, Oldenborg P, Sykes M, Yang Y. 2007. Attenuation of phagocytosis of xenogeneic cells by manipulating CD47. *Blood* [Internet] 109:836-42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17008545>

Wang J, Al-Lamki RS, Zhang H, Kirkiles-Smith N, Gaeta ML, Thiru S, Pober JS, Bradley JR. 2003. Histamine antagonizes tumor necrosis factor (TNF) signaling by stimulating TNF receptor shedding from the cell surface and Golgi storage pool. *The Journal of biological chemistry* [Internet] 278:21751-60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12646554>

Wang X, Ye M, Zhang Y, Chen S. 2007. CD200-CD200R regulation of microglia activation in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology* [Internet] 2:259-64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18040859>

Ware CF, Crowe PD, Vanarsdale TL, Andrews JL, Grayson MH, Jerzy R, Smith CA, Goodwin RG. 1991. Tumor necrosis factor (TNF) receptor expression in T lymphocytes. Differential regulation of the type I TNF receptor during activation of resting and effector T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* [Internet] 147:4229-38. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1661312>

Webb M, Barclay AN. 1984. Localisation of the MRC OX-2 glycoprotein on the surfaces of neurones. *Journal of neurochemistry* [Internet] 43:1061-7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6147390>

Weiss T, Grell M, Siemienski K, Mühlenbeck F, Dürkop H, Pfizenmaier K, Scheurich P, Wajant H. 1998. TNFR80-dependent enhancement of TNFR60-induced cell death is mediated by TNFR-associated factor 2 and is specific for TNFR60. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* [Internet] 161:3136-42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9743381>

Wilson NS, Dixit V, Ashkenazi A. 2009. Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks. *Nature immunology* [Internet] 10:348-55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19295631>

Wright GJ, Cherwinski H, Foster-Cuevas M, Brooke G, Puklavec MJ, Bigler M, Song Y, Jenmalm M, Gorman D, McClanahan T, et al. 2003. Characterization of the CD200 receptor family in mice and humans and their interactions with CD200. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* [Internet] 171:3034-46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12960329>

Wright GJ, Jones M, Puklavec MJ, Brown MH, Barclay AN. 2001. The unusual distribution of the neuronal/lymphoid cell surface CD200 (OX2) glycoprotein is conserved in humans. *Immunology* [Internet] 102:173-9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11260322>

Wright GJ, Puklavec MJ, Willis AC, Hoek RM, Sedgwick JD, Brown MH, Barclay AN. 2000. Lymphoid/neuronal cell surface OX2 glycoprotein recognizes a novel receptor on macrophages

implicated in the control of their function. *Immunity* [Internet] 13:233-42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10981966>

Xia G, Ji P, Rutgeerts O, Waer M. 2000. Natural killer cell- and macrophage mediated discordant guinea pig-->rat xenograft rejection in the absence of complement, xenoantibody and T cell immunity. *Transplantation* [Internet] 70:86-93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10919580>

Yamada K, Yazawa K, Shimizu A, Iwanaga T, Hisashi Y, Nuhn M, O'Malley P, Nobori S, Vagefi PA, Patience C, et al. 2005. Marked prolongation of porcine renal xenograft survival in baboons through the use of alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout donors and the cotransplantation of vascularized thymic tissue. *Nature medicine* [Internet] 11:32-4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15619627>

Yi S, Hawthorne WJ, Lehnert AM, Ha H, Wong JK, van Rooijen N, Davey K, Patel AT, Walters SN, Chandra A, et al. 2003. T cell-activated macrophages are capable of both recognition and rejection of pancreatic islet xenografts. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* [Internet] 170:2750-8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12594306>

Zhang L, Sivashanmugam P, Wu J, Brian L, Exum ST, Freedman NJ, Peppel K. 2008. Tumor necrosis factor receptor-2 signaling attenuates vein graft neointima formation by promoting endothelial recovery. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* [Internet] 28:284-9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18006858>

Zhang S, Cherwinski H, Sedgwick JD, Phillips JH. 2004. Molecular mechanisms of CD200 inhibition of mast cell activation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* [Internet] 173:6786-93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15557172>

Zhang S, Phillips JH. 2006. Identification of tyrosine residues crucial for CD200R-mediated inhibition of mast cell activation. *Journal of leukocyte biology* [Internet] 79:363-8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16330532>

Zhao Y, Swenson K, Sergio JJ, Arn JS, Sachs DH, Sykes M. 1996. Skin graft tolerance across a discordant xenogeneic barrier. *Nature medicine* [Internet] 2:1211-6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8898747>